

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

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ HASTALARINDA
HEMOKROMATOZİS GEN MUTASYON SIKLIĞININ
SİNÜZOİDAL OBSRTÜKSİYON SENDROMU VE İLK 100
GÜN SAĞKALIM İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. DEMET GÖKALP YAŞAR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. GÜLSAN TÜRKÖZ SUCAK

ANKARA – 2008

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim boyunca yakın destek ve ilgilerini gördüğüm, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Şükrü Sindel başta olmak üzere tüm saygıdeğer hocalarıma;

Tez çalışmalarımda kıymetli rehberlik ve katkılarından dolayı tez hocam Prof. Dr. Gülsan Türköz Sucak'a; bana birçok konuda yol gösteren Uzm. Dr. Zübeyde Nur Özkurt'a; genetik çalışmalardaki desteği için Doç. Dr. Mehmet Ali Ergun ve Uzm. Biolog Sezen Güntekin'e ve değerli asistan arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemde her türlü desteği ve sevgisini veren çok değerli aileme ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Temel Kaya Yaşar'a en içten dileklerimle teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

1.	SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iii
2.	ŞEKİLLER VE TABLOLAR.....	iv
3.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	2
4.	GENEL BİLGİLER	6
4.1.	HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ	6
4.1.1.	Tanımı	6
4.1.2.	Çeşitleri.....	8
4.1.3.	Hazırlama Rejimleri.....	8
4.1.4.	Komplikasyonları.....	9
4.2.	SİNÜZOİDAL OBSTRÜKSİYON SENDROMU.....	10
4.2.1.	Tanım	10
4.2.2.	Patogenez.....	10
4.2.3.	Tanı , Klinik Bulgular ve Prognoz.....	17
4.2.4.	Risk Faktörleri	19
4.2.5.	Tedavi ve Profilaksi	23
4.3.	HEMOKROMATOZİS GENİ	25
4.3.1.	Hemokromatozis tanımı	25
4.3.2.	Hemokromatoz Geni, Kalıtım Modeli ve Mutasyonları	26
4.3.3.	Hemokromatozis gen mutasyonlarının belirlenmesi.....	30
4.3.4.	Demir, Demir toksisitesi ve HFE proteini.....	31
4.3.5.	Hemokromatozis Prevelansı	37
4.4.	DEMİR, HFE VE MALİGNİTELER	38
4.5.	HKHN, DEMİR BİRİKİMİ VE HFE İLİŞKİSİ.....	42
4.6.	SOS, DEMİR VE HFE İLİŞKİSİ	45
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	48
5.1.	HASTALAR	48
5.2.	HFE GEN ANALİZİ	48
5.2.1.	Örnek Toplanması	48
5.2.2.	DNA İzolasyonu.....	48
5.2.3.	PCR ve Restriksiyon enzimleri ile kesim	49
5.3.	BİYOKİMYASAL ANALİZLER	51
5.4.	İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	51
6.	BULGULAR	52
7.	TABLOLAR.....	63
8.	TARTIŞMA VE SONUÇ	68
8.1.	HEMOKROMATOZİS GEN MUTASYON SIKLIĞI	68
8.2.	HFE GEN MUTASYONLARININ DEMİR PARAMETRELERİNE ETKİSİ	73
8.3.	HFE GEN MUTASYONLARININ SOS VE İLK 100 GÜNLÜK SAĞKALIMA ETKİSİ	76
8.4.	SOS RİSK FAKTÖRLERİ, HKHN ÖNCESİ DEMİR PARAMETRELERİNİN SOS SIKLIĞI VE 100 GÜNLÜK SAĞKALIMA ETKİSİ	79
8.5.	SONUÇ	83
9.	ÖZET	86
10.	ABSTRACT.....	88
11.	KAYNAKLAR	90

1. SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Aplastik Anemi
AST	Aspartat aminotransferaz
ALT	Alanin aminotransferaz
ALP	Alkalen fosfataz
AML	Akut Myeloid Lösemi
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
Ark.	Arkadaşları
Bu-Cyc	Busulfan ve Siklofosamid
CMV	Sitomegalovirus
C282Y	HFE proteininin 282. pozisyonundaki tirozin amino asidi yerine sisteinin geçmesi ile oluşan mutasyon
CPS1	Karbamoil fosfat sentetaz 1
EBMT	Avrupa Kemik İliği Nakli Birliği
Fe⁺²	Ferröz Demir
Fe⁺³	Ferrik Demir
Fe	Serum Demiri
FEBK	Serum Demir bağlama kapasitesi
GST	Glutasyon-S transferaz
GVHH	Graft Versus Host Hastalığı
GGT	Gama glutamil transferaz
HFE	Hemakromatozis Geni sembolü
HH	Hereditör Hemokromatozis
H63D	HFE proteininin 63. pozisyonundaki aspartat amino asidi yerine histidine amino asidi geçmesi ile oluşan mutasyon
HKHN	Hematopoetik Kök Hücre Nakli
HLA	Human Leukocyte Antijen (İnsan Lökosit Antijeni)
HD	Hodgkin Hastalığı
HDL	Hodgkin dışı Lenfoma
HCV	Hepatit C virusu
HbsAg	Hepatit B yüzey antijeni
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HNE	4-hidroksinonenal
İV	İntravenöz (damar yolu ile)
LPS	Lipopolisakkarit
MM	Multiple Myelom
MDS	Myelodisplastik sendrom
MDA	Malondialdehit
NTBI	Transferrine bağlı olmayan demir (Non transferrin bound iron)
NO	Nitrik oksit
•OH	Hidroksil Radikali
•O₂⁻	Süperoksit
OH⁻	Hidroksil Anyonu
PGE1	Prostaglandin E1
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1

PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
r-tPA	rekombinant Doku Plazminojen Aktivatörü
SOS/VOD	Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu/Veno-oklüziv hastalık
SEH	Sinüzoidal Endotel Hücresi
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TBI	Tüm Beden Işınlaması
TS	Transferrin Saturasyonu
UIBC	Bağlanmamış Demir Bağlanma Kapasitesi

2. ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Şekil 1.	Kök hücreler ve farklılaşmaları
Şekil 2.	Karaciğer anatomisi
Şekil3.	Sinüzoidal anatomi
Şekil 4.	Sinüzoidal hasar
Şekil 5.	Sinüzoidal hasara neden olan faktörler
Şekil 6.	6. kromozom üzerinde HFE geninin yeri
Şekil 7.	HFE proteininin yapısı
Şekil 8.	C282Y mutasyonunun oluşumu
Şekil 9.	H63D mutasyonunun oluşumu
Şekil 10.	Demir ile reaktif oksijen türevlerinin oluşumu
Şekil 11.	Antioksidan yollar
Şekil 13.	Hematopoetik kök hücre nakli sonrası demir yüklenmesi ve komplikasyonları
Şekil 14.	Bir grup hastanın PZR programından çıkan jel görüntüsü
Şekil 15.	Bir grup hastanın H63D mutasyonu için %3'lük agaroz jel görüntüleri
Şekil 16.	Bir grup hastanın C282Y mutasyonu için %3'lük agaroz jel görüntüleri
Şekil 17.	Otolog HKHN yapılan hastalarda 100 günlük sağkalım eğrisi
Şekil 18.	Allojenik HKHN yapılan hastalarda 100 günlük sağkalım eğrisi
Şekil 19.	Allojenik HKHN yapılan hastalarda 100 günlük transplant ilişkili mortalite
Şekil 20.	Allojenik HKHN yapılan hastalarda H63D allel varlığının ilk 100 gün toplam sağkalımla ilişkisi
Şekil 21.	Allojenik HKHN yapılan hastalarda H63D allel varlığının ilk 100 gün toplam sağkalımla ilişkisi
Tablo 1.	Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu için prognoz ölçütleri
Tablo 2.	Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu tanı kriterleri
Tablo 3.	Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu gelişimi için risk faktörleri
Tablo 4.	Hastaların temel tanımlayıcı istatistik değerleri, tanılarına göre hastaların dağılımları, performans durumları ve aldıkları hazırlık rejimleri

Tablo 5.	Hastaların hemokromatozis gen mutasyonlarına göre sıklık dağılımı
Tablo 6.	H63D mutasyonu olan ve olmayan hastaların tanılarına göre dağılımı
Tablo 7.	HKHN öncesi demir yüklerinin ve karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesi
Tablo 8.	HKHN yapılan hastalarda H63D mutasyonu olan ve olmayanların demir yükü ve karaciğer enzimlerinin karşılaştırılması
Tablo 9.	HKHN yapılan allojenik ve otolog olgular arasında H63D mutasyonu ile demir parametrelerinin ve karaciğer enzimlerinin karşılaştırılması
Tablo 10.	HKHN yapılan hastalarda SOS risk faktörleri açısından dağılım
Tablo 11.	Hastaların sinüzoidal obstrüksiyon sendromu oluşumu ve şiddeti açısından değerlendirilmesi
Tablo 12.	Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu olan hastaların tanılarına göre dağılımı
Tablo 13.	Allojenik HKHN yapılan ve SOS gelişen hastalarda H63D mutasyonu ile ilişki
Tablo 14.	SOS şiddeti ile H63D mutasyonu arasındaki ilişki
Tablo 15.	SOS gelişen olgularda HKHN öncesi demir yükünün ve karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesi
Tablo 16.	Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu gelişen olgularda HKHN öncesi SOS oluşuma katkıda bulunan değerlerin logistik regresyon analiz tablosu
Tablo 17.	Türkiye’de yapılan HFE gen mutasyon çalışmaları

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) Kemik iliği ve/veya immun sistemi doğuştan veya tümör, kemoterapi ve radyoterapi gibi kazanılmış nedenlerle hasar görmüş kişilerde hematopoetik sistemin yeniden yapılanmasını sağlamak amacıyla pluripotent kök hücrelerin (CD34 + hücreler) alıcıya transfer edilmesinden ibaret bir tedavi şeklidir (1,2). HKHN sonrası karaciğer toksisitesi önemli bir erken morbidite ve mortalite etkeni olup, %50-80 hastada ortaya çıkar ve olguların %5-10 ölümle sonuçlanır. İlaç toksisitesi, sinüzoidal obstrüksiyon sendromu (SOS), akut graft versus host hastalığı (GVHH), fungal, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar en sık karşılaşılan karaciğer ilişkili komplikasyonlardır (3,4,5,6). SOS; HKHN uygulanan hastalarda ilk 20 gün içerisinde hepatomegali, kilo artışı (>%2), sıvı birikimi, hiperbilirubinemi (>2mg/dl) ve asit ile karakterizedir. Sıklığı %10-70 arasında değişmekte olup mortalitesi %90'a kadar ulaşabilmektedir (1,7,8,9). SOS ilk olarak karaciğerin zon 3 bölgesindeki sinüzoidal endotel hücrelerinden (SEH) başlar. Sinüzoidlerde daralma, buna bağlı olarak kan akımında azalma, hepatik konjesyon, fibrin depolanması ve trombosit agregasyonu oluşur (9,10,11,12). Trombüs nedeni ile venüllerde tıkanma, intrahepatik postsinüzoidal portal basınçta artış olurken, fibrozis ve hepatosit nekrozu da gelişebilir (9). Kemoterapötik ajanlar karaciğerin zon 3 olarak isimlendirilen bölgesinde glutatyon ile konjuge edilerek metabolize olur. Bu nedenle antioksidan etkisi ile koruyucu olan glutatyon içeriği zon 3'de diğer bölgelere göre daha azdır (7,10,12).

Demir, tüm hücrelerin fonksiyonları için önemlidir. Oksidasyon durumuna göre (ferröz demir; Fe^{+2} ve Ferrik demir; Fe^{+3}) elektron alıp verir. Başta

hemoglobin ve myoglobin olmak üzere oksijen bağlayan moleküllerin ve mitokondrial sitokrom enzimlerinin fonksiyonlarına katılır (13,14,15,16). Serbest iyonik formu çok reaktif olduğu için dolaşımda transferrin aracılığı ile taşınır ve ihtiyaç fazlası demir, ferritin ve/veya hemosiderine bağlı olarak depolanır (15,14,17). Demir yükünün arttığı durumlarda (transfüzyon, ihtiyaç dışı oral demir preparatı alımı, hemokromatozis, vb) ortamda fazla bulunan serbest demir, katalitik özelliği nedeni ile serbest radikallerle reaksiyona girer. Hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit dismutaz gibi reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşur. Sonuç olarak ROS ise hücre membranında, proteinlerde ve DNA'da hasar meydana getirir (16,14,18,19,17,15,13).

Demir emiliminden Hemokromatozis (HFE) geni sorumludur. Şu ana kadar 2 mutasyon (H63D ve C282Y) tanımlanmıştır. HFE proteininin 282. pozisyonundaki tirozin amino asidi yerine sistein amino asidinin geçmesi ile C282Y mutasyonu, 63. pozisyonundaki aspartat amino asidi yerine histidin amino asidi geçmesiyle H63D mutasyonu oluşmaktadır (20,21,22,23,18). Bu mutasyonlar demir emiliminin kontrolünün bozulmasına, serumda serbest demir açığa çıkmasına ve başta karaciğer olmak üzere parankimal organlarda demir birikimine yol açar (20,14,22,18). Vücuttaki serbest demirin artışı ROS oluşumuna ve karaciğerde inflamasyon ve fibroze neden olur. Bu hasta popülasyonunda başta hepatosellüler karsinom başta olmak üzere bazı neoplastik hastalıklar normal popülasyona oranla daha sık görülür (24,25,26).

Hematolojik maliniteli hastalarda artmış demir yükü sık görülen bir bulgudur. Transfüzyon, inefektif eritropoez, hemoliz, kemoterapiden sonra

parçalanen hücrelerden açığa çıkan demir, mukozit nedeni ile hasar gören gastrointestinal mukoza hücrelerinden demir emiliminin artması, anemi nedeni ile demir emiliminin artması bu hasta grubundaki artmış demir yükünün en önemli nedenleridir (27,17,28,29,30). HKHN yapılan olgularda başlangıç demir yükünün akut ve kronik süreçte sağkalım ve morbidite ile yakın ilişkisi olduğu öne sürülmektedir (17,31,28,29,32,33). SEH’de daha öncede belirtildiği gibi glutatyon düzeyi düşüktür. Bu hasta grubunda artmış serbest demir ROS oluşturup glutatyonu daha da azaltır. Kemoterapinin glutatyonun düzeyi üzerine olan olumsuz etkisi de eklendiğinde SOS gelişimi için uygun ortam gerçekleşmiş olur. Literatürde yüksek serum ferritin değerlerinin, SOS oluşumu açısından risk faktörü olduğuna dair çalışmalar vardır (34,35,29). Özellikle, Talasemi Major nedeni ile HKHN yapılan hastalardaki çalışmalar dikkati çekmektedir. Jastaniah ve ark.’ı Talasemi Major nedeni ile HKHN yapılan olgularda SOS sıklığının anlamlı olarak arttığını saptamışlar ve bu durumu karaciğerdeki demir birikimine bağlanmışlardır (36). Hemokromatozisli olgularda da talasemi majorlül hastalardakine benzer olarak artmış demir yükü ve karaciğer inflamasyonu vardır.

SOS mortalitesi yüksek ve şiddetli olgularda tedavisi güç bir komplikasyondur. Risk faktörlerini ortadan kaldırarak gelişimini önlemek önemlidir. Artmış demir yükü olanlarda flebotomi ve/veya eritropoezisi stimule edici ajanlar, antioksidan ajanların kullanılması ile SOS gelişimi engellenebilir. Bu çalışmada hemokromatozis gen mutasyonlarının SOS gelişimine katkısı araştırılmıştır. Bu amaçla; Gazi Üniversitesi HKHN Birimine başvuran hastalarda HFE geninin sıklığı, HKHN yapılan hastaların demir parametreleri (ferritin,

trasferrin saturasyonu) ve var ise hemokromatozis gen mutasyonlarının bu parametrelere olası etkisi, hemokromatozis gen mutasyonu var ise SOS gelişimine ve ilk 100 günlük sağkalıma etkisi, biyokimyasal demir parametrelerinin SOS gelişimine olası etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

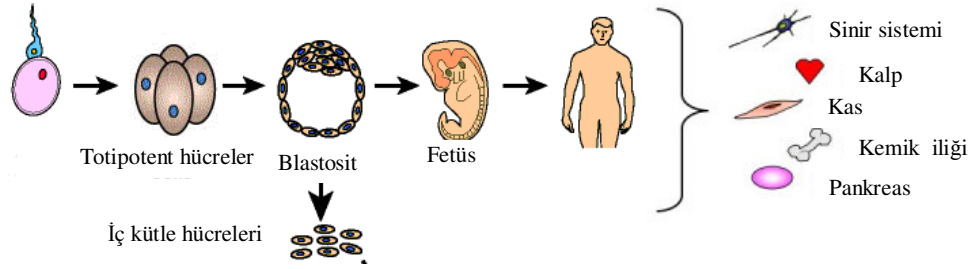
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hematopoetik Kök Hücre Nakli

4.1.1. Tanımı

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) Kemik iliği ve/veya immun sistemi doğuştan veya tümör, kemoterapi ve radyoterapi gibi nedenlerle hasar görmüş kişilerde, hematopoetik sistemin yeniden yapılanmasını sağlamak amacıyla pluripotent kök hücrelerin (CD34 + hücreler) alıcıya nakledilmesidir (1,2). Bu yöntem ile ilk uygulama 1939 yılında aplastik anemili bir hastaya damar yolu ile aynı kan grubundan kemik iliği verilmesi şeklinde yapılmıştır (37). Malesef bu ilk deneme graft rejeksiyonu ile sonuçlanmıştır. Ancak II. Dünya savaşında atom bombası ve buna bağlı problemler tekrar konunun popüler hale gelmesini sağlamıştır (37). 1950’li yılların sonunda yapılan çalışmalarda radyasyona maruz kalan hayvanların geri dönüşümsüz pansitopeniden, başka bir hayvandan elde edilen kemik iliği sayesinde kurtulabildiklerini gösterilmiştir (38,39). 1957 yılında Thomas ve ark. yüksek doz kemoradyoterapi sonrası ilk kez allojenik kök hücre naklini gerçekleştirmişlerdir (38). 1970’li yıllarda *human leukocyte antigenlerin* (HLA) gösterilmesi ve ardından 1980 yılında Siklosporin A’nın kullanıma girmesi nakil alanında önemli kilometre taşları olmuştur (37,38). Uzun dönem yaşayan ilk olgu, ağır kombine immün yetmezlik nedeni ile 1968 yılında HKHN yapılan olgudur (38). Kök hücre nakli günümüzde kemik iliği yetmezliği, metabolik hastalıklar, immün yetmezlikler, hematolojik maliniteler ve solid tümörlerde şifa potansiyeli olan güncel bir tedavi seçeneğidir (1,38). 2000 yılında tüm dünyada 40000 üzerinde nakil yapılmıştır (5).

Kök hücreler vücudumuzda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler, sınırsız bölünebilme, kendi kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (40). İki tip kök hücre vardır; birincisi “*embriyonik kök hücre*”dir ve blastositin iç kütesinden köken alır (40). İç kütle hücreleri fetusu oluştururlar (40) (Şekil 1). İkinci tip hücreler ise “*Embriyonik olmayan kök hücre*”dir ve erişkin kök hücreler olarak adlandırılmaktadırlar (40). Genellikle kaynakları kemik iliği olup çevre kanda, kordon kanında ve fetal karaciğerde de bulunabilirler (1,4,5,40).



Şekil 1. Kök hücreler ve farklılaşmaları (41,42)

İliak krestten aspire edilen kemik iliği uzun yıllar boyunca hematopoetik kök hücre nakli için temel kaynağı oluşturmuştur (38). Çevre kanında da kök hücre bulunduğunun gösterilmesi ile 1990’lı yılların sonunda, çevre kanından toplanan kök hücreler HKHN’de kullanılmaya başlamıştır (38). Kök hücreler *mobilizasyon* rejimleri (büyüme faktörü ve/veya kemoterapi) ile kemik iliğinden çevre kana yönlendirilmekte ve santrifüj esasına dayanan hücre ayırma cihazları ile (aferez yöntemi) toplanmaktadır (38). Kordon kanı hematopoetik kök hücrelerden zengin diğer bir kaynak olup allojenik HKHN’de kullanılabilir (38).

4.1.2. Çeşitleri

i. Singenik: Genetik olarak tam uyumlu bireyler arasında yapılır (119,118). Tek yumurta ikizleri buna örnek olarak verilebilir (37).

ii. Allojenik: Aynı tür arasında yapılır ancak alıcı ve verici arasında genetik ilişki yoktur (1,6,37). Kardeşler arasında, aile içindeki diğer bireylerden veya akraba dışı bireylerden kemik iliği bankaları aracılığı ile yapılır. Bu tip HKHN'de alıcı ve verici arasında HLA uyumu aranır (1,2,6). Graft versus tümör etkisinin görüldüğü maliniteler ve malin olmayan hastalıklarda (Talasemi major, Aplastik Anemi vb) tercih edilmektedir (6,37).

iii. Otolog: Hastanın kendisinden toplanan hemotopoetik kök hücrelerin kemoterapi ve/veya radyoterapiden sonra geri verilmesi esasına dayanır (1,6,37). Özellikle daha yüksek doz kemoterapiye daha çok cevap veren tümörlerde kullanılmaktadır (1,37).

4.1.3. Hazırlama Rejimleri

HKHN öncesinde geride kalan malin hücrelerin ortadan kaldırılması ve engrafman* için hastanın immün sisteminin baskılanması amacı ile hazırlık rejimleri verilir (2,4,37,38). Hazırlama rejimleri çok çeşitli olup tek bir hazırlama rejiminin üstünlüğü gösterilememiştir (2,4,37). Hematopoetik kök hücre nakli tipine ve hastalığa göre değişiklik göstermektedir (1,2,37). Kemoterapi ve/veya radyoterapi (RT) birlikte uygulanabilmektedir (2,37). Tüm beden ışınlaması (TBI) ve siklofosamid (TBI-Cy) tercih edilen bir hazırlama rejimidir (2,4,37). Yüksek doz busulfan, etoposid gibi ajanlar da kullanılabilmektedir (2,37). Bu rejimler

* Engrafman: Hazırlık rejimini takip eden aplazi sonrası hücre serilerinin tekrar ortaya çıkarak kan tablosunun düzelmesi durumudur, nötrofiller >500/UL 3 gün süre ile ve plateletler >20000/UL üzerindedir (38).

“myeloablatif” rejimler olarak adlandırılmakta olup hastanın kemik iliğinin hastalıktan doğrudan etkilenmiş olduğu durumlarda tercih edilir. Hazırlama rejiminin yoğunluğu lösemik relapsı azaltmakta fakat yüksek toksik etkiler nedeni ile bu durum her zaman sağkalıma yansımamaktadır (6,38). Bununla birlikte verici kaynaklı immün sistemin güçlü anti-lösemik etkisinden faydalanmak için yeni hazırlama rejimleri geliştirilmiştir (6,38). Bu rejimlere “nonmyeloablatif” rejim denilmektedir (6,38). Nonmyeloablatif rejimde temel prensip verici T hücrelerinin alıcıdaki tümör ile (graft versus tümör etkisini) savaşmasıdır (38). Daha az toksik bu rejimler sayesinde yaşlı ve komorbiditesi olan hastalar da HKHN’den faydalanabilmektedirler (38).

4.1.4. Komplikasyonları

i. HKHN erken komplikasyonları; hematolojik, hazırlık rejimine bağlı ve immünolojik komplikasyonlar olarak üç başlıkta incelenebilir (2,4,6,37). Hematolojik komplikasyonlar; kemoterapi/radyoterapiye bağlı kemik iliği aplazisi sonucu gelişir. Anemi, trombositopeniye bağlı kanamalar, nötropeniye bağlı enfeksiyonlar bu komplikasyonlar arasında sayılabilir (4,6,37). Hazırlık rejimine bağlı komplikasyonlar arasında ise, bulantı, kusma, mukozit, alopesi, hemorajik sistit, idiyopatik pulmoner sendrom, Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu (SOS) vardır (2,4,37). İmmünolojik komplikasyonlar ise Akut Graft Versus Host hastalığı (GVHH), graft yetmezliği sayılabilir (4,6,37).

ii. HKHN geç komplikasyonları; kronik GVHH, hipotiroidi, sterilite ve hipogonadizm, katarakt, avasküler kemik nekrozu, ikincil maliniteler bu grupta sayılabilir (1,4,37).

4.2. Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu

4.2.1. Tanım

Veno-oklüziv hastalık (VOD), ilk defa Jamaikada pirolizin alkaloidi alan hastalarda tanımlanmıştır (8,12). Daha sonra Hindistan, Mısır, İsrail ve Güney Afrika'da kontamine buğday ve bitkisel bazı ürünleri alan kişilerde de gösterilmiştir (8). Alkol, oral kontraseptifler, toksik yağ, terbinafin ve radyasyon hasarından sonra da bildirilmiştir (12,43). Bras ve ark. küçük hepatik venüllerdeki tıkaçıcı fibrozisi tanımlamak için ilk önce “*veno-oklüziv hastalık*” terimini kullanmışlardır (44). Daha sonra hastalığın aslında sinüziodlerden başladığı 2000’li yıllarda ortaya konulmuş ve hastalık “*sinüzoidal obstrüksiyon sendromu*” olarak yeniden isimlendirilmiştir (44).

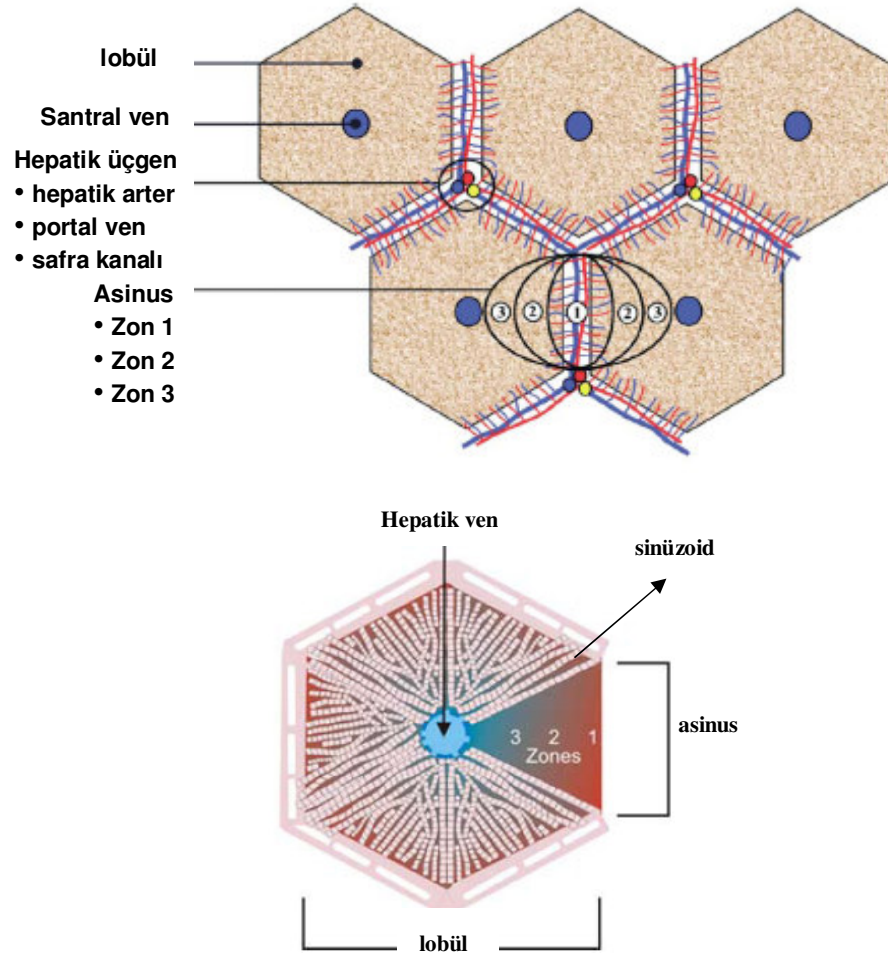
SOS, HKHN yapılan hastalarda %10-70’e varan oranda görülen ciddi ve öldürücü bir karaciğer komplikasyonudur (1,7,8,12,43,45). Kök hücre nakli ile ilişkili SOS olan ilk olgu 1979 yılında bildirilmiştir (12,43). Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu; ağırlı hapatomegali, hızlı kilo alımı (>%2, ilk kilosunun), sıvı retansiyonu, hiperbilirubinemi (>2mg/dl) ve asit ile karakterizedir (1,7,9). Şiddetli SOS; portal hipertansiyon, hepatorenal sendrom ve sonucunda çoklu organ yetmezliği ile ölüme kadar gidebilen, mortalitesi %40-67’e kadar çıkabilen bir durumdur (7,12). Şiddetli SOS’da ilk 100 gün mortalitesi %90’a kadar çıkmaktadır (46). SOS bulguları HKHN yapıldıktan sonraki bir ay içerisinde ortaya çıkar (1,7,12). Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu solid organ nakillerinden sonra da bildirilmiş olup genellikle Azatiopirin toksisitesi ile ilişkili bulunmuştur (43,44).

4.2.2. Patogenezi

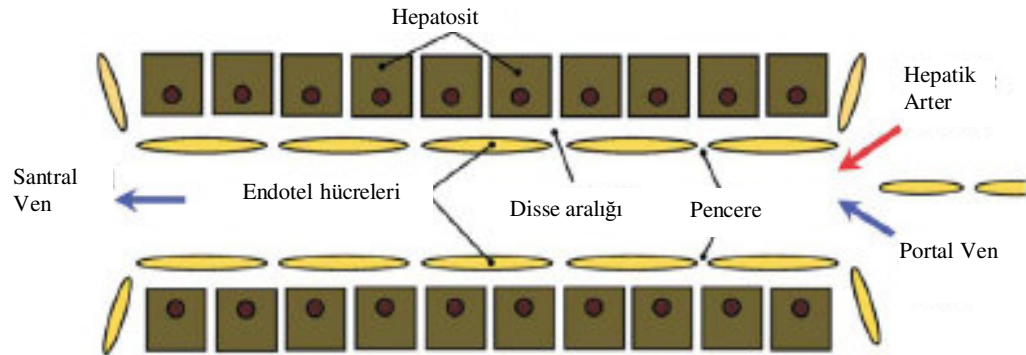
Sinüzoidal obstriksiyon sendromunun patogeneğinde sitokinler, hemostatik mekanizmalar ve glutatyon üzerinden hepatik ilaç detoksifikasyonu ile ilişkili kompleks mekanizmalar rol oynar (7). Küçük intrahepatik venüllerin tıkanması ve bunu saran sentrilobular hepatosit ve sinüzoidlerin hasara uğraması ile karakterizedir (1,2). SOS’da bahsi geçen bu endotel hasarının radyo/kemoterapi, endotoksinler ve tümör nekrozis faktör (TNF) salınımı ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (47).

i. Karaciğer anatomisi: Karaciğer çok kanlanan bir organdır (9). Kan ihtiyacının %30’u hepatik arterden, %70’ini portal venden karşılanır (9). Karaciğer fonksiyonel ünitesi altıgen şeklinde “lobül”lere ayrılmıştır ve her lobülün ortasında hepatik ven bulunur (9). Her altıgenin köşesinde karaciğer portal üçgeni bulunmakta olup portal ven dalı, hepatik arter dalı ve safra kanalından oluşmaktadır (9). Lobüller içinde küçük üçgen alanlar “asinus” olarak isimlendirilirken, asinuslar da kendi içlerinde “zon”lara ayrılırlar (9) (Şekil 2)

Hepatosit kordonları “sinüzoid” adı verilen kavitelerle ayrılmışlardır (9). Portal venden ve hepatik arterden gelen kan bu sinüzoidlerde karışır (9). Sinüzoidler, bazal membranı olmayan sinüzoidal endotel hücresi (SEH) ile çevrilidir (9). Sinüzoidlerde “Disse aralığı”na plazmanın kolay geçişini sağlayan pencereler vardır (9). Bu pencereli yapı ve bazal membran yokluğu, albuminin hepatosit ile sinüzoidler arasında kolayca hareketine izin verir (9). (Şekil 2)



Şekil 2. Karaciğer Anatomisi (7,9)



Şekil 3. Sinüzoidal Anatomi (7)

ii. Sinüzoidal hasar: Sinüzoidal obstrüksiyon sendromunda ilk hasar zon 3'deki SEH'den başlamaktadır, hasara bağlı basınç artmakta ve portal hipertansiyon gelişmektedir (7,12). Bu nedenle 2002 yılında veno-oklüziv hastalık terimi yerini hastalığın başlangıç yeri olan ve mutlaka hastalığa katılan SEH göz önünde bulundurularak sinüzoidal obstrüksiyon sendromuna bırakmıştır (44).

SEH'den başlayan bu hasarın mekanizması birkaç nedene bağlanmaktadır. Karaciğerde kemoterapötikler de dahil olmak üzere ilaçların metabolize olduğu bölge ile SOS'un olduğu bölge olan sentrilobular (zon 3) aynıdır (7,12). Birçok ilacın eliminasyonu için suda çözünür metabolitlere dönüşmesi gerekmektedir. Bu eliminasyon karaciğerdeki sitokrom P-450 ve konjugasyon enzimleri aracılığı ile olmaktadır (7,12). Birçok ilaç stabil metabolitlerine dönüşürken siklofosamid, "akrolein" gibi toksik metabolite dönüşür (7,12). Bu zararlı metabolitlerin toksisiteleri çeşitli koruyucu mekanizmalarla sınırlandırılmaya çalışılır. Bunlardan en önemlisi glutatyondur (7,12,48,49). Glutasyon, ilaçların suda çözünür metabolitlerinin oluşumunda ve ROS'ların detoksifikasyonunda görev almaktadır (7). Zon 3'deki hepatositler, sitokrom P-450 ve Glutasyon-S transferaz (GST) enzimlerinden zengindirler (7,12). Buna karşın glutasyon içeriği diğer bölgelerden azdır (7,10,12,48,49). Karaciğerin sentrilobular bölgesi bu yapısı nedeni ile toksik metabolitlerin öncelikli hedefi haline gelmektedir (12,48,49). Yüksek serum demiri ROS üretmek suretiyle DNA ve proteinlerde hasar oluşturarak epitel ve endotel (örn: SEH) hücrelerinde hasar oluşturur (48,49). Sonuçta HKHN'de siklofosamid gibi metabolitleri de toksik olan ajaların kullanılması, glutasyonu

azaltan radyasyon, busulfan* gibi ajanlara maruziyet, serum serbest demirinin yüksek olması sonucu oluşan ROS ve glutatyonun göreceli olarak bu bölgede az bulunması zon 3'deki sinüzoidal endotel hücrelerinde ve hepatositlerde hasar oluşturmaktadır (7,10,12).

SEH'leri lipopolisakkaritler (LPS) için reseptör görevi yapan CD14 antijenini eksprese ettikleri için, portal dolaşımda bulunan toksin ve bakterilerin ilk hasar oluşturdıkları bölgedir (7). LPS'ler bakteri duvarının bir komponentidir ve TNF alfa salınımını uyarırlar (7). TNF-alfa güçlü bir inflamatuvar sitokin olup doğrudan hücresel hasar oluşturabildiği gibi koagülasyonu da aktive eder (7). HKHN nedeniyle bağışıklığı baskılanmış hastalarda gastrointestinal sistemdeki bakteriler SEH'lere ulaşarak hasara ve TNF alfa salınımına neden olabilmektedirler (7).

DeneySEL SOS modellerinde, hasarın SEH'den başladığı ve SEH'de glutatyonun azaldığı gösterilmiştir (7,44,50).

SOS'unun bir varyantı olan radyasyon ilişkili karaciğer hasarı 30-35 cGy gibi yüksek doz radyasyon alan hastalarda tanımlanmıştır HKHN'de kullanılan radyasyon dozu ise 1200cGy'dir. Bu durum SEH'lerinin HKHN'de kullanılan radyasyon dozuna hepatositlerden daha duyarlı olduğunu göstermektedir (44,51). Busulfan ve TBI'nın da hepatositlerdeki glutatyon seviyelerinde azalmaya yol açtığı ve bu şekilde SOS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (9,50). Karaciğerdeki tek antioksidan olan glutatyonu metabolize eden Glutatyon S-transferaz (GST) enzimindeki M1 polimorfizm nedeni ile glutatyon seviyesini azaltmaktadır (52).

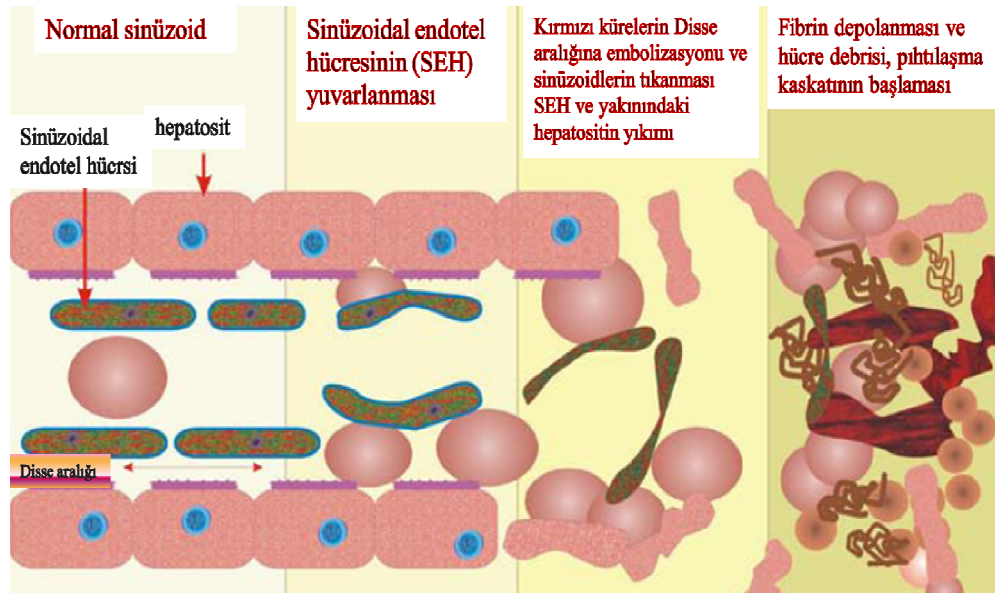
* Busulfanın konjugasyonu, zon 3'de glutatyonla olmaktadır (50).

Bu polimorfizmin olduğu, HKHN yapılan talasemili çocuklarda SOS insidansında artış saptanmıştır (52). GST'in görevi Busulfan, Siklofosamid gibi ajanların metabolitlerinin glutatyon ile konjugasyonunu sağlamaktır (7,52,53). Farmakolojik çalışmalar; bu etkiyi indirgenmiş glutatyonun azalmasına veya glutatyonla konjuge olmuş Busulfan metabolitlerinin toksisitesine bağlamaktadır (53,54).

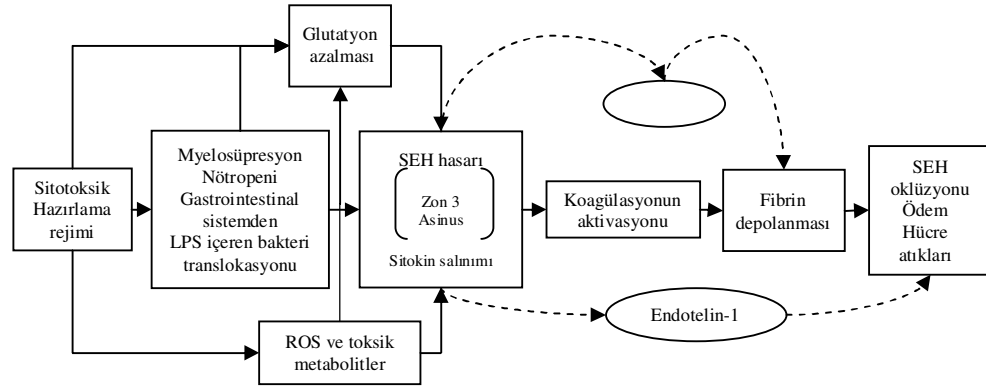
Hayvan modelleri sinüzoidal hasarın sinüzoidal endotel hücrelerinden (SEH) başladığını ve bu hasar nedeni ile SEH'lerin yuvarlaklaştığı, kırmızı kürelerin disse aralığına doğru sızdığını göstermiştir (2,9,10,44). Takiben SEH'i lümene dökülür. Dökülen SEH'i nedeni ile kan akımında yavaşlama ve tıkanma oluşur (44). Sonuçta sinüzoidlerde daralma; kan akımında azalma ve hepatik konjesyon gelişir (9,10). Bu bölgeye ulaşan monositler ise tıkanmayı daha da arttırmırlar (44). Takip eden süreçte fibrin depolanması, trombosit agregasyonu ve trombüs oluşumu ile tablo tamamlanır (2,9,10,11). Venüllerde tıkanma, intrahepatik postsinüzoidal portal basıncın artmasına, fibrozise ve son olarak da hepatosit nekrozu gelişmesine kadar ilerler (9).

Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) seviyesinin SOS olan hastalarda arttığı gösterilmiştir (47). PAI-1 fibrinoliz inhibitörü olduğu gibi endotel hasarının da bir göstergesidir (47). Endotel hücreesindeki hasar lokal düzeyde tromboz oluşumuna eğilim (hiperkoagulobilité) yaratarak trombosit agregasyonuna ve trombüs oluşumuna neden olur (47). Bu oluşan mikrotrombüsler hedef organda kan akımını kesintiye uğratarak aynı organda fonksiyon kaybına neden olmaktadır (11,12). Bununla birlikte kullanıma bağlı

olarak protein C, protein S ve antitrombin III gibi doğal antikoagülanlarda da azalma görülür (47). SOS'lu hastalarda gözlenen trombosit transfüzyonuna dirençli trombositopeninin endotel hasarının olduğu bölgede hızlı trombosit kullanımına bağlı olduğu düşünülmektedir (9,47). (Şekil 4 ve 5) PAI-1 aynı zamanda allojenik HKHN'den sonra gelişen SOS'da tanı amacı ile ve klinik tablonun şiddetini gösteren bir belirteç olarak da kullanılabilmektedir (55,56). Lee ve ark., HKHN yapılan 115 hastada PAI-1 düzeyi ile SOS şiddeti arasında korelasyon olduğunu saptadılar ve tanı amaçlı ve klinik tablonun şiddetini gösteren bir belirteç olarak kullanılabileceğini öne sürdüler (55).



Şekil 4. Sinüzoidal Hasar (9)



Şekil 5. Sinüzoidal Hasara neden olan faktörler (7)

4.2.3. Tanı , Klinik Bulgular ve Prognoz

Terminal hepatik venüllerin tıkanması, SEH ve tromboz nedeni ile intravasküler alandan ekstrasvasküler alana su ve sodyum geçişi olmaktadır (4). Bu sıvı kaçıışı renal kan akımında azalma ve renin anjiotensin sisteminde aktivasyona su ve sodyum tutulumuna neden olmaktadır (4). Bu nedenle genellikle kilo artımı (>%2) SOS için önemli bir tanı ölçütüdür (10). İlk iki gün içerisinde de hiperbilirubinemi (>2mg/dl) gelişmesi beklenir (10). Çoğu hastada asit ve sağ üst kadranda ağrı, fizik muayenede sert ve hassas hepatomegali saptanabilir (10). Trombosit transfüzyonuna dirençli trombositopeni olguların %50'sinde ise böbrek yetmezliği gelişebilir (10). Çoklu organ yetmezliği genellikle şiddetli SOS olgularına eşlik eder ve bu olguların %25'i hemodiyaliz tedavisi gerektirir (10). Hafif hastalığı olanlarda bilirubin seviyeleri (<7mg/dl) ve kilo artımı daha azdır (4). Bununla birlikte bilirubin seviyesi 20mg/dl'den daha yüksek olan veya HKHN öncesi ağırlıklarının %15'inden daha fazla kilo artımı olan hastalarda ilk 100 gün mortalitesi %90'a çıkmaktadır (4). Şiddetli SOS olgularında, hepatorenal

sendrom nedeni ile çoklu organ yetmezliği gelişebilmekte özellikle, böbrek, akciğer, karaciğer ve/veya kalbi etkileyerek klinik olarak konfüzyon, plevral efüzyon, pulmoner infiltratlar, ensefalopati ve komaya kadar ilerleyebilmektedir (1,12,10,51). SOS olgularının şiddetinin ve prognozunun belirlenmesinde kilo alımı, bilirübin düzeyi, periferik ödem, asit varlığı ve ilk 100 gün mortalitesini içeren Seattle kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 1) (43,10).

Tablo 1. Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu için prognoz ölçütleri (8,10)

	Hafif	Orta	Ağır
Kilo artımı (% artış)	7±3,5	10,1±5,3	15,5±9,2
En yüksek bilirübin düzeyi (mg/dl)	4,7±2,9	7,9±6,6	26,6±15,2
Ödem (% olgu)	23	70	85
Asit (% olgu)	5	16	48
İlk 100 gün mortalitesi	3	20	98

Sinüzoidal obstrüksiyon sendromunun kesin tanısı karaciğer biyopsisi ile konulur, ancak HKHN sonrası ilk 20 günde trombositopeni ve kanama riski nedeni ile biyopsi riskli olup genellikle klinik bulgularla tanı konulmaktadır (9,10,51). Histopatolojik örnek alınabilen hastalarda patoloji; santral ve sublobular venlerdeki intima tabakasında kalınlaşma, lümen içinde fibril materyal ve parçalanmış eritrositlerin birikimi ve bunun sonucunda konsantrik olarak lümende daralma şeklindedir (7,10,12,44). Erken evrede endotel altındaki tabakada eitrosit ve sıvı birikimine bağlı kalınlaşma ve özel boyalarla fibrinojen saptanabilmektedir (10). Bu venlere drene olan sinüzoidlerde konjesyon ve çevresindeki hepatositlerde nekroz oluşur (12). Erken evrede henüz tromboz oluşmamıştır, bulgular venöz kan akımının engellenmesine bağlı sentrilobular konjesyonla uyumludur (10). Bu nedenle eğer özel boyalar yapılmaz ise erken evre değişiklikler sinüzoidal konjesyondan ayrılamayabilir (10). Geç evrede

etkilenen venler subendotelial kollajen fibrilleri ile tamamen tıkanmışlardır (12,44). Hastalık ilerledikçe olay tüm karaciğer parankimine yayılır ve son histolojik görünüm siroz ile aynıdır (7).

SOS tanısında iki farklı sınıflandırma vardır (43). Bunlar Baltimore ve Seattle kriterleridir (Tablo 2) (10,43). Baltimore kriterleri daha katı kurallar taşımaktadır, bu nedenle bu kriterleri karşılayanlar daha ileri evre hastalığı olanlardır (43).

Tablo 2. Sinüzoidal Obsrtiksiyon Sendromu Tam Kriterleri (10,12,43)

Seattle kriterleri
Nakil sonrası 30 gün içinde 3 kriterden en az 2'sinin bulunması
1. Sarılık
2. Hepatomegali ve sağ üst kadranda ağrı
3. Asit ve/veya açıklanamayan kilo artımı
Baltimore kriterleri
Nakil sonrası 21 gün içinde serum total bilirübin seviyesinin yükselmesi ($\geq 2\text{mg/dl}$) ve aşağıdakilerden 2 tanesinin bulunması
Hassas hepatomegali
Kilo alımı ($\geq \% 5$, ilk kilosunun)
Asit
Modifiye Seattle kriterleri
Nakil sonrası 20 gün içinde en az 2 tanesinin olması
Hiperbilirubinemi ($\geq 2\text{mg/dl}$)
Hepatomegali ve sağ üst kadranda ağrısı
Açıklanamayan kilo alımı ($> \% 2$, ilk kilosunun), sıvı tutulumuna bağlı

4.2.4. Risk Faktörleri

Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu risk faktörleri tablo 3’de özetlenmiştir.

i. Transplant tipi: SOS, otolog kök hücre nakli yapılanlarda daha az görülmektedir (12). Bu konu ile ilgili yapılmış çalışmalarda değişik sonuçlar olmakla beraber Avrupa Kemik İliği Nakil (EBMT) grubunun yayınladığı son raporda en önemli risk faktörünün allojenik HKHN olduğu belirtilmiştir (57). Bu

farkın, GVHH profilaksisi için kullanılan siklosporin ve metotreksat ile ilişkili olabileceği gibi, alloimmün yanıtın da rolü olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (12).

ii. Nakil öncesi karaciğer enzim yüksekliği: Nakil öncesi karaciğer hastalığı bulunması örneğin hepatit C (HCV), daha önceden karaciğerde fibrozis veya siroz gibi hastalığın bulunması ve fazla alkol alımı bir risk faktörüdür (7,8,12,51,57). Öyküde süregelen bir karaciğer hastalığı bulunması SOS oluşumunda 2,5-4 kat risk artışı yaratmaktadır (12). İlginç olarak büyük serilerde bu ilişki hepatit ile ilgili bulunmamıştır (12). Locasciulli ve ark., karaciğer transaminaz yüksekliği ile SOS gelişimi arasında ilişki saptamışlardır (58). Çalışmalarda aspartat aminotransferaz (AST) düzeyi ile ciddi SOS arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (51).

iii. Hazırlama rejimleri: Hazırlama rejimleri ve sitotoksik kemoterapilerden özellikle Siklofosamid, Busulfan ve Dakarbazinin SOS ile ilişkisi gösterilmiştir (7,9,8,44). Relaps-refrakter akut myeloid lösemili hastalarda kullanılan Gemtuzumab Ozagamisın (anti-CD33) ile yüksek SOS insidansı bildirilmiştir (59). Gemtuzumab Ozagamisın karaciğerdeki CD33+ AML hücrelerine, CD33 antijeni taşıyan kupfer hücrelerine ve stellat hücrelere toksini taşımaktadır (59). Sinüzoidal endotel hücreleri Siklofosamid'in metabolitlerinden akroleine çok hassastırlar (60). Busulfan alan hastalarda da hazırlama rejiminde siklofosamid bulunmasa da SOS izlenmiştir (60). Busulfan'ın karaciğer hasarına oksidatif stresi arttırarak, glutatyon seviyesini azaltarak ve siklofosamid metabolizmasını değiştirerek yol açabileceği öne sürülmektedir (44). Busulfan ve

Siklofosfamid hazırlık rejimlerinde, Siklofosfamid Busulfandan önce verildiğinde daha az sıklıkla SOS gelişmekte bu da Busulfanın Siklofosfamid toksisitesini, akrolein gibi toksik maddelerin eliminasyonu için kullanılacak glutatyonu azaltarak, arttırdığını düşündürmektedir (44). Tüm beden ışınlamasını içeren hazırlık rejimlerinde SOS sıklığı artmış bulunmuştur (9,44).

iv. Diğer ilaçlar: Kadın hastalarda mensturasyonu baskılamak için kullanılan Norethisterone’unda SOS riskini 10 kat arttırdığı gösterilmiştir (7,12). Siklosporin ile birlikte Metotreksat kullanımı, Ketokanazol kullanımı, Vankomisin ve Asiklovir kullanımının risk faktörü olabileceği gösterilmiştir (7,12). Bazı çalışmalarda Amfoterisin B kullanımının da SOS ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (12). Nakil yapıldığı hafta içerisinde fungal enfeksiyon bulunması da risk faktörü arasında bahsi geçen bir unsurdur (12).

v. Abdominal ışınlama: Daha önceden abdominal bölgeye karaciğeri içine alacak şekilde radyoterapi alanlarda SOS sıklığının arttığı bildirilmiştir (10,12,51,61).

vi. Performans Durumu: Özellikle kanser hastalarının genel iyilik hallerinin belirlenmesi amacı ile geliştirilmiş bazı cetveller bulunmaktadır. Bunlar Karnofsky Performans Skalası ve ECOG skalasıdır (62,63). Yapılan çalışmalarda Karnofsky skalasında %90’nın altında performans gösteren hastalarda SOS daha sık gelişmektedir (57).

vii. Genetik faktörler: HKHN’de kullanılan ilaçların çoğu glutatyon ile konjuge ve metabolize edilmektedir (7). Glutatyon yolundaki enzimleri etkileyen gen polimorfizimleri, genin ekspresyonunu etkileyerek glutatyon

seviyelerinde azalmaya neden olabilirler (7). Talasemi Major nedeni ile HKHN yapılan, glutatyon-S-transferaz polimorfizimi olan hastalarda daha sık SOS görüldüğü bildirilmiştir (52). Hemakromatozis gen mutasyonlarından C282Y mutasyonunun da SOS gelişmesinde risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (64). Tümör nekrozis faktör alfa geninde saptanan polimorfizimlerin HKHN komplikasyonlarından SOS ve akut GVHH ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (7). Antioksidan olan nitrik oksit (NO)'in artmasına neden olan karbamoil fosfat sentetaz 1 (CPS 1) enzimindeki AA polimorfizminin SOS'dan koruyucu özelliği olduğu gösterilmiştir (53).

viii. Diğer: Daha önceden kök hücre nakli yapılmış olması %20 olasılıkta ciddi SOS görüleceğini göstermektedir (7,51). Bazı çalışmalarda yaş, kadın cinsiyet, Akut Lenfoblastik Lösemi dışında bir hastalığın bulunması da sinüzoidal obsrüksiyon sendromu ile ilişkili bulunmuştur (51). HKHN başlangıcından itibaren toplam geçen ateşli gün sayısının da bir risk faktörü olabileceği bunun da salgılanan inflamatuvar sitokinlerin karaciğerde meydana getirdiği hasardan kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (51). Bunlara ek olarak HKHN öncesinde yüksek serum ferritin seviyesinin de SOS'da risk faktörü olduğunu gösteren çalışmalar vardır (34,35,29,32). HKHN hastalarında nakil öncesi artmış transferrine bağlı olmayan demir (NTBI) değerlerinin SOS için bağımsız bir risk faktörü olduğu Sucak ve ark. tarafında bildirilmiştir (33).

Tablo 3 Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu gelişimi için risk faktörleri
(12,44,43,51,34,35,65,28,32,66,10,53,33,29)

Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu gelişimi için risk faktörleri
• Transplant tipi • Önceden karaciğer hastalığı bulunması (HCV, siroz, hepatik fibroz) • Daha önceden myeloablatif hazırlama rejimi ile karşılaşmış olmak • İleri yaş • Kadın cinsiyet • Karnofsky indeksi (<% 90) • Daha önceden SOS hikayesi • Yüksek doz TBI • Siklofosamid içeren hazırlama rejimi kullanımı • Siklofosamidin Busulfandan sonra verilmesi • Sabit Busulfan dozu kullanımı • Busulfanın damar yolu (İV) yerine ağızdan kullanımı • Abdomen bölgesine radyoterapi almış olması • Daha önceden Norethisterone kullanımı • Yüksek serum ferritin seviyesi • Hemokromatozis C282Y mutasyonu taşıyıcıları

4.2.5. Tedavi ve Profilaksi

SOS tedavisinde en başarılı olacak yöntem gelişmesinin önlenmesidir. Bu bakımdan risk faktörlerinin saptanması ve bunlardan değiştirilebilir olanlarının düzeltilmesi büyük öneme sahiptir. Örneğin: akut hepatiti veya hepatit reaktivasyonu olan hastalarda HKHN'nin ertelenmesi, sitotoksik ilaç dozlarının dozunun azaltılması, düzey tayinine göre Busulfan verilmesi, Siklofosamid'in Busulfan'dan önce verilmesi gibi yöntemler sayılabilir (7). SOS tedavisinin en önemli kısmı destek tedavisi olup, hafif olgularda %70-80 kendiliğinden düzelme bildirilmiştir (43). Bununla birlikte ciddi formlar kendiliğinden düzelmez ve spesifik tedavi gerektirirler (43). Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu gelişmiş hastalarda tedavi iki grupta incelenebilir (10).

i. Destek tedavisi: Destek tedavisi intravasküler hacimin sağlanması ve böbrek perfüzyonunun devamı ve ekstrasvasküler sıvı birikimini engellemeye yönelik tedavilerdir (10). Sıvı ve sodyum kısıtlaması, diüretik

tedavisi gereken hastalarda hemodiyaliz yapılabilir (7,10). Gelişen asit, hastalarda nefes almayı engelliyorsa parasentez yapılır (7,10). Hepatik ensefalopatiyi engellemek amacı ile proteinden kısıtlı diyet ve laktuloz verilmesi önerilmektedir (7,10).

ii. Spesifik tedaviler: Hepatik venüllerdeki mikrotrombüsler göz önünde bulundurularak fibrinolizin arttırılmasına yönelik tedaviler bunlardan birisidir (10). Bu amaçla kullanılan rekombinant doku plazminojen aktivatörü (r-tPA) fibrin ile bağlı plazminojene spesifik trombolitik bir ajandır (67). Bearman ve ark., heparin ve r-tPA verilen 42 hastanın %29'unda yanıt almışlardır (68). Aynı çalışmada %24 hastada ciddi kanama ve bunların %7'sinde ölüm saptanmıştır (68). Bir diğer çalışmada SOS saptanan ve r-tPA ile tedavi edilen 17 hastanın %35,3 cevap oranı bulunmuştur (67). Diğer bir ajan olan Prostaglandin E1 (PGE1) vazodilatasyon etkisi ile ve trombosit fonksiyonlarını inhibe ederek trombolizi provoke eder (9). PGE1 ile yapılan çalışmaların sonuçları çelişkili olup tedavide yararlı etkisi gösterilememiştir (69,51). Defibrotid; SOS tedavisinde yeni ve etkili tedavi ajanı olup, domuz ve sığır mukoza hücrelerinden elde edilen bir polideoksiribonükleik asittir (7). Defibrotidin etki mekanizması tam açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte yapılan çalışmalar trombomodulin, tPA, prostasiklin ve Prostaglandin E2'i arttırdığını, trombin oluşumunu, doku faktörü salınımını, PAI-1 salınımını ve endotelin aktivitesini azalttığını göstermişlerdir (7,10). Yapılan çalışmalarda SOS saptanan ve defibrotid ile tedavi edilen hastalardaki yanıt oranları %42-78 arasında değişmektedir (46,70).

iii. Profilaksi: Profilaktik olarak antioksidan ve antiapoptotik bir ajan olan Ursodeoksikolik asit kullanımının SOS gelişmesini azalttığı gösterilmiştir (43). Yine antioksidan olan glutatyonun seviyesini arttırmaya yönelik kullanılan glutaminin de HKHN yapılan hastalarda karaciğer fonksiyonlarını koruduğunu gösteren çalışmalar vardır (48,50). PGE1'in profilaktik olarak kullanıldığı 8 hastada SOS'a rastlanmamıştır fakat PGE1 ile ilgili sonuçlar netlik kazanmamıştır (69).

4.3. Hemokromatozis Geni

4.3.1. Hemokromatozis tanımı

Hemokromatozis, ilk defa 19. yüzyılın sonlarında tanımlanmıştır (14). 1935 yılında yazılan Hemokromatozis ile ilgili ilk yazıda fazla demir yükü ve demirin organlarda birikimine bağlı toksisite ve organ yetmezliklerine yol açtığı belirtilmiştir (14). Başlangıcı nonspesifik olup hastalık ilerledikçe artropati, diabetes mellitus, hipogonadizm ve diğer endokrinopatiler, siroz, ciltte pigmentasyon ve karaciğerde hepatosellüler kanser oluşmaktadır (14,20,37).

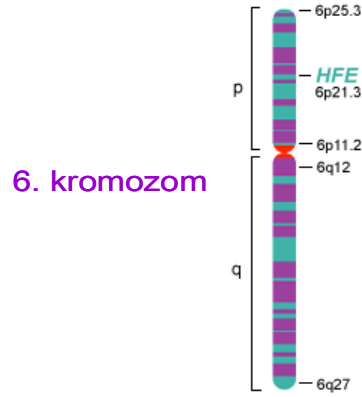
Hemokromatozis iki şekilde sınıflanabilir.

i. Herediter hemokromatozis (HH): Otozomal resesif geçiş göstermektedir (14,20,37).

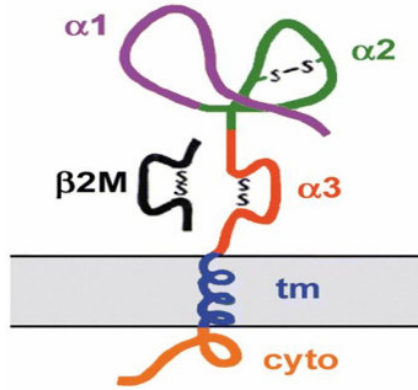
ii. İkincil demir birikimi: Demir birikiminin genetik olmayan nedenlerinden kaynaklanmaktadır (18,20,37). Diyetle fazla demir alınması, demir yüküne neden olan anemiler, kronik karaciğer hastalıkları (hepatit C, nonalkolik steatohepatit), fazla kan transfüzyonu, porfiriya, uzun dönem hemaodiyaliz, hematolojik maligniteler ikincil demir birikimine örnek olarak sayılabilecek hastalıklardır (18,20,23,37)

4.3.2. Hemokromatoz Geni, Kalıtım Modeli ve Mutasyonları

Hemokromatozisten sorumlu gen 1996 yılında bulunmuş olup ilk önce HLA-H olarak adlandırılmıştır (20). Daha sonra genin rolü ve yapısı anlaşıncı Feder ve ark. tarafından adlandırılması HFE olarak değiştirilmiştir (18,20,37,41,71,72). HFE geni 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.3) (Şekil 6) yer almakta olup otozomal resesif kalıtım gösterir. HFE proteini hem yapısal olarak HLA proteinine benzemekte hem de HLA klas I gibi 6. kromozomda yer almaktadır. HFE geni, 1029 baz çiftinden oluşmakta ve 343 aminoasitlik MHC (major histocompatibility complex) klas I proteinine yapısal olarak benzeyen “*herediter hemokromatoz proteini*”ni (HFE proteini) kodlamaktadır (20,64,37,23,73) (Şekil 7). HFE proteini karaciğer ve bağırsak hücrelerinde bulunan bir transmembran proteindir (73). HLA proteinleri $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ alt ünitelerinin disülfid bağları ile birbirine bağlanmasından oluşan bir yapıya sahiptir. Bu yapı Şekil 7’de gösterildiği gibi HFE proteininde de bulunmaktadır (21,73). Ayrıca ekstraselüler peptid bağlayan kısmı ($\alpha 1$), transmembran kısmı ve kısa sitoplazmik kısımları bulunmaktadır (22,73) (Şekil 7). HFE molekülünün $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ alt ünitelerinde bulunan disülfid bağları tersiyer yapının stabilizasyonunda gereklidir (22,73). HLA klas I proteinlerinde bulunan $\alpha 3$ alt yapı beta-2-mikroglobin ($\beta 2M$) ile ilişkiyi sağlamada gereklidir (20,22,73). Buradan yola çıkılarak HFE proteininin de aynı özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (20,22,73). HFE proteini özellikle karaciğerde ve ince bağırsaklardaki kriptlerde epitel hücrelerinde nükleusun yanında bulunmaktadır (20,73). HFE proteininin bu yerleşimi demir emiliminin düzenlendiği bölgeye karşılık gelmektedir (20,73).



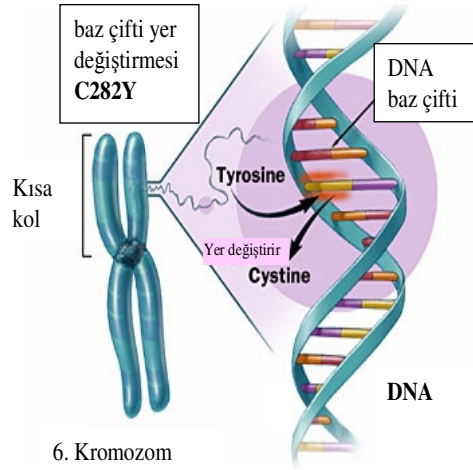
Şekil 6. 6. kromozom üzerinde HFE geninin yeri: p:kromozomun kısa kolu, q: kromozomun uzun kolu (39)



Şekil 7. HFE proteinin yapısı. ($\alpha 1$: alfa-1 alt ünite, $\beta 2M$: beta-2-mikroglobin, $\alpha 2$: alfa-2 alt ünite, $\alpha 3$: alfa-3 alt ünite, tm: transmembran, cyto: sitoplazma) (74)

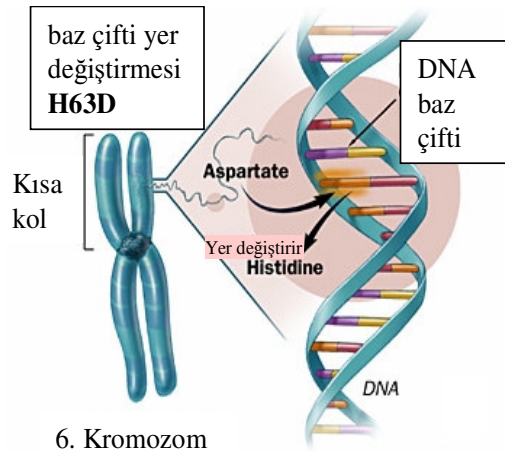
HFE'nin 37 allel varyantı tanımlanmıştır (20,75,76,77). Bu varyasyonlar içinde klinik korelasyonu olan iki mutasyon bulunmaktadır; C282Y ve H63D (20,76,77). Bu mutasyonların 1 allelde oluşması *heterozigot mutant*, 2 allelde oluşması *homozigot mutant* olarak adlandırılmaktadır (20,23). Mutasyon olmayan popülasyondaki alleller *yabani tip (wild type)* olarak isimlendirilmektedir (20,23).

i. C282Y mutasyonu: HFE proteininin 282. pozisyonundaki tirozin amino asidi yerine sisteinin geçmesi ile C282Y mutasyonu oluşur (18,20,21,22,23,37). Bu mutasyon nedeni ile HFE proteininin β 2M ile bağlanma yerindeki disulfit bağları etkilenmektedir. (18,20,21,22,37) HFE proteini yerine yeni oluşan C282Y proteini golgi cisimciğinde işlenip hücre yüzeyinde sunulamaz ve yüksek moleküler ağırlıklı agregat olarak intraselüler bölgede kalır (18,22,71,73,78). Sentezlenen C282Y proteininin büyük kısmı yıkıma uğramaktadır (22,71,73,78). Beta-2 mikroglobine bağlanamayan C282Y proteini bu nedenle normal görevini (transferrin reseptörü ile etkileşip demirin emiliminin kontrolünü sağlamak) yapamayan HFE proteini fazla demir emilimine neden olur (22,73,78,79).



Şekil 8. C282Y mutasyonunun oluşumu (80)

ii. H63D mutasyonu: HFE proteininin 63. pozisyonundaki aspartat amino asidi yerine histidin amino asidi geçmesi nedeni ile H63D mutasyonu oluşur (20). Bu mutasyon molekülün peptid bağlayan kısmında ($\alpha 1$) yer almaktadır (20). H63D mutasyonu alfa-1 alt ünite de oluşmakta olup beta-2-mikroglobin ile bağlanmayı etkilememektedir (22,73). Molekülün 3 boyutlu yapısı bozulmamakta ancak demir emiliminde gerekli olan transferrin reseptörü gibi proteinlerle ilişki kaybolmaktadır (18,22,71,79).



Şekil 9. H63D mutasyonunun oluşumu (80)

iii. Bileşik heterozigot: H63D ve C282Y mutasyonlarından birer kopya bulunması halidir.

4.3.3. Hemokromatozis gen mutasyonlarının belirlenmesi

HFE genindeki mutasyonların belirlenmesinde PZR-RFLP (plimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi) kullanılır (81,82,83,84).

PZR ilk olarak 1985 yılında R. Saiki ve K. Mullis tarafından geliştirilmiş çift zincirli DNA dizilerinin in vitro olarak çok sayıda kopyasının oluşturulması esasına dayalıdır (81,84). PZR için çok az miktarda DNA örneği yeterli olmaktadır ve 3 temel basamakla ürünün miktarı belirlenmektedir (84). Birinci basamak ile çoğaltılmak istenilen DNA, yüksek sıcaklıkta (90-95°C) çift zincirli halden tek zincirli hale getirilir (84,84). İkinci basamakta ısı azaltılarak *primerlerin** tek zincirli hale gelen DNA'ya bağlanması sağlanır (82,85,84). Üçüncü basamakta *Taq polimeraz enzimi*[†] nükleotidleri 5' ucundan 3' uca ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar (82,85). Bu olayların birinci basamağı denatürasyon, ikinci basamağı annealing (bağlanma), ve üçüncü basamağı uzama olarak adlandırılmakta olup bir döngüye *1 siklus* denir (82,85). Bir PZR yaklaşık 25-30 döngü olarak yapılır, sonunda DNA miktarında yaklaşık 10⁹ kat artma beklenir (82,83).

Bir DNA segmentinin her 100 baz çiftindeki (bç) nükleotid dizisi bireylerde farklılık gösterir (83,85). Bu nedenle restriksiyon fragman büyüklükleri

* primer: 15-30 baz uzunlukta 2 oligonükleotid içerirler (81,83).

[†] Taq polimeraz enzimi: *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen ısıya dayanıklı enzim (81,82).

(RFLP) her bölge için farklıdır ve bu yöntemle DNA'nın belirli bölgeleri bulunabilir (82). RFLP ile belirlenerek kesilen DNA'lar jel elektroforezde görüntülenebilir (82,83). Elektroforezde; 1 allelde mutasyon saptanmasına *heterozigot mutant*, 2 allelde oluşmasına *homozigot mutant* ve normal popülasyondaki allellere *yabani tip* denilmektedir (20,23).

4.3.4. Demir, Demir toksisitesi ve HFE proteini

Demir, tüm hücrelerin fonksiyonlarına katılmakta, oksidasyon durumuna göre (ferröz demir; Fe^{+2} ve Ferrik demir; Fe^{+3}) elektron alıp verebilmektedir (14,15,86). Bu özellik hemoglobin ve myoglobin gibi oksijen bağlayan moleküllerin özellikle demir içeren mitokondrial sitokrom enzimleri için önemlidir (14,86). Demir olmadan hücreler elektron taşıma kapasitelerini yitirirler (14). Öte yandan ortamda fazla bulunan demir hidroksil radikalleri oluşumunu katalizleyerek hücre membranında, proteinlerde ve DNA'da hasar meydana getirir (14,86). Demir ilişkili hasardan korunmak için demir vücutta proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır (14,15,86). Plazmada demir *transferrine* bağlı olarak dolaşır ve hücrelere yüksek çözünürlüklü ferrik demiri *Transferrin reseptörü* (TfR) aracılığı ile ulaştırır (14). Hücre içerisinde ise *ferritin* ve *hemosiderin* olarak depolanmaktadır (14,15). Kullanılmayıp depolanan demirin büyük kısmı hepatositte ve retikuloendotelial makrofajlarda bulunur (86).

i. Demir Homeostazisi: Demirin aktif bir atılımı olmadığı için vücudun demir dengesi büyük oranda bağırsaklardan demir Emilimi ile sağlanır (86,87,88,73,89,90). Duedonal epitel hücreleri vücut demir homeostazisinde temel göreve sahiptirler. Demir Emilimi bu hücrelerde gerçekleşir (86,73,88). Emilim sırasında birçok basamak vardır; (88). Bu basamaklar demirin Ferröz (Fe^{+2}) forma

indirgenmesi, apikal alım, hücre içi depolama ve bazolateral salgılamadır (86,88). Demirin Ferrik (Fe^{+3}) formdan Ferröz forma (Fe^{+2}) indirgenmesi enterosit mukozasında *Duodenal Ferrik Redüktaz* ile olmaktadır (88,90). Daha sonra Ferröz demir *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1) ile enterositin apikal membranına taşınmaktadır (88). Yabanıl tip HFE, bazolateral membranda TfR ile etkileşir, molekülün transferrine olan afinitesini azaltır ve demirin epitelial hücreye alınmasını sağlar (23,79,73). Enterosite giren demir, içeride Ferritin olarak depolanabilmekte veya bazolateral membrandan plazmaya geçmektedir (88). Dolaşıma verilen demir, kullanılacak ve depolanacak bölgelere transferrin ile taşınır (88). Enterositte ferritin olarak depolanan demir bu hücrelerin ömrünü tamamlaması ile, onlarla birlikte lümene dökülür (88).

Demir depolarının azalması, eritropoetik aktivitenin artması, anemi veya hipoksi ile bağırsaklardan demir Emilimi artar (88). Öte yandan, enfeksiyonla, demir Emilimi azalır (88). Vücuttaki demir içeriği 3-4 gram arasında olup bu denge bağırsaklardan demir Emilimi ile demir kaybı arasında dengededir (18,37,86). Bu denge yaklaşık erkeklerde 1 mg/gün ve kadınlarda 1,5 mg/gün demir gereksinimi yaratır. Hemokromatozisde demir Emilimi vücudun ihtiyacından fazla olup 4 g/gün'ü geçebilmektedir (27,86).

Demir Emilimi hücresel düzeyde ve sistemik olarak kontrol edilir (14,18,88). Kriptik hücrelerdeki HFE, vücut demir ihtiyacına göre TfR ile etkileşerek feedback mekanizma ile ne kadar demirin emileceğini belirler (73,18,23). Demir, dolaşımda transferrin ile taşınarak kript hücrelerine geldiğinde TfR ile etkileşip hücre içine ve HFE'e sinyal gönderir (23). Bu etkileşim

sayesinde demir yükü ve ihtiyacı anlaşarak demir emilimi düzenlenmektedir (18,23,73). Yabanıl tip HFE yerine mutant tip HFE varlığında, HFE proteininin duodonal kript hücre yüzeyindeki ve makrofajlardaki üç boyutlu yapısı bozulur (89). TfR ile etkileşemez ve feedback mekanizması bozulduğu için duodonal epitel hücrelerinden fazla demir emilimi olur (18,23,73,89). Hepsidin, karaciğerden sentezlenen 25 amino asitlik bir peptiddir ve demir emiliminde önemli işlevi vardır (14,88,89,90). Hepsidin negatif düzenleyicidir, yani seviyesi arttığı zaman duodonal demir emilimi ve makrofajdan demir salınımı azalır (89,91). Hepsidin genellikle inflamasyona yanıt olarak artmaktadır ve kronik demir eksikliğinde gözlenen anormal demir parametrelerinin nedenidir (89). Hepsidin bu yükselişinin bireyin defans mekanizması olduğu, yayılan mikroorganizmalar ve malign hücreler için gerekli demirin azaltıldığı düşünülmektedir (89). HH'de de hepsidin seviyesi düşüktür ve demir birikimi olmaktadır (90).

HH'da artmış demir emilimi sonucunda transferrin saturasyonu (TS) ve ferritin artar (14). Normal şartlar altında, transferrin demir bağlayan bölgelerin %33'ü veya 1/3'üne bağlıdır. Bu doluluk oranı TS ile hesaplanır. TS; serum demirinin, serum demir bağlama kapasitesine bölünmesi ile elde edilen bir değerdir, % olarak ifade edilir (14,17,18). Demir az ise TS düşük, fazla ise yükselir ve transferrinin bağlanma kapasitesini aşan demir dolaşımında serbest demir olarak bulunur ve bu demir toksiktir. HH hastalarda TS ile transferrine bağlı olmayan demir arasında korelasyon vardır (14,18).

En sık kullanılan tarama testi Transferrin saturasyonu (TS)'dur (18,92,93,94). TS yükselmesi hastalığın en erken fenotipik görünümüdür (18,92,93). TS'nun sensitivitesi %94-98 ve spesifitesi %70-90'dır (18,94). Normal TS %45'in altındadır (18,94). Premenapozal kadında >%45 TS, postmenapozal kadın ve erkeklerde >%55 TS araştırılmalıdır (18,23). Serum ferritin seviyesi doğrusal olarak serum depo demiri ile orantılıdır (18,23,94). Serum ferritin değeri normalde erkekte ve postmenapozal kadında <300µ/L ve premenapozal kadında <200µ/L'dir (18,23,93). Serum ferritini HH'da geç dönemde yükselmektedir (18,92,94). Bu nedenle serum ferritin seviyesi tarama testi olarak kullanılsa da daha çok flebotomi ile tedavi edilen hastaların izleminde tercih edilen bir tanı yöntemidir (18,23,94). Bazı çalışmalarda serum bağlanmamış demir bağlanma kapasitesinde (UIBC) transferrin saturasyonu kadar değerli olabileceği öne sürülmektedir fakat henüz bunun için bir eşik değer belirlenmemiştir (18,94). Yüksek TS, yüksek serum ferritin seviyesi ve karaciğer enzimlerinde yükseklik saptanan kişilerde HH için HFE gen testi ve/veya karaciğer biyopsisi açısından ileri değerlendirme yapılması gerekmektedir (18).

HFE genotipinin kliniğe yansımaları yani fenotipik görünüm birçok faktöre bağlıdır örneğin diyetle demir alımı, gebelik ve mensturasyon ile kan kaybı, kan bağıışı ve mutasyonun tipidir (20,37,87,95). Fenotipik olarak kadınlardaki mensturasyon ve gebelik gibi kan kaybı yaratan nedenlerden dolayı, erkeklerde 5-10 kat daha sık görülmektedir (37,71,76). C282Y homozigot mutasyonu olanlarda %75-95 demir yüklenmesi olmaktadır, fakat H63D fenotipik görünümü daha komplekstir (71). Lim ve ark., bileşik heterozigot (C282Y/H63D) olan hastalarda

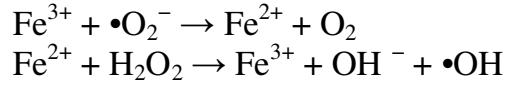
orta derecede demir yüklenmesi olduğunu ve karaciğerin demir konsantrasyonunun 30-100µmol/g arasında saptamışlardır (93). Aynı çalışmada C282Y homozigot mutant hastaların bileşik heterozigot olanlardan daha ciddi demir yüklenmesi olduğu görülmüştür (93). Literatürdeki veriler, C282Y mutasyonuna göre diğer mutasyonlarda klinik penetrasyonun düşük olduğunu ve daha az demir yükü olabileceğini düşündürmektedir (77,91,93,94,95). Morrison ve ark.'nın çalışmasında serum ferritin seviyesi <1000mg/dl olan hastalarda homozigot C282Y veya kombine heterozigot mutasyonuna sahip olsalar da siroz saptanmamıştır (96). Serum ferritin seviyesinin 1000mg/dl'nin üzerinde olması, serum aminotransferaz seviyelerinde yükseklik bulunması siroz için bağımsız risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (96). Bu nedenle, serum ferritin seviyesi >1000 mg/dl ve karaciğer aminotransferaz seviyesi yüksek olan hastalarda karaciğer biyopsisi önerilmektedir (96).

ii. Demir toksisitesi: Reaktif oksijen türleri (ROS); Hidrojen Peroksit (H_2O_2), Singlet Oksijen (O_2), Hidroksil iyonu (OH^-), süperoksit ($\bullet O_2^-$) gibi çeşitli moleküllerden oluşmaktadırlar (15,16,17,97). Mitokondriyal solunum, sinyal taşıma yolları, transkripsiyon faktör aktivitesi, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi hücre aktivitelerinde ROS'un önemli görevleri vardır (16).

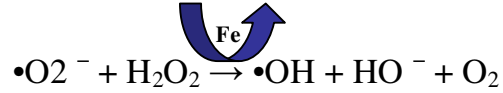
Demir yüklenmesi oluştuğunda örn; talasemi, hemokromatozis, transferrin ile bağlı olmayan demir dolaşımında ortaya çıkmaktadır (14,15,17). Ortamda serbest olarak bulunan demir, katalitik özelliği nedeni ile serbest radikaller ile reaksiyona girerek hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve süperoksit dismutaz gibi reaktif oksijen türevleri oluşumuna neden olmaktadır (14,15,16,17,18,64,89,98)

(Şekil 10). Normalde hücre içinde ROS'lar sabit miktarda tutulmaya çalışılır (15,54). Eğer kontrolsüz olarak fazla üretilirse, önemli hücresel komponentlerle (epitel ve endotel hücreleri başta olmak üzere) etkileşime girer ve bu hücrede hasar meydana getirirler (15,16,30,54). Bu duruma *Oksidatif Stres* adı verilmektedir (15,16,54). Oksidatif stresde özellikle üretilen hidroksil radikali, lipid peroksidasyonu, mutagenез, DNA kırıkları, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inhibisyonuna neden olan kuvvetli bir oksidan ajandır (89). Hücreler oksidatif strese antioksidan düzeylerini arttırarak, ve/veya yeni gen ekspresyonunu indükleyerek yanıt verirler (15,16,54). Antioksidan mekanizmalar enzimatik veya nonenzimatik olarak ikiye ayrılabilir (15,16,97). Nonenzimatik olanlar arasında vitamin E, vitamin C, β -karoten, glutatyon, bilirubin sayılabilir. Enzimatik mekanizmalar arasında da katalaz, glutatyon peroksidaz, Glutatyon-S-transferaz (GST) sayılabilir (15,16,97,98) (Şekil 11). Artmış demir düzeyleri, vitamin E, glutatyon gibi koruyucu sistemleri ROS'ların ortadan kaldırılması için tüketirler (97,98).

Reaktif oksijen türevlerinin başlıca düzenleyicisi olan demir, oksidatif stres nedeni ile kanser gibi birçok hastalığın patofizyolojinde bulunarak rol oynamaktadır (15,54). Karaciğer demirin biriktiği temel organ olduğu için demir toksisitesi özellikle karaciğerde izlenmektedir (15,54). Karaciğerde biriken demir hepatositlerde hasar oluşturduktan sonra başlayan inflamatuvar kaskat nedeni ile karaciğerde ekstraselüler matrikste artışa yani fibrosise neden olmaktadır (15,54). Karaciğerde oluşan fibrozis dinamik bir süreç olup kronik karaciğer hasarında siroza kadar ilerleyebilmektedir (15,54).

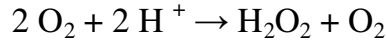


Toplam reaksiyon

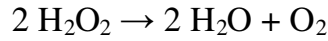


Şekil 10. Demir ile reaktif oksijen türevlerinin oluşumu (Fe^{3+} : Ferröz Demir, Fe^{+2} : Ferrik Demir, $\bullet\text{OH}$: hidroksil radikali, H_2O_2 : hidrojen peroksit, $\bullet\text{O}_2^-$: Süperoksit, OH^- : Hidroksil anyonu) (15,17,30,97,99)

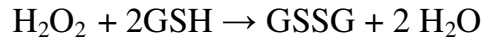
Superoksit Dismutaz (SOD):



Katalaz:



Glutatyon peroksidaz



Şekil 11. Antioksidan yollar (H_2O_2 : hidrojen peroksit, H_2O : su, O_2 : oksijen, GSH: glutatyon, GSSG: indirgenmiş glutatyon) (97,100)

4.3.5. Hemokromatozis Prevelansı

C282Y varyantının 2000 yıl önce Kuzey Avrupada Keltik soyundan başladığı düşünülmektedir (14,90,101). Bu nedenle Kuzey Avrupada tek allel bulunması 10 kişiden 1'inde, iki allel bulunması (homozigot mutant) 200 kişiden

12'sinde vardır (14,21,23,37). H63D varyantı tüm dünyada dağılmış olsa da en sık Bask bölgesinde görülmektedir (23,101).

Kuzey Avrupada HH hastalarındaki mutasyonun %70-100'ünden C282Y mutasyonu sorumlu tutulmaktadır (101,102). Güney Avrupada ise özellikle Akdeniz kıyısındaki ülkelerde HH C282Y mutasyon insidansı azdır (101). Bununla birlikte HH'de H63D'nin rolü tam olarak belirlenememiş olup HH'li hastalarda %5-10 sıklıkta saptanmaktadır (18,76,102,103,104,105). Amerikada İngiliz ve İrlanda kökenli olan HH'lular arasında da C282Y mutasyonu sıklığı artmıştır (102).

Türkiyede HFE genindeki mutasyonlar ile ilgili çok fazla çalışma olmamakla beraber saptanan HH hastalarda C282Y mutasyonu gösterilmemiştir (76,102,104,105). Türkiyede HFE genindeki C282Y ve H63D allel sıklıklarını belirlemek amacı ile yapılan çalışmalarda da C282Y mutasyonuna rastlanmamış olup H63D allel sıklığı değişiklik göstermektedir (76,102,103,105,106). Barut ve ark. çalışmasında TS>%50 olan 26 hastanın 1 tanesinde H63D homozigot, 11 tanesinde de H63D heterozigot mutasyon saptamışlardır (76). Şimşek ve ark. çalışmasında H63D allelinin kontrol grubundaki sıklığı %24,8 iken H63D homozigot mutant ve H63D heterozigot mutata sıklığı sırası ile %17,1 ve %7,6 saptanmıştır (103). Bozkaya ve ark. çalışmasında Demir bağlama kapasitesi <28µmol/l olan 65 hastanın 7 sinde H63D heterozigot mutasyonu saptarlarken H63D homozigot mutasyon saptamamışlardır (105).

4.4. Demir, HFE ve Maligniteler

HH'da Hepatosellüler karsinomdan ölümlerin fazla olması, demir dekstran enjeksiyonu yapılan tavşalarda enjeksiyon yerinde sarkom gelişmesi ve demir

maden işçilerinde akciğer kanserinin daha fazla görülmesi gibi nedenlerden demirin neoplazi patogeneğinde rolü olduğu 1900'li yılların başından beri farkedilmiştir (19,107). Neoplastik hücrelerin de aynı normal hücreler gibi demire ihtiyacı vardır (13). Normal hücrede proliferasyonda görev alan demir, tümör hücrelerinde de klonal büyümede önemli bir faktördür (13). Pek çok tümör hücresinde aynı dokudaki benign hücreler ile karşılaştırıldığında artmış transferrin reseptör ekspresyonu bildirilmiştir (13). Transferrin reseptörünün tümör hücrelerinde daha fazla olması, tümör proliferasyonunda, DNA sentezinde demir gereksiniminin karşılandığını göstermektedir (13). Demirin 3 farklı mekanizma ile karsinogeneşte rol oynadığı düşünülmektedir (79). Birincisi mutajenik serbest hidroksil radikallerin oluşumu, ikincisi kanser hücreleri için bir esansiyel element olması ve üçüncüsü ise defans mekanizmalarını bozarak kansere zemin hazırlamasıdır (79,108). Mutajenik hidroksil radikalleri lipid peroksidasyonu ile veya doğrudan DNA'da hasar meydana getirmektedirler (98). Buna ek olarak ROS'lar temel immün mekanizmalarda da bozukluklar oluştururlar, örneğin; antijen antikor spesifik immün mekanizma, sitotoksik T-hücrelerinin proliferasyonu, T-süpresör hücre etkisini fazlalaştırmak bunların arasında sayılabilir. Kanser savunmasında rol alan T-hücre aracılı bu mekanizmalarda bozukluk kanser hücreleri ile savaşta başarısızlıkla sonuçlanabilir (107,109).

Tedavi edilmemiş Herediter Hemokromatozis (23) hastalarında en kaygı verici komplikasyon karaciğer kanseridir (109). Literatürde HH'de karaciğer kanser riskinde 100-240 kat artış bildirilmektedir (25,79,107,110,111). Bununla birlikte HH'lu hastalarda karaciğer dışı kanserlerde de artış saptanmıştır

(109,112,107). Hsing ve ark., HH'lu hastalarda özofagus, melanom ve diğer karaciğer dışı kanserlerde de normal popülasyona oranla artmış risk bulmuşlardır (110). Tiniakos ve arkadaşları Herediter Hemokromatozlu 71 hastanın 7 yıllık takibinde %8,4 karaciğer dışı kanser saptamışlardır (113). Bu nedenle hastalığın başlangıcından itibaren oluşan genetik bir değişimin bu olaylara yol açtığı düşünülmektedir (98). Toyokuni ve Sagripanti serumda bulunan serbest demirin demir sitratla bağlandığını ve demir sitratin oksidasyonu indüklediği bununda plazmid DNA'sında tek ve çift kırıklara yol açtığını yani DNA hasarı oluşturduğunu göstermiştir (112).

Türk meme kanserli 176 hastada yapılan HFE mutasyon analizinde kontrol grubuna oranla H63D allel sıklığında artış saptanmıştır (sırası ile %22,2, %14) (114). Bir diğer çalışma da Kallianpur ve ark., tarafından meme kanserili hastalarda C282Y sıklığında artış (%36,6) bildirilmiştir (99).

Hemokromatoz geni ve maligniteler arasındaki ilişki sadece meme kanserinde değil hematolojik malignitelerde de tanımlanmıştır fakat bu konu ile ilgili literatürde çelişkili raporlar bulunmaktadır (24,25,26,115,116,117,118). HFE geninin sadece gastrointestinal epitel hücrelerinde değil doku makrofajlarında, monositlerde ve B-lenfoid hücre dizilerinde de eksprese olduğu gösterilmesi ile hematolojik hastalıklar ve HFE gen ilişkisindeki araştırmalar derinleştirilmiştir (119,24,75).

Dorak ve ark., çocukluk çağı ALL'lerinde C282Y mutasyonunun bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (115). Hannuksela ve ark. çeşitli hematolojik hastalıkları olan hastalarda HFE gen mutasyonunun sıklığına araştırdılar; H63D

mutasyonu myelodisplastik sendromlu (MDS) hastalarda yüksek bulunmuştur (24), AML’li hastalarda C282Y mutasyonu sıklığı düşük saptanmıştır ve Dorak ve ark.’nın çalışmasının aksine ALL ve çocukluk çağı ALL’lerinde C282Y mutasyonu sıklığını da normal popülasyonla aynı olduğunu saptamışlardır (24,115). Nelson ve ark., Herediter Hemokromatozis için heterozigot olan hastalardaki neoplastik hastalık sıklığını araştırmışlar ve hematolojik malignitelerde normal popülasyona oranla bir artış saptamışlardır (25). Bu farklılıklar HFE geninin hematolojik malignitelerin gelişmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (24,25,115). Öte yandan, Akut Myeloid Lösemili 36 hasta ile yapılan bir çalışmada H63D ve C282Y mutasyonunun kontrol grubundan farklı sıklıkta olmadığını saptamışlardır (26). MDS’li hastalarda yapılan bir diğer çalışmada da Varkonyi ve ark., normal popülasyona oranla artmış mutasyon saptamışlardır (116). Barton ve ark., yaptığı çalışmada medikal onkoloji kliniğinde takip edilen hastalarda H63D ve C282Y mutasyon sıklığı normal popülasyon ile aynı bulunmuş fakat spesifik tip malignitelerde mutasyon sıklıklarının değişik olabileceği öne sürülmüştür. Hodgkin dışı Lenfomalı hastalarda C282Y mutasyonunda artış ve H63D mutasyonunda azalma tesbit etmişlerdir (117). Aynı zamanda Myeloproliferatif hastalıklarda ve Prostat Adenokarsinomunda da H63D mutasyonunda artış gösterilmiştir (117). Veneri ve ark., ise 45 Akut Myeloid Lösemili hastada bakılan Hemokromatoz C282Y ve H63D mutasyonlarının sıklığının normal popülasyondan farklı olmadığını bildirmişlerdir (120). Aynı zamanda hemokromatoz gen mutasyonun demir

parametrelerini (ferritin, transferrin saturasyonu) değiştirmediği saptanmıştır (120).

4.5. HKHN, Demir birikimi ve HFE İlişkisi

HKHN’de demir birikimi pek çok faktöre bağlı gelişebilmektedir (27,28).

Hastaların hem tedavinin başlangıcında hem de nakil sonrası dönemde fazla kan ürünü transfüzyonuna maruz kalmaları en önde gelen sebebi oluşturmaktadır (27).

Bir nite eritrosit süspansiyonu 200-250mg demir içermekte olup 10-20 ünite transfüzyon alanlarda ciddi demir yüklenmesi oluşmaktadır (27). Bununla birlikte inefektif eritropoez ve hemoliz durumlarında kan hemoglobinin değeri düşük olduğu için gastrointestinal sistemden demir emilimi devam etmektedir (17,27,28,29,30). Ayrıca, kemoterapiden sonra parçalanan hücrelerden (zellikle kemik iliği ve karaciğer) demir açığa çıkması mukozit nedeni ile gastrointestinal mukozalardan fazla demir emilimi de demir yüklenmesine katkıda bulunmaktadır (17,27,30,121,122,123). Demir metabolizmasını etkileyen ve demir artışına neden olan diğer faktörlerin de birlikte görülmesi örneğin herediter hemokromatoz gen mutasyonu varlığı, demir yüklenmesi riskini daha da arttırabilir (27).

HKHN’de ve öncesinde birçok kemoterapetik ajan kullanılmaktadır. Kemoterapi için kullanılan pek çok ajanın bizzat kendisi serbest radikaller üretmektedirler ve bunların ortadan kaldırılması için kullanılan antioksidanlar tüketilmektedir (17,121). Demirin ortamda bulunması halinde radikallerle reaksiyona girerek ROS özellikle hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) retilmekte ve antioksidanlar (Vitamin C, Vitamin E, glutatyon, vb) azalmaktadır (16,54,121). Karaciğer hücreleri ile yapılmış in vitro bir çalışmada ROS’a bağlı oksidatif stresin hücrede glutatyon bittikten sonra hasara yol açtığı ve ortama antioksidan

konulması ile bu hasarın ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (124). Bu nedenle kemoterapi, radyoterapi ile glutatyonun azalması ve kök hücre nakli sırasında ortamda fazla demir bulunması yan etkilerin artmasına veya ciddiyetinin artmasına neden olmaktadır (15,16,17,121).

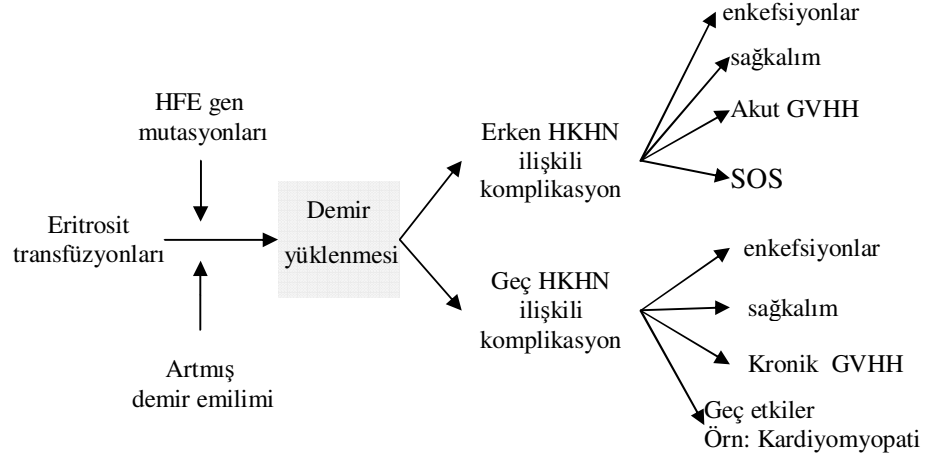
HKHN’de demir yükü ile ilgili olan erken ve geç komplikasyonlar şekil 13’de özetlenmiştir (27). Demir yükü ile ilgili erken komplikasyonlar içerisinde enfeksiyonlar, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma ve SOS bulunmaktadır (27,125). Buna ek olarak HKHN öncesi yüksek ferritin değerinin erken transplant ilişkili mortalitede yüksek risk oluşturduğunu gösteren retrospektif çalışmalar da bulunmaktadır (27,125). Geç komplikasyonlar başlıca kalp ve karaciğeri ilgilendirmektedir (27,125,126). Talasemili hastalarda kardiyomyopati, karaciğerde fibrozis ve siroz gösterilmiştir (27,126).

HKHN’den sonra karaciğer işlev bozukluğu, %45-55 hastada görülebilen bir komplikasyondur (3,28,127,128). HKHN’den sonra görülen kronik karaciğer hastalığının önemli nedenlerinden birisi de artmış demir yüküdür (3,17,27,28,99,122,126,127,128,129). Strasser ve ark., HKHN sonrasında siroz olan olgularda SOS’un nakil sonrası erken dönemde daha sık olduğunu gözlemlemişlerdir (28).

Çeşitli maligniteleri nedeni ile HKHN yapılan 88 hastada Evens ve ark., HKHN öncesi serum demir, transferrin saturasyonu ve ferritin düzeylerinde anlamlı bir yükseklik saptamışlardır (17). Seattle’da nakil sonrası 50-100 günde ölen hastalarda yapılan otopsilerde karaciğerde Herediter Hemokromatoziste olduğu kadar demir biriktiği saptanmıştır (126). Birçok kez eritrosit transfüzyonu

almak buna neden olabilmektedir fakat tek sebep olarak gözükmemektedir (126). Seattle raporunda alınan eritrosit sayısı ile doku demir içeriği arasında korelasyon bulunmamıştır (126). Sucak ve ark., HKHN sonrası geç dönemde karaciğer enzimlerinde yükseklik saptanması nedeni ile biyopsi yapılan 24 olguda en sık histopatolojik tanıyı demir yüklenmesi olarak bulmuştur (29). Aynı çalışmada, ferritin seviyesi >1000ng/ml olan 14 hastanın 13'ünde histolojik olarak demir yüklenmesi gösterilmiştir (29).

Uzun dönem yaşayan HKHN yapılan hastalarda yapılan bir çalışmada hastaların %57'sinde kronik karaciğer hastalığı gelişmiştir (130). Bu hastaların %52'sinde demir yüklenmesi, %47'inde Hepatiti C enfeksiyonu, %37'sinde GVHH, %7'sinde Hepatiti B enfeksiyonu, %5'inde steatohepatit, %5'inde de otoimmün hepatit saptanmıştır (130). Aynı çalışmada HFE mutasyonlarının demir yükünü arttıran önemli bir faktör olduğu ve bu hasta grubunda bakılması önerilmektedir (130). HKHN hastalarında kronik karaciğer hastalığı sıktır ve demir birikimi en sık rastlanılan etyolojik faktörlerden birisidir. Bu çalışmada allojenik ve otolog HKHN hastalarında demir yükünün artmasında, genetik faktörlerin katkısını araştırmak için HFE mutasyonuna bakılmasını istedik.



Şekil 13. HKHN sonrası demir yüklenmesi ve komplikasyonları (17,27).

4.6. SOS, Demir ve HFE ilişkisi

Sinüzoidal obstrüksiyon sendromunda hastanın daha önceden karaciğer hastalığı olması bir risk faktörüdür (8,9,43).

Fazla demir karaciğer hücrelerinde toksik etki yaratarak hücre ölümüne ve uzun dönemde Kupfer hücre aktivasyonu ve karaciğerde fibrosis gelişimine neden olmaktadır (16). Hepatositler normal zamanda fazla miktarda ROS üretirler ve karaciğer kendi antioksidan defans mekanizmaları ile bunları ortamdan temizleyebilir (54). Hücre içi ROS yapımı çok arttığında defans mekanizmaları yetersiz kalır ve hücre zedelenmesi ve hücre ölümü gelişir (54). Kupfer hücreleri ve aktive lökositler sinüzoidal endotel hücrelerine yapışırlar (54). Bu nedenle sinüzoidal endotel hücreleri ROS aracılı hasara en duyarlı bölgelerdir (15,54). Pediatrik HKHN hastalarında talasemi major tanısının SOS riskini arttıran bir faktör olduğu gözlemlenmiştir (65). Bu artışın nakil öncesi demir depolanmasına

bağlı oluşan karaciğer hasarından kaynaklandığı düşünülmektedir (65). Morado ve ark.'nın 180 otolog HKHN hastasını içeren prospektif çalışmalarında, sinüzoidal obstrüksiyon sendromu gelişen hastalarda otolog HKHN öncesi bakılan ferritin düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğunu ve serum ferritin seviyesi >300mg/dl olan hastalarda SOS gelişme riskinin yüksek olduğunu saptamışlardır (OR:6,75) (35). Armand ve ark. yaptığı 590 nakil hastasının analizinde nakil öncesi yüksek ferritin düzeylerinin ile sinüzoidal obstrüksiyon sendromunda orta derecede risk artışına yol açtığını gösterdiler (OR:1,7) (34). Altes ve ark. siklofosamid ve TBI ile kök hücre nakli yapılan 25 hastada nakil öncesi demir yüklerini değerlendirmişlerdir (31). Bu çalışmada çok yüksek transferrin saturasyonu (>%100) ile toplam sağkalımda azalma ve nakil sonrası komplikasyonlarda artış saptamışlardır (31). Kallianpur ve ark.'nın çalışmasında HKHN yapılan hematolojik maligniteli ve meme kanserli 168 hastada C282Y mutasyon sıklığı ve bu mutasyonun sinüzoidal obstrüksiyon sendromu ile ilişkisi incelenmiştir (64). Hemotolojik malignitelerdeki C282Y mutasyon sıklığı normal popülasyonla aynı bulunurken meme kanserli hastalardaki mutasyon sıklığı yüksek bulunmuştur (64). Bu çalışmada C282Y mutasyonu taşıyan hastalarda sinüzoidal obstrüksiyon sendromu gelişimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,015$). Aynı çalışmada demir parametreleri ile C282Y mutasyon sıklığı incelenmiş ve demir parametreleri üzerine mutasyonu anlamlı olarak etki etmediği, ancak demir depolarında göreceli olarak bir artma olduğu saptanmıştır (64).

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmanın amacı;

1. HKHN olmak için Gazi Üniversitesi HKHN Birimine başvuran hastalarda HFE geninin sıklığı,
2. HKHN yapılan hastaların demir parametreleri (ferritin, transferrin saturasyonu) ve hemokromatozis gen mutasyonlarının bu parametrelere etkisi,
3. Sinüzoidal obstrüksiyon sendromunun etyolojisinde rol oynayabileceği öne sürülen hemokromatozis gen mutasyonlarının SOS'a ve ilk 100 gün sağkalımına etkisi,
4. Sinüzoidal obstrüksiyon sendromunun etyolojisinde risk faktörü olarak belirtilen serum ferritini ve diğer biyokimyasal demir parametreleri ile SOS arasındaki ilişkinin incelenmesi hedeflenmiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Hastalar

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan onay alındıktan sonra, Kök Hücre Nakli Biriminde HKHN yapılan 93 hastada ileriye dönük olarak yapılmıştır. Çalışmaya 2006-2008 yılları arasında kök hücre nakli yapılan ve çalışmaya katılmak için bilgilendirilmiş onam formu dolduran hastalar dahil edilmiştir. Yirmi Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), 28 Akut Myelositik Lösemi (AML), 11 Hodgkin Hastalığı (HD), 7 Hodgkin dışı Lenfoma (HDL), 13 Multiple Myelom (MM), 4 Myelodisplastik Sendrom (MDS), 2 Kronik Myeloid Lösemi (KML), 1 Talasemi Major ve 7 ağır Aplastik Anemi (AA) tanıları olan 93 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların 24'üne otolog HKHN, 69'una ise allojenik HKHN uygulanmıştır. Hastaların 26'sı (%28) kadın, 67'si (%72) erkekti. Hastaların ortalama yaşları $33,3 \pm 1,3$ /yıl olarak saptanmıştır. Hastalar HKHN sonrasında SOS gelişimi ve ilk 100 günlük sağkalım açısından prospektif olarak değerlendirilmişlerdir. SOS tanısı için Seattle kriterleri kullanılmıştır (10,12,43).

5.2. HFE Gen Analizi

5.2.1. Örnek Toplanması

Çalışmaya katılan hastalardan nakil öncesi spina iliaka posterior superiordan yapılan kemik iliği aspirasyonundan 2 ml kemik iliği örneği EDTA'lı tüpe ayrılarak -80 °C'de saklandı.

5.2.2. DNA İzolasyonu

Hastalardan toplanan EDTA'lı tüpteki örneklerden Heliosis yöntemi ile (Metis Biyoteknoloji, Ankara) DNA izolasyonu yapıldı. DNA örneklerinin spektrofotometrik yöntemle 260 ve 280 nm'lik dalga boylarında optik dansite ölçümleri gerçekleştirildi.

5.2.3. PCR ve Restriksiyon enzimleri ile kesim

Elde edilen DNA ile HFE genine ait H63D ve C282Y bölgelerine ait aşağıda belirtilen primer dizileri ile reaksiyon şartlarına göre çoğaltıldı.

i. Primer dizileri:

H63D mutasyonu için:

forward: 5'-ACATGGTTAAGGCCTGTTGC-3'

reverse: 5'-GCCACATCTGGCTTGAAATT-3'

C282Y mutasyonu için:

forward: 5'-TGCCAAGGGTAAACAGATCC-3'

reverse: 5'-CTCAGGCACTCCTCTCAACC-3'

ii. Reaksiyon şartları: 16µl distile su, 2 µl PZR tamponu, 1,5 µl MgCl₂, 0,3 µl dNTP, 0,5µl çoğaltılmak istenilen primer, 0,2µl Taq DNA polimeraz, 4,5µl DNA ile her bir ependorf için toplan hacim 25µl olacak şekilde karışımlar hazırlandı. Bu reaksiyonlar hem H63D hem de C282Y mutasyonlarını içeren primerler için ayrı ayrı tekrar edildi.

Bu karışımlar PZR programında 35'er döngü bekletildi (şekil.14).

PZR programı H63D için;

94°C'de 2 dakika

94°C'de 1 dakika

60°C'de 1 dakika

72°C'de 1 dakika

72°C'de 5 dakika

PZR programı C282Y için;

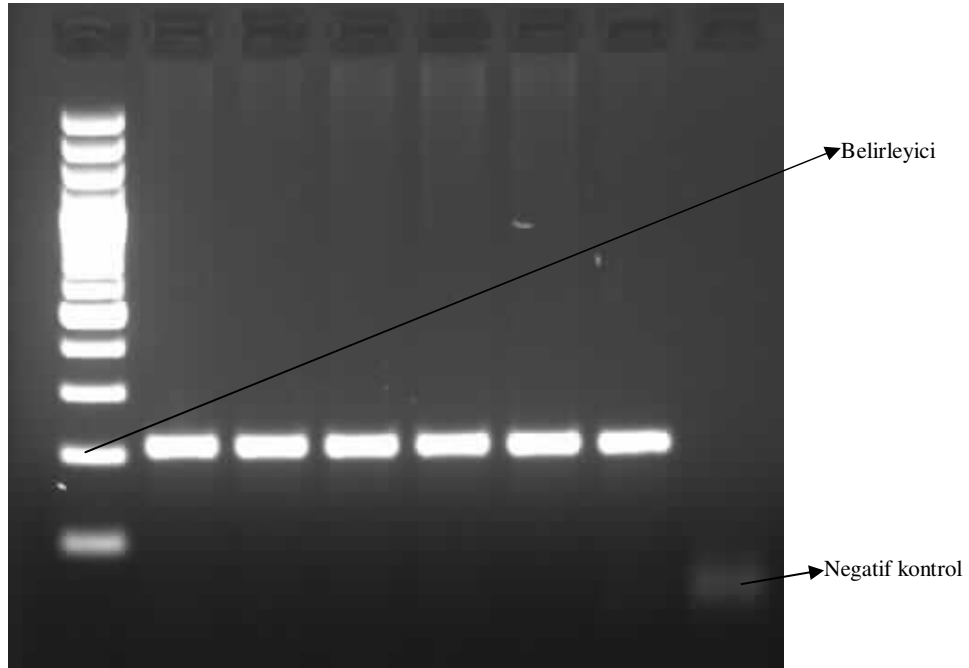
94°C’de 2 dakika

94°C’de 1 dakika

62°C’de 1 dakika

72°C’de 1 dakika

72°C’de 5 dakika



Şekil 14. Bir grup hastanın PZR programından çıkan jel görüntüleri (belirleyici 100bp’dedir).

1 gece 37°C’de H63D mutasyonunu için Bcl 1 restriksiyon enzimi ile, C282Y mutasyonunu için Rsa 1 restriksiyon enzimi ile kesimine bırakıldıktan sonra %3’lik agaroz jel elektroforezinde 120 V’da 45 dakika yürütülerek H63D ve

C282Y mutasyonları heterozigot, homozigot veya yabanıl tip olarak belirlenmiştir.

5.3. Biyokimyasal Analizler

Kök hücre naklinden öncesinde tüm hastalarda rutin olarak değerlendirilen standart otoanalizör ile ölçülen alanin aminotransferaz (AST; üst limit: 40 IU/l), aspartat aminotransferaz (AST; üst limit: 40 IU/l), alkalen fosfataz (ALP; üst limit: 140 IU/l), gamaglutamil peptidaz (GGT; üst limit: 50 IU/l), total bilirubin (üst limit: 1,3 mg/dl), direkt bilirubin (üst limit: 0,5 mg/dl), Serum demiri (referans aralığı: 25-156 ug/dl), serum demir bağlama kapasitesi (referans aralığı: 135-526 ug/dl), transferrin saturasyonu (%), ferritin düzeyleri (referans aralığı: 21-274 ng/ml) ve HBV antikorları kaydedilmiştir.

5.4. İstatistiksel Yöntemler

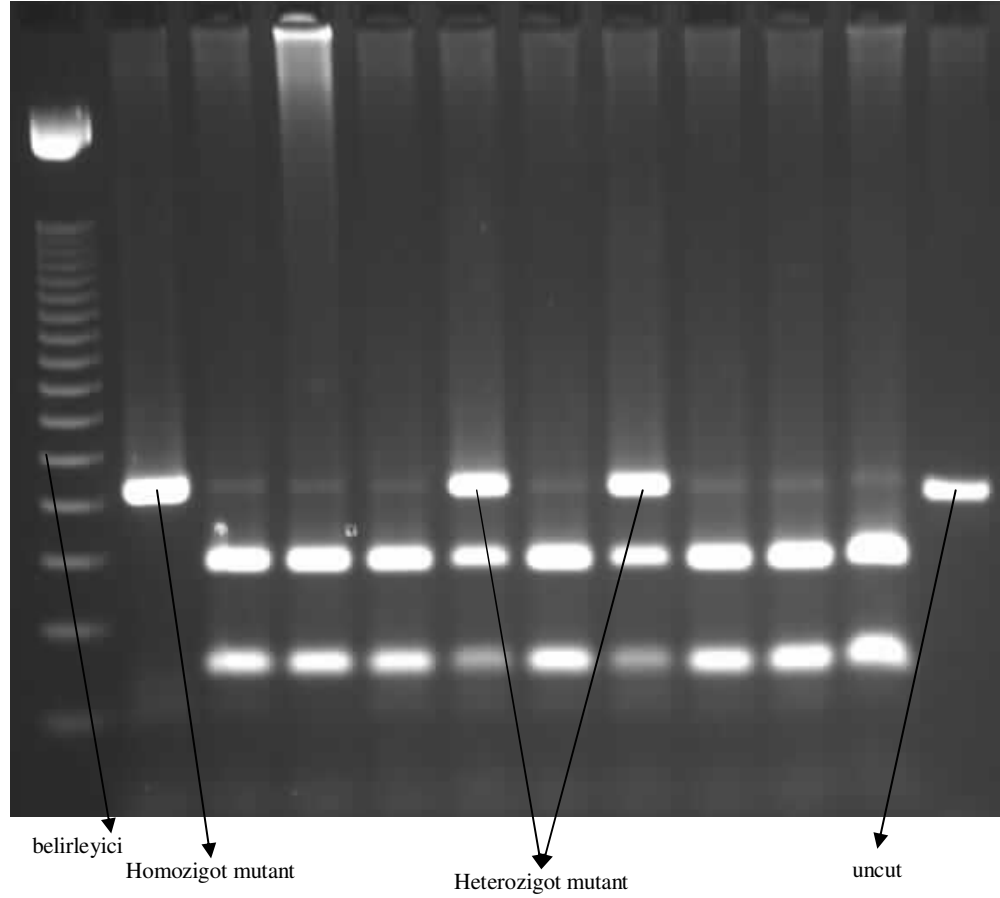
Verilerin istatistiksel analizinde Windows için SPSS 16.0 versiyon programı kullanıldı. HKHN yapılan hastalardaki kategorik değişkenler *ki-kare testi* veya *Fischer exact testi* ile karşılaştırıldı. Parametrik değişkenler dağılım şekline göre *Student t testi* veya *Mann Whithney U testi* ile karşılaştırıldı. SOS risk faktörlerini belirlemek amacı ile *çok değişkenli lojistik regresyon analizi* yapıldı. Sağkalım analizi *Kaplan-Meier* yöntemi ile yapıldı. Toplam sağkalımla ve transplant ilişkili mortalite ile ilişkili risk faktörlerinin araştırılmasında *Cox regresyon analizi* kullanıldı.

6. BULGULAR

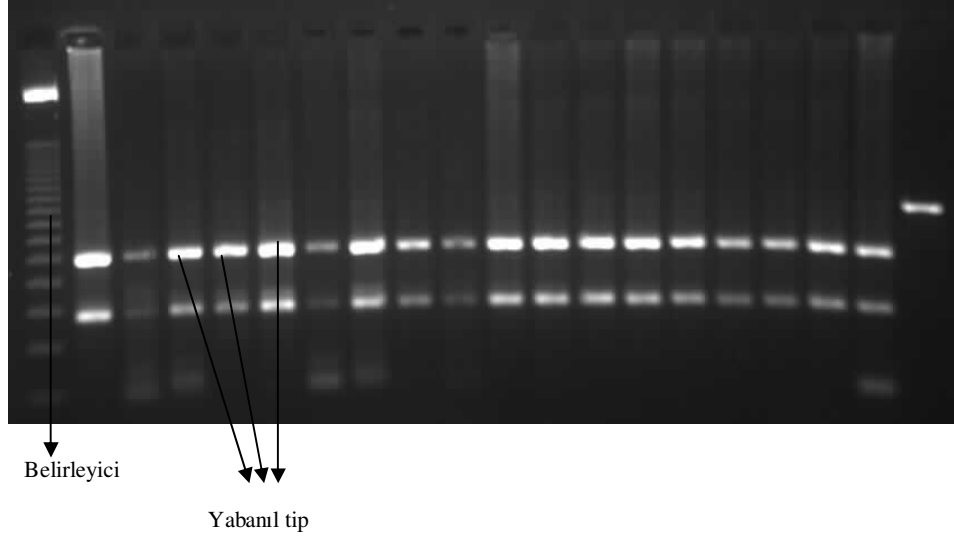
Çalışmaya alınan 93 hastanın 26'sı (%28) kadın, 67'si (%72) erkekti. Hastaların yaş ortalamaları $33,4 \pm 1,3$ /yıl olarak bulundu. Çalışmaya alınan hastaların 20'sinde (%21,5) ALL, 28'inde (%30,1) AML, 11'inde (%11,8) HD, 7'sinde (%7,5) HDL, 13'ünde (%14) MM, 4'ünde (%4,3) MDS, 2'sinde (%2,2) KML, 1'inde (%1,1) Talasemi Major ve 7'sinde (%7,5) ağır AA tanıları bulunmaktadır. Hastaların 24'üne (%25,8) otolog HKHN, 69'una (%74,2) allojenik HKHN yapılmıştır. Otolog HKHN yapılan olguların 5'i kadın (%20,8), 19'u erkek (%79,2) ve yaş ortalamaları $41,8 \pm 2,7$ /yıl olarak bulunmuştur. Allojenik HKHN yapılan olguların 20'si kadın (%29), 48'i erkek (%71) ve ortalama yaşları $30,4 \pm 1,4$ /yıl olarak bulunmuştur. Hastaların Karnofsky performansı 64'ünde (%88,6) %90, 20'sinde (%21,5) %80, 7'sinde (%7,5) %70, 1'inde (%1,1) %50 ve 1'inde (%1,1) %40 hesaplandı. Hazırlık rejimi olarak 38 hastada (%40,9) Busulfan ve siklofosfamid, 12 hastada (%12,9) TBI ve Siklofosfamid, 10 hastada (%10,8) BEAM (karmustin, etoposid, sitarabin ve Melfelan), 6 hastada (%6,5) Fludarabin ve Melfelan kullanılmıştır. Hazırlama rejimine göre allojenik myeloablative HKHN 49 hastaya (%52,7) ve allojenik nonmyeloablative HKHN 20 hastaya (%21,5) yapılmıştır. Otolog HKHN yapılan hastaları median takip süresi 100 gün (min:12-max:100), allojenik HKHN yapılan hastaların median takip süresi 100 gün (min:10-max:100) saptanmıştır. Hastaların cinsiyet, yaş, tanıları, Karnofsky performans durumları ve hazırlama rejimlerine göre özellikleri Tablo 4'de görülmektedir.

Hastaların H63D yabancı tip, heterozigot mutant ve homozigot mutant genotiplerine göre sıklıkları sırası ile %75,3, %23,7, %1,1 idi. H63D allel sıklığı

%24,8 saptanmıştır (Tablo 5). Hastaların hiçbirinde Hemokromatozis C282Y mutasyonu saptanmamış olup tüm hastalar yabanıl tiptir (Tablo 5). Bir grup hastanın H63D için %3'lük agaroz jel görüntüleri şekil.15'de C282Y yabanıl tip %3'lik agaroz jel görüntüleri şekil.16'da gösterilmektedir.



Şekil 15. Bir grup hastanın H63D mutasyonu için %3'lük agaroz jel görüntüleri (22 hastada heterozigot mutasyon ve 1 hastada homozigot mutasyon saptanmış olup diğer 70 hasta yabanıl tiptir) (DNA belirleyici 50bp'dir).



Şekil 16. Bir grup hastanın C282Y mutasyonu için %3'lük agaroz jel görüntüleri, tüm hastalar C282Y mutasyonu için yabanıl tiptir. (DNA belirleyici 50bp'dir).

H63D heterozigot mutasyonu 13 ALL hastasında (%14), 8 AML hastasında (%8,6), 1 HD'da, 4 MM hastasında (%4,3), 1 MDS hastasında, 1 ağır AA'li hastada ve 1 KML hastasında saptanmıştır. H63D homozigot mutasyonu ise 1 ALL hastasında saptanmıştır. Olgular tanılarına göre birbirleri ile karşılaştırıldığında H63D mutasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Tanılarına göre H63D sıklıkları tablo 6'da gösterilmektedir.

HKHN öncesi ferritin değeri $1366,6 \pm 2890$ ng/ml, serum demiri $96,8 \pm 77,2$ ug/dl, FeBK $259,4 \pm 63,7$ ug/dl, TS $\%39,2 \pm 30$ bulunmuştur. HKHN öncesi AST $24,9 \pm 18,5$ U/l, ALT $34,9 \pm 34,7$ U/l, ALP $120,8 \pm 74,8$ U/l, GGT $54,4 \pm 67$ U/l bulunmuştur. HKHN öncesi serum demir parametrelerinin ve

karaciğer enzimlerinin allojenik, otolog ve tüm HKHN yapılan hastalara göre dağılımı Tablo 7’de gösterilmektedir.

HKHN yapılan hastalarda HFE gen mutasyonunun serum demir parametrelerine ve karaciğer enzimlerine etkisi C282Y mutasyonu hiçbir hastada saptanmadığı için yalnızca H63D için değerlendirilmiştir. H63D alleli bulunan hastalarda serum demiri $97\pm66,2\mu\text{g/dl}$, FeBK $257,5\pm61,6\mu\text{g/dl}$, TS $\%39,3\pm27,7$, ferritin $1270\pm1286\text{ng/ml}$ saptanmıştır. H63D mutasyon varlığının demir parametreleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye bulunmadığı saptanmıştır ($p>0,05$) (Tablo 8). Aynı parametreler allojenik ve otolog HKHN yapılan hastalarda ayrı ayrı değerlendirildiğinde de H63D mutasyon varlığının demir parametrelerine etki etmediği bulunmuştur. Yalnızca, Otolog HKHN yapılan hastalarda H63D mutasyonu olanlarda serum demiri, H63D mutasyonu olmayan hastalardan daha fazla bulunmuştur ve burada saptanan p değeri 0,08 olup anlamlılık düzeyine yakındır (Tablo 9). H63D mutasyonu bulunan hastalarda HKHN öncesi AST $25,3\pm17,7\text{U/l}$, ALT $32,4\pm20,9\text{U/l}$, ALP $113,5\pm57,9\text{U/l}$, GGT $39,7\pm34,4\text{U/l}$ saptanmıştır. H63D mutasyon varlığının HKHN öncesi karaciğer enzimleri üzerine anlamlı bir etkiye bulunmadığı saptanmıştır ($p>0,05$) (Tablo 8). H63D mutasyon varlığı ile HKHN öncesi karaciğer enzimlerindeki değişiklikler allojenik ve otolog HKHN yapılan hastalar için ayrı ayrı değerlendirildiğinde de H63D mutasyonunun, HKHN öncesi karaciğer enzimleri üzerien etkisinin olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo 9).

Çalışmamızda SOS 20 hastada izlenmiştir. SOS gelişen olguların 4’ü (%20) kadın ve 16’sı (%80) erketir. SOS izlenen olguların yaş ortalaması

28,5±11,6/yıl, SOS izlenmeyen olguların yaş ortalaması 31,18±11,34/yıl bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo 10). Hazırlama rejimi olarak Bu-Cy 34 hastada, TBI-Cy 12 hastada kullanılmıştır. Bu iki rejim diğerlerinden anlamlı derecede farklı olarak SOS gelişiminde rol oynamaktadırlar ($p=0,02$). SOS gelişen hastalar hazırlık rejimi bakımından değerlendirildiğinde olguların 8'inin (%40) TBI aldığı, 12'sinin ise (%60) almadığı görülmüştür. SOS izlenmeyen ve hazırlama rejiminde TBI alan 6 olgu (%13) ve TBI almayan 43 olgu (%87) bulunmaktadır. Hazırlama rejiminde TBI bulunması SOS gelişimi için risk faktörü olarak saptanmıştır ($p=0,02$) (Tablo 10). SOS; hazırlama rejiminde Busulfan alan 10 hastada (%50), almayan 10 hastada (%50) izlenmiştir. SOS izlenmeyen ve hazırlama rejiminde Busulfan alan 34 olgu (%69) ve Busulfan almayan 15 olgu (%31) bulunmaktadır. Hazırlık rejiminde Busulfan bulunması SOS gelişiminde risk faktörü olarak saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 10).

SOS gelişen hastaların 17'si (%85,6) myeloablatif hazırlık rejimi almıştır, 3 hasta ise nonmyeloablatif hazırlık rejimi almıştır (%14,4). SOS izlenmeyen ve myeloablatif rejim uygulanan 32 olgu (%65) ve nonmyeloablatif rejim uygulanan 17 olgu (%35) bulunmaktadır. Myeloablatif hazırlık rejimi uygulanan hastalarda SOS gelişimindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,08$) (Tablo 10).

SOS otolog HKHN yapılan hiçbir olguda görülmemiştir. Allojenik HKHN yapılan olguların %28,9'unda SOS gözlenmiştir. Allojenik HKHN olan hastalarda otolog HKHN olan hastalara göre SOS gelişmesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$) (Tablo 10, Tablo 11).

HKHN öncesi hepatosteatoz olan hastaların hiçbirinde SOS görülmemiştir.

Hepatit B pozitif olan 4 olguya (1'ine otolog, 3'üne allojenik) HKHN yapılmıştır. Hepatit B pozitif olan 3 hastanın 2'sinde SOS görülmüştür fakat Hepatit B negatif hastalar ile karşılaştırıldığında SOS gelişimi açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 10).

Hastaların nakil öncesi değerlendirilen performans durumları ile SOS gelişen ve gelişmeyen hastalar arasında farklı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 10).

Allojenik HKHN yapılan hastalarda abdominal bölgeye RT alan hasta olmadığı için SOS risk faktörü içinde değerlendirilememiştir.

SOS izlenen olguların şiddetine göre dağılımları Tablo 11'de gösterilmiştir. SOS gelişen 20 olgunun 7'sinde (%35), grade 1 SOS, 3'ünde (%15) grade 2 SOS ve 10'unda (%50) grade 3 SOS izlenmiştir.

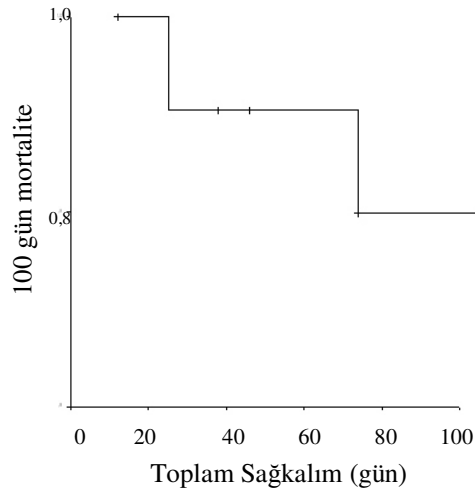
SOS gelişen olguların %35'i ALL, %15'i AML, %0,5'i HDL, %0,5'i KML ve %1'i ağır AA'dir. SOS gelişimi hastaların tanılarına göre incelendiğinde ALL'li hastalarda anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır ($p=0,003$) (Tablo 12).

SOS gelişen hastaların maksimum total bilirübin değeri; $4,9\pm 2,1$ gr/dl ve maksimum direk bilirübin değerleri $3,7\pm 1,6$ gr/dl bulunmuştur.

SOS otolog HKHN yapılan hiçbir olguda izlenmediği için H63D mutasyonu ile SOS arasındaki ilişki allojenik HKHN yapılan hastalarda incelenmiştir. Bununla birlikte hiçbir hastada C282Y mutasyonu izlenmediği için SOS ile C282Y mutasyonu arasındaki ilişki incelenememiştir. Allojenik HKHN yapıp SOS gelişen olguların %70'inde yabanıl tip, %25'inde heterozigot mutant ve %5'inde homozigot mutant H63D mutasyonu saptanmıştır. SOS gelişen ve

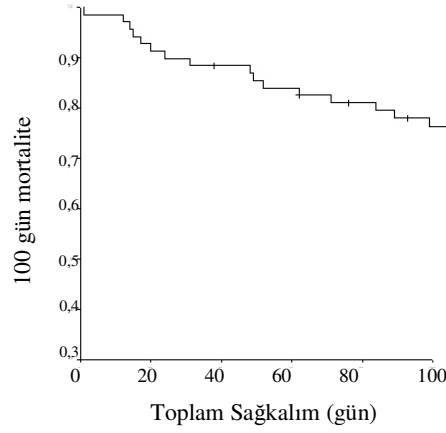
gelişmeyen olgularda H63D mutasyonu açısından farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 13). Normal genotipe sahip hastaların %15'inde Grade 2 ve 3 SOS gelişmiştir. Heterozigot mutant ve homozigot mutant olan hastalarda gelişen Grade 2 ve 3 SOS sıklığı sırası ile %25 ve %100'ür. Şiddetli SOS gelişimi ile H63D mutasyonu arasında anlamlılık derecesine yakın p değeri elde edilmiştir ($p=0,07$) (Tablo 14).

İlk 100 günde otolog HKHN yapılan 3 hasta (%12,5) ve allojenik HKHN yapılan 30 hasta (%43,5) kaybedilmiştir. Otolog transplant ilişkili mortalite 1 hastada (%4,2) izlenirken, allojenik transplant ilişkili mortalite 19 hastada izlenmiştir (%27,5). Otolog HKHN yapılan hastalarda 100 günde %89,85 sağkalım olasılığı vardır (Şekil.17).



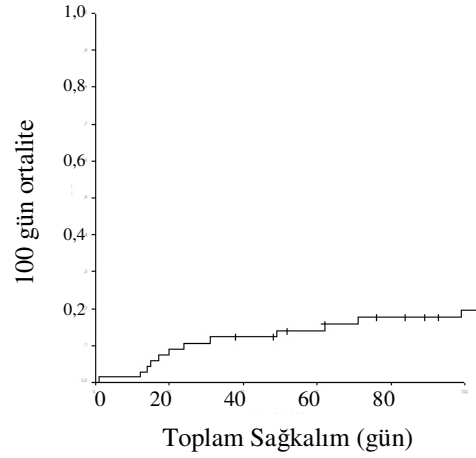
Şekil.17. Otolog HKHN yapılan hastalarda 100 günlük sağkalım eğrisi

Allojenik HKHN yapılan hastalarda 100 günde %76,4 sağkalım olasılığı vardır (Şekil.18).



Şekil 18. Allojenik HKHN yapılan hastalarda 100 günlük sağkalım eğrisi

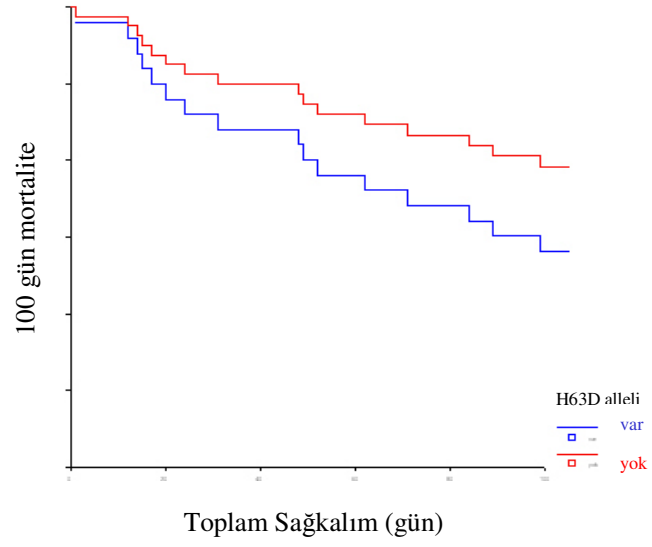
100 günde transplant ilişkili mortalite otolog HKHN yapılan hastalarda %4,7 ve allojenik HKHN yapılan hastalarda %17,8 saptanmıştır (Şekil.19).



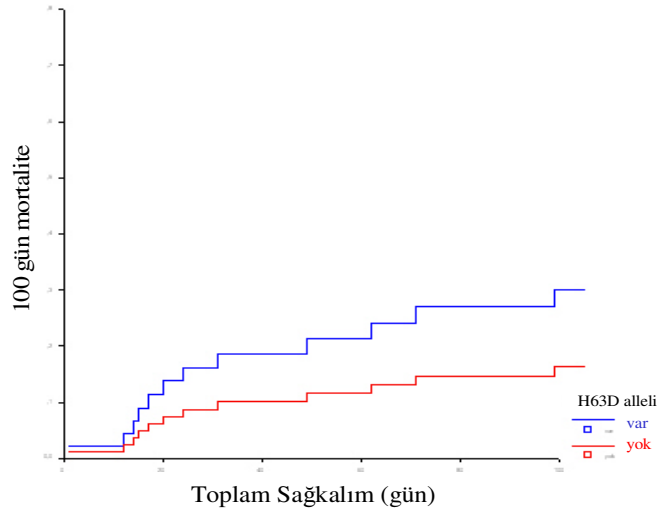
Şekil 19. Allojenik HKHN yapılan hastalarda 100 günlük transplant ilişkili mortalite

Otolog HKHN transplant ilişkili mortalite yalnızca 1 hastada olduğu için sağkalım ve transplant ilişkili mortalite ile ilgili istatistiksel analiz yapılamadı.

Allojenik HKHN yapılan hastalarda H63D allel varlığının sağkalıma etkisi gösterilemedi ($p>0,05$) (Şekil.20). Allojenik HKHN yapılan hastalarda transplant ilişkili mortalite ile H63D allel varlığı arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil.21). Allojenik HKHN yapılan hastalarda HKHN öncesi ferritin yüksekliği, ilk 100 gün sağkalıma etki etmektedir ($p=0,003$). Allojenik HKHN yapılan hastalarda serum ferritin yüksekliği transplant ilişkili mortaliteyi etkilemektedir ($p=0,004$).



Şekil 20. Allojenik HKHN yapılan hastalarda H63D allel varlığının ilk 100 gün toplam sağkalımla ilişkisi ($p>0,05$)



Şekil 21. Allojenik HKHN yapılan hastalarda H63D allel varlığının transplant ilişkili ilk 100 gün mortaliteye etkisi ($p>0,05$)

SOS gelişen olgularda HKHN öncesi serum demiri $119,8 \pm 78 \mu\text{g/dl}$ FeBK $232 \pm 66,74 \mu\text{g/dl}$ ve TS $\%57,3 \pm 36,1$ saptanmıştır. SOS gelişen olgularla gelişmeyen olgular karşılaştırıldığında FeBK düşük, TS yüksek saptanmıştır, istatistiksel olarak $p=0,05$ 'dir (Tablo 15). SOS gelişen olgularda HKHN öncesi ferritin $3051 \pm 5801,8 \text{ ng/ml}$, gelişmeyenlerde $1081 \pm 946,7 \text{ ng/ml}$ saptanmıştır. HKHN öncesi ferritin değeri SOS gelişimi için risk faktörü olarak bulunmuştur ($p=0,009$) (Tablo 15). SOS gelişen olgularda HKHN öncesi AST $32,5 \pm 23,3 \text{ U/l}$, ALP $145,9 \pm 96,5 \text{ U/l}$ saptanmıştır. SOS gelişen ve gelişmeyen olgular karşılaştırıldığında HKHN öncesi AST ve ALP değerleri ile SOS gelişimi arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 15). SOS gelişen olgularda HKHN öncesi ALT $46,4 \pm 32,8 \text{ U/l}$, gelişmeyenlerde $31,6 \pm 22,8 \text{ U/l}$ saptanmıştır. HKHN öncesi bakılan ALT değeri SOS gelişiminde bir risk faktörü olarak bulunmuştur ($p=0,03$) (Tablo 15). SOS gelişen olgularda HKHN öncesi GGT $71,4 \pm 71,2$ ve gelişmeyenlerde $55,3 \pm 77,9$ saptanmıştır. HKHN öncesi GGT düzeyi SOS gelişimi için bir risk faktörü olarak bulunmuştur ($p=0,04$) (Tablo 15).

SOS gelişimini etkileyen faktörlerden tanı, TBI, HKHN öncesinde ferritin değeri, ALT değeri, GGT değeri logistik regresyon analizinde incelendi. Hazırlama rejiminde TBI bulunması ve serum ferritin değerinin HKHN öncesinde yüksek olması SOS gelişimi açısından diğer parametrelerden bağımsız bir risk faktörü olarak bulundu (sırası ile $\text{OR}=1,0001$ ve $\text{OR}=6,93$) (Tablo 16).

7. TABLOLAR

Tablo 4. Hastaların temel tanımlayıcı istatistik değerleri, tanılarına göre hastaların dağılımları, performans durumları ve aldıkları hazırlık rejimleri.

	Tüm HKHN yapılan hastalar n=93	Otolog n=24	Allojenik n=69	
			Myeloablative n=49	Non myeloablative n=20
Cinsiyet (n/%)				
• Kadın	26/28	5/20,8	14/28,6	7/35
• Erkek	67/72	19/79,2	35/71,4	13/65
Yaş /yıl (ortalama±SS)	33,4±1,3	41,8±2,7	30,6±1,5	29,95±3
Tanı (n/%)				
• AML	28/30,1	4/ 16,7	22/44,9	2/10
• ALL	20/21,5	-	20/40,8	-
• HD	11/711,8	7/29,2	-	4/20
• NHL	7/7,5	3/12,5	2/4,1	2/10
• MM	13/14	10/41,7	-	3/15
• KML	2/2,2	-	1/2	1/5
• MDS	4/4,3	-	4/8,2	-
• Ağır AA	7/7,5	-	7/35	-
• Talasemi major	1/1,1	-	-	1/5
Karnofsky (n/%)				
• %40	1/1,1	1/4,2	-	-
• %50	1/1,1	1/4,2	-	-
• %70	7/7,5	1/4,2	4/8,2	2/10
• %80	20/21,5	4/16,7	12/24,5	4/20
• %90	64/88,6	17/70,8	33/67,3	14/70
Hazırlama rejimi				
• Bu-Cyc*	38/41	4/16,7	34/69,4	-
• TBI-Cyc**	12/12,9	-	12/24,5	-
• Melfelan	10/10,8	10/41,7	-	-
• BEAM	10/10,8	10/41,7	-	-
• Bu-Cyc-Flu***	6/6,5	-	-	6/30
• Flu-Melfelan	6/6,5	-	-	6/30

*Bu-Cyc: Busulfan ve Siklofosamid

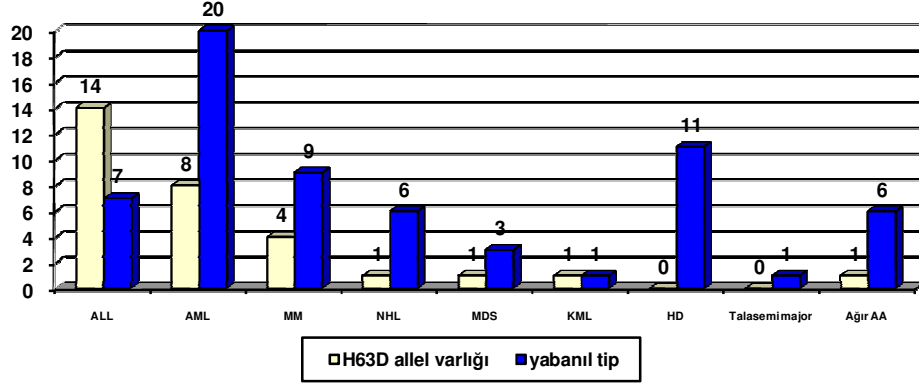
**TBI-Cyc: Tüm beden ışınlaması ve siklofosamid

***Bu-Cyc-Flu: Busulfan, Siklofosamid ve Fludarabin

Tablo 5. Hastaların hemokromatozis gen mutasyonlarına göre sıklık dağılımı

n=93	H63D n/%	C282Y n/%
Yabancıl tip	70/75,3	93/100
Heterozigot mutant	22/23,7	-
Homozigot mutant	1/1,1	-

Tablo 6. H63D mutasyonu olan ve olmayan hastaların tanılarına göre dağılımı



Tablo 7. HKHN öncesi demir yüklerinin ve karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesi

	Otolog (ortalama±SS)	Allojenik (ortalama±SS)	Tüm HKHN yapılan hastalar (ortalama±SS)
Fe (ug/dl)	51,9±26,1	112,4±83	96,8±77,2
FeBK (ug/dl)	270,5±56	255,5±66	259,4±63,7
TS (%)	20,3±11,7	45,8±31,7	39,25±30
Ferritin (ng/ml)	545,8±622,6	1652,2±3293,7	1366,6±2890
AST (U/l)	21,8±15,3	25,9±19,5	24,9±18,5
ALT (U/l)	31,9±52	35,8±26,7	34,9±34,7
ALP (U/l)	115,5±79,8	112,6±73,5	120,8±74,8
GGT (U/l)	34,5±19,5	59,9±75,8	53,4±67

Tablo 8. HKHN yapılan hastalarda H63D mutasyonu olan ve olmayanların demir yükü ve karaciğer enzimlerinin karşılaştırılması

	H63D alleli var	H63D alleli yok	P değeri
Fe (ug/dl)	97±66,2	96,6±81	>0,05
FeBK (ug/dl)	257,5±61,6	260±64,8	>0,05
TS (%)	39,3±27,7	39,2±31	>0,05
Ferritin (ng/ml)	1270±1286,4	1398,3±3256	>0,05
AST (U/l)	25,3±17,7	24,7±18,9	>0,05
ALT (U/l)	32,4±20,9	35,6±38,4	>0,05
ALP (U/l)	113,5±57,9	123,2±79,8	>0,05
GGT (U/l)	39,7±34,4	57,8±74,2	>0,05

Tablo 9. Hematopoetik kök hücre nakli yapılan allojenik ve otolog olgular arasında H63D mutasyonu olan ve olmayanların demir yükü ve karaciğer enzimlerinin karşılaştırılması

	Allojenik		Otolog	
	H63D alleli var	H63D alleli yok	H63D alleli var	H63D alleli yok
Fe (ug/dl)*	107,3±71,5	114±87	68±39,2	46,5±18,7
FeBK (ug/dl)	247,3±60,2	258,2±68,2	286,5±61,1	265,2±55
TS (%)	44,4±29,4	46,3±32,7	24,8±16,1	18,7±9,8
Ferritin (ng/ml)	1572,5±1360,4	1678,2±3725,7	414,6±411,8	589,5±683
AST (U/l)	27±20,1	25,6±19,5	20,5±7,7	22,3±17,2
ALT (U/l)	34,5±22,3	36,3±28,2	26,3±16,6	33,8±59,7
ALP (U/l)	117,7±47,7	124,3±80,5	101,6±85	120,1±80
GGT (U/l)	43,1±4	65,4±84,1	30±14	36±21,2

Tüm p değerleri >0,05'dir

*Otolog HKHN yapılan hastaların H63D mutasyonu olanlar ile olmayanlar arasındaki Fe karşılaştırmasında p=0,08 bulunmuştur.

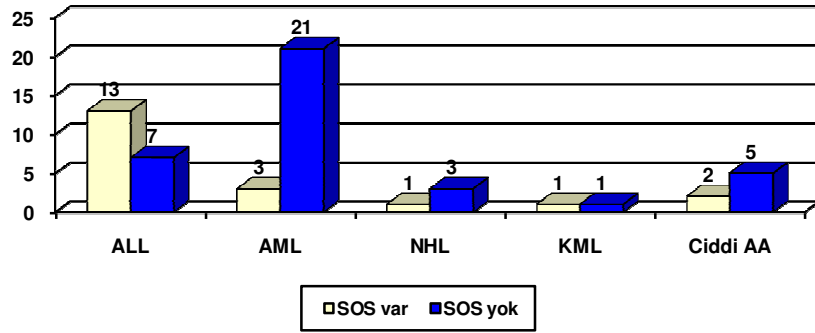
Tablo 10. Hematopoetik Allojenik kök hücre nakli yapılan hastalarda sinüzoidal obstrüksiyon sendromu risk faktörleri açısından dağılım

	SOS		P değeri
	Var n=20	Yok n=49	
Cinsiyet (n/%)			
• Kadın	4/20	17/34	0,1
• Erkek	16/80	32/66	
TBI (n/%)			
• Alan hastalar	8/40	6/13	0,02
• Almayan hastalar	12/60	43/87	
Busulfan (n/%)			
• Alan hastalar	10/50	34/69	0,17
• Almayan hastalar	10/50	15/31	
Nakil tipi (n/%)			
• Allojenik	20/100	49/100	0,001
• Otolog	-	24	
Hazırlama rejimi (n/%)			
• Myeloablatif	17/85,6	32/65	0,08
• Nonmyeloablatif	3/14,4	17/35	
Hepatosteatoz (n/%)			
• Var	-	2/4	0,5
• Yok	20/100	47/96	
Hepatit B (n/%)			
• pozitif	2/10	1/2	0,19
• negatif	18/90	48/98	
Karnofsky performans durumu	Ortanca:90 Min:70 Max:90	Ortanca:90 Min:70 Max:90	0,17
Yaş (ortalama±SS)	28,55±11,6	31,18±11,34	0,1

Tablo 11. Hastaların sinüzoidal obstrüksiyon sendromu oluşumu ve şiddeti açısından değerlendirilmesi

	Otolog n=24	Allojenik n=69	
		Myeloablative n=49	Nonmyeloablative n=20
SOS var (n/%)	-	17/34,7	3/15
• Grade 1	-	6/12,2	1/5
• Grade 2	-	2/4,1	1/5
• Grade 3	-	9/18,4	1/5
SOS yok (n/%)	24	32/65,3	17/85

Tablo 12. Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu olan hastalarda tanılarına göre dağılımı



Tablo 13. Allojenik HKHN yapılan ve SOS gelişen hastalarda, Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu ile H63D mutasyonu arasındaki ilişki

		SOS	
		var	yok
63D	Yabamlı tip (n/%)	14/70	38/77,5
	Heterozigot mutant (n/%)	5/25	11/22,5
	Homozigot mutant (n/%)	1/5	-
	Toplam	20	49

* H63D sıklığı SOS olan ve olmayanlar arasında farklı bulunmadı (p>0,05)

Tablo 14. Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu şiddeti ile H63D mutasyonu arasındaki ilişki

		Grade 0 ve 1	Grade 2 ve 3	Toplam
H63D	Yabamlı tip	44	8	52
	Heterozigot mutant	12	4	16
	Homozigot mutant	0	1	1

*H63D allel varlığı ile SOS şiddeti arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0,07).

Tablo 15. Sinüzoidal obstriksiyon sendromu gelişen olgularda HKHN öncesi demir yükünün ve karaciğer enzimlerinin değerlendirilmesi

	SOS		<i>P değeri</i>
	Var (ortalama±SS)	Yok (ortalama±SS)	
Fe (ug/dl)	119,8±78	109,3±85,6	
FeBK (ug/dl)	232±66,7	265,1±64	0,05
TS (%)	57,3±36,1	41,2±28,8	0,05
Ferritin (ng/ml)	3051±5801,8	1081,3±946,7	0,009
AST (U/l)	32,5±23,3	23,3±17,4	0,05
ALT (U/l)	46,4±32,8	31,6±22,8	0,03
ALP (U/l)	145,9±96,5	113,2±60,4	0,09
GGT (U/l)	71,4±71,2	55,3±77,9	0,04

Tablo 16. Sinüzoidal obstriksiyon sendromu gelişen olgularda HKHN öncesi SOS oluşuma katkıda bulunan değerlerin logistik regresyon analiz tablosu

	β	P değeri	Olasılık Oranı (OR)
Tam	0,025	0,8	1,02
TBI	1,93	0,012	6,93
Ferritin	0,001	0,034	1,001
ALT	0,018	0,18	1,01
GGT	0,004	0,5	0,99

8. TARTIŞMA VE SONUÇ

Artmış demir yükü HKHN hastalarında sık görülen bir komplikasyondur. Transplantasyon sonrası erken dönemde enfeksiyon, SOS, GVHH ve karaciğer disfonksiyonu riski artmakla beraber (34,125), uzun dönemdeki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Talasemi ve orak hücre anemili hastalardan elde edilen deneyim uzun süregelen demir birikiminin kalp ve karaciğer gibi parankimal organların fonksiyonlarını önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Demir birikimi bu hastaların kalp yetmezliği ve siroz gibi ölümcül komplikasyonlardan kaybedilmesine neden olabilmektedir (125,131). Transplant adayı hastalarda demir birikimi; inefektif eritropoez, transfüzyonlar, kemoterapiden kaynaklanan doku zedelenmesi ile demirin açığa çıkması, hemoliz gibi nedenlerden kaynaklandığı gibi, mukozit de gastrointestinal mukoza hücrelerinden demir emilimini arttırmaktadır (17,27,28,29,30,121,123). Demir homeostazisinde rol oynayabilecek diğer bazı faktörler demir birikim riskini daha da arttırabilir. Batı toplumlarının en sık görülen genetik hastalığı HFE gen mutasyonu ve bu mutasyon sonucu gelişen Herediter Hemokromatozis bu riski arttırabilir (90). Bu çalışmada da HKHN adayı bir grup hastada transplant öncesi çalışılan HFE mutasyonları ile gelişebilecek komplikasyonlardan birisi olan SOS ve ilk 100 gün sağkalımı açısından prospektif olarak değerlendirme yapılmıştır.

8.1. Hemokromatozis Gen Mutasyon Sıklığı

Bugüne kadar Türkiye’de yapılan araştırmalarda C282Y mutasyonuna rastlanmamıştır (76,102,103,104,105,106,114). C282Y mutasyonunun 2000 yıl önce Keltik soyundan başladığı yapılan popülasyon çalışmaları sonucunda düşünülmektedir (14,109). Keltik bölgesi, Avrupa’nın Kuzeybatı kısmındaki

bölge olup İngiltere, İskoçya, İrlanda, Galler, Britanya ve Kuzey Fransıya içine almaktadır. Bu bölgede belirtilen C282Y homozigot 200 kişiden 12'sinde, heterozigot 10 kişiden 1'inde bulunmaktadır (14,21,23,37). H63D mutasyonu ise tüm dünyada görülmekle beraber en sık İspanya'nın Bask bölgesinde bulunmaktadır (23,102,101). Söz konusu H63D alleli Afrika, Asya Amerikalı yerlilerinde ise düşük sıklıkta görülmektedir (102). Türkiye'ye yakın bir coğrafi bölge olan Yunanistan'da C282Y mutasyonu görülmezken, H63D heterozigot mutasyon sıklığı %16,2, homozigot mutasyon sıklığı %0,75 ve H63D allel sıklığı ise %18 olarak bulunmuştur (132). Türkiye, Ortadoğu, Asya ve Avrupa'nın arasında yerleşmiş bir ülke olup farklı coğrafik bölgelerden göç eden farklı etnik unsurların harmanlandığı bir bölgedir. Türkiye'den bildirilen H63D allel sıklığı %11,7 - 42 arasında değişmektedir (76,103,104,102). Sunulan bu çalışmada H63D heterozigot mutasyon sıklığını 22/93 hastada (%23,7), homozgot mutasyon sıklığını ise 1/93 hastada (%1,1) ve H63D allel sıklığını ise %24,8 olarak saptadık.

Barut ve ark., artmış demir yükünü araştırmak amacı ile 158 hastada tarama yapmışlar ve TS>%50 olan 26 hastanın 1'inde homozigot H63D mutasyonu (%3,8), 11'inde ise heterozigot H63D mutasyonu (%42,3) saptamışlardır (76). Ankara Üniversitesinden Bozkaya ve ark. kan bağışlamak üzere Kan Bankasına başvuran 3060 gönüllüyü, hemokromatozis için taramaya aldılar (105). UIBC<28 olan ve TS >%45 olan 5 birey ve bunlardan 2'sinde H63D heterozigot mutasyon saptanmıştır (105). Hacettepe Üniversitesinden Şimşek ve ark. ise, kan bağışlamak için 2677 hastayı taramaya almışlar ve TS>%45 olan 57

bireyde ve TS<%45 olan 45 bireyde H63D allel sıklığını %24,7 saptamışlardır (103). Bu çalışmada H63D homozigot mutasyon sıklığı %7,6 olarak saptanmıştır. Merryweather-Clarke ve ark., HFE mutasyonu prevalans çalışması için birçok etnik grubun DNA'sını incelemişler ve Türk popülasyonunda H63D allel sıklığını $13,6 \pm 5,8$ olarak bulmuşlardır (102). Biz çalışmamızda normal popülasyon ile verilerimizi karşılaştırmak için rastgele seçilmiş bireylerin DNA'larının çalışıldığı Merryweather-Clarke ve ark. verilerinden faydalandık. Türkiye'den bildirilen ve Tablo 17'de özetlenen diğer çalışmaların Türkiye'nin normal popülasyonunu yansıtmadığını düşündük. Bu çalışmalarda bireyler TS >%45 olan demir yükü artmış bireylerden ve gönüllü kan bağışçılarından seçilmiştir. Kan bankası için gönüllüler sadece erkeklerden seçilmektedir. Bunun dışında bahsi geçen çalışmalar coğrafi olarak tek bir bölgede yapılmıştır. Türkiye coğrafi olarak Kafkasya, Anadolu, Ortadoğu gibi pek çok farklı bölgeden gelmiş, farklı etnik kökenlere sahip bir toplumdur. Tek bir bölgeden yapılan çalışmalar Türkiye'nin genel popülasyonunu yansıtmayabilir. Örneğin kistik fibrozisde, T1677delITA mutasyonunun Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde daha sık görülmektedir (133). Bu değerlendirmeler ışığında çalışmamızda bulduğumuz H63D allel sıklığı Türkiye'deki normal popülasyondan daha sıktır (24,8). Hematolojik maligniteli hastalardan oluşan çalışma grubumuzdaki bu artmış sıklık, sebep sonuç ilişkisi bakımından anlamlı bulunmuştur.

Tablo 17. Türkiye’de yapılan HFE gen mutasyon çalışmaları

Kaynak	Çalışılan bireyler	H63D heterozigot n/%	H63D homozigot n/%
Barut ve ark.	TS>50, n=26	11/42,3	1/3,8
Bozkaya ve ark.	TS>45 n=65	7/11,6	-
Şimşek ve ark.*	TS>45, n=57 TS<45, n=45	25/14,5 24/21	11/12,7 -
Merryweather- Clarke ve ark.	Normal popülasyon, n=70	15/17	2/2,3

*Bu çalışmada %95 birey erkektir.

HFE mutasyonları kliniğe vücutta fazla demir depolanması ve ROS üretiminde artış olarak yansımaktadır (13,98,107,109). Demirden ROS oluşumu esas itibarıyla Fenton reaksiyonu ile olur. Bu reaksiyon sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksitten hidroksil radikalleri oluşur. Oluşan Hidroksil radikalleri ile 8-hidroksigunin nükleik bazı reaksiyona girer. Oluşan bu oksidatif stres ve DNA ya olan etkiler teratojenite ve karsinojenite gelişmesi ile ilişkili gibi görünmektedir. Benzer şekilde bir diğer ROS’da lipid hidroksil peroksit (LOOH) olup, karsinojenite ve teratojenite ile yakından ilişkilidir (16,19). Demirin arttığı durumlarda lipid peroksidasyon ürünleri olan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE) artmış olarak bulunur (16,19). Sonuçta oluşan lipid bazlı radikaller, hidroksil radikaline göre daha uzun ömürlü olup kronik süreçte hücre toksisitesi ve DNA’da hasarı yapma olasılıkları daha yüksektir. Hepatosellüler karsinomda HFE’nin patogeneizde rolü olabileceği daha önce gösterilmiştir (13,79,99,107,109,112,114). Bu bakımdan HFE’nin eksprese olduğu makrofaj, duodenal epitel, monosit gibi hücrelerin bulunduğu diğer bölgelerde de karsinogeneizde artış olasılığı vardır (119,134). Kallianpur ve ark, Barton ve ark meme kanserinde bu durumun özellikle dikkat çektiğine vurgu yapmışlardır

(99,117). Türkiyede de meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada H63D allel sıklığı %22,2 saptanmış olup kontrol grubundaki sıklıktan (%14) fazla bulunmuştur (114). Bizim çalışmamızda saptanan H63D allel sıklığı Türk meme kanserli hastalardan da fazladır. Nelson ve ark., HFE için heterozigot olanlarda neoplastik olaylarda ve hematolojik malignitelerde normal popülasyona oranla artış saptamışlardır (25). Bunu destekleyen veri Dorak ve ark., C282Y mutasyonunun erkeklerde çocukluk çağı lenfoblastik lösemisi için risk faktörü olduğunu göstermesi ile olmuştur (115).

Çalışmamızda hematolojik maligniteli hastaların tanıları ile H63D allel sıklığı karşılaştırıldığında hastalıklar arasında farklılığa rastlanmamıştır.

Çalışmamızda 14 ALL hastasında (%15) H63D alleli saptanmıştır. Dorak ve ark., 6. kromozomda yer alan bu kromozomun immün mekanizmalarında rol oynayabileceğini öne sürmüşler ve C282Y mutasyonunun çocukluk çağı erkek ALL'lerinde risk faktörü olduğunu iddia etmişlerdir (115). Çalışmamızda 90 numaralı A.H. kodlu hasta 17 yaşında erkek olup H63D mutasyonu için homozigot bulunmuştur. Bu bir iddia öneri sürmek için yeterli olmayıp bir anektod olmakla beraber H63D'nin de C282Y ile aynı kromozom üzerinde yerleşmesi ve MHC klas I proteinlerine yakın olması penetransı daha az da olsa bu mutasyonun da ALL patogenezinde rol alabileceğini düşündürmektedir. Violo ve ark., ALL'deki H63D sıklığını kontrol grubuna göre daha fazla bulmuşlardır (135). Öte yandan Hannuksula ve ark. ALL li hastalarında C282Y ve H63D mutasyon sıklığının normal popülasyondan farklı olmadığını saptadılar (24). Veneri ve ark., ALL hastalarındaki H63D allel sıklığını %9,7 bulmuşlardır (120).

Bu çalışmadaki H63D allel sıklığı İtalya'nın normal popülasyon çalışmaları ile bildirilen sıklık (%12-15) ile aynıdır (136-137).

Çalışmamızda 8 AML hastasında (%8,6) H63D alleli saptandı. Literatürde AML hastalarında HFE mutasyonunun arttığına dair bir veri yoktur (26,120,138,139). Sunulan çalışmada 4 MDS'li hastanın 1'inde H63D heterozigot mutasyonu saptanmıştır. Hannuksela ve ark. istatistiksel olarak anlamlı olamamakla birlikte MDS'li hastalarda H63D mutasyon sıklığını ve bileşik heterozigot mutasyon sıklığının arttığını öne sürmektedir (116). Yunanistanda da 42 MDS'li hastada yapılan çalışmada kendi popülasyonlarından daha fazla oranda (%23,8) H63D allel sıklığı saptanmıştır (140). Çalışmamızda yalnızca 4 MDS olgusu bulunmakta olup yorum yapmak için kısıtlayıcı bir unsurdur.

Kanser sıklığı ile bir genetik mutasyon arasında bir ilişki varlığını kesin olarak söyleyebilmek için kuşkusuz ki yukarıda bahsi geçen tüm araştırmalardan çok daha fazla sayıda olguya ve kapsamlı bir normal popülasyon verisine ihtiyaç vardır. Bu nedenle bahsi geçen çalışmalardaki çelişkili sonuçlar, bu çalışmaların az sayıda olgu ve farklı etnik ve coğrafi unsurlarda yapılmış olmaları ile açıklanabilir.

8.2. HFE gen mutasyonlarının demir parametrelerine etkisi

Çalışmamızda HKHN öncesi demir parametreleri özellikle allojenik HKHN hastalarında yüksek saptanmıştır (Tablo 7). Biz bu çalışmada serum demir parametreleri ve karaciğer enzimleri ile H63D allel varlığı arasında anlamlı bir ilişki saptamadık. Bu veriler literatürde bildirilen sonuçlar ile benzerdir (26,116,138).

Benzer şekilde Rose C ve ark., HKHN yapılan ve demir yükünü inceledikleri 65 hastanın %58'inde demir yükünün arttığını saptadılar. Bu olgularda HFE mutasyonu ile ferritin değerleri, manyetik rezonans görüntüleme ile tayin edilen karaciğer demir indeksleri (mg/kuru ağırlık) ilişkisiz bulunmuştur (141). Diğer bir çalışmada da Altes ve ark., HKHN öncesi demir parametrelerine bakılan 81 olgunun 6'sında TS'nu > %80 bulmuşlardır. Söz konusu bu çalışmada HFE mutasyonlarından 41 hastada (%50,6) yabanıl tip H63D, 36 hastada (%44,5) heterozigot H63D mutasyonu ve 4 hastada (%4,9) homozigot H63D mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışmadaki H63D prevalansı bizim hasta grubumuzda bulduğumuzdan daha sık olmakla beraber bizim verilerimize benzer şekilde Altes ve ark. da mutasyonların demir parametrelerine etki etmediğini gösterdiler (142). Mutasyon oranı çalışmanın yapıldığı İspanya toplumu için bildirilen değerlerden yüksek olduğu için fenotipik bir demir birikimi bulgusu olmasa da karsinogenez ile mutasyonlar arasındaki ilişki açısından dikkat çekicidir. Kuzey Avrupa'nın en sık görülen resesif mutasyonu C282Y'dir ve Herediter hemokromatozis olgularının büyük çoğunluğunda etken bu mutasyondur. HFE mutasyonları içerisinde serum demir parametrelerine en belirgin etki C282Y homozigot mutasyonunda oluşmaktadır (71). Buna rağmen homozigot C282Y mutasyonu %2-3 olguda siroz ile seyreden aşikar hemokromatozis şeklinde klinik tablo oluşturmaktadır ve bunların %50'sinde flebotomi endikasyonu gelişmektedir (91). Sham ve ark., 61 HH olgusunun %67'sinde C282Y homozigot mutasyon, %4,9'unda H63D homozigot mutasyon ve %8,2'sinde bileşik heterozigot mutasyon saptamışlardır (92). Bu hastaların C282Y homozigot mutant olanlarında

demir yükü fazla bulunmuştur fakat heterozigot mutant hastaların bir kısmında demir yükü fazla diğer kısmında ise normal sınırlarda saptanmıştır (92). Phatak ve ark., C282Y homozigot olan 12 hastanın 11'inde transferrin saturasyonunu $> \%45$ bulunmuşlardır. Erkeklerin $\%100$ 'ünde kadınların ise $\%50$ 'sinde serum ferritin düzeyleri >200 mg/dl bulunmuştur (95). Buna karşın, bileşik heterozigot veya H63D homozigot olan hastaların sadece $\%7$ 'sinde serum ferritin seviyesi >300 mg/dl'dir (95). Bu veriler; klinik penetrasyonun H63D içeren diğer mutasyonlarda, homozigot C282Y mutasyonuna göre daha düşük olduğunu ve daha az demir yükü olabileceğini düşündürmektedir (77,94,95). Bu nedenle heterozigot C282Y, heterozigot ve homozigot H63D ve bileşik heterozigot mutasyonu olan hastalardaki mutasyonlar tek başına demir parametrelerinden sorumlu tutulmamaktadır (77,93,94,95). Nitekim sunulan bu çalışmada da H63D mutasyonu olan olguların transferrin saturasyonu ve serum ferritin değerleri mutasyonu taşımayan hastalardan farklı bulunmamıştır. HKHN hastalarında karaciğerde demir birikiminin oluşabilmesi için demir birikimine yol açabilecek genetik ve/veya kazanılmış bazı faktörlerin birarada bulunması gerekebilir. Karaciğer disfonksiyonu, viral hepatitler, metabolik sendrom demir birikimini arttıran faktörlerdir (91). Proton pompa inhibitörleri kullanımı, fazla miktarda çay tüketimi gibi durumlarda demir emilimi azalır (91). HFE gen mutasyonlarının demir parametrelerine etkisinde önemli rolü olan bir molekülde hepsidindir (91). Hepsidin eksikliği HFE mutasyonlarına eşlik eden önemli bir fizyopatolojik mekanizmadır. Hepsidin azalması ile ferroportin artışı olur. Ferroportin artışı ile demirin plazmaya geçişi artar. Sonuçta serum demirinde ve NTBI'da artış olur.

NTBI ise hızla karaciğer tarafından yakalanır ve sonuç itibarı ile karaciğerde demir birikimi olur (91). HKHN sırasında gelişen akut faz reaksiyonu IL-6 ve hepsidin transkripsiyonunu indükleyerek, göreceli olarak hepsidin eksikliğini kompanze ediyor olabilir. Artmış demir yükü gelişmesi bakımından bu kadar riskli bir grupta mutasyonların demir parametrelerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamış olması H63D mutasyonunun normalin varyantı bir polimorfizm olabileceği yönündeki iddiaları destekler niteliktedir (91,143,144). Hemokromatozise yol açan diğer mutasyonların beraber bulunması da penetransı etkileyebilecek faktörlerden birisidir.

8.3. HFE gen mutasyonlarının SOS ve ilk 100 günlük sağkalıma etkisi

Hematolojik hastalıklarda tanı anında dahi ferritin yüksekliği ve TS da artış görülmektedir. Bu durum büyük ölçüde inefektif hematopoeze bağlıdır. Anemi, barsak mukoza hücrelerinden demir emiliminin artmasına, emilen bu demirin eritropoez için etkin bir şekilde kullanılamaması ise demirin vücutta birikmesine yol açmaktadır. Tedavinin ilerleyen aşamalarında ise akut ve kronik hepatitler, kemoterapötik ajanların yol açtığı doku yıkımı sırasında demir açığa çıkması, mukozit nedeniyle hasar gören gastrointestinal sistemden demir emiliminin artması demir yükünün daha da artmasına yol açabilir. Bunların dışında HKHN hastalarında kullanılan immunsupresif ajanların yol açtığı metabolik sendrom ve hepatit reaktivasyonu, graft versus host hastalığına bağlı intestinal mukoza hücrelerinden demir emiliminin artması gibi özgül nedenlerle de vücutta demir birikimi daha da artabilir (89,91,145,146). Standart kemoterapi ve HKHN hazırlık rejimleri sonrasında görülen yoğun inflamasyon ve sitokin

fırtınası oluşmaktadır. Bu sitokinler ve inflamasyon demir trafiğini normoblastlardan makrofajlara ve ferritin ve hemosiderin gibi diğer depo demiri formlarına yönlendirmek sureti ile demir yükünü daha da arttırabilir. HFE gen mutasyonları karaciğeri başka nedenlerle demir birikimi açısından tehdit altında olan olgularda örneğin hepatit C'li hastalarda, alkoliklerde önemli rol oynayabilir (90,91). Biz de genetik hemokromatozis mutasyonlarının HKHN hastalarındaki artmış demir yüküne ve demir ile ilişkisi daha önceden tanımlanmış SOS gibi bir karaciğer komplikasyonuna katkı sağlayıp sağlamadığını araştırdık. Demir birikimi açısından önemli bir risk grubunu oluşturan bu hasta grubunda, HFE mutasyonlarının demir birikimini potansiyalize edici bir etkisi gösterilememiştir.

Kallianpur ve ark., HFE mutasyonlarından C282Y mutasyonunun SOS'u için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir, ancak H63D mutasyonu ile ilgili benzer bir çalışma yoktur (64). Çalışmamızda hiç C282Y mutasyonu bulunmadığı için Kallianpur ve ark. çalışmasındaki sonuçları doğrulayamadık. Bu durum farklı coğrafi bölgelerde ve etnik gruplarda HKHN komplikasyonlarının, morbidite ve mortalite etkenlerinin farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir. Hastalarımızda H63D allel varlığı ile SOS gelişimi arasında anlamlı ilişki yok iken, SOS şiddeti arasında anlamlılık derecesine yakın bir ilişki saptadık ($p=0,07$). Bu durum H63D mutasyonunun tek başına olmasa da diğer çevresel ve/veya genetik faktörlerle birlikte SOS patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Örneğin CPS1; güçlü bir antioksidan olan Nitrik Oksit (NO)'in sentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir ve bu enzimde çıkan AA polimorfizmi NO seviyelerinde artışa yol açar (53). Summer ve ark. AA genotipi olan olgularda

SOS'nun daha az geliştiğini bunun da antioksidan özellikler ve vasküler açıklığı sağlayan NO'daki artışın bir sonucu olduğunu savunmuşlardır (53). Kallianpur ve ark. da C282Y mutasyonunun SOS için bağımsız risk faktörü olduğunu yayınladıkları makalelerinde CPS AA polimorfizminin SOS riskini azalttığını göstermişlerdir (64). Türkiye'de CPS AA polimorfizminin sıklığı ile ilgili veri yoktur. Türk toplumunda ve dolayısı ile bizim hastalarımızda CPS AA polimorfizmi sık ise, bu durum HFE mutasyonlarının demir birikimi ve ROS oluşumu bakımından olası etkilerinin hafifletilmesine neden olabilir. Benzer şekilde glutatyon da diğer antioksidan mekanizmadır ve glutatyonu sentezleyen enzimde (GST) de polimorfizm gösterilmiştir (52). Talasemili çocuklarda GST enzimindeki polimorfizmin glutatyon seviyesini azalttığı ve HKHN sırasında SOS oluşmasında risk oluşturduğu gösterilmiştir (52). TNF-alfa genindeki polimorfizimler HH hastalarındaki karaciğer hasarının görülme zamanını ve ciddiyetini etkilemektedir (53). SOS gibi pek çok fizyopatolojik mekanizmanın rol oynadığı bir hastalıkta, tek bir gendeki mutasyon hastalığın ortaya çıkmasında tek başına bağımsız bir etken olmayabilir. Koagülasyon faktörlerini etkileyen proteinlerde, matriks metalloproteinazlarında, inflamatuvar mediatörleri etkileyen genlerdeki mutasyonlar bu bakımdan yeni çalışma alanlarını oluşturmaktadır. Bu genetik çalışmalar sonucunda yüksek riskli hastalarda risk durumuna göre çeşitli tedavi düzenlemeleri yapmak, örneğin transplant öncesi hazırlıklar sırasında bu riskleri ortadan kaldıracak ilaçlar eklemek gerekebilir. NO sentezindeki hız kısıtlayıcı CPS1 enzimini devre dışı bırakmak sureti ile NO sentezini arttıran *sitrülin*'in oral formunun bu amaçla kullanılması gündemde olup, bu konudaki

alışmalar devam etmektedir (53). Artmış demir yükü SOS gelişiminde ve ilk 100 gün mortalitesinde bir risk faktörüdür. Bu nedenle hangi nedene bağlı olursa olsun artmış demir yükü ve buna bağlı olarak artan ROS üretimini azaltmak amacı ile vitamin E, glutamin, N-asetil sistein gibi antioksidan ilaçlar, flebotomi ve/veya demir bağlayıcı ajanlar tedavi seçenekleri arasında dşnlmelidir.

Çalışmamızda H63D mutasyonu ilk 100 günlük sağkalıma ve transplant ilişkili mortaliteye etki etmemektedir. Bu hastalarda mutasyonların uzun süreli takiplerde gelişen diğer geç toksisite parametrelerine nasıl etki gösterdiği ise bilinmemektedir. Bu nedenle bu hasta grubu daha uzun bir süre gözlenmeli ve geç komplikasyonlar açısından H63D mutasyonun bir etkisi olup olmadığı araştırılmalıdır.

8.4. SOS risk faktörleri, HKHN ncesi demir parametrelerinin SOS sıklığı ve 100 günlük sağkalıma etkisi

Çalışmamızda otolog HKHN yapılan hiçbir hastada SOS'a rastlanmamıştır. Buna karşın allojenik HKHN yapılan %28,9 hastada SOS gözlenmiştir. EBMT grubunun son raporundakine benzer şekilde bizim çalışmamızda da allojenik HKHN, SOS için en önemli risk faktörü olarak tesbit edilmiştir ($p=0,001$) (57).

Hazırlama rejiminde TBI bulunması SOS gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak saptanmıştır ($OR=1,0001$). 30-35cGy üzerinde radyasyon alanlarda karaciğer hasarı oluşmaktadır ve bu SOS benzeri bir tablo oluşurur. Bu bilgilerin ışığında radyasyona bağlı karaciğer hasarı SOS'unun bir varyantı olarak

tanımlanabilir (44,51). Bu veri bize SOS gelişiminde radyasyon hasarının önemli olduğunu ve TBI'ın bu nedenle bir risk faktörü olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmadaki ALL'li olgularda daha sık SOS görülmüştür ($p=0,003$). Bu durum ALL'li olgularda hazırlama rejiminde sıklıkla TBI bulunması ile ilişkili gibi görünmektedir.

Çalışmamızda HKHN öncesi TS yüksekliği ($p=0,05$), ferritin yüksekliği ($p=0,009$), ALT yüksekliği ($p=0,03$) ve GGT yüksekliği ($p=0,04$) SOS gelişimi için risk faktörü olarak saptanmıştır. Ferritin diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak SOS gelişiminde etkili bulunmuştur ($OR=6,93$). Demir artışı, karaciğer üzerinde toksik etki yaratarak uzun dönemde hücre aktivasyonuna ve karaciğerde fibrozis gelişmesine neden olmaktadır (16). Kalp ve karaciğer gibi parankimal organlar demir birikiminden özellikle etkilenmekte, kardiyomiyopati ve siroz gelişebilmektedir (27,126). Talasemi nedeni ile süregelen demir birikimi ve karaciğerde inflamasyonu olan hastalarda SOS'un daha sık görülmesi bu açıdan tipik bir örnektir (36,52). Literatürde ferritin ve demir yükünün SOS'la ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (29,34,35,147). Sucak ve ark., HKHN sonrası geç dönemde karaciğer enzimlerinde bozukluk saptanan 20 hastanın karaciğer biyopsilerinin değerlendirilmesinde %75 olguda demir birikimi olduğunu göstermişlerdir (29). Bu çalışmada ferritin seviyesi ile de karaciğerdeki histopatolojik demir birikimi derecesi arasında korelasyon saptanmıştır (29). Morado ve ark.'nın 180 hastayı içeren prospektif çalışmasında, otolog HKHN yapılan ve SOS gelişen hastalarda nakil öncesi bakılan ferritin düzeyleri, SOS gelişmeyen hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (35). Armand ve

ark.'nın 590 HKHN retrospektif olarak değerlendirdikleri çalışmada, nakil öncesi yüksek ferritin düzeyleri ile SOS gelişimi arasında orta derecede risk artışı saptanmıştır (34). Kaliforniya City of Hope'dan Pullarkat ve ark. ileriye dönük izledikleri 190 allojeneik HKHN olgusunda transplant öncesi ferritin değerlerinin ilk 100 gün sağkalımı, mortalite, akut graft versus host hastalığı ve kan akımı enfeksiyonlarının her birini olumsuz etkilediğini gösterdiler (125). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir. Artmış demir yükünün kardiovasküler hastalıkların riskini de arttırdığı bilinmektedir. EBMT geç yan etkiler grubu 2008 yılı içerisinde yayınladıkları son raporlarında kök hücre alıcılarının prematüre kardiovasküler hastalık riski ile karşı karşıya olduğunu bildirdiler. Hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, sigara, fiziksel inaktivite ve artmış beden kitle indeksi gibi standart kardiovasküler risk faktörlerinden en az nn bulunduğu hastaların %17 sinde prematüre kardiovasküler hastalık gelişebilmektedir (145). Biz artmış demir yükünün de transplant hastalarının artmış kardiovasküler morbiditesinde rolü olabileceğini ve bu bakımdan değerlendirmeler yapılması gerektiğini düşünüyoruz. Öte yandan allojenik HKHN'de kullanılan Takrilimus ve Siklosporin A gibi immunosupresif etkili kalsinrin inhibitörleri lipid metabolizmasını bozarak nonalkolik steatohepatit, metabolik sendrom tablosu gelişmesine yol açarak hem karaciğerde demir birikmesi, hem de kardiovasküler hastalıklar bakımından birer risk oluştururlar (89).

90 nolu AH kodlu hastadan çeşitli özellikleri nedeni ile ayrıca bahsetmek gerekir .

17 yaşındaki ALL'li, hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) bulunan bu hastada

homozigot H63D mutasyonu vardır. Bu olgu şiddetli SOS nedeni ile kaybedilmiştir. HKHN öncesi Karnofsky cetveline göre performans %90, AST 91U/l, ALT 61U/l, ferritin 1863ng/ml, TS %86 bulunmuştur. Bu olguda SOS sendromu için birden fazla risk faktörü birarada bulunmaktadır. HbsAg pozitif, HKHN öncesi ferritin değeri 1893 ng/ml ve homozigot H63D mutasyonu pozitif olan bu olgunun şiddetli SOS ile kaybedilmiş olması birçok risk faktörü biraraya geldiğinde SOS olasılığını ve şiddetinin artabileceğini düşündürmektedir.

HH yaratılarak HKHN yapılan farelerin karaciğer histolojisinde ciddi fibrozis, inflamasyon ve hücre nekrozuna rastlanmamıştır. Oysa bu farelerde karaciğerde ciddi demir depolanması dikkati çekmiştir (148). Nitekim, karaciğer enzimleri normal kişilerde dahi belirgin demir birikimi olabileceği bilinmektedir. Artmış demir, fibrozisi uyardığı halde çok az hepatosit hasarı ve inflamasyonla seyretmekte, hafif yüksek hatta normal transaminaz düzeyleri ile beraber olabilmektedir (29). Waalen ve ark'nın 19699 hastayı ferritin düzeylerine bakarak taradıkları çalışmalarında 59 olgunun ferritin düzeyi 1000 ng/ml üzerinde bulundu. Bu hastaların %40'ının HH olduğu anlaşılmış ve sadece %5'inde karaciğer testlerinde bozukluk görülmüştür (149). Bir başka ifade ile demire bağlı karaciğer fibrozisi sessiz seyredebilmektedir. H63D mutasyonu gibi penetransı düşük bir mutasyonun demir depolanmasına yol açması, eşlik eden diğer bazı faktörlere bağlı olduğu için demir parametrelerine ve karaciğer enzimlerine yansımaksızın karaciğerde demir birikimi ve minimal de olsa hasar geliştirmeye başlamış olabilir. En azından uzun dönem takipler olmaksızın H63D

mutasyonunun karaciğerde demir birikimine katkıda bulunmadığını söylemek güçtür.

Bu konu ile ilgili kesin bir ifade kullanabilmek için verilerin daha çok sayıda olguyu içermesi gerekmektedir. Tomas ve ark., 106 allojenik HKHN hastasının %57'sinde kronik karaciğer hastalığı geliştiğini bildirmişler ve bu hastaların %47'sinde demir birikimine yol açan birden fazla faktörün birarada bulunduğu saptanmıştır (3). HKHN hastaları demir birikimine yol açan pek çok faktörün bir araya gelmesi konusunda bizim 90 nolu hastamızda olduğu gibi oldukça şanssızdırlar. Karaciğerde demir birikimi GVHH, hepatit C ve B enfeksiyonu, transfüzyonlar, Siklosporine bağlı metabolik sendrom, non-alkolik steatohepatit gibi durumların herbiri karaciğerde demir birikimine yol açarak tek bir hastada birarada bulunabilirler. Genetik mutasyonların da bu duruma katkıda bulunması mümkündür. Nitekim C282Y mutasyonunun sık görüldüğü Kuzey Avrupa toplumunda benzer bir etki gösterilmiştir (64).

8.5. Sonuç

HKHN'de aynı tedavi rejimi alan hastalarda gelişen toksiste ve komplikasyonlar farklılık gösterebilmekte ve bu farklılığın genetik faktörlere bağlı olabileceği öne sürülmektedir. Bu genetik farklılıkların açığa çıkması ile HKHN ilişkili risklerin önceden tahmin edilmesi mümkün olabilir. Bu farklı riskler ve bu risklere yol açan fizyopatolojik mekanizmaların aydınlatılması hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve bu sayede ortadan kaldırılması veya azaltılmasına olanak sağlayabilir. *Yüksek komplikasyon*

beklentisi olan hastalarda HKHN dışı tedavi yöntemlerine başvurulması da bir diğer seçenek olarak akılda tutulmalıdır.

Bu çalışmada HKHN aday hastaların H63D mutasyonunu varlığının, demir yükünde mutasyonu taşımayan hastalardan farklı bir etki yapmadığı gösterilmiştir. H63D mutasyonu bunun dışında SOS gelişmesi ve ilk 100 günlük mortalitede de bir katkıya yol açmamaktadır. *Aynı hasta grubu uzun dönem komplikasyonlar açısından izlenmeye devam edilmelidir.* Transplant öncesi ferritin değerleri ve hazırlık rejiminde TBI bulunması ise gerek SOS gelişmesi gerek ise ilk 100 günlük mortaliteyi olumsuz etkileyen bağımsız risk faktörleri olarak bulunmuştur. *HKHN öncesinde tüm hastaların demir parametrelerine ve serum ferritinlerine bakılması gereklidir.*

Demir homeostazisinin demir birikimi yönünde bozulması, HKHNde erken ve geç komplikasyonlar ve sağkalım açısından önemli bir risk faktörü olup, farklı nedenden kaynaklanmaktadır. Bu faktörlerden birisinin de genetik HFE mutasyonları olabileceği düşünülmüş ve C282Y mutasyonu için bu yönde veriler elde edilmiştir. Türkiyede görülmeyen bu mutasyonun etkisini bu çalışma ile doğrulamak mümkün olmamış, H63D nin ise benzer bir etkiye yol açmadığı gösterilmiştir. HKHN öncesi HFE mutasyonları için tarama mevcut veriler ile *ancak demir birikimive /veya karaciğer toksitesi bakımından riski yüksek olgularda yapılabilir.*

SOS, mortalitesi yüksek ve kesin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Hastalık gelişmeden önce risk faktörlerini belirleyip buna göre modifikasyon yaparak SOS gelişimini önlenmek mümkün olabilir. Bu bakımdan demir birikiminin erken

saptanması ve tedavi edilmesi, erken ve geç komplikasyonların azaltılmasını sağlayabilir. Benzer şekilde demir artışı ile ilişkili olabilecek karaciğer sirozu ve kanseri, diğer maligniteler ve kardiovasküler mortalite açısından da katkı sağlanabilir.

TBI alan hastalardaki doz fraksiyone ve düşük dozda verilmesi, ALL li olgularda aynı derecede etkin ancak TBI içermeyen hazırlık rejimlerinin kullanılması, hazırlık rejimlerindeki Siklofosfamidin, busulfandan önce verilmesi, artmış demir yükünün azaltılması HKHN hastalarında yapılabilecek tedavi düzenlemeleridir.

Çok yüksek riskli bireylerde HKHN öncesinde demir yükünü azaltan (flebotomi ve/veya eritropoetin, demir bağlayıcı ajanlar) ve antioksidan tedaviler (Vitamin E, glutatyon, N-asetil sistein) uygulanabilir.

9. ÖZET

Sinüzoidal Obstrüksiyon Sendromu (SOS), HKHN'nin nedeni bilinmeyen ciddi bir karaciğer komplikasyonudur. Yeni yapılan çalışmalarda çeşitli etyolojik faktörler içerisinde artmış demir yükü SOS için bir sirk faktörü olarak bildirilmiştir. Benin ve malin hastalıklardan özellikle inefektif eritropoez ve artmış transfüzyon ihtiyacı ile seyredenlerde demir yükü artar ve ferritin seviyesi yükselir. Karaciğer demirin depolandığı ve dolayısı ile artmış demir yükü ile oluşan oksidatif stresden etkilenen temel bölgedir. Kuzeyyarım kürede en sık saptanan genetik mutasyon olan HFE de demir yükünü arttırır. Bu çalışmada, çeşitli hematolojik malinitesi nedeni ile HKHN endikasyonu olan hastalarda HFE gen mutasyon sıklığını inceledik. Aynı zamanda HFE gen mutasyonlarının HKHN öncesi demir parametrelerine etkisini, SOS gelişimine katkısını ve ilk 100 sağkalımı ile ilişkisini de inceledik.

Hiçbir hastada C282Y mutasyonuna rastlanmazken, H63D allel sıklığı %24,8 bulundu. Çalışmamızın kohortu, Türk popülasyonu ile karşılaştırıldığında (%13,6±5,8) H63D allel sıklığında hematolojik malignitelerde artmış bulundu. HFE mutasyonlarının demir yüküne ve 100 gün sağkalıma etkisi gösterilemedi. Allojenik HKHN yapılan 20 hastada SOS saptandı. Otolog HKHN' göre allojenik HKHN SOS için risk olarak bulundu ($p=0,001$). HKHN öncesi yüksek serum ferritin seviyesi ve hazırlık rejiminde TBI bulunması SOS için bağımsız risk faktörü olarak bulundu (sırası ile $OR=1,0001$ ve $OR=6,93$). Ferritin değerinin ilk 100 gün toplam sağkalımla negatif ilişkisi gösterildi ($p=0,003$).

Sonuç olarak, transplantasyon öncesi demir yükü, ransplantasyonun sonucu için önemli rol oynamaktadır. Heterozigot H63D mutasyonu HKHN

hastalarında demir yüküne katkıda bulunmamakta iken homozigot H63D mutasyonu için veriler yetersizdir. Demir yükü durumunun bilinmesi SOS gelişimi için risk faktörlerinin belirlenip buna göre tedavi düzenlenmesi flebotomi ve/veya demir şelasyonu gibi için önemlidir.

10. ABSTRACT

Sinusoidal obstruction Syndrome (SOS) is a serious hepatic complication of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with uncertain etiology. Increased iron stores, have recently been reported to be among the various risk factors predisposing HSCT recipients to SOS. Benign and malignant hematological disease, particularly the ones associated with ineffective hematopoiesis and increased transfusion requirements have increased body iron stores and elevated serum ferritin levels. Liver as the major site of iron deposition is particularly susceptible to oxidative stress produced by increased body iron stores. HFE mutations which is the most common genetic disorder of the Northern hemisphere, is also associated with increased body iron stores. We investigated the prevalence of HFE genotypes in various hematological malignancies requiring HSCT. We also analysed whether the presence of HFE mutations further increases the iron overload in HSCT recipients and predisposes them to SOS. Day +100 mortality and its relationship with the HFE genotype was also assessed. HFE H63D and C282Y genotypes were determined in 93 HSCT recipients who were evaluated prospectively for the development of SOS. The influence of the HFE genotype on serum iron parameters was also tested.

No C282Y mutation was detected while H63D allele frequency was %24,8. Our data suggests that HFE H63D mutation frequency was increased in our patient cohort with various hematological malignancies compared to the general Turkish population (%13,6 $\pm$ 5,6). While we could not demonstrate any effect of HFE genotypes on neither the iron status nor on 100 day mortality. Twenty patients had developed SOS all of whom had undergone allogeneic HSCT.

Allogenic HSCT was found to be a risk factor for SOS ($p=0,001$). Elevated pretransplant ferritin levels and TBI was independent risk factors for SOS (OR=1,0001 and 6,93, respectively). Serum ferritin was also found to be inversely correlated with day 100 mortality ($p=0,003$).

In conclusion, pretransplantation iron overload seems to play an important role in transplantation outcome. The presence of heterozygote H63D mutation does not seem to contribute to increased iron overload in HSCT recipients while the role of homozygote mutation remains to be verified. Determination of iron stores might facilitate risk-stratification and developing strategies such as phlebotomy and/or iron chelation to prevent SOS.

11. KAYNAKLAR

1. Hoffman R. *Hematopoietic Stem cell transplantation*. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, editors. *Hematology Basic Principles and Practice 3rd edition*, New York: Churchill Livingstone; 2005;1551-69.
2. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L. *Harrison principles of internal medicine 15th edition, volume 1&2*. New York: McGraw-Hill;2001.
3. Tomas JR, Pinilla I, Garcia-Buey ML, Garcia A, Figuera A, Gomez-Garcia de Soria V. *Long-term liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: clinical features and course in 61 patients*. Bone marrow transplant 2000;26:649-55.
4. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z. *Allogeneic Hematopoietic stem cell Transplantation*. Arch Intern Med 2002;162:1558-66
5. Devetten M, Armitage O. *Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles*. Ann Oncol 2007;18:1450-6.
6. Djulbegovic B, Seidenfeld J, Bonnell C, Kumar A. *Nonmyeloablative Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Hematologic Malignancies: A Systematic Review*. Cancer Control 2003;10(1):17-41.
7. Coppell JA, Brown SA, Perry DJ. *Veno-occlusive disease: cytokines, genetics, and haemostasis*. Blood Reviews 2003;17:63-70.
8. Helmy A. *Review article: updates in the pathogenesis and therapy of hepatic sinusoidal obstruction syndrome*. Aliment Pharmacol Ther 2006;23:11–25.
9. Eisenberg S. *Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplant*. Oncol Nurs Forum 2008;35(3):385-97.
10. Baon F, Deprez M, Beguin Y. *The veno-occlusive disease of the liver*. Hematologica 1997;82:718-25.
11. Nürnbergger W, Michelman I, Burdach S, Göbel U. *Endothelial dysfunction after bone marrow transplantation: Increase of soluble thrombomodulin and PAI-1 patients with multiple transplant-related complication*. Ann Hematol 1998;76:61-5.
12. Carres E. *Veno-occlusive disease of the liver after hematopoietic cell transplantation*. Eur J Haematol 2000;64:281-91.
13. Cermak J, Balla J, Jacob H, Balla G, Enright H. *Tumor cell Heme uptake induces Ferritin synthesis resulting in Altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy*. Cancer Res 1993;53:5308-13.
14. Swinkels D, Jassen M, Bergmans J, Marx J. *Hereditary Hemochromatosis: Genetic complexity and New Diagnostic Approaches*. Clin Chem 2006;52(6):950-68.
15. Pietrangelo A. *Mechanism of iron toxicity*. Adv Exp Med Biol 2002;509:19-43.

16. Pietrangelo A. *Iron, oxidative stress and fibrogenesis*. J Hepatol 1998;28:8-13.
17. Evens AM, Mehta J, Gordon LI. *Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress*. Bone Marrow Transplant 2004;34(7):561-71.
18. Hash RB. *Hereditary Hemochromatosis*. J Am Board Fam Pract 2001;14(4):266-73.
19. Weinberg ED. *Iron withholding: a defence against infection and neoplasia*. Physiol Rev 1984;64(1):65-102.
20. Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Batts KF, Thibodeau SN. *Update on hereditary hemochromatosis and HFE gene*. Mayo Clinic Proc 1999;74:917-21.
21. John F, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee I, Mapa F, Morikang E. *The Hemochromatosis Founder Mutation in HLA-H disrupts beta2 microglobulin interaction and cell surface expression*. J Biol Chem 1997;272(22):14025-8.
22. Waheed A, Parkkila S, Zhou Y, Shunji T, Tsuchihashi Z, Feder NJ. *Hereditary hemochromatosis: Effect of C282Y and H63D mutations on association with β -2-microglobulin, intracellular processing and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells*. Proc Natl Acad Sci 1997;94:12384-89.
23. Pietrangelo A. *Haemochromatosis*. Gut 2003;5:23-30.
24. Hannuksela J, Savolainen ER, Koistinen P, Parkkila S. *Prevalence of HFE genotypes, C383Y and H63D in patients with hematologic disorders*. Hematologica 2002;87:131-5
25. Nelson RL, Davis FG, Persky V, Becker E. *Risk of Neoplastic and Other Diseases among people with heterozygosity for Hereditary Hemochromatosis*. Cancer 1995;76(5):875-9
26. Gimferrer E, Nomdedeu J, Gich I, Barcelo JM, Baiget M. *Prevalence of hemochromatosis related HFE gene mutations in patients with acute myeloid leukemia*. Leuk Res 1999;23(6):597-8
27. Majhail NS, Lazarus HM, Burns LJ. *Iron overload in hematopoietic cell transplantation*. Bone Marrow Transplant 2008;41(12):997-1003
28. Strasse SI, Sullivan KM, Myerson D, Spurgeon CL, Storer B, Schoch GH, et al. *Cirrhosis of the liver in long-term marrow transplant survivors*. Blood 1999;10:3259-66
29. Sucak GT, Yeğin ZA, Özkurt ZN, Akı ŞZ, Karakan T, Akyol G. *The role of liver biopsy in the workup of liver dysfunction late after SCT: is the role of iron underestimated*. Bone marrow transplant 2008; [Epub ahead of print]
30. Gordon LI, Brown SG, Tallman MS, Rademaker AW, Wietzman AS, Lazarus HM. *Sequential changes in serum iron and ferritin in patients undergoing high-dose chemotherapy and radiation with autologous bone marrow transplantation: possible implications for treatment related toxicity*. Free Radic Biol Med 1995;18(3):383-9.

31. Altès A, Remacha AF, Sureda A, Martino R, Briones J, Canals C, et al. *Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation* Bone Marrow Transplant 2002;29(12):987-9.
32. Yeğin ZA, Özkurt ZN, Akı ŞZ, Yağcı M, Sucak GT. *Hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda demir yükü ile erken dönem toksisite ve sağkalım ilişkisi*. 5. Ulusal Kemik iliği Transplantasyonu ve Kök hücre tedavileri kongresi 2008, poster sunumu;193:0004
33. Sucak GT, Akı SZ, Paşaoğlu H, Özkurt ZN, Demirtaş C, Yeğin ZA, et al. *The role of pre-transplantation serum parameters and anti-oxidative potential in early posttransplant toxicities*. Hematologica 2008, poster sunumu;93:0818
34. Armand P, Kim HT, Cutler CS, Ho VT, Koreth J, Alyea EP, et al. *Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation*. Blood 2007;109(10):4586-8.
35. Morado A, Ojeda E, Garcia-Bustos J, Aguado MJ, Arrieta R, Quevedo E, et al. *Serum ferritin level as Risk Factor for Veno-occlusive disease of the liver. Prospective cohort study*. Hematology 2000;6(5):505-512
36. Jastaniah W, Harmatz P, Pakbaz Z, Fischer R, Vichinsky E, Walters MC. *Transfusional iron burden and liver toxicity after bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia and hemoglobinopathies*. Pediatr Blood Cancer 2008;50:319-24.
37. Akoğlu T. *Kemik iliği Transplantasyonu*. In: İliçin G, Biberoğlu S, Süleymanlar G, Ünal S, editörler. *İç Hastalıkları 2. Baskı*. Ankara:Güneş Kitapevi, 2003;1959-68.
38. Aschan J. *Allogenic haematopoietic stem cell transplantation:current status and future outlook*. Br Med Bull 2006;77-78:23-36.
39. Medscape General Medicine. 2005;7(1):19. (available from http://www.medscape.com/viewarticle/499049_2)
40. Tuch BE. *Stem cells a clinical update*. Aust Fam Physician 2006;35(9):719-21.
41. *Genetic engineering, The future technology 2002-2007*, (2008 Available from <http://www.bootstrike.com/Genetics/StemCells/obtainingstemcells.html>)
42. *Reeve-Irvine Research Center Anatomy Lectures 2008*, (Available from <http://www.reeve.uci.edu/anatomy/stemcells.php>)
43. Senzolo M, Germani G, Cholongitas E, Burra P, Burroughs AK. *Veno occlusive disease: Update on clinical management*. World J Gastroenterol 2007;13(29):3918-29.
44. Deleve DL, Schulman HM, McDonald GB. *Toxic injury to Hepatic Sinusoids: Sinusoidal Obstruction Syndrome (veno-occlusive Disease)*. Semin Liver Dis 2002;22(1):27-41.
45. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Wolford JL, et al. *Veno-occlusive Disease of the Liver and Multiorgan Failure after Bone*

Marrow Transplantation: A Cohort Study of 355 Patients Ann Intern Med 1993;118:255-67.

46. Ho VT, Revta C, Richardson PG. *Hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation: update on deibrotide and other current investigational therapies.* Bone marrow transplant 2008;41:229-37.
47. Pihusch V, Pihusch M, Penovici M, Kolb H, Hiller E, Pihusch R. *Transforming growth factor beta-1 release from platelets contributes to hypercoagulability in veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation.* Thromb Res 2005;116:233-40.
48. Brown SA, Goringe A, Fegan C, Davies SV, Giddings J, Whittaker JA. *Parenteral glutamine protects hepatic function during bone marrow transplant.* Bone marrow transplant 1998;22:281-4
49. Goringe AP, Brown S, Callaghan UO, Rees J, Jebb S, Elia M. *Glutamine and Vitamin E in the treatment of hepatic veno-occlusive disease following high-dose chemotherapy.* Bone marrow transplant 1998;21:829-32
50. Hassan Z, Hellström-Lindberg E, Alsadi D, Edgren M, Hagglund H, Hassan M. *The effect of modulation of glutathione content on busulphan-induced cytotoxicity on hematopoietic cells in vitro and in vivo.* Bone marrow transplant 2002;30:141-7
51. Bearman SI. *The Syndrome of Hepatic Veno-occlusive Disease After Marrow Transplantation.* Blood 1995;85(11):3005-20.
52. Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji VR, George B, Mathews V, Chandy M, et al. *Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation.* Blood 2004;104:1574-7.
53. Kallianpur AR. *Genomic screening and complications of hematopoietic stem cell transplantation: has the time come?* Bone marrow transplant 2005;35:1-16
54. Pietrangelo A. *Metals, Oxidative stress and Hepatic Fibrogenesis.* Semin Liver Dis 1996;16(1):13-27
55. Lee JH, Lee KH, Lee JH, Kim S, Soel M, Park CJ, et al. *Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent diagnostic marker as well as severity predictor of hepatic veno-occlusive disease after allogeneic bone marrow transplantation in adults conditioned with busulphan and cyclophosphamide.* Br J Haematol 2002;118:1087-94.
56. Markus P, Wegner H, Goehring P, Salat C, Verena P, Hiller E, et al. *Diagnosis of Hepatic Veno-Occlusive Disease by Plasminogen Activator Inhibitor-1 Plasma Antigen Levels: A Prospective Analysis in 350 Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Recipients.* Transplantation 2005;80(10):1376-82
57. Carreras E, Bertz H, Arcese W, Vernan JP, Toma's JF, Hagglund H. *Incidence and Outcome of Hepatic Veno-Occlusive Disease After Blood or Marrow Transplantation: A Prospective Cohort Study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* Blood 1998;92:3599-604.
58. Locasciulli A, Testa M, Valsecchi MG, Bacigalupo A, Solinas S, Tomas JF, et al. *The role of hepatitis C and B virus infections as risk factors for*

- severe liver complications following allogeneic BMT: a prospective study by the Infectious Disease Working Party of the European Blood and Marrow Transplantation Group.* Transplantation. 1999;68(10):1486-91.
59. Cohen AD, Luger SM, Sikles C. *Gemtuzumab ozagamisine (Mylotarg) monotherapy for relapsed AML after hematopoietic stem cell transplant: efficacy and incidence of hepatic veno-occlusive disease.* Bone Marrow Transplant 2002;30:23-28.
 60. McCune JS, Batchelder A, Deeg HJ, Gooley T, Cole S, Phillips B, et al. *Cyclophosphamide following targeted oral busulfan as conditioning for hematopoietic cell transplantation: pharmacokinetics, liver toxicity, and mortality.* Biol Blood Marrow Transplant 2007;13(7):853-62.
 61. Lee SW, Russell AH, Kinney WK. *Whole abdomen radiotherapy for patients with peritoneal dissemination of endometrial adenocarcinoma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003;56(3):788-92.
 62. Schag CC, Heinrich RL, Ganz PA. *Karnofsky performance status revisited: reliability, validity, and guidelines.* J Clin Oncol 1984;2(3):187-93.
 63. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden, et al. *Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group.* Am J Clin Oncol 1982;5(6):649-55.
 64. Kallianpur AR, Hall LD, Yadav M, Byrne DW, Speroff T, Dittus RS, et al. *The hemochromatosis C282Y allele: a risk factor for hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant 2005;35:1155-64.
 65. Cheuk DKL, Wang P, Lee TL, Hiang AKS, Ha SY, Lau YL, et al. *Risk factors and mortality predictors of hepatic veno-occlusive disease after pediatric hematopoietic stem cell transplantation.* Bone marrow transplant 2007;40:935-44
 66. Bouligand J, Maitre AL, Valteau-Couanet D, Grill J, Drouard-Troalen L, Paci A. *Elevated plasma ferritin and busulfan pharmacodynamics during high-dose chemotherapy regimens in children with malignant solid tumors.* Clin Pharmacol Ther 2007;82(4):402-9.
 67. Kulkarni S, Rodriguez M, Lafuente A, Mateos P, Mehta J, Singhal S, et al. *Recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) for the treatment of hepatic veno-occlusive disease (VOD).* Bone Marrow Transplant 1999;23:803-7.
 68. Bearman SI, Lee JL, Baro' n AE, McDonald GB. *Treatment of Hepatic Venocclusive Disease With Recombinant Human Tissue Plasminogen Activator and Heparin in 42 Marrow Transplant Patients* Blood 1997;89(5):1501-6.
 69. Morio S, Oh H, Kogure K, Ishii H, Ishii A, Nakaseko C, et al. *A trial use of prostaglandin E1 for prevention of hepatic veno-occlusive disease after allogeneic bone marrow transplantation (abstract).* Rinsho Ketsueki 1994;35(9):846-52.

70. Sucak GT, Akı ZS, Yağcı M, Yeğın ZN, Haznedar R. *Treatment of sinusoidal obstruction syndrome with defibrotide: A single centre experience*. Transplant Proc 2007;39:1558-63.
71. Lyon E, Frank EL. *Hereditary Hemochromatosis since discovery of the HFE gene*. Clin Chem 2001;47(7):1147-56.
72. Human genomic project information, gene getaway-exploring genes and genetic disorders 2008 (available from <http://www.ornl.gov/sci/techresources/HumanGenome/posters/chromosome/hfe.shtml>)
73. Anntonello P, Camaschella C. *Molecular genetics and control of iron metabolism in hemochromatosis*. Haematologica 1998;83:456-61.
74. HFE Orthologs, 2008 (available from <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Marcil/orthologs.html>)
75. Dorak T, Burnett AK, Wordwood M. *Hemochromatosis gene in Leukemia and Lymphoma*. Leuk Lymphoma 2002;43(3):467-77.
76. Barut G, Balcı H, Bozdayı M, Hatemi İ, Özçelik D, Şentürk H. *Screening for iron overload in Turkish population*. Dig Dis 2003;21(3):279-85
77. Holmström P, Marmur J, Eggertsen G, Gafvels M, Stal P. *Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls*. Gut 2002;51:723-30
78. Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Costaldi ME. *Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci 2002;99(5):3117-22.
79. Beckman LE, Van Landeghem GF, Sikström C, Wahlin A, Markevaran B, Hallmans G, et al. *Interaction between hemochromatosis and transferrin receptor genes in different neoplastic disorders*. Carcinogenesis 1999;20(7):1231-3.
80. Reactive Oxygen Species and oxidative stress 2008, (available from <http://www.redlabs.be/red-labs/our-science/oxidative-stress.php>)
81. Dilsiz N. *Moleküler biyoloji*. Ankara: Palme yayıncılık;2004:61-63
82. Gelehrter TD, Collins SF, Ginsburg D. *Principles of Medical Genetics*. 2nd ed. Baltimore: Williams&Wilkins;1998:73-77
83. Hartwell HL, Hood L, Goldberg LM, Reynolds EA, Silver LM, Veres CR. *Genetics from genes to genome*. 2nd ed. Boston: McGraw Hill;2004:297-302
84. Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö. *Renkli Genetik Atlası*. Ankara: Nobel Tıp kitabevi;1995:72-3
85. Öner C. *Genetik kavramlar*. Ankara: Palme yayıncılık;2000:515-522
86. Andrews NC. *Disorders of iron metabolism*. N Engl J Med 1999;341(26):1986-95.
87. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. *Balancing acts: molecular control of Mammalian iron metabolism*. Cell 2004;117:285-97
88. Fleming ER, Bacon BR. *Orchestration of iron Homeostasis*. N Engl J Med 2005;352(17):1741-4.

89. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. *Ferritin for the clinician*. Blood Reviews 2008;article in press
90. Yen AW, Fancher TL, Bowlus CL. *Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress*. Am J Med 2006;119:391-9.
91. Brissot P, Troadec MB, Bardou-Jacquet E, Lan C, Jouanolle AM, Deugnier Y. *Current approach to hemochromatosis*. Blood reviews 2008;22:195-210.
92. Sham LR, Ou CY, Cappucino J, Braggins C, Dunnigan K, Phatak PD, *Correlation between Genotype and Phenotype in Hereditary Hemochromatosis: Analysis of 61 Cases*. Blood Cells Mol Dis 1997;23(16):314-20
93. Lim EM, Rossi E, De Boer WB, Reed WD, Jeffrey GP. *Hepatic iron loading in patients with compound heterozygous HFE mutations*. Liver International 2004;24:631-6
94. Dubois S, Kowdley KV. *Review article: targeted screening for hereditary hemochromatosis in high risk groups*. Aliment Pharmacol Ther 2004;20:1-14
95. Phatak PD, Ryan DH, Cappucio J, Oakes D, Braggins C, Provenzano K. *Prevalence and Penetrance of HFE mutations in 4865 unselected primary care patients*. Blood Cells Mol Dis 2002;29(1):41-7
96. Morrison ED, Brandhagen DJ, Phatak PD, Barton JC, Krawitt EL, El-Serag HB, et al. *Serum ferritin level predicts advanced hepatic fibrosis among U.S. patients with phenotypic hemochromatosis*. Ann Intern Med 2003;138(8):627-33.
97. Marx JJM, Van Asbeck BS. *Use of iron chelators in preventing hydroxyl radical damage: adult respiratory distress syndrome as an experimental model for the pathophysiology and treatment of oxygen-radical-mediated tissue damage*. Acta haematol 1996;95:49-62.
98. Toyokuni S. *Iron-induced Carcinogenesis: the role of redox regulation*. Free Radic Biol Med 1996;20(4):553-66.
99. Kallianpur AR, Hall DL, Yadav M, Christman BW, Dittus RS, Haines LJ et al. *Increased prevalence of the HFE C282Y Hemochromatosis allele in women with breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13:205-12
100. *Hemochromatosis Hereditaria*, 2008 (available from <http://aesculapius.iespana.es>)
101. Ropero P, Briceno O, Mateo M, Polo M, Mora A, Gonzales FA. *Frequency of the C282Y and H6D mutations of the hemochromatosis gene (HFE) in a cohort of 1000 neonates in Madrid*. Ann Hematol 2006;226(85):323-6
102. Merryweather-Clarke A, Pointon JJ, Shearmen JD, Robson HJK. *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. J Med Genet 1997;34:275-78

103. Şimşek H, Sumer H, Yılmaz E, Balaban H, Özcebe O, Haçelik G. *Frequency of HFE mutations among Turkish Blood donors according to transferrin saturation*. J Clin Gastroenterol 2004;38:671-5
104. Şimşek H, Balaban H, Yılmaz E, Sumer H, Büyükaşık Y, Cengiz C. *Mutations of the HFE gene among Turkish hereditary hemochromatosis patients*. Ann Hematol 2005;84:646-9
105. Bozkaya H, Bektas M, Metin O, Erkan Ö, İbrahimoglu D, Dalva K. *Screening for Hemochromatosis in Turkey*. Dig Dis Sci 2004;49(3):444-9
106. Şimşek H, Balaban Y, Sümer H, Yılmaz E, Tatar G. *HFE mutations Analysis of Turkish patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Dig Dis Sci 2006;51:1723-4
107. Fracanzani AL, Conte D, Frquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A, et al. *Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparson matched control patients with non-iron-related chronic liver disease*. Hepatology 2001;33(3):647-51.
108. Stevens RG, Jones Y, Micozzi SM, Taylor PR. *Body iron stores and the risk of cancer*. N Engl J Med 1988;319:1047-52.
109. Frankanzani Al, Conte D, Fraquelli M, Taioli E, Mattioli M, Losco A. *Hereditary Hemochromatosis and Cancer risk: more Fuel to the Fire?* Gastroenterology 2001;121(5):1253-4.
110. Hsing AW, McLaughlin JK, Olsen JH, Mellekjær L, Wacholder S, Fraumeni JF. *Cancer risk following primary hemochromatosis: a population-based cohort study in Denmark (abstract)*. Int J Cancer 1995;60(2):160-2
111. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G. *Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis (abstract)*. N Engl J Med 1985;313(20):1256-62
112. Toyokuni S, Sagripanti JL. *Induction of oxidative single- and double-strand breaks in DNA by ferric citrate*. Free Radic Biol Med 1993;15(2):117-23
113. Tiniakos G, Williams R. *Cirrhotic process, liver cell carcinoma and extrahepatic malignant tumors in idiopathic haemochromatosis. Study of 71 patients treated with venesection therapy (abstract)*. Appl Pathol 1988;6(2):128-38.
114. Günel-Ozcan A, Alyılmaz-Bekmez S, Güler NE, Güç D. *HFE H63D mutation frequency shows an increase in Turkish women with breast cancer*. BMC Cancer 2006;6(37):1-7
115. Dorak MT, Burnett AK, Worwood M, Sproul AM, Gibson BE. *The C282Y mutation of HFE is another male-specific risk factor for childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 1999;94(11):3957.
116. Varkonyi J, Tarkovacs G, Karadi I, Andrikovics H, Varga F, Varga F. *High incidence of Hemochromatosis gene mutations in the Myelodysplastic syndrome: the Budapest study on 50 patients*. Acta Hematol 2003;109:64-7

117. Barton JC, Bertoli LF, Ronald TA. *HFE C282Y and H63D in adults with malignancies in a community medical oncology practice.* BMC Cancer 2004;4(6):1-8
118. Hebert B, Potti A, Alonto MA, Mehdi S. *Incidence and relationship of non-hepatocellular malignancies in patients with hemochromatosis.* Blood 2001;98:5b.
119. Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Britton RS, Zyou XY, Fleming RE, et al. *Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes.* Hematologica 2000;85:340-5.
120. Veneri D, Franchini M, Krampera M, Mattes G, Solero P, Pizzolo G. *Analysis of HFE and TFR2 gene mutations in patients with acute leukemia.* Leuk Res 2005;29:661-4
121. Carmine TC., Evans P., Bruchelt G., Evan R., Handgretinger R., Niethammer D. *Precence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management.* Cancer Lett 1995;94:219-26.
122. Grigg AP, Bhathal PS. *Compound heterozygosity for haemochromatosis gene mutations and hepatic iron overload in allogeneic bone marrow transplant recipients.* Pathology 2001;33(1):44-9.
123. Nielsen P, Günther U, Dürken M, Fischer R, Düllman J. *Serum ferritin iron in iron overload and liver damage: correlation to body iron stores and diagnostic relevance.* J Lab Clin Med 2000;135(5):413-8.
124. Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. *CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HEPG2 cells.* Free Radic Biol Med 2001;31(12):1539-43.
125. Pullarkat V, Blanchard S, Tegmeier B, Dagis A, Patane K, Ito J. *Iron overload adversely outcome of allogenic hematopoietic cell transplantation.* Bone marrow transplant 2008;1-7.
126. Strasser SI, Kowdley KV, Sale GE, McDonald GB. *Iron overload in bone marrow transplant recipients.* Bone Marrow Transplant 1998;22(2):167-73
127. Ho GT, Parker A, MacKenzie JF, Morris AJ, Stanley AJ. *Abnormal liver function tests following bone marrow transplantation: aetiology and role of liver biopsy.* Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;16(2):157-62.
128. McKay PJ, Murphy JA, Cameron S, Burnett AK, Campbell M, Tansey P. *Iron overload and liver dysfunction after allogenic or autologous bone marrow transplantation.* Bone marrow transplant 1996;17:63-6
129. Lichtman SM, Attivissimo L, Goldman IS, Schuster MW, Buchbinder A. *Secondary Hemochromatosis as a long-term complication of the treatment of hematologic malignacies.* Am J Hematol 1999;61:262-4
130. Kamble R, Mims M. *Iron-overload in long-term survivors of hematopoietic transplantation.* Bone Marrow Transplant 2006;37:805-6.
131. Muretto P, Angelucci E, Lucarelli G. *Reversibility of Cirrhosis in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation.* Ann Intern Med 2002;136:667-2.

132. Papazoglou D, Exiara T, Speletas M, Panagopoulos I, Maltezos E. *Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece* (abstract). *Acta Haematol* 2003;109(3):137-40.
133. Angelicheva D, Boteva K, Jordanova A, Savov A, Kufardjieva A, Tolun A. *Cystic fibrosis patients from the Black Sea region: the 1677delTA mutation*. *Hum Mutat* 1994;3(4):353-7.
134. Beutler E. *The significance of the H63D mutation in Hemochromatosis*. *Clin Lab Haematol* 1998;20(2):65-75.
135. Viola A, Pagano L, Laudati D, D'elia R, D'amico MR, Ammirabile M. *HFE gene mutations in patients with acute leukemia*. *Leuk Lymphoma* 2006;47(11):2331-4.
136. Floreani A, Rizotto R, Basso D, Navaglia F, Zaninotto M, Petridis I, Andrea DI. *An open population screening study for HFE gene major mutations proves the low prevalence of C282Y mutation in central Italy*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(4):577-86.
137. Mariani R, Salvioni A, Corengia C, Erba N, Lanzafame C, De Micheli V. *Prevalence of HFE mutations in upper Northern Italy of 1132 unrelated blood donors*. *Dig Liver Dis* 2003;35(7):479-81.
138. Veneri D, Franchini M, Zannetti F, Krampera M, Mattesi G. *Iron overload in acute myeloid leukemia patients is not related to HFE and TFR2 gene mutations*. *Hematologica* 2003;88:1069-70.
139. Restagno G, Lombardo F, Ghiglione P, Calvo A, Cocco E, Sbaiz L. *HFE H63D polymorphism is increased in patients with amyotrophic lateral sclerosis of Italian origin*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(3):327.
140. Speletas M, Kioumi A, Mandala E, Katodritou E, Papaioannou G, Ritis K, et al. *Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greek patients with myelodysplastic syndromes*. *Acta Haematol* 2003;110(1):53-4.
141. Rose C, Ernst O, Hecquet B, Maboudou P, Renom P, Noel MP. *Quantification by magnetic resonance imaging and liver consequences of post-transfusional iron overload alone in long-term survivors after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Hematologica* 2007;92:850-3.
142. Altes A, Remancha AF, Sarda P, Baiget M, Sureda A, Martino R. *Early clinical impact of iron overload in stem cell transplantation. A prospective study*. *Ann Hematol* 2007;86:443-7.
143. Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK. *A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation*. *Gastroenterology* 2002;122(3):646-51.
144. Walsh A, Dixon JL, Ramm GA, Hewett DG, Lincoln DJ, Anderson GJ. *The clinical relevance of compound heterozygosity for the C282Y and H63D substitutions in hemochromatosis*. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4(11):1403-10.
145. Tichelli A, Passweg J, Wojcik D, Rovo A, Harousseau J, Masszi T. *Late cardiovascular events after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective multicenter study of the late effects*

- working party of the european group for blood and marrow transplantation. Hematologica* 2008;93(8):1203-10.
146. Locasciulli A, Bruno B, Alessandrino EP, Meloni G, Arcese W, Bandini G. *Hepatitis reactivation and liver failure in haemopoietic stem cell transplants for hepatitis B virus (HBV)/hepatitis C virus (HCV) positive recipients: a retrospective study by the Italian group for blood and marrow transplantation. Bone Marrow Transplant* 2003;31(4):295-300.
 147. Harrison P, Neilson JR, Marwah SS, Madden L, Bareford D, Milligan DWJ. *Role of non-transferrin bound iron in iron overload and liver dysfunction in long term survivors of acute leukaemia and bone marrow transplantation. Clin Pathol* 1996;49(10):853-6.
 148. Morán-Jiménez MJ, García-Bravo M, Méndez M, Gutiérrez-Vera I, Grau M, Navarro-Ordoñez S, et al. *Bone marrow transplantation into hemochromatotic mice decreases hepatic and duodenal iron overload. Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(1):135-46.
 149. Waalen J, Felitti VJ, Gelbart T, Beutler E. *Screening for hemochromatosis measuring ferritin levels: a more effective approach. Blood* 2008;111:3373-6.