

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

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ YAPILMIŞ
HASTALARDA ANJİYOGENİK FAKTÖR DÜZEYLERİNİN
aGvHH İLE İLİŞKİSİ

Dr. Özlem ŞATIRER
UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2019

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

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ YAPILMIŞ
HASTALARDA ANJİYOGENİK FAKTÖR DÜZEYLERİNİN
aGvHH İLE İLİŞKİSİ

Dr. Özlem ŞATIRER
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Fatma Visal OKUR

ANKARA
2019

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr Fatma Visal Okur'a, uzmanlık eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım İnci Cevher'e ve Berna Alkan'a en önemlisi hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve eşim Yılmaz'a sonsuz teşekkür ederim.



ÖZET

Şatırer Ö, Hematopoietik kök hücre nakli yapılmış hastalarda anjiyogenetik faktör düzeylerinin aGvHH ile ilişkisi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Tezi, Ankara, 2019

Allojeneik hematopoietik kök hücre nakli (HKHN) özellikle hematolojik kanserlerde, hastalık eradikasyonu için çok önemli bir tedavi seklidir. Ancak akut gelişen bir alloreaktif immünolojik reaksiyon olan graft versus lösemi etkisi hematopoietik sistem dışına yayıldığında en önemli transplant komplikasyonlarından biri olan akut graft versus host hastalığı (GvHH) gelişmesine neden olmaktadır. Devam eden laboratuvar ve klinik çalışmalar ile aGvHH etyopatogenezi daha iyi anlaşılmalıya başlanmıştır. Ancak belirlenen farklı biyobelirteç panellerinden (*sistemik inflamasyon, immün aktivasyon, endotel hasarı/aktivasyonu ile ilişkili*) hiçbirinin aGvHH gelişme riskinin veya steroid tedavi yanıtının erken tespiti sağlayacak etkinliği/güvenilirliği kanıtlanamamıştır. Son yıllarda elde edilen bilimsel veriler aGvHH gelişiminde vasküler endotel hücre hasarı, disfonksiyonu ve/veya aktivasyonunun da immün aktivasyon kadar kritik önem taşıdığını göstermiştir.

Transplantasyon öncesi verilen kemoterapi ve radyoterapi içeren yoğun hazırlama rejimleri, profilaktik immünsupresif tedaviler, engraftmanı desteklemek için kullanılan büyüme faktörleri ve gelişen enfeksiyonlar endotel hasarına neden olabilmektedir. Endotel hasarı endotel hücre aktivasyonuna ve anjiyogenezin uyarılmasına yol açar. Anjiyogenezin aGvHH gelişimindeki önemli rolü farklı araştırma sonuçları ile gösterilmiş olmasına rağmen anjiyogenez ile inflamasyon arasındaki ilişkinin aGvHH patogenezindeki rolü (*neden veya sonuç ilişkisi*) hala araştırılmaktadır.

Çalışmamıza Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kemik İliği Transplantasyonu Ünitesi'nde, Haziran 2008 ile Ekim 2018 tarihleri arasındaki allojeneik HKHN yapılmış 37 tane hasta dahil edilmiştir. Hasta grubu, malign ya da malignite dışı nedenler ile HKHN yapılmış olan tüm hastaları kapsamaktadır [18 kız, 19 erkek; ortalama yaş: 8,5 (1-22)]. Ayrıca 10 sağlıklı kök hücre vericisi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu ortalama yaşları 22,4 (2-39) olan 7 kadın ve 3 erkekten oluşmaktadır.

Hastaların hazırlık rejimi öncesinde (-9.günde) ve hazırlık rejimi tamamlandıktan hemen sonra, transplantasyon öncesi (0.günde) toplanan plazma örneklerinden endotel hücre kaynaklı anjiyogenik faktörlerden (Epidermal büyüme faktörü (EGF), Anjiopoetin-2 (Ang2), Endoglin, Follistatin (FS), Heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), Plasental büyüme faktörü (PLGF) ve Vasküler endotelial büyüme faktör A (VEGF-A) düzeyleri multiplex immunoassay yöntemi ile çalışmıştır. Doku rejenerasyonu ile ilişkili trofik faktörler olan VEGF-A, HB-EGF, EGF ve inflamasyon/doku hasarı ile ilişkili olan Ang2, Follistatin ve Endoglin düzeylerine bakılarak aGvHH gelişme riskini belirlemede kullanılabilecek anjiyogenik bir profil elde edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca sistemik inflamasyon belirteçleri olarak serum ürik asit ve albümin değerleri, mutlak lenfosit ve monosit sayıları da rejim öncesi (-9.günde) ve sonrası (0.günde) olmak üzere iki kez bakılarak kaydedilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda ,Ang2, Endoglin, EGF, HB-EGF, VEGF-A plazma düzeyleri incelendiğinde hazırlama rejimi öncesi (-9.gün) bakılan değerlerin rejim aldıktan sonra (0.gün) ciddi bir düşme gösterdiği ancak sadece Ang2 ve Endoglin için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Rejim sonrası bakılan bu anjiyogenik faktör düzeyleri ile kontrol grubundan elde edilen değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

Plazma Follistatin düzeyleri incelendiğinde ise ise; hem rejim öncesinde (-9.gün) hemde rejim sonrasında (0.gün) plazma değerinin kontrol grubu ile hem karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek kaldığı görülmüştür.

Aynı zamanda hastalardan hazırlama rejimi öncesinde ve sonrasında bakılmış olan sistemik inflamasyon belirteçleri olan ürik asit, albümin, absolü lenfosit, absolü monosit değerleri de karşılaştırılmıştır. Eksi dokuzuncu gün ve sıfırıncı gün absolü lenfosit ve monosit

değerlerindeki değişim hem sayısal hem de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Diğer parametrelerde ise sayısal açıdan fark olmakla birlikte istatistiksel açıdan fark tespit edilememiştir.

aGvHH gelişen grup ile gelişmeyen hasta grupları arasında rejim öncesi ve sonrası plazma Ang2, VEGF-A, Endoglin, Follistatin, HB-EGF düzeyleri ve diğer parametreler (ürik asit, albümin, absolü lenfosit, absolü monosit sayıları)) açısından farklılık olup olmadığı araştırıldığında gruplar arasında hiç bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Daha sonra pre-transplant angiyojenik profil belirleme açısından daha anlamlı olabileceği düşünülerek rejim öncesi ve sonrası değerlerin oranlanması ile indeks değerleri hesaplanmış ve aGvHH olan ve olmayan hastalar arasında indeks değerleri açısından farklılık olup olmadığı irdelenmiştir. aGvHH gelişen grupta Ang2 indeks ortalama değeri $3,59 \pm 2,98$ bulunurken; GvHH geliştirmeyen grupta bu değer $1,99 \pm 1,11$ 'dir ($p=0.043$). Endoglin, VEGF-A, Follistatin, HB-EGF, ürik asit, albümin, lenfosit, monosit parametrelerine ait indeks değerlerinde ise; iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Akut GvHH olan ve olmayan hasta grubunda ortalama sağ kalım süresi kıyaslandığı zaman aGvHH geliştirmeyen hastaların geliştiren hastalara göre daha uzun süre yaşadığı tespit edilmekle birlikte bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Lojistik Regresyon Analizi sonucuna göre aGVHH gelişme riski açısından yapılan analizlerde primer hastalık sınıflaması (malign vs. nonmalign), Ang2 ve albümin indeks değişkenleri önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Malign hastalıklar nedenle nakil yapılmış olan hastaların malign olmayan nedenle nakil yapılmış olan hastalara oranla akut GvHH görülme riski 9,72 kat fazladır. Ang2 indeks değerindeki bir birim artışı aGvHH hastalığı görülme riski 2,25 kat arttırdığı ve tedavi sonrası albümin değerindeki düşme yani indeks değerindeki bir birimlik artışın ise aGvHH riskini 62 (1/0,016) kat arttırdığı bulunmuştur.

Sonuç olarak allogeneik HKHN yapılan hastalarda nakil öncesi endotel ilişkili angiyojenik faktör düzeyleri prognostik bilgi edinebilmek amacıyla incelendiğinde sadece vasküler endotel hasarı ve inflamasyon ile ilişkili olan Ang2 indeksi açısından farklılık saptanmıştır. Ang2 değeri yüksek olup, hazırlık rejimi sonrası yeterli düzeyde düşüş elde edilemeyen dolayısı ile Ang2 indeksi yüksek olan hastaların aGvHH gelişimi açısından riskli oldukları tespit edilmiştir.. Diğer angiyojenik faktörler ile aGvHH gelişimi arasında ilişki tespit edilememiştir. Bu durum çalışmadaki hasta sayımızın sınırlı olmasından kaynaklı olabilir. Ancak hem aGvHH olan hemde olmayan hastalarda rejim sonrası benzer değişim paternlerinin izlenmiş olması, aGvHH henüz gelişmediği erken dönemdeki inflamasyon başlangıcındaki endotel hücre değişim mekanizmalarının, aGvHH geliştikten sonra görülen endotel hücre aktivasyon/hasar mekanizmalarından farklı olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısı ile transplant öncesi aGvHH gelişme riskini tespit edebilmek için bu mekanizmaların aydınlatılması ve daha geniş kapsamlı klinik araştırmalar ile bu sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışma sonunda elde edilen ve aGvHH gelişme riski açısından anlamlı bulunan Ang2 ve Albumin indeksleri aynı zamanda immün regülatuar rolleride olan angiogenik faktörler ile inflamasyon başlangıcı arasındaki bu ilişkinin daha detayli araştırılması gerekliliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu, Graft versus Host Hastalığı, Anjiyogenetik Faktörler

ABSTRACT

Şatırer Ö, The relationship between aGvHH and angiogenetic factor levels in hematopoietic stem cell transport. Child Health and Diseases Thesis, Ankara, 2019.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a very important treatment for disease eradication, especially in hematological cancers. However, when the effect of graft versus leukemia spreading out of the hematopoietic system, an acute alloreactive immunological reaction, causes acute graft versus host disease (GvHD) which is one of the most important transplant complications. The ongoing laboratory and clinical studies have begun to better understand the etiopathogenesis of aGvHH. However, the efficacy / safety of none of the different biomarker panels (systemic inflammation, immune activation, associated with endothelial injury / activation) to provide early detection of aGvHH development or steroid treatment response could not be established. Recent scientific data have shown that vascular endothelial cell damage, dysfunction and / or activation are as critical as immune activation in the development of aGvHH.

Intensive preparation regimens including chemotherapy and radiotherapy given before transplantation, prophylactic immunosuppressive therapies, growth factors used to support engraftment and developing infections may cause endothelial damage. Endothelial damage leads to endothelial cell activation and stimulation of angiogenesis. Although the role of angiogenesis in aGvHH development has been demonstrated by different research results, the role of the relationship between angiogenesis and inflammation in the pathogenesis of aGvHH is still being investigated.

In our study, 37 patients with allogeneic HSCT between June 2008 and October 2018 were included in the study of the Bone Marrow Transplantation Unit, Department of Pediatrics, Hacettepe University, Faculty of Medicine. The patient group consisted of all patients who underwent HSCT for malignant or non-malignant reasons [18 girls, 19 men; Mean age: 8.5 (1-22)]. In addition, 10 healthy stem cell donors were included in the study as a control group. The control group consisted of 7 women and 3 men with a mean age of 22.4 (2-39).

Before the preparation regimen of the patients (day -9) and immediately after completion of the preparation regimen, plasma samples collected before transplantation (day 0) from endothelial cell-derived angiogenic factors (Epidermal Growth Factor (EGF), Angiopoietin-2 (Ang2), Endoglin, Follistatin (FS), Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), Placental growth factor (PLGF) and Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) levels were studied by multiplex immunoassay method VEGF-A, the trophic factors associated with tissue regeneration. The aim of this study is to obtain an angiogenic profile which can be used to determine the risk of aGvHH development by looking at the levels of HBV-EGF, EGF and inflammation / tissue damage in terms of Ang2, Folistatin and Endoglin levels. pre-regime (-9th day) and later (on day 0) were recorded twice.

In all patients included in the study, Ang2, Endoglin, EGF, HB-EGF, VEGF-A plasma levels were examined when the pre-treatment regimen (-9th day) values after the regime (day 0) showed a significant decrease but only Ang2 and Endoglin It was determined that this change was statistically significant when compared with the control group ($p < 0.05$). There was no significant difference between these angiogenic factor levels and the control group ($p > 0.05$).

Plasma Folistatin levels are examined; It was observed that the plasma values were significantly higher when compared with the control group both before the regimen (-9th day) and after the regime (day 0).

At the same time, uric acid, albumin, abscess lymphocyte and absolute monocyte values, which are the markers of systemic inflammation, were compared before and after the preparation period. The change in abscess lymphocyte and monocyte values on day minus ninth day and zero day were found to be both statistically significant and statistically difference. In other parameters, although there is a difference in terms of numerical difference, no statistically significant difference was found.

The groups that did not develop with aGvHH group were evaluated before and after the administration of the groups. There was no difference between them.

Afterwards, it was thought that pre-transplant angiogenic profile could be more meaningful and the index values were calculated with the ratio of the values before and after the regime and whether there was any difference between the patients with and without aGvHD. The mean value of Ang2 index was 3.59 ± 2.98 in the developing group. In the group who did not develop GvHH, this value was 1.99 ± 1.11 ($p = 0.043$). In the index values of Endoglin, VEGF-A, Folistatin, HB-EGF, uric acid, albumin, lymphocyte and monocyte parameters; There was no statistically significant difference between the two groups.

Although the mean survival time of the patients with and without acute GvHH was compared with the patients who did not develop aGvHH compared to the patients who developed it, this difference was not found statistically significant ($p > 0.05$).

According to the results of logistic regression analysis, primary disease classification (malignant vs. nonmalign), Ang2 and albumin index variables were found to be significant in the analyzes made for the risk of developing aGVHD ($p < 0.05$). The risk of acute GvHH is 9.72 times higher than the patients who underwent transplantation because of malignant diseases. It was found that a unit increase in Ang2 index increased the risk of aGvHH disease by 2.24 times and a decrease in albumin value after treatment, ie a one-unit increase in the index value increased the risk of aGvHH by 62 ($1 / 0.016$).

In conclusion, endothelium-related angiogenic factor levels before transplantation in patients undergoing allogeneic HSCT were statistically different from Ang2 index, which was associated with vascular endothelial injury and inflammation. Ang2 value is high and it is determined that patients with high Ang2 index are at risk of developing aGvHH after the preparation regimen. Therefore, there was no relationship between the other angiogenic factors and aGvHH development. This may be due to the limited number of patients in our study. However, the similar patterns of change in patients with and without aGvHH have been shown to be different from the endothelial cell activation / damage mechanisms seen in the onset of inflammation at the beginning of inflammation in the early period when aGvHH has not been developed. Therefore, in order to determine the risk of aGVHH before transplantation, these mechanisms should be illuminated and these results should be verified with a wider clinical research. The Ang2 and Albumin indices obtained at the end of this study and which are significant in terms of the risk of developing aGvHH also indicate the necessity to investigate this relationship between the onset of angiogenic factors in the immune regulated roles and the onset of inflammation.

Keywords: Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Graft versus Host Disease, Angiogenic Factors

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hematopoietik Kök Hücre ve Hematopoietik Kök Transplantasyonu	3
2.2. Hematopoietik Kök Hücre Kaynakları	4
2.2.1. Kemik İliği Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücreler	4
2.2.2. Periferik Kan Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücreler	5
2.2.3. Kordon Kanı Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücre Nakli	5
2.3. Kök Hücre Nakli Tipleri	5
2.3.1. Sinjeneik Hematopoietik Kök Hücre Nakli	5
2.3.2. Otolog Hematopoietik Kök Hücre Nakli	6
2.3.3. Allojenik Hematopoietik Kök Hücre Nakli	6
2.4. Donör Seçimi	6
2.5. Hazırlama Rejimleri [19]	7
2.5.1. Myeloablatif Hazırlama Rejimleri	7
2.5.2. İndirgenmiş Yoğunlukta Hazırlama Rejimleri	8
2.5.3. Radyasyon Temelli Rejimler	8
2.6. Hematopoietik Kök Hücrenin Verilişi ve Engraftman	8
2.6.1. Nakledilen Kök Hücrenin Vücuda Yerleşmesi (Engraftman)	9
2.7. Hematopoietik Kök Hücre Nakli Komplikasyonları	9
2.7.1. Erken Dönem Nakil Komplikasyonları [4, 26]	10
2.7.2. Endotel Kaynaklı Komplikasyonlar [26, 27]	10
2.8. Graft versus Host Hastalığı	14
2.8.1. Akut Graft versus Host Hastalığı Gelişim Mekanizmaları	15

2.8.2. Klinik Bulgular [4, 33]	17
2.8.3. GvHH Klinik Sınıflandırılması [33]	19
2.8.4. Akut GvHH Profilaksisi ve Tedavisi	20
2.8.5. Akut GvHH’de Tedavi Prensipleri	20
2.9. Akut Graft versus Host Hastalığı Patogenezini Açıklamaya Yönelik Yeni Yaklaşımlar: Anjiyojenez ve İnflamasyon	23
2.10. Anjiyojenik Faktörler	25
2.10.1. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)	26
2.10.2. VEGF-A (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A)	27
2.10.3. Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Hormonu (HB-EGF)	27
2.10.4. Endoglin	28
2.10.5. Plakental Growth Faktör	28
2.10.6. Follistatin	29
2.10.7. Anjiopoetin-2	29
3. MATERYAL ve METOD	31
3.1. Hasta Örneklerinin Belirlenmesi ve Hasta Bilgilerinin Toplanması	31
3.2. Plazma Örneklerinin Hazırlanması ve İmmünoassay Yöntemi ile Anjiyogenik Faktörlerin Plazma Düzeylerinin Belirlenmesi	31
3.2.1. Hasta ve Donörlere Ait Plazma Örneklerinin Seyreltilmesi	32
3.2.2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması	32
3.2.3. Standartların Hazırlanması	32
3.2.4. Reaktif Hazırlama	33
3.2.5. Mikropartiküler Karışım Hazırlama	34
3.2.6. Seyreltilmiş Biotin Antikor Karışımının ve Streptavidinin Hazırlanması	34
3.2.7. İmmünoassay Yöntemi ile Anjiyogenik Faktörlerin Plazma Düzeylerinin Belirlenmesi	35
3.3. Sonuçların Hesaplanması ve İstatistiksel Yöntem	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR	56
7. KAYNAKLAR	58

8. EKLER	65
EK 1. Hasta Veri Toplama Formu	65
EK 2. Biyobanka Onam Formu	67
EK 3. Etik Kurul Onam Form	71



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(APC)	: Antijen-Sunucu Hücreler
aGvHH	: Akut Graft versus Host Hastalığı
Ang2	: Anjiopoetin 2
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FS	: Folistatin
HB-EGF	: Heparin-bağlayıcı EGF benzeri Büyüme Faktörü
HKHT	: Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
HLA	: Human Lökosit Antijen
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleksi
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VOD	: Veno Oklusif Hastalık

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Akut GvHH Evrelemesi	19
Tablo 2. Akut GvHH Derecelendirmesi	20
Tablo 3. Standart 1 Hazırlanması İçin Gerekli Hacim Oranları	33
Tablo 4. Mikropartikül Karışım Seyreltiğinin Örnek Sayısına Göre Hazırlanması	34
Tablo 5. Biyotin-Antikor Karışımının Seyreltilme Oranları	34
Tablo 6. Streptavidin-PE Seyreltiğinin Hazırlanması	35
Tablo 7. Hastaların Demografik Özellikleri	38
Tablo.8. Endotel ilişkili Plazma Anjiyogenik Faktörlerinin ve İnflamasyon Belirteçlerin Hazırlama Rejimi Öncesi ve Sonrası Değerleri	40
Tablo 9. Akut GvHH ile Faktörlerin Hazırlık Protokolü Öncesi ve Sonrası Plazma Düzeyleri Arasındaki İlişki	42
Tablo 10. Akut Gvhh Olan ve Olmayan Hastaların Plazma Anjiyogenik Faktör ve İnflamasyon Belirteç İndekslerinin Karşılaştırılması	43
Tablo.11. Akut GVHH için İki durumlu Lojistik Regresyon Analizi Sonuçları	46
Tablo 12. Literatürdeki GvHH İle Endotel Markerların İlişkisini İnceleyen Çalışmalar	54
Tablo 13. Literatürdeki GVHH İle Ang 2 İlişkisini İnceleyen Çalışmalar	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Hematopoietik Kök Hücre Özellikleri ve Kemik İliği Niş Bileşenleri	3
Şekil.2. HKHT Sonrasında Erken Gelişen Vasküler Endotel Sendromlarının Ortak Patogenezi.	12
Şekil 3. GvHH Gelişim Basamakları	18
Şekil 4.a. Akut GvHH'nın Başlangıç Fazı	21
Şekil 4.b. GvHH'nin Trafiği,Genişlemesi ve Efektör Fazı	22
Şekil 4.c. GvHH'nın Tedavi Fazı	22
Şekil 5. Anjiyojenik Faktörlerin Sınıflandırılması	26
Şekil.6. Endotel Hasarı Sonrasında Endotelden Salınan Markerlar.	29
Şekil 6. Standart 1'in Hazırlanması	32
Şekil 7. Reaktiflerin Hazırlanması	33
Şekil 8. Nakil Yapılan Hastalarda Sağkalım Grafiği	44
Şekil 9. aGVHH durumuna Göre Sağkalım Grafikleri	44

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hematopoetik kök hücre transplantasyonunun hematolojik kanserlerde ve kanser dışı pek çok hastalığın tedavisinde kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve tedavi başarısı artmaktadır. Donör seçiminde kullanılan moleküler tekniklerin gelişimi, hazırlama rejimlerinin ve destek tedavilerinin modifikasyonu bu başarıya önemli katkı sağlamıştır. Allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) özellikle hematolojik kanserlerde, hastalık eradikasyonu için çok önemli bir tedavi seklidir. Ancak akut gelişen bir alloreaktif immünolojik reaksiyon olan graft versus lösemi etkisi hematopoetik sistem dışına yayıldığında en önemli transplant komplikasyonlarından biri olan akut graft versus host hastalığı (GvHH) gelişmesine neden olmaktadır [1]. GvHH genellikle standart tedavi yaklaşımı olarak yüksek doz steroid başta olmak üzere çoklu immünosupresif tedavilerin kullanımını gerektirmektedir. Ancak hastaların önemli bir grubunda steroid tedavisine direnç ya da bağımlılık gelişmekte ve uzun süreli çoklu immünsupresif tedavilerin kullanımına bağlı çok ciddi komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır [4]. Devam eden laboratuvar ve klinik çalışmalar ile aGvHH etyopatogenezi daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Ancak belirlenen farklı biyobelirteç panellerinden (*sistemik inflamasyon, immün aktivasyon, endotel hasarı/aktivasyonu ile ilişkili*) hiçbirinin aGvHH gelişme riskinin ve steroid tedavi yanıtının erken tespiti sağlayacak etkinliği güvenilirliği kanıtlanamamıştır [5]. Bu nedenle aGvHH gelişimi açısından standart risk grubunda değerlendirilen hastaların bir kısmında ciddi tedavi direnci ortaya çıkarken, yüksek riskli kabul edilen hastaların bir kısmı da gereksiz yere yoğun immünosupresif tedavi almaktadır.

Akut gelişen ve dokularda özellikle cilt, karaciğer ve gastrointestinal sistemde yoğun inflamatuvar hasara yol açan bir klinik tabloya neden olan aGvHH'nın temelinde allojenik donör hücrelerinin alıcı dokuları tarafından sunulan polimorfik doku antijenlerine gösterdikleri güçlü immünolojik yanıt yatmaktadır. Son yıllarda elde edilen bilimsel veriler aGvHH gelişiminde vasküler endotel hücre hasarı, disfonksiyonu ve/veya aktivasyonunun da immün aktivasyon kadar kritik önem taşıdığını göstermiştir [2].

Transplantasyon öncesi verilen kemoterapi ve radyoterapi içeren yoğun hazırlama rejimleri, profilaktik immünsupresif tedaviler, engraftmanı desteklemek için

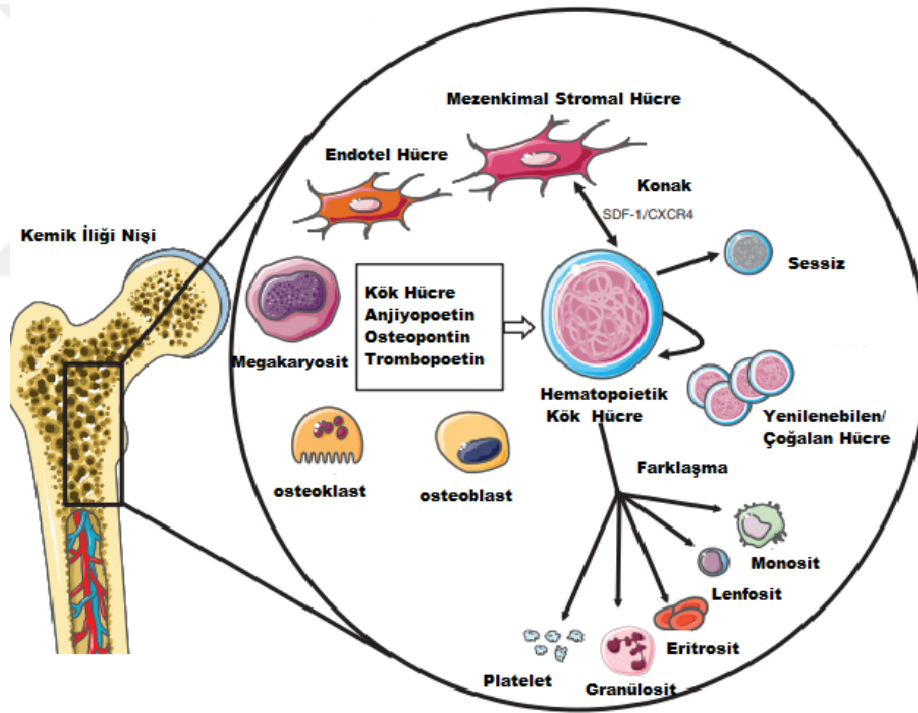
kullanılan büyüme faktörleri ve gelişen enfeksiyonlar endotel hasarına neden olabilmektedir. Endotel hasarı endotel hücre aktivasyonuna ve anjiyogenezin uyarılmasına yol açar. Anjiyogenezin aGvHH gelişimindeki önemli rolü farklı araştırma sonuçları ile gösterilmiş olmasına rağmen anjiyogenez ile inflamasyon arasındaki ilişkinin aGvHH patogenezindeki rolü (*neden veya sonuç ilişkisi*) hala araştırılmaktadır. Bu ilişkinin aydınlatılması aGvHH dışında endotel hasarı ile ilişkili diğer erken transplantasyon komplikasyonlarında (*venooklusif hastalık, kapiler kaçak sendromu, engraftman sendromu, diffüz alveolar hemoraji, idiopatik pnömoni sendromu ve transplant-ilişkili mikroanjiyopati*) erken tanısını ve tedavisinde katkıda bulunacaktır [3]. Endotel hasarının ve aktivasyonunun belirlenmesi için koagülasyon, hücresel adezyon veya anjiyogenez ile ilişkili farklı biyobelirteçlere bakılabilir.

Endotel-ilişkili bu belirteçlerden olan anjiyojenik faktör düzeylerine, ilk hasarın geliştiği erken dönemde (hazırlama rejimi sonrası) bakılması, endotel hücresinin hasara duyarlılığı hakkında bilgi veren anjiyojenik profilin çıkarılmasını sağlayabilir. Doku onarımı ve rejenerasyon ile ilişkili anjiyojenik faktörler (VEGF, EGF, HB-EGF, vb.) ile endotel hasarı ve inflamasyonla ilişkili anjiyojenik faktörler (Ang2, endoglin, PlGF, follistatin, vb.) arasındaki denge hakkında bilgi verici olan böyle bir profillemeye ile aGvHH gelişme riskinin erken dönemde tespiti ve tedavi planlaması yapılabilir. Bu çalışmada transplant öncesi bakılacak endotel ile ilişkili plazma anjiyojenik faktör düzeyleri ile aGvHH gelişim riski arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoietik Kök Hücre ve Hematopoietik Kök Transplantasyonu

Kök hücreler kendi kendini yenilenebilme ve köklülük derecesine göre değişik hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeline sahip olan hücrelerdir. Bütün hematopoietik hücre serilerinin kaynağı olan “Hematopoietik Kök Hücreler (HKH)“, doku onarımı ve rejenerasyonu için gerekli olan ve doku/organların neredeyse tamamında varlığı gösterilmiş olan somatik kök hücreler içerisinde en fazla çalışılan kök hücre modelini oluşturmaktadır. HKH davranışlarının doğru anlaşılabilmesi için HKH niş organizasyonunun, nişi oluşturan hematopietik veya non-hematopoietik hücreler birbirleri ve nörovasküler ağ ile etkileşimlerinin bilinmesi önemlidir [6] [7].



Şekil 1. Hematopoietik Kök Hücre Özellikleri ve Kemik İliği Niş Bileşenleri [7]

DeneySEL hematoloji alanındaki araştırmalar sayesinde HKH’ler ile farklı hematopoietik hücre serilerindeki fonksiyon yetersizliği ve/veya bozukluğunun giderilmesi başta HKHT olmak üzere etkili hücreSEL replasman tedavilerinin geliştirilmesinin yolu açılmıştır. Bu tedaviler içerisinde en yaygın olarak kullanılan

ve en başarılı olan hematopoietik kök hücre transplantasyonunda hedef, kemik iliğinin benign veya malign hastalıklarında hastanın kendisinden ya da sağlıklı ve doku grubu uyumlu başka kişilerden alınan hematopoietik kök hücrelerin hazırlama rejimini takiben hastaya verilmesi ile normal hematopoezin yeniden başlatılması ve kalıcı olarak idame ettirilmesidir [8].

Hematopoietik kök hücre kaynağı; kemik iliği, periferik kan veya kordon kanı olabilmektedir. Eğer kök hücre kaynağı, hastanın kendisi ise “otolog”, doku grubu tam veya kısmi uyumlu başka bir kişi ise “allojenik” HKHT olarak isimlendirilir. Allojenik HKHT’da donörün akraba-dışı (akraba olmayan) veya akraba (akraba olan) olmasına göre de sınıflandırılır. Akraba donörler ise hastanın kardeşi, sinjenik ikizi veya kardeş dışı akrabası olarak kendi içinde ayrılır.

Günümüzde malign (lösemiler, lenfomalar, solid tümörler vb.) ve benign (hemoglobinopatiler, aplastik anemi, kalıtsal immün yetmezlikler vb.) birçok hastalığın tedavisinde HKHT uygulanabilmektedir [9]. İdeal allojenik HKH donörü, hastanın insan lökosit antijeni (HLA) ile tam uyumlu olan kardeşidir. Böylelikle transplantasyon sonrası alloreaktif immünolojik komplikasyonların görülme olasılığı en aza indirgenmiş olur. Akraba dışı donörlerden yapılan HKHT’unda, transplantasyon ilişkili erken dönem mortalite ve morbidite olasılığında artış bulunmuş olmakla birlikte gelişen donor tarama methodları, graft işleme teknikleri ve destek tedavileri sayesinde günümüzde akraba dışı donör kullanılması pek çok hastalık için küratif olabilmektedir [10].

2.2. Hematopoietik Kök Hücre Kaynakları

2.2.1. Kemik İliği Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücreler

Kan yapıcı kök hücrelerin ana kaynağı olan kemik iliğinin vericiden alınması cerrahi bir süreçtir. Vericiye ameliyathanede genel ya da spinal anestezi uygulanmaktadır. Özel kemik iliği iğneleri ile iliak kemiğin arka üst kenarından kemik iliği enjektörle çekilir. Toplama sırasında bir seferde çekilen kemik iliği miktarı arttıkça üründeki periferik T hücre miktarı da artar. Bu nedenle tek seferde 2-3 ml’den daha fazla kemik iliği çekilmemeye dikkat edilir. Allojenik nakillerde alıcının kilosu başına $2-6 \times 10^8$, otolog nakillerde ise $1-2 \times 10^8$ çekirdekli hücre toplanması

beklenmektedir. CD34⁺ hücreler kan yapıcı öncül hücrelerin bir göstergesidir. Normal kemik iliği hücrelerinin %0.5-5 'ini oluşturur [11].

Toplanan kemik iliği ürünü, pıhtılardan ve kemik partiküllerinden temizlenmek için filtreden geçirilmelidir. Kan gurubu uygunsuzluğu yoksa ve alınan hücrelere *in vitro* ayıklama işlemi yapılmayacaksa toplanan hücreler genellikle ilk birkaç saat içinde ve hastaların çoğunda ilk 24 saat içinde damar yolu ile alıcılara verilir. Otolog nakillerde ise toplanan ürün dondurularak saklanır ve yüksek doz radyoterapi ve/veya kemotrapi sonrası eritilerek damar yolu ile hastaya verilir [12].

2.2.2. Periferik Kan Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücreler

1998'den önce çoğu allojenik kök hücre naklinde başlıca kaynak kemik iliği iken bu tarihten sonra özellikle alıcıların 20 yaş ve üzerinde olduğu durumlarda kök hücre kaynağı olarak dolaşan kan kaynaklı (periferik) kök hücrelerin kullanımı artmıştır. Aferez yöntemi ile periferik kandan hematopoietik kök hücrelerin toplandığı bu işlem sırasında genel ya da spinal anestezi uygulaması gerekmez. Ayrıca nakil sonrası kan yapım süreci de daha hızlı düzelme göstermektedir [13].

2.2.3.Kordon Kanı Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Kordon kanı kolay toplanabilen, verici için herhangi bir risk taşımayan yeni bir kök hücre kaynağıdır. Yalnızca doğumdan sonra plasental yüzdeki kan alınarak elde edilir. Fakat kemik iliği ve periferik kana göre daha düşük sayıda hücre içerir bu durum ilk etapta bir dezavantaj gibi görünse de; aynı zamanda içerdiği kök hücre sayısı periferik kana göre yaklaşık beş kat fazladır. Veriler incelendiği zaman bugüne kadar yapılmış olan nakillerde, hücre sayısının yetersizliği gibi bir problem ile sık olarak karşılaşılmadığı gözlenmiştir. Aynı zamanda nakil yapılan bu hastalarda GvHH daha nadir gözleendiği ve daha hafif seyrettiği de raporlanmıştır [14-16].

2.3. Kök Hücre Nakli Tipleri

2.3.1.Sinjeneik Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Sinjeneik nakil; alıcı ve vericinin tek yumurta ikizi olduğu durumlarda yapılan nakile verilen isimdir. Bu durumda alıcı ve vericinin ikisi de aynı genetik yapı ve aynı

doku tipine sahiptir. Bu tip nakillerde verici hücrelerinin reddedilmesi ihtimali teorik olarak mümkün değildir ve alıcı dokuları vericinin immün hücrelerinin saldırısına uğramaz [17].

2.3.2.Otolog Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Verici kişinin kendisidir. Genellikle lenfoma ya da solid kanseri olan çocuk ve erişkin hastaların tedavisinin belli bir aşamasında kök hücreler kişinin kemik iliğinden ya da aferez yoluyla alınmış olan periferik kanından toplanır ve yoğun bir radyoterapi ve/veya kemoterapi sonrasında kan yapımının düzeltilmesi amaçlanarak hastaya geri verilir.. Amac primer hastalık eradikasyonu için uygulanan yüksek doz sitoreduktif tedavi sonrası gelişen kemik iliği aplazisinin düzeltilmesidir.[17].

2.3.3. Allojenik Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Allojenik nakil farklı iki kişi arasında yapılan hematopoetik kök hücre nakline verilen isimdir. Bu nakilden önce alıcı ve verici arasındaki majör doku antijenlerinin uyum oranını belirlemek son derece önemlidir. Uyum, alıcı ve vericinin doku tiplerinin moleküler metodlar ile tayini yapılarak değerlendirilir.

Hematopoetik kök hücre nakli yapılacak hastalarda en iyi verici tam uyumlu kardeş vericilerdir. Ancak kardeşlerin doku tipleri her zaman tam olarak uymaz. Allojenik nakil yapılacak hastaların sadece %25-30'unun tam uyumlu kardeş vericisi vardır. Akrabalık evliliklerinin fazla olduğu ülkelerde bu oran daha yüksektir ve anne,baba veya akrabalar da tam uyumlu verici olabilir.

Doku grubu uyumlu olan hematopoetik kök hücreler, akraba dışı gönüllü vericilerden de elde edilebilir. Fakat uyum olasılığı aile içi vericilere oranla oldukça düşüktür. Akraba içi ve akraba dışı allojenik nakiller, verilen hücrelerin alıcı tarafından immün reddi ve verici hücrelerinin alıcı hücrelerine karşı geliştirdiği alloimmun reaksiyon nedeni ile otolog nakillerden farklıdır [17].

2.4. Donör Seçimi

Alıcı ve verici (donor) arasındaki uyum doku tipi tayini ile değerlendirilir. Doku tipi ile ilgili antijenler (Major Histocompatibility Complex, MHC) hücre yüzeyinde bulunan özgül bir grup molekül olup, kişinin bağışıklık sisteminin kendi

hücreleri ile yabancı hücreleri birbirinden ayırt etmesini sağlayarak; kendi hücrelerine karşı bir reaksiyon vermezken, yabancı hücrelerin bir tehdit olarak algılamasında ve eredike edilmesinde rol alırlar.

Major doku grubu (MHC) antijenleri insanda 6. Kromozomun kısa kolu üzerinde 6 milyon baz uzunluğunda bir parçada yerleşmiş genler tarafından kodlanır. Bu genler Sınıf I-II-III olarak adlandırılır. Sınıf I-II genler ilk olarak lökositler üzerinde belirlenmeleri nedeni ile “İnsan Lökosit Antijenleri” (Human Leucocyte Antigens-HLA) olarak adlandırılmışlardır. Sınıf I antijenler; A,B,C gruplarını, sınıf II antijenler ise D olarak bilinen ve beş alt tipi olan (DR,DQ,DP,DO ve DN) grubu kapsamaktadır.

Sınıf I antijenler insan vücudundaki tüm çekirdekli hücrelerde bulunur. Sitotoksik T hücrelerin ($CD8^+$ T lenfositler) antijenleri tanınmasında ve aktivasyonunda rol alırlar. Sınıf II antijenler ise sadece monositler, aktive B ve dentritik hücrelerin gibi antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunurlar.. Yardımcı T hücrelere ($CD4^+$ T lenfositler) antijen sunumunda rol oynarlar. Doku uygunluk antijenlerinin tiplendirilmesinde serolojik ya da moleküler yöntemler son derece önemlidir. Fakat alıcı ile vericinin Sınıf I ve II antijenlerinin tamamen uyumlu olduğu nakillerde bile verici hücrelerin alıcı hücrelerine karşı geliştirdiği bir alloreaktif immünolojik yanıt olan GvHH gelişebilmesi MHC antijenleri dışında kodlanan başka genetik farklılıkların da önemli olduğunu göstermektedir. Bu farklı genler tarafından kodlanan moleküllere minör doku grubu antijenleri adı verilmektedir, ancak rutinde doku tiplendirilmesinde bakılan moleküller değildir [18].

2.5. Hazırlama Rejimleri [19]

2.5.1. Myeloablatif Hazırlama Rejimleri

Miyeloablatif rejimlerle hastaya verilen yüksek doz sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi ile yetersiz ve/veya fonksiyonu bozuk olan mevcut kemik iliğinin yok edilerek (myelodeplesyon) yeni verilecek kök hücrelere niş sağlanması, ardından engraftman elde edilmesi, graft rejeksiyonu ve GvHH'nin önlenmesi için yeterli ölçüde immünosupresyon sağlanmış olan alıcıya HLA tam uyumlu olan vericiden alınan hematopoetik kök hücrelerin verilmesi amaçlanır. Hazırlama rejimi olarak total

vücut ışınlaması (TBI)/ Siklofosfamid (CY) , Busulfan (BU)/ CY gibi alkilleyici kemoterapotik ajan kombinasyonları klasik protokollerde en sık kullanılan myeloablatif hazırlama rejimleridir. Bu rejimlerin birbirine üstünlüğü henüz net olarak gösterilememiştir [20].

2.5.2. İndirgenmiş Yoğunlukta Hazırlama Rejimleri

İndirgenmiş yoğunlukta hazırlama rejimleri (İYHR), yeterli immünosupresyon ile engraftmanın oluşmasını ve myeloablasyon yapmadan daha az toksisite ile naklin gerçekleşmesini amaçlayan genellikle fludarabin (FLU) ve doz ayarlaması yapılmış, myeloablatif ajanları içeren rejimler olup; özellikle malign olmayan hastalıklarda, kemik iliği yetmezliği sendromlarında ve eşlik eden hastalığı bulunan hastalarda tedavi ilişkili mortaliteyi azaltmak için tercih edilen rejimlerdir. Genellikle HKHT sonrası gelişen sitopeninin süresi ve kök hücre replasmanı gereksinimine göre sınıflandırılmaktadırlar [21],[22].

2.5.3. Radyasyon Temelli Rejimler

Hematopoetik kök hücre nakli uygulamalarının ilk başladığı dönemden beri kullanılmakta olan total vücut ışınlama (TBI) temelli rejimlerin tercih edilme nedenleri arasında; etkin immünosupresif özellik, kemoterapotik ilaçlara göre merkezi sinir sistemi ve testisler gibi bölgelere daha iyi penetre olması nedeniyle bu bölgelerden gelişebilecek nüklere karşı daha etkili olması sayılabilir. Etkisi hızlı ortaya çıkar, yarı ömrü kısadır. TBI tek bir doz halinde veya fraksiyonel olarak verilebilir. Yapılan çalışmalar ile fraksiyonel günlük dozlarda uygulanan TBI rejimlerinde erken ve geç dönemde ortaya çıkan komplikasyonlar ile daha nadir olarak karşılaşılabildiği ortaya konulmuştur [21],[23].

2.6. Hematopoietik Kök Hücrenin Verilişi ve Engraftman

Hazırlama rejiminden sonra toplanan kan yapıcı kök hücreler bir santral venöz kateter yoluyla alıcının kan dolaşımına verilir. Kök hücre verilmesi esnasında ağrı, döküntü, ateş, göğüs ağrısı gibi transfüzyon ilişkili komplikasyonlar gelişebilir. Verici kaynaklı kök hücreler hücreler arası sinyalizasyon yollarının aktivasyonu sayesinde kendi yollarını bularak kemik iliğine ulaşırlar. Sağlıklı hematopoietik hücrelerin kan

hücrelerine farklılaşmaları ile kalıcı donör tipi hematopoezin rekonstrüksiyonu gerçekleşir. Nakil öncesi günler eksi (-), nakil sonrası günler artı(+) olarak belirtilir ve nakil günü 0. Gün olarak ifade edilir. Böylece hasta ve ailesinin tedavinin neresinde olduklarını, transplant ilişkili risklerin gelişim zamanlarını ve taburculuk zamanını daha iyi anlaması ve hastaların nakil sürecinde daha iyi izlenmesi sağlanmış olur [1].

2.6.1. Nakledilen Kök Hücrenin Vücuda Yerleşmesi (Engraftman)

Engraftman, verilen kök hücrelerin alıcı kemik iliğine ulaşarak yerleşmesi ve tüm serilere ait yeni kan yapıcı hücrelerin yapılması ile gerçekleşir. Naklin tipi, kök hücre kaynağı ve altta yatan hastalık gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmesine rağmen genel olarak engraftmanın +15 ile +30. günler arasında gerçekleştiği bilinmektedir. Enfeksiyon, tıbbi girişimler, verilen kök hücre sayısının azlığı ya da yetersizliği durumunda engraftman zamanı gecikebilir ya da engraftman hiç olmayabilir. İlk 30 günde yeni kemik iliği hücreleri yapımı başlamış olsa bile immünolojik rekonstrüksiyon daha uzun sürmektedir [24].

2.7. Hematopoetik Kök Hücre Nakli Komplikasyonları

Hematopoetik kök hücre nakli hematolojik, immünolojik, onkolojik ve metabolik bir çok hastalık için önemli bir tedavi seçeneğidir. Fakat hazırlık rejiminde kullanılan ilaçlar ve vücut ışınlamasına bağlı olarak gelişen doku/organ hasarları, uzamış veya tekrarlayan pansitopeni ve immün yetmezlik tablosu, bunlara bağlı gelişen tekrarlayan ağır enfeksiyonlar, immün supresif tedaviler ve primer hastalığa ait özellikler gibi hasta/donor ve transplant ilişkili birçok faktör erken ve geç dönemde gelişen nakil komplikasyonlarına neden olmaktadır. Son yıllarda doku gurubu en uygun vericinin seçilmesine yönelik moleküler tekniklerin gelişmesi, hazırlama rejimlerinin ve destek tedavilerinin modifikasyonları ile transplant ilişkili mortalite oranları düşmüş ve nakil sonrası hastaların yaşam süreleri belirgin olarak uzamıştır buna rağmen yine de mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkileyen komplikasyonlar karşımıza çıkmaktadır [25].

2.7.1. Erken Dönem Nakil Komplikasyonları [4, 26]

Erken komplikasyonlar genellikle HKHT'dan sonraki ilk 100 gün içinde gözlenirken geç komplikasyonlar daha sonraki dönemde gelişen komplikasyonlardır.

2.7.1.1. Erken Dönem Komplikasyonları

- Graft Rejeksiyonu
- Enfeksiyonlar
- İmmunolojik Komplikasyonlar
- Akut Graft Versus Host Hastalığı
- Organ Spesifik Komplikasyonlar

2.7.1.2. Geç Dönem Nakil Komplikasyonları [25]

- Kronik GvHH
- İkincil Malignansiler
- İnfertilite
- Endokrin Bozukluklar
- Kronik Akciğer Hastalıkları
- Adrenal Fonksiyon Bozuklukları
- Büyüme Gelişme Geriliği
- Göz ve İşitme ile İlgili Sorunlar
- Nörolojik ve Psikiyatrik Sorunlar
- Kronik Enfeksiyonlar (Hepatit B-C)

2.7.2. Endotel Kaynaklı Komplikasyonlar [26, 27]

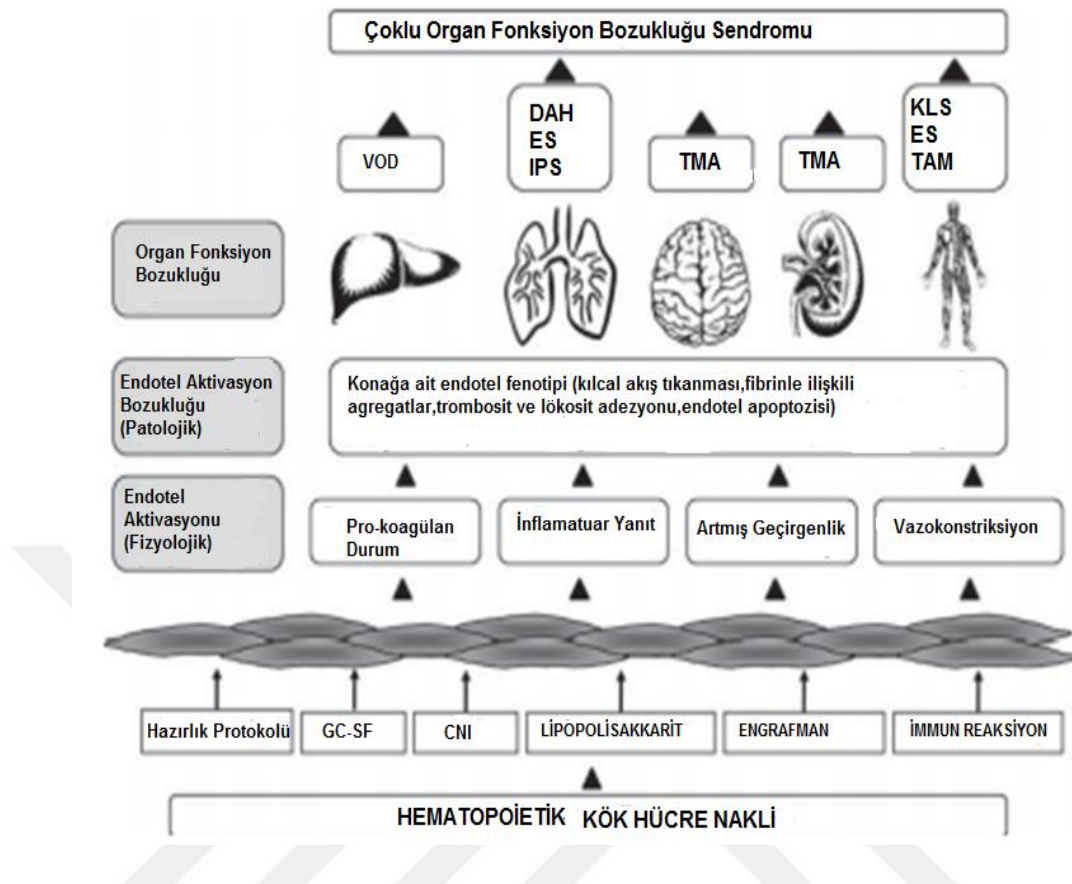
Endotel kan ve dokular arasındaki aktif biyolojik ara yüzüdür.Çeşitli olaylar lokal ve sistemik olmak üzere endotel aktivasyonunu tetikler ve vasküler yatakta bir takım değişikliklere yol açar. Nakil öncesi verilen hazırlık rejimleri, geçirilmiş enfeksiyonlar, hastaya verilen GC-SF tedavileri, nakilin kendisi endoteli aktive eder, yıkılmış mukoza bariyerinden geçen endojen faktörler ile sitokin salınımı tetiklenir. İmmun sistem aktive olur doğal immün sistem elemanlarının ve T hücrelerin endotel tabakadan transmigrasyonu ile endotel ve T hücrelerinin aktivasyonu kolaylaşır,ikinci

olarak da yeni oluşan T lenfositlerin kan dolaşımına katılması ile endotel ile T lenfositlerin bifazik etkileşimi sağlanır. Tüm bu mekanizmaların henüz tam olarak aydınlatılmış olmasa da nakil sonrası endotel kaynaklı komplikasyonlar olarak adlandırmış olduğumuz aşağıda yer alan komplikasyonların etyopatogenezinde rol aldığı düşünülmektedir.

- Kapiller Sızıntı Sendromu
- Engraftman Sendromu
- Diffüz Alveolar Hemoraji
- Trombotik Mikroanjiopati
- Venookluzif Hastalık

2.7.2.1. Kapiller Kaçış Sendromu

Vasküler endotel hasara bağlı olarak, intravasküler sıvının ekstrasvasküler alana kaçmasına verilen isimdir. İnsidansı %20 civarındadır. Genel olarak nakilden sonraki ilk 10 gün içerisinde ortaya çıkmaktadır. HKHT öncesinde yüksek doz kemoterapi alan hastalar ve akraba dışı vericiden HKHT yapılan hastaların daha büyük risk altında olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır. Klinik olarak 24 saat içinde %3'den fazla kilo artışının olması ve hastanın diüretiğe yanıt vermeyen yaygın ödeminin bulunması ile karakterizedir. Tedavisinde metil prednizolon ve C1 esteraz inhibitörü kullanılabilir [26, 27].



Şekil.2. HKHT Sonrasında Erken Gelişen Vasküler Endotel Sendromlarının Ortak Patogenezi.

CLS (Kapiller Leak Sendromu) CNI (Kalsinörin İnhibitörleri) DAH (Diffuz Alveolar Hemoraji) ES(Engraftment sendromu) IPS(idiyopatik pnömoni sendromu) LPS (lipopolisakarit) TMA (Trombolitik Mikroanjyopati) VOD (veno-okluzif hastalık)

2.7.2.2. Engrafman Sendromu

HKHT sonrasında nötrofil engraftman sürecinde gelişebilen ;T hücre, monosit ve diğer efektör hücrelerin, kompleman aktivasyonunun, endojen ve egzogen etkileri ile salınan proinflamatuvar sitokinler ile oluşan epitel ve endotel hasar engrafman sendromunun patogenezinde rol almaktadır. Yeni oluşan nötrofillerin çoğunlukla akciğerde sekestre olması nedeni ile pulmoner ödem belirgindir.

Engraftmanın olduğu günlerde (+15-30.gün) meydana gelen $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$ ateş, vücut yüzeyinin %25'ini ve daha büyük bir alanı içeren cilt döküntüsü, kardiyak olmayan akciğer ödemi, hipoksi ve ani yükselen CRP ($\geq 20\text{mg/dL}$) majör kriterlerini oluştururken, vücut ağırlığının %2.5 veya daha fazla artışı, kreatin değerinin normalden en az iki kat yüksek olması, billirubin değerinin $\geq 2\text{mg/dL}$,ALT ve AST

değerlerinin normalin iki katı ve/veya daha fazla kat yüksek olması ise minör kriterleridir [26][27] [28].

2.7.2.3. Diffüz Alveolar Hemoraji

Göğüs radyografisinde diffüz infiltrasyon, ateş, arteryal hipoksemi, öksürük, ateş ve progresif dispne ile karakterizedir. İnsidansı %10-21 arasındadır. Nakilden sonraki 30 gün içerisinde özellikle 11 ve 19. günler arasında karşımıza çıkmaktadır.

Hastanın transplant öncesinde yoğun kemoterapi almış olması, hazırlık rejimi toksisitesi, total vücut ışınlaması, torakal radyoterapi ve hasta yaşının büyük olmasının diffüz alveolar hemaraji etyolojisinde önemli olduğu bildirilmiştir.

İki teori vardır ; bir teoride, kemoterapi ve radyoterapi farklı pulmoner yapıları etkilemekte ve proteaz-serbest radikallerin toksik etkisiyle pulmoner vasküler endotel hasar görmektedir. Diğer teori, inflamatuvar hücrelerin uyardığı sitokinlerin, peri engraftman döneminde pulmoner vasküler endoteli zedelemesidir [29].

2.7.2.4. Trombotik Mikroanjiyopati TA-TMA

Transplantasyon ile ilgili trombotik mikroanjiyopati çok sık görmüş olduğumuz bir komplikasyon olmasa da kliniği ciddi seyreden bir komplikasyondur. Bir veya daha fazla risk faktörünün açığa çıkardığı IL-1,TNF-a,interferon gama gibi sitokinlerin mikrovasküler endotel hücrelerde oluşturduğu hasar ile apoptozis, lökosit adezyonu, trombosit ve koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu ile trombüs oluşmaktadır. Ve tüketimdeki artış sonucunda dirençli trombositopeni meydana gelmektedir. Klinik tablo olarak anemi, ateş, mikrovasküler tıkanma renal fonksiyon bozukluğu ile klinik olarak ortaya çıkmaktadır. Genellikle nakil sonrası +32 -40.gün civarında ortaya çıkar ve tedavisinde ekülizumab, rituximab, defibrotid ve plazma exchange yararlı olabilir. [30].

2.7.2.5. Hepatik Venooklusif Hastalık (VOD)

Sinuzoidal obstruktif sendrom olarak da adlandırılan VOD'ın karaciğerde yer alan sitokrom P450 enzimatik sistemi ile detoksifiye edilen bazı ilaç metabolitlerinin karaciğer hasarı sonucu glutatyon peroksidaz enzim sisteminin de yetersiz kalmasıyla karaciğerde birikmeye başlaması ve toksik metabolitlerin özellikle zon 3'de hepatosit

sinüzoidal endotele zarar vermesi ile sinüzoidal ve venüller duvarındaki Faktör 8 ve fibrinojenin aktifleşmesini takiben antikoagülan bir faktör olan ATIII, protein C miktarı azalması, buna bağlı olarak trombüs oluşması ve sinüzoidal kollajen birikimi ile venüller duvarda sklerozis ve fibrozis gelişmesi ile karakterize olduğu düşünülmektedir.

Von Willebrand faktör multimerlerindeki düzensiz artış ve dirençli trombositopeni, koagülasyon kaskadının venooklusif hastalığın etyopatogenezinde çok etkin olduğunun bir diğer göstergesidir. Sonuç olarak hepatoselüler nekroz ve vasküler tıkanma sonucunda karaciğere gelen sıvı akımında geriye kaçış başlamakta, damar içi sıvıdaki sodyum ve albümin ekstravasküler alana kaçmaktadır. Azalan volüm renal kan akımını azaltarak renin-anjiyotensin sistemini aktif hale getirir. Sıvı ve sodyum retansiyonu, asit, ödem ve kilo artışı meydana gelir.

Tanı kriteri olarak; açıklanamayan trombositopeni, üç gün içinde diüretik tedavisine rağmen %5 veya daha fazla kilo artışı, hepatosplenomegali, asit, üç gün süreyle billirubin 2mg/dL veya daha fazla değerinde olması gibi parametreler kullanılmaktadır [31].

Yüksek doz kemoterapi ve radyoterapi alan hastalarda daha sıklıkla gözlenmektedir. HKHT öncesinde ALT özellikle de AST yüksekliği, HLA uyumsuzluğu, antimikrobial tedavi almış olması bu riski arttırmaktadır. [32]

Tedavisinde defibrotid ve steroid tedavisi kullanılmaktadır.[31]

2.8. Graft versus Host Hastalığı

GvHH, vericiden alınarak hastaya kök hücrelerle birlikte nakledilen sağlıklı T lenfositlerin neden olduğu şiddetli immünolojik reaksiyon sonucu oluşan organ fonksiyon bozukluğu ile giden kompleks bir klinik tablodur. Özellikle alloHKHN yapılan hastalar bu durumla daha fazla karşılaşma riski altındadır. HLA tam uyumlu nakillerde bile, immünsupresif profilaksiye rağmen, oldukça sık gözlenebilen bir tablodur. Kapsamlı laboratuvar ve klinik çalışmalara, profilaktik ve tedavi edici ajanlara rağmen GvHH halen alloHKHN sonrası en önemli mortalite ve morbidite sebebi olarak kabul edilir.

Altta yatan risk faktörlerine bağlı olarak (*HLA uyumsuzluğu, yaş, kök hücre kaynağı, donör-alıcı cinsiyet farkı ve hazırlama rejimi*) hala alıcılarda gelişme sıklığı

%40'a kadar çıkabilmektedir. HKHN'den sonra ortaya çıkış zamanına göre akut ve kronik GvHH diye ikiye ayrılır. Genellikle ilk 100 gün içerisinde gelişen durum akut GvHH olarak adlandırılır. [33]

Hastalığın etyopatogenezinin temelinde DAMP'lar (hasar ilişkili moleküller) ve PAMP'ler (patojen ilişkili moleküller) tarafından aktive edilmiş olan konak antijen sunan hücrelerinin (APC) aktivasyonu ile, T hücrelerine antijen sunumu sonrasında açığa çıkan inflamatuvar sitokinler ve immün efektör diğer hücrelerin tetiklediği mekanizma yer almaktadır. (Şekil 2.a.) [34]

2.8.1. Akut Graft versus Host Hastalığı Gelişim Mekanizmaları

Alıcının cilt, mukozalar, karaciğer, barsak gibi bazı doku hücrelerindeki MHC sınıf II moleküllerine karşı verici CD4+ T hücre aktivasyonu ve bu aktivasyonu takiben IL-2, IL-4 ve IL-10 gibi moleküllerin salınması patogeneizde başlıca rol oynar.

Kök hücrelerin hastaya infüzyonundan önce hastaya uygulanan yüksek-doz kemoterapi rejimleri, hastanın geçirdiği infeksiyonlar ve primer hastalığının etkisi ile hastanın dokularında çeşitli derecelerde hasar oluşur. Özellikle yüksek-doz kemoterapi hastanın (alıcının) Antijen-Prezente-Edici Hücrelerini (APC) aktive ederek infüze edilen suspansiyon içindeki donör T-lenfositlerinin bölgeye gelmelerini kolaylaştırır, Alıcıda bulunan APC'ler donör T-hücrelerinin uyarımı için gereklidir. MHC'deki Sınıf-I antijenleri CD8+ T-Hücrelerini ve MHC Sınıf-II antijenlerindeki antijen farklılıkları ise CD4+ T-Hücrelerini uyarır. En kuvvetli APC görevi yapan dendritik hücreler (DC), nakil öncesi ve sonrasında aktive olurlar, immün cevabı uyarırlar ve T hücrelerine çoklu aktivasyon sinyalleri iletirler. Naif T-hücreleri sonuçta Th1 (IL2, IFN-gama) ve Th2 sitokinleri (IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13) salgırlar, ve optimal aktivasyon durumuna geçerler; cilt, gastrointestinal epitel ve endotel gibi dokuların hasarına neden olurlar (Sekil 1) [35] .

Tüm nakillerde HLA tam uyumlu vericiler bulunamamaktadır. AGvHH için yüksek risk teşkil eden HLA uyumsuzluğu açısından 2000'li yıllardan sonra yeni çalışmalar ışığında yeni teoriler ortaya konmuştur. Son zamanlarda HLA class 1 molekülünün peptit bağlayıcı kısmındaki aminoasitlerin ve HLA B ve C nin belirli lokuslarındaki uyumsuzlukların aGvHH hastalığı ile bağlantısının olabileceği

tartışılmaktadır. Bu lokuslardaki uyumsuzluktan kaçınmak unrelated nakillerde GvHH riskini azaltabilir.

Diğer üzerinde durulan faktör ise;Minör Histocompability Antijen (miHAS) 'in dişi-erkek cinsiyet arasındaki nakillerde Y kromozomuna karşı vermiş olduğu immun yanıttır. Cinsiyet seçimine dikkat edilmesinin de aGvHH'de önleyici etmenlerden olabileceği konusu gündemdedir. Aynı zamanda killer immun globülin-like reseptör de (KIR-KIR Ligand) bu konuda üzerinde çalışılan başka bir markerdir.

Bunların dışında aGvHH immun reaksiyonunda rol alan genetik olmayan tetikleyici ajanlar bulunmaktadır.DAMP (Yıkım ilişkili moleküler patern) ve PAMP (patojen ilişkili moleküler patern) adını vermiş olduğumuz bu moleküllerden DAMP'lar extraselüler matrix komponentlerini,adenozin trifosfat ve ürik asit gibi moleküler yapıları içerir. Örneğin ekstraselüler matriksin bir komponenti olan heparan sülfat ve endojen toll-like reseptör 4 (TLR4) alloreaktif T hücre cevabını uyarır. Dolayısı ile aGvHH patogenezinde önemli rol oynar.Ürik asit de NLRP3 uyarımını gerçekleştirerek GvHH için anahtar rol oynayan IL-1 β adlı sitokin salınımını uyarır [36].

Son zamanlarda üzerinde durulan bir diğer konu ise PAMP'lardır. Bakteri flagelinin komponentlerinin TLR5 etkileşimi ile ilginç şekilde aGvHH gelişimini azalttığı yönde de bir takım yayınlar bulunmaktadır.

Antijen sunan hücrelerin ise (APC) geçmişten beri aGvHH'de en önemli tetik nokta olduğu düşünülmektedir. Son zamalarda langerhans hücrelerin,B hücrelerin azaltılması ile aGvHH'ın azalmadığını hatta konak makrofajları,nötrofil ve dentritik hücreleri baskılanan hayvan modellerinde daha da fazla GvHH izlenmiş olduğunu gösteren yayılar olsa da; APC'nin 100-1000 kat oranında GvHH'yi tetiklediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Henüz mekanizmalar tam aydınlatılamamıştır bununla birlikte bu derece mortalite ve morbiditeyi arttıran bu durum ile ilgili henüz profilaksi açısından yeterli strateji bulunmamaktadır [37].

GvHH efektör fazında donör T hücreleri, NK hücreler, B hücreler, mononükleer fagositik hücreler ve bunların tetiklediği sitokin cevapları temel rol oynar. Donör T hücreleri üzerinde en iyi çalışılmış olan efektörlerdir .Birçok profilaksi ve tedavi stratejilerinin temelinde bu hücreler vardır. Bu hücrelerin aktive olabilmesi için antijen sunan hücreler tarafından uyarılması gerekmektedir. Bu uyarım için pek

çok kostimulatör görev alır. B7/CD28/CTLA4 , CD30/CD30L, CD40/CD40L gibi [38].

Aktive olan bu T hücreleri çoğalabilir,hedef dokulara taşınabilir.Kemokin reseptörlerinin CCR2,CCR5,CCR6,CCR7 aktivasyonu ile periferik kandaki bu hücre alt grupları değişebilir.

Naif T hücreler aGvHH kliniğinin temelini oluştururken, hafıza T hücreleri ve NK hücreler, mononükleer fagositik hücreler, nötrofiller de etyopatogeneze de rol almasına rağmen henüz bireysel olarak katkıları tam netleşmiş değildir.

Nötrofil engraftmanı da GvHH için ikincil bir efektördür, transplant sonrası GC-SF kullanımının artmış GvHH ile ilişkisi olduğunu gösteren yayınlar aracılığı ile rolü indirekt olarak belirtilmiştir.

B hücre depleasyonu yapılan hastalarda, rituximab gibi B hücreleri baskılayan ajanlar kullanan hastalarda daha az GvHH geliştiğinin gösterilmesi de B hücrenin de aGvHH etyopatogenezindeki önemini ortaya koymaktadır.

Efektör fazın final birleşenleri olan sitokinler proinflamatuvar ve antiinflamatuvar dengede rol alır. Bu sitokinlerin bazıları TNF-alfa, IL-13, 1L-6, IL-7, IL-23,Th2'dir.

İnflamatuvar kaskad ve devam eden doku yıkımı efektör fazda dolaşıma bir takım biyomarkerların salınımına neden olur. T hücre tarafından aktive olan CD30,deri spesifik elafin, barsak spesifik REG-,IL-1 ailesinde ST2, mikro-RNA bunlardan bazılarıdır [34].

GvHH'de tedavi amaçlı steroid başta olmak üzere immunsupresif tedaviler kullanılırken hastaların yaklaşık yarısı steroide dirençlidir yani birinci basamak tedavilere tam yanıt vermez. Kontrol edilemeyen bu inflamasyon ve refrakter hastalık durumunda epitel hücrelerde yıkım devam eder marofajlar epitele ve endotele infiltre olur ve uzun vadede bu durumun getirmiş olduğu komplikasyonlar nedeni ile survival önemli ölçüde azalır. Son çalışmalara bakıldığında zaman steroid dirençli aGvHH vakalarında survival %15 olarak hesaplanmıştır [39].

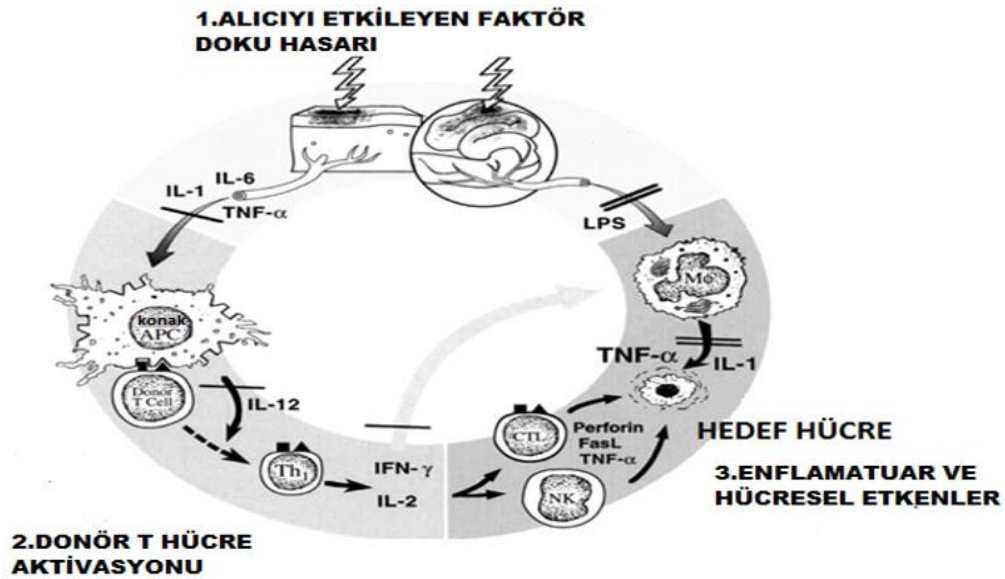
2.8.2. Klinik Bulgular [4, 33]

Akut GvHH'nın en sık rastlanan ve klinikte en sık karşımıza çıkan bulguları şunlardır: deride eritematöz döküntü,kızarıklık, sarılıkla karakterize hepatit ve

gastroenterit (karın ağrısı ve ishal). Bu semptomlar tek başına ortaya çıkabileceği gibi üçü birlikte ve aynı anda da karşımıza gelebilir.

2.8.2.1. Deri ve Mukoza Bulguları

Akut GvHH'da sıklıkla nötrofillerin engrafmanını takiben ilk ortaya çıkan klinik bulgu makülo papüler döküntüdür. Erken evrede beliren kaşıntılı ve kırmızı renkli deri lezyonları, boyun, omuzlar, avuç içleri ve ayak tabanlarında görülür. Hastalık ilerledikçe eritemli döküntüler giderek göğüse, sırtta ve karın bölgesine, bazen ileri evrelerde tüm vücut bölgesine yayılabilir. Ağır seyirli akut GvHH hastalarında üçüncü derece yanıklarda izlenen deri lezyonlarına benzer bülloz lezyonlarla karakterize epidermal nekroz görülebilir. Deri bulgularının yanı sıra bazen burunda tıkanıklık ve hapşırmaya da, mukozal semptomların ilk belirtisi olabilir. Ayrıca, akut GvHH'li hastalarda konjunktivite de sık rastlanır. Kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda deride eritematöz döküntü gözlenmesi halinde antibiyotikler başta olmak üzere ilaç toksisitesi ve hazırlık rejiminin yan etkileri gibi olasılıkların da ayırıcı tanıda düşünülmesi gerekir.



Şekil 3. GvHH Gelişim Basamakları [40]

2.8.2.2. Karaciğer Bulguları

Akut GvHH'da deriden sonra ikinci sıklıkta tutulan organ karaciğerdir. Karaciğer tutulumunun ilk ve en sık görülen belirtisi serumda direkt bilirubin, alkalen fosfataz düzeylerinde ve daha az miktarlarda transaminazlarda artıştır. Akut GvHH'nın karaciğer'i tutması sonucu ortaya çıkan hiperbilirubineminin ayırıcı tanısında karaciğerin venookluzif hastalığı (VOD), hiperalimentasyonun yan etkisi, nodüler rejeneratif hiperplazi, enfeksiyonlar (sitomegalovirüs, herpes ve simplex Hepatitis-B) ve ilaç toksisitesi de akılda tutulmalıdır.

2.8.2.3. Gastro İntestinal Sistem Bulguları

Akut GvHH'nın deri-mukoza ve karaciğer'den sonra etkilediği üçüncü sistem gastrointestinal organlar ve özellikle bağırsaklardır. İlk dönemde hastada kramp fleklinde karın ağrısı ve ishal ortaya çıkar. Diyare miktarları giderek artabilir, günde 6-8 litreye varabildiği gibi bazen kanlı bir görünüm de alabilir [41].

2.8.3. GvHH Klinik Sınıflandırılması [33]

GvHH klinik bulguları ve şiddeti ile ilişkili ilk sınıflandırmayı Glucksberg ve arkadaşları 1974 yılında ortaya koymuştur. Her organ için sıfır ile dört arasında değişen evrelendirme sistemini içeren bu sınıflama daha sonra dereceleme sistemi ile kombine edilmiştir [41]. 1995 yılında Przepiorka ve arkadaşları tarafından üst intestinal sistem bulguları da eklenerek genişletilmiştir [42]. (Tablo 1-2)

Tablo 1. Akut GvHH Evrelemesi

Evre	Deri(makülopapuler raş)	KC(bilirubin)	GİS (diyare)
+	<%25	34-50µmol/L	500-1000mL
++	%25-50	51-102 µmol/L	1001-1500mL
+++	Jeneralize eritrodermi	103-255 µmol/L	>1500 mL
+++	Jenerolize eritrodermi büllöz ve squamoz	>255 µmol/L	İleus/abdominal ağrı

Tablo 2. Akut GvHH Derecelendirmesi

Derece	
I	Deri +/++
II	Deri +/+++,GIS+ ve/veya Karaciğer +
III	Deri ++/+++,GIS+ ve/veya Karaciğer ++/+++
IV	Deri ++/++++,GIS+ ve/veya Karaciğer ++/++++

2.8.4. Akut GvHH Profilaksisi ve Tedavisi

Hematopoetik kök hücre nakli sonrasında allograft'ın yerleşimini sağlamak, alıcı (hasta) tarafından kabülünü kolaylaştırmak ve GvHH'nın gelişimini önlemek amacıyla geçici bir süre immünosupresyon uygulamak gerekmektedir. GvHH'nın gelişimini önlemek amacıyla planlanan profilaksiye allojenik kök hücrelerin alıcıya infüzyonundan önce başlanmalı ve nakil sonrası dönemde de yaklaşık 6 ay kadar devam edilmelidir. Profilakside temel olarak kortikosteroid (CSA), kalsinörin inhibitörleri (CNI), metotreksat (MTX), ATG (Antitimositgloblin), MMF (mikofenolat mofetil), Takrolimus (TAC), Sirolimus gibi ajanlar kullanılmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalarda CNI-MTX kombinasyonlarının tek başına MTX profilaksisine üstünlüğü gösterilmiştir. TAC ve CSA kombinasyonlarının ise; grade 2-4 a GvHH hastalığını %32 oranında önlediği faz 3 çalışmalarında bildirilmiştir.[33]

2.8.5. Akut GvHH'de Tedavi Prensipleri

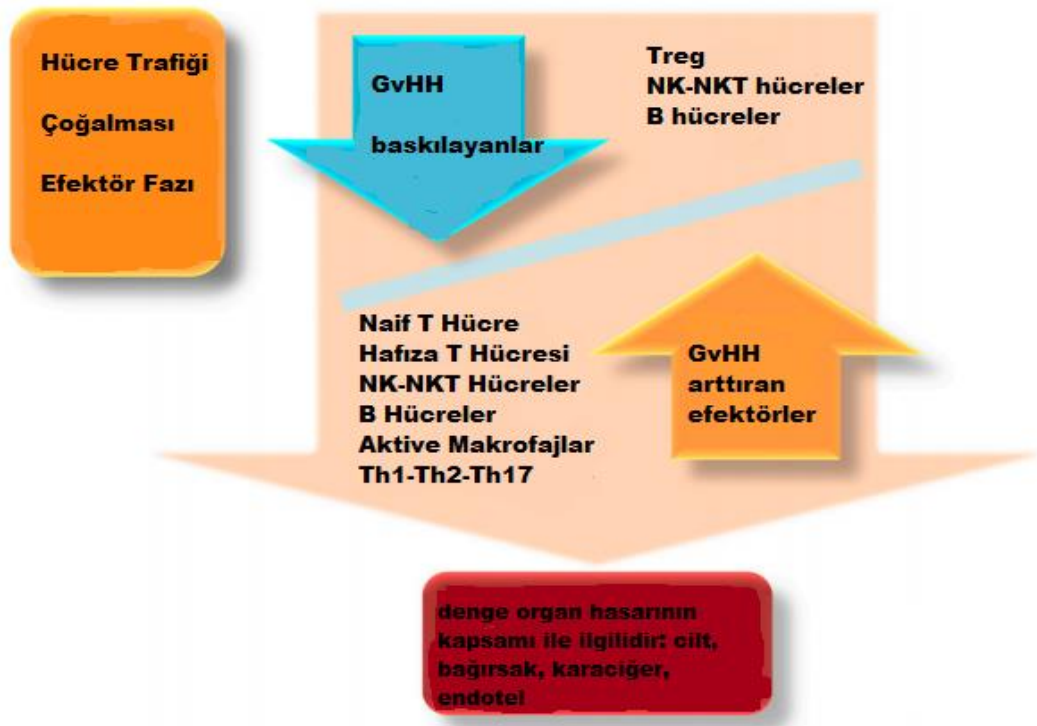
Akut GvHH'nın tedavisi kök hücre transplant merkezlerinin en önemli sorunlarından bir tanesidir. Tedavide aynen profilakside olduğu gibi kortikosteroidler, siklosporin ve ATG kullanılabilir. Akut GvHH'nın tedavisinde kortikosteroidler öncelikle tercih edilen ilaç grubudur. Bazı transplant merkezleri özellikle deri bulguları önde olan grade 1 aGvHH hastalarına sadece lokal düşük dozda steroid başlamayı tercih etmektedirler. Sistemik steroidlerin uzun dönemde avantajı gösterilememiştir. Daha ileri derecelerde ise sistemik steroid tedavisi gerekmektedir.Yüksek dozda metilprednizolon veya eşdeğeri 2mg/kg/gün dozunda başlanır 7-14 gün civarında kullanılır ve doz azaltılarak kesilir.[33, 43] Standart doz steroid tedavisi başarısız olursa; ATG,T cell CD52 markerının monoklonal antikoru

alemtuzumab, T hücre aktivatorü IL-2 reseptörünün alfa subunitine bağlanarak etki eden inolimumab ve TNF-alfa inhibitörü infliximab ve etanerseb kullanılabilir.[33]

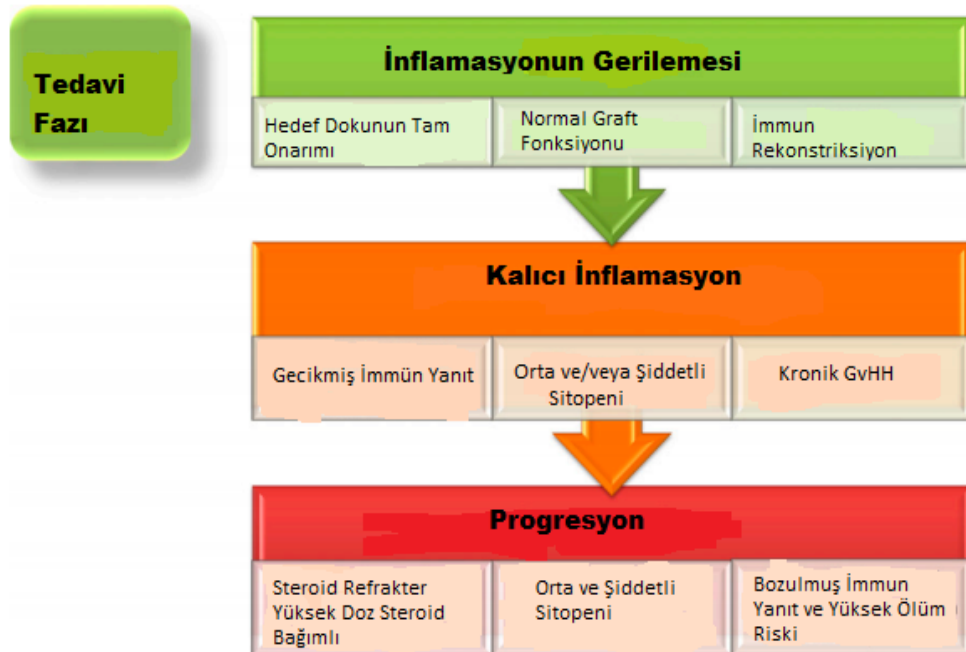
Tüm koruyucu önlemlere rağmen bu hastalarda ciddi immünsupresyon nedeniyle viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar siktır ve mortalitede büyük rol oynarlar.



Şekil 4.a. Akut GvHH'nın Başlangıç Fazı [34]



Şekil 4.b.GvHH'nin Trafiği,Genişlemesi ve Efektör Fazı [34]



Şekil 4.c.GvHH'nın Tedavi Fazı [34]

2.9. Akut Graft versus Host Hastalığı Patogenezini Açıklamaya Yönelik Yeni Yaklaşımlar: Anjiyojenez ve İnflamasyon

Elde edilen yeni bilimsel veriler akut başlangıçlı sistemik bir alloimmün reaksiyon olan öncelikle cilt, karaciğer ve gastrointestinal sistem olmak üzere farklı organları etkileyebilen aGvHH'nın gelişiminde vasküler endotel hasarının ve aktivasyonunun belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir [44]. Hatta aGvHH'da karakteristik bulgusu olan epitel hücre hasarının alloreaktif T hücrelerin neden olduğu vasküler endotel hasarına sekonder geliştiği düşünülmektedir[45]. aGvHH erken tanısı ve/veya riskli hastaların tespit edilmesi ve tedavi planını risk grubuna göre yapılması allojenik nakillerde tedavi ilişkili morbidite ve mortalitenin azaltılması için kritik önem taşımaktadır. Ancak bu amaçla kullanılabilecek biyobelirteç veya biyobelirteç kombinasyonları hala araştırılmaktadır.

Hazırlama rejimine ve HKHN'ne bağlı gelişen inflamasyon, doku hasarı, oksijen veya besin alımındaki yetersizlik endotel hücre hasarını/aktivasyonunu başlatmakta, uyarılan anjiyogenez bir yandan devam eden inflamasyona katkı sağlayarak diğer yandan rejenerasyonu uyarak aGvHH klinik tablosunun ortaya çıkmasına yardımcı olmaktadır. İnflamasyon ve anjiogenez arasındaki bu etkileşim aGvHH başta olmak üzere diğer tranplantasyon ilişkili komplikasyonların da (*vasküler endotelial sendromlar*) gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle vasküler endotelin HKHN komplikasyonlarının önlenmesinde erken tanı ve tedavisinde bir hedef olabileceği gündeme gelmiştir [46].

Vasküler endotel dolaşım sistemindeki temel işlevi dışında, koagülasyon hemostaz, inflamasyon doku rejenerasyonu ve regülasyonunda da önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle endotel ilişkili anjiyojenik faktörler arasındaki denge aGvHH'da klinik tabloyu belirleyici olabilir (*doku onarımı/rejenerasyon veya devam eden endotel hasarı/disfonksiyonu ve inflamasyon yönünde*) [44]. Literatürde steroide dirençli GvHH olan hastalarda bakılan doku tamiri ile ilişkili anjiyojenik faktörlerden EGF ve VEGF-A düzeylerinin steroide cevaplı gruba kıyasla belirgin derecede düşük olduğu, endotel hasarı/inflamasyon ile ilişkili faktörlerden PIGF ve FS düzeylerinin ise steroide dirençli GvHH olan hastalarda belirgin derecede yüksek olduğu gösterilmiştir.

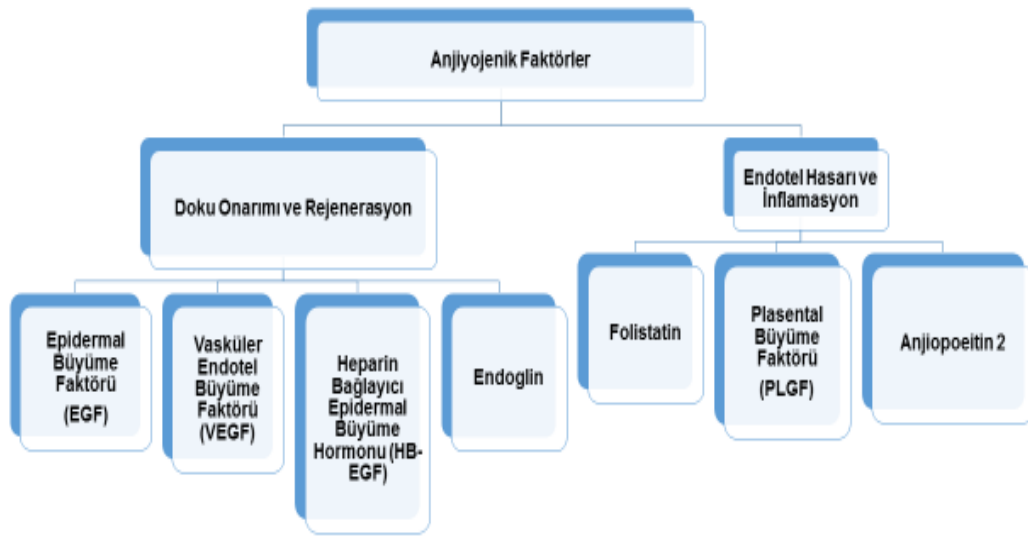
PIGF düzeyinin özellikle doku uyumu tam olmayan donörlerden yapılmış olan nakillerde artmış olduğu raporlanmıştır [47]. Holtan ve ark. tarafından aGvHH tanısı almış olan hastalarda ve kontrol grubu olarak aGvHH olmayan hasta ve sağlıklı bireylerden bakılan on üç tane anjiyojenik faktörden, serum düzeyleri kontrol ve aGvHH olan hastalar arasında anlamlı farklılık gösteren altı tane faktör (EGF, VEGF-A, FS, endoglin, PIGF, Ang2) seçilmiş ve validasyon çalışması yapılmıştır.. Doku onarımı/rejenerasyon ile ilişkili faktörler olan EGF ve VEGF-A düzeylerinin aGvHH olanlarda düşük olduğu ve tedaviye yanıt alınan hastalarda yükseldiği gösterilmiştir. Endotel hasarı/inflamasyon ilişkili faktörler olan FS ve PIGF düzeylerinin ise aGvHH'da yükseldiğini ve tanı sonrası yüksek kalan 28.gün FS düzeyinin önemli bir prognostik belirteç olduğunu göstermişlerdir [44].Transplantasyon öncesi bakılan Ang2, IL-8, trombomodulin serum düzeyleriyle transplant sonrası oluşabilecek komplikasyonların ilişkisi irdelendiğinde, transplant öncesi yüksek serum Ang2 düzeyine sahip olan hastaların steroide dirençli derece II-III aGvHH gelişen hastalar oldukları bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda transplant ilişkili mortalite oranlarında daha yüksek bulunmuştur [2]. Refrakter aGvHH olan hastalarda serum trombomodulin düzeyinin ve Ang2/VEGF oranının yüksek olduğunu ve bu hastalarda transplant ilişkili mortalitenin de arttığını tespit edilmistir [45]. Ayrıca inflamatuvar barsak hastalığı ve aGvHH gibi hastalık modellerinde anjiyogenez inhibisyonu ile lökositlerin doku infiltrasyonunun azaltıldığı da gösterilmiştir [48]. Ancak anjiyogenez ve inflamasyon arasındaki bu dinamik ilişkinin aGvHH gelişimindeki rolü, yani inflamasyonun anjiyogenez ile mi başladığı yoksa zaten gelişmiş olan inflamasyon tablosuna sekonder mi anjiogenezin başladığı net olarak bilinmemektedir.

Bütün bu çalışmaların sonuçları vasküler endotel ile aGvHH arasındaki ilişkiyi kanıtlar niteliktedir. Ancak farklı çalışmalarda farklı anjiyojenik faktör düzeylerine farklı zamanlarda (*transplant öncesi, transplant sonrası, aGvHH tanısı sonrası veya tedavi sonrası*) bakıldığı için bu faktör düzeylerinde izlenen değişimlerin aGvHH gelişimi ve ilerlemesi, tedavi yanıtı ve/veya prognoz üzerindeki net etkileri halen tam olarak bilinmemektedir.

2.10. Anjiyojenik Faktörler

Dolaşımdaki anjiogenik faktör düzeyleri genel olarak doku iyileşme potansiyelini gösterirler ancak vasküler endotel disfonksiyonunun bir göstergesi olan inflamasyon gelişiminde de rol oynadıkları bilinmektedir. Son yıllarda vasküler endotel kaynaklı trofik faktörlerin immünolojik yanıt modifikasyonunda da görev aldığı ile ilgili veriler elde edilmiştir [49]. Bu veriler aGvHH patogenezinin aydınlatılması ve özellikler steroid tedavisine dirençli hastalarda alternatif tedavi yaklaşımlarının araştırılması için önemlidir. Vasküler proliferatif yanıtın akut GvHH'na eşlik ettiği 1960'lardan beri bilinmektedir. [50]. Ama anjiyojenik yanıtın aGvHH gelişen hastaların prognozu üzerine etkisinin iyileşmeye katkı sağlaması nedeniyle olumlu yönde mi yoksa inflamasyon gelişimi açısından risk oluşturması nedeniyle olumsuz yönde mi olduğu hala net değildir. Dolayısı ile aGvHH'da endotel hasarı ve anjiogenezin arasındaki bu ilişkiyi açıklamayabilmek için farklı anjiyojenik faktörlerin doku rejenerasyonu ve inflamasyon üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmaların sayısı giderek artmaktadır.

Bu araştırmaların sonuçları bazı anjiogenik faktörlerin (EGF, VEGF, HB-EGF, FGF, vb.) doku rejenerasyonunda daha etkin rolleri olduğunu, bazılarının (Ang-2, s-Endoglin, folistatin, leptin, PlGF, vb.) ise doku hasar ve inflamasyon gelişiminde daha etkili olduğunu göstermektedir [51]. Akut GvHH tanısı alan hastalarda bu iki gruptaki anjiyojenik faktörlerin düzeylerine bakılarak elde edilecek anjiyojenik profil ile prognoz ve tedavi yanıtı hakkında öngörude bulunulabilir.



Şekil 5. Anjiyojenik Faktörlerin Sınıflandırılması [52]

2.10.1. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)

Epidermal Büyüme Faktörü ilk olarak 1965 yılında Cohen tarafından tanımlanmış bir trofik faktördür [66].

Submandibular bezler, ekzokrin pankreas, paneth hücreler ve brunner bezleri başta olmak üzere gastrointestinal sistemden salınan mitojenik bir peptittir [66].

Epitelin gelişimi ,onarımı ,yara iyileşmesinin hızlandırılması, endotelin büyüme farklılaşmasının uyarımı temel görevleridir [66].

Literatürde inflamatuvar barsak hastaları üzerinde yapılmış olan çalışmalarda kontrol grupları ile kıyaslandığı zaman düşük EGF seviyelerinin, artmış inflamasyon ve tedaviye dirençli hastalık ile ilişkisi olduğu öne sürülmüş.Ve tedavi sonrası kontrolde EGF düzeylerinin arttığını dolayısı ile doku tamiri ile EGF düzeyinin pozitif korelasyon içinde olduğu bildirilmiştir. Yenidoğanda NEK etyopatogenezinde ve tedavisinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur[66].

EGF son zamanlarda allojenik hematopoietik kemik iliği nakillerinin bir komplikasyonu olarak karşımıza çıkan GvHH'nın da etyopatogenezini ile ilgili çalışmaların da gündemindedir. Düşük EGF düzeylerinin artmış GvHH ve steroide

dirençli GvHH ile ilişkili olduğunu gösteren yayınlar olsa da etyopatogeneze yönelik çalışmalar halen devam etmektedir. Fakat mevcut çalışmalar ışığında EGF'ün endotel onarımından sorumlu bir endotel faktörü olduğu söylenebilir [44].

2.10.2. VEGF-A (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A)

VEGF-A tıpkı epidermal büyüme faktörü gibi bir anjiyogenez faktörüdür ve özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahiptir. Endotelin proliferasyonu ,migrasyonu ve farklılaşmasına neden olur ve özellikle embriyogenez, neovaskülarizasyon , tümör büyümesi , yara iyileşmesi konularında görevlidir . 2004 yılından beri VEGF inhibitörleri malignensi durumunda tümöre olan kan akımı desteğini kesmek amacı ile kullanılmaktadır [53]. VEGF-A'nın sürekli infüzyonu ve 120-160 pg/mL serum seviyesi dentritik hücre maturasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır [54][67]. Bu durumdan da yola çıkarak VEGF-A'nın aynı zamanda da alloimmun reaksiyonlarda atak riskini azaltabileceği konusu gündeme gelmiştir. Dolayısıyla hasar ve yıkım durumunda periferel dokuda VEGF-A üretilmesi oldukça mantıklıdır. VEGF tek nükleotid polimorfizmi olan kişilerde düşük VEGF üretiminin artmış GvHH ile bağlantısının olduğunu gösteren çalışmalar da hipotezi desteklemeye yönelik olarak bulunmaktadır. Yine benzer şekilde VEGF blokajı kullanan insanlarda GvHH' nin daha şiddetli seyrettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [55].

Vasküler endotel moleküllerinin GvHH ile bağlantısını inceleyen çalışmaların da son zamanlarda gündemindedir ve düşük VEGF düzeylerinin artmış GvHH'nin yanı sıra steroide dirençli GvHH vakaları ile ilişkisini gösteren birçok yayın literatürde yer almaktadır [66].

2.10.3. Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Hormonu (HB-EGF)

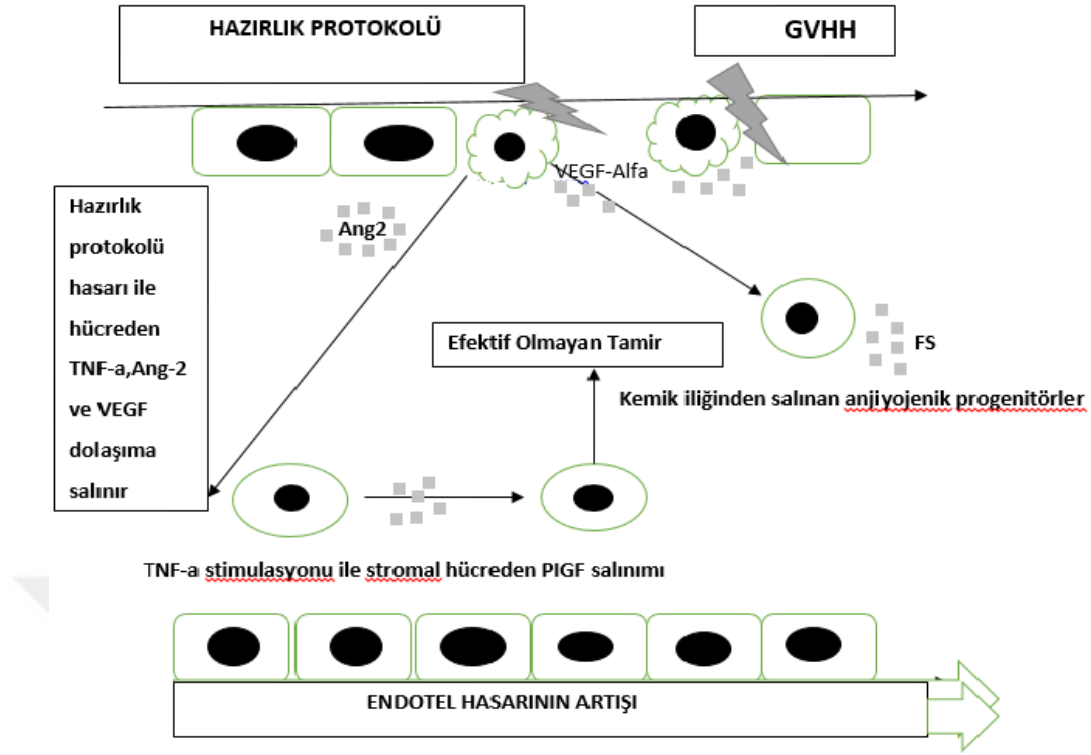
Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü (HB-EGF), farklılaşmayı ve büyümeyi uyaran EGF ailesinin büyüme faktörü üyesidir. HB-EGF başlangıçta insan makrofaj benzeri hücrelerden salgılanan bir molekül olarak tanımlanmışken, sonradan bir transmembran proteini olarak kabul edilmiştir. sHB-EGF, anjiyogenez, ateroskleroz, tümör oluşumu, inflamatuvar yanıt gibi pek çok hücreyel olayda rol alır dolayısı ile tedavi hedeflerinde üzerinde çalışılan bir moleküldür [56].

2.10.4. Endoglin

Endoglin yirmi yıl önce tanımlanmış ve endotel hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir. Ekspresyonu aktif olarak proliferatif endotelial hücrelerde düzenlenmektedir. Bu nedenle endoglin, tümörle ilişkili anjiyogenez ve neovaskülarizasyon için uygun bir belirteç olarak gösterilmektedir. Neoplazmların prognoz, tanı ve tedavisindeki yeri tartışılmaktadır. İnflamasyondaki rolü de çeşitli yayınlarca gösterilmiş olan endoglinin, dolayısı ile de aGvHH' de tetiğini çektiği konusundaki araştırmaları son dönemde hızlanmıştır. Bu nedenle de aGvHH tedavisi için bir hedef tedavi olabilmesi konusundaki çalışmalar devam etmektedir[57].

2.10.5. Placental Growth Faktör

PlGF de anjiyogenik faktörlerin VEGF ailesine ait bir üyedir. PlGF sinyali de VEGF-1 reseptör üzerinden etki eder ve placental bir faktör olduğu için her ne kadar tolerojenik olduğu düşünülse de PlGF VEGF 'e oranla çok daha fazla inflamatuvar rol içerir. TNF-a ve IL-1, IL-8, makrofaj inflamatuvar protein-1, monosit kemoatraktan protein-1 yapımını indükleyerek inflamasyonu artırır. Son zamanlarda yapılmış olan çalışmalarda allojenik nakil yapılan hastalarda sağlıklı donör ile kıyaslandığı zaman 10 kat daha fazla PlGF tespit edilmiştir. Tam olarak mekanizması bilinmese de aGvHH'de deride artmış, kolonda ise azalmış PlGF olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [44].



Şekil.6. Endotel Hasarı Sonrasında Endotelden Salınan Markerlar [58].

2.10.6. Follistatin

Follistatin de aGvHH ile klinik olarak ilişkili anjiyojenik faktörlerden bir tanesidir. Follistatin ilk olarak overde FSH inhibisyonu yapan bir inhibitör olarak tanımlanmıştır. Hormon regülasyonunun yanı sıra aynı zamanda anjiyojenik rolü de vardır. FS aynı zamanda inflamasyondan sorumlu bir protein olan aktivin-A'nın da bir spesifik bağlayıcısıdır.

Artmış follistatin düzeyi artmış doku yıkımını gösterirken, steroid dirençli GvHH hastalarında yüksek FS düzeylerinin olduğunu gösteren çalışmalar da söz konusudur. Bu nedenle diğer faktörlerde de olduğu gibi follistatin de aGvHH açısından hedef bir molekül olarak nitelendirilebilir[44].

2.10.7. Anjiopoetin-2

Kan damarı oluşumunun ana düzenleyicileri anjiopoetinlerdir. Anjiopoietinler damar oluşumu ve yeniden şekillenmesinde rol oynayan büyüme

faktörleri ailesinde yer alır. Anjiyogenezde rol almaları yanında inflamatuvar yanıtı da düzenlemektedirler.Önceki çalışmalarda endotelin Weibel-Palade cisimlerinden situmulasyon sonucu hızla salındığı ve inflamatuvar yanıtta önemli rol aldığı da bildirilmiştir [59].

Endotel yanıtının kontrolünde Ang-2'nin rolü vardır. Angiopoietin-2 inflamatuvar yanıtı tetikler, endotel dengesini bozar ve endotelin dış etkilere duyarlı hale gelmesine neden olur. Endotel dengesinin bozulması endoteli özellikle sitokinlere karşı duyarlı hale getirir. Vasküler endotelial büyüme faktörü gibi anjiyogenik, TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin aktivitelerini kolaylaştırır.

Son zamanlarda vasküler endotel ilişkili hematopoietik kök hücre nakli komplikasyonlarının gündem maddelerinden birisi haline gelmiş olan Ang 2 ile ilgili bir çok yayın bulunmaktadır. Literatürde tranplantasyon öncesi yüksek Ang-2 düzeyine sahip olan kişilerde daha yüksek oranda , inflamasyon ilişkili komplikasyon ve GvHH geliştiğini ve gelişen GvHH ve komplikasyonların şiddetinin Ang 2 düzeyi arttıkça daha da arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [60][66-67].



3. MATERYAL ve METOD

3.1. Hasta Örneklerinin Belirlenmesi ve Hasta Bilgilerinin Toplanması

Çalışmamıza Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kemik İliği Transplantasyonu Ünitesi'nde, Haziran 2008 ile Ekim 2018 tarihleri arasındaki malign ya da malignite dışı hastalıklar nedeni ile allojenik hematopoietik kök hücre nakli yapılmış 37 hasta dahil edilmiştir. Ayrıca çalışmamıza 10 sağlıklı hematopoietik kök hücre vericisi kontrol grubu olarak dahil edilmiştir.

Çalışma kapsamında seçilmiş olan hastaların elektronik ve arşiv dosyaları geriye yönelik taranarak hastaların demografik özellikleri, nakil öncesi ve nakil sonrası önemli klinik ve laboratuvar bulguları, nakil ile ilgili bilgiler ve transplantasyon sonrası oluşan komplikasyonlar oluşturulan veri toplama formuna (EK-1) kaydedilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik kurul izin No 27.01.2016 tarihli 2016/03 toplantı ve 01 karar numaralı “Kök Hücre ve Hücre Bankası” izni (EK -2) Biyobanka onam formu ve Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik kurul izin No 20.02.2018 tarihli 2018/06 toplantı ve GO 18/235-29 karar numaralı (EK -3) etik kurul izni ile hazırlık rejimi öncesi -9. günde ve hazırlık rejimi tamamlandıktan sonra nakil öncesi 0. günde alınmış olan periferik kan örneklerinden 2300 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2. Plazma Örneklerinin Hazırlanması ve İmmünoassay Yöntemi ile Anjiyogenik Faktörlerin Plazma Düzeylerinin Belirlenmesi

Dondurularak -80°C’de saklanmış olan hasta ve sağlıklı kontrol bireylerin plazma örneklerinde anjiyogenik faktörlerden EGF, Ang-2, G-CSF, endoglin, follistatin, HB-EGF, PLGF ve VEGF-A düzeylerine, yüzeylerinde floresan bulunan manyetik boncuklarla işaretlemeye dayalı olan multiplex immünoassay yöntemi ile “Human Premixed Multi-Analyte Kiti” kullanılarak Luminex™ 200 cihazında bakılmış ve “Luminex® analyzer with X-Y platform” programı ile analiz edilmiştir.

3.2.1. Hasta ve Donörlere Ait Plazma Örneklerinin Seyreltilmesi

- Polipropilen tüpleri içerisinde -80°C 'de muhafaza edilmiş olan donör ve -9 ve 0.günlerdeki hastalara ait plazma örnekleri için uygun seyreltmeyi belirlemek amacıyla <http://www.RnDSsystems.com/Products/LXSAHM> adresinde yer alan tablodan yararlanılmıştır.
- Dondurulmuş plazma örnekleri oda ısısına getirildikten sonra seyreltmeden hemen önce $16.000 \times g$ 'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
- Önerildiği şekilde her bir plazma örneği için 2 kat seyreltme yapılmıştır ($75 \mu\text{L}$ örnek + $75 \mu\text{L}$ kit içerisinde bulunan kalibratör seyreltici RD6-52).

3.2.2. Yıkama Tamponunun Hazırlanması

Kit içerisinde bulunan konsantre haldeki 20 mL yıkama tamponu üzerine 480 mL distile su eklenmiş ve kristallerin oluşumunu engellemek için oda sıcaklığında ısıtılarak iyice karıştırılmıştır.

3.2.3. Standartların Hazırlanması

Standart kokteyllerinin her birinden 100'er μL alınıp bir tüpte toplanmış ve Tablo 3'e göre son hacim 1000 μL olacak şekilde uygun miktarda Kalibratör Diluent RD6-52 eklenerek Standart 1 oluşturulmuştur.



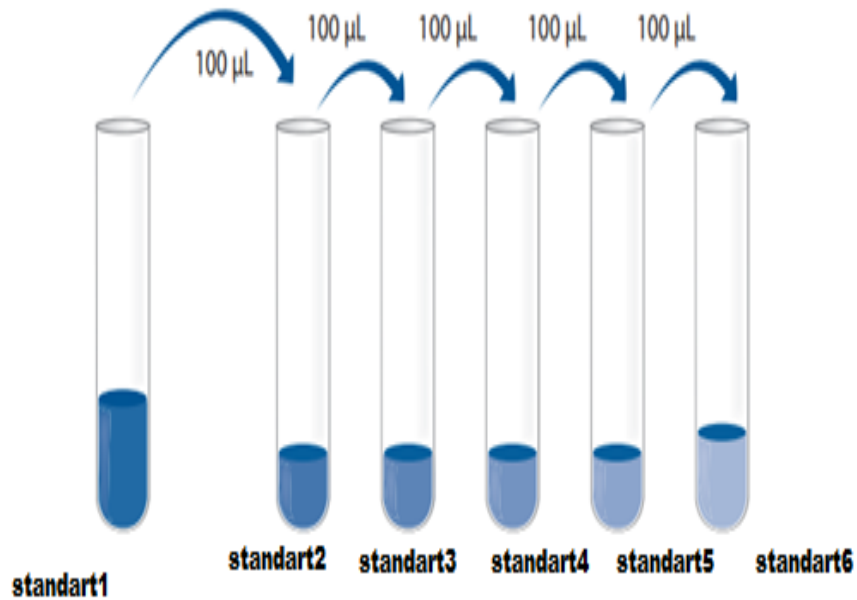
Şekil 6. Standart 1'in Hazırlanması

Tablo 3. Standart 1 Hazırlanması İçin Gerekli Hacim Oranları

Standart	Tek Tüpte Birleştirilecek Hacim	Seyreltmek İçin Gereken Kalibratör Hacmi	Standart 1 Total Hacmi
1	100 µl	900 µl	1000 µl
2	100 µl	800 µl	1000 µl
3	100 µl	700 µl	1000 µl
4	100 µl	600 µl	1000 µl
5	100 µ	500 µ	1000 µ
6	100 µ	400 µ	1000 µ
7	100 µ	300 µ	1000 µ
8	100 µ	200 µ	1000 µ
9	100 µ	100 µ	1000 µ
10	100 µ	0 µ	1000µ

3.2.4. Reaktif Hazırlama

Özetle, 2-6 arasındaki tüplerin her birine kalibratör seyreltici RD 6-52'den 200'er µl eklendikten sonra daha önce hazırlanan Standart 1'den Şekil 6'daki gibi seri dilüsyonlar hazırlanmış ve 3'er kat dilüe edilmiş standart seyreltikleri oluşturulmuştur.

**Şekil 7.** Reaktiflerin Hazırlanması

3.2.5. Mikropartiküler Karışım Hazırlama

- Mikropartiküler karışımın olduğu vialin kapağını açılmadan önce 1000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Mikropartikülleri tekrar süspansiyon haline getirmek için, vial ters çevrilmeden yavaşça vortekslenmiştir.
- Tablo 4'deki oranlar dikkate alınarak uygun miktarda diluent RD2-1 ve mikropartikül karışımı eklenerek seyreltilmiştir.

Tablo 4. Mikropartikül Karışım Seyreltiğinin Örnek Sayısına Göre Hazırlanması

Kullanılan Kuyu Sayısı	Mikropartiküler Karışım	Seyreltik RD2-1
96	500 µl +	5.00 µl
72	375 µl +	3.75 µl
48	250 µl +	2.50 µl
24	125 µl +	1.25 µl

Not: Kullanım sırasında mikropartikülleri ışıktan korunmuş ve 30 saniye içinde hazırlanmış olmasına özen gösterilmiştir.

3.2.6. Seyreltilmiş Biyotin Antikor Karışımının ve Streptavidinin Hazırlanması

Kapağı açılmadan önce Biyotin-Antikor Karışım viali 1000 x g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra vial ters çevrilmeden dikkatli bir şekilde vorteks edilmiştir. Seyreltici RD2-1 ile Tablo 5'e göre Biyotin-Antikor karışımı seyreltilmiştir.

Tablo 5. Biyotin-Antikor Karışımının Seyreltilme Oranları

Kullanılan Kuyu Sayısı	Biyotin Antikor Kokteyli	Seyreltici RD2-1
96	500 µ	5.00 µ
72	375 µ	3,75 µ
48	250 µ	2,75 µ
24	125 µ	1,25µ

Polipropilen amber şişesi veya aliminyum folyo ile sarılmış polipropilen test tüpü kullanılarak Streptavidin-PE taşıma ve saklama esnasında ışıktan korunmuştur. Kapağı açılmadan önce Streptavidin-PE viali 1000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve sonrasında şişe ters çevrilmeden yavaşça vortekslenmiş, yıkama tamponu ile Tablo 6'e göre seyreltilmiştir.

Tablo 6. Streptavidin-PE Seyreltiğinin Hazırlanması

Kullanılan Kuyu Sayısı	Streptavidin- PE Konsantrasyonu	Yıkama Tamponu
96	220 µl +	5.35 µl
72	165 µl +	4.00 µl
48	110 µl +	2.65 µl
24	55 µl +	1.35µl

3.2.7. İmmünoassay Yöntemi ile Anjiyogenik Faktörlerin Plazma Düzeylerinin Belirlenmesi

Mikroplate'in her bir kuyucuğuna dilüe edilen mikropartikül kokteyli 50ul / kuyucuk olacak şekilde eklenip uygun kuyucuklara (50ul / kuyucuk) standart ve plazma örnekleri eklenmiş, mikroplate üzeri kaplanarak ve oda ısısında, 800 rpm'deki sallayıcıda 2 saat inkübe edildikten sonra 100ul / kuyucuk olacak şekilde yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Seyreltilmiş Biotin antikor karışımlarından 50ul / kuyucuk olacak şekilde eklenip mikroplate kaplanmış ve oda ısısında, 800 rpm'deki sallayıcıda 1 saat inkübe edilerek yıkama solüsyonu (100ul / kuyucuk) ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 50 ul / kuyucuk Streptavidin-PE eklenmiş, mikroplate üzeri kapatılmış ve oda ısısında, 800 rpm'deki sallayıcıda 1 saat inkübe edilip yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. 100ul / kuyucuk yıkama solüsyonu eklenerek mikropartiküller resüspanse edilip 800 rpm'deki sallayıcıda 2 dakika inkübe edildikten sonra Luminex™ 200 cihazında okutulmuştur.

3.3. Sonuçların Hesaplanması ve İstatistiksel Yöntem

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığını test etmek için Kolmogorov Smirnov testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren değişkenleri iki grupta karşılaştırmak için “İki ortalama arasındaki farkın önemlilik test (Bağımsız gruplarda t testi)” kullanılmıştır ve tanımlayıcı istatistikler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirtilmiştir. Normal dağılmayan sayısal değişkenler için Parametrik olmayan test olarak Mann Whitney-U testi ile iki bağımsız grup karşılaştırılmış olup tanımlayıcı istatistik olarak ortanca ve (en küçük-en büyük değer) verilmiştir. Bağımlı iki grup karşılaştırmalarında Wilcoxon Testi ile yapılmıştır.

Tüm hastaların için sağkalım analizi yapılmıştır. Ortalama sağkalım zamanlarını ve olasılıklarını kestirmek için Kaplan-Meier yöntemi kullanılmış ve sağkalım eğrisi çizilmiştir. aGVHH gruplarına göre sağkalım eğrileri Log-rank testi ile karşılaştırılmıştır. aGVHH nin ortaya çıkma nedenleri Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmiştir. Tek değişkenli analizlerin sonucunda aGVHH ile diğer değişkenlerin ilişkisi göz önüne alınarak, bağımlı değişken olarak aGVHH değişkeni, bağımsız değişken olarak albümin indesk, absolülenfindeks, angindeks alınmıştır. Regresyon analizi sonucunda önemli değişkenler belirlenmiş, Odds oranları ve güven aralıkları elde edilmiştir. $P < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

4. BULGULAR

Çalışmamıza 18'i kadın 19'u erkek olmak üzere toplam 37 hasta 10 kontrol grubu dahil edilmiştir. Hastaların yaş aralığı 1-22 yaş olup ortalama 8,5 olarak hesaplanmıştır. 37 hastanın 10 tanesine malignite dışı hematolojik nedenler ile, 12 tanesinde malign nedenler ile, 12 tanesine immun yetmezlik sebebi ile üç tanesine ise nörometabolik nedenler ile allojenik kemik iliği nakli uygulanmıştır. Kemik iliği vericilerinin olası komplikasyonlara karşı tam uyumlu akraba içi donör olmasına dikkat edilmiş olup 37 hastanın sadece bir tanesi akraba fakat tam uyumlu olmayan vericiden nakil yapılmıştır. Kök hücre kaynağı olarak ise 33 hastada kemik iliği kullanılırken üç hastada periferik kan kaynaklı kök hücre kaynağı tercih edilmiştir. Nakil öncesi hastaya verilen hazırlık rejimlerinde hastanın tanısı, cinsiyeti, ek hastalıkları, yaşı gibi faktörler de göz önünde bulundurularak 33 hastaya myeloablatif hazırlık rejimi uygulanırken, kalan 4 hastaya ise nonmyeloablatif hazırlık rejimi uygulanmıştır.

Tablo 7. Hastaların Demografik Özellikleri

	N(%)
Primer Hastalık	
• Malign	12(32)
• Nonmalign	10(27)
• İmmun Yetmezlik	12(32)
• Nörometabolik	3(8)
Cinsiyet	
• Erkek	19(51)
• Kız	18(48)
Donör Tipi	
• Tam uyumlu akraba	36(97)
• Tam uyumlu olmayan akraba	1(3)
Kök Hücre Kaynağı	
• Periferik	3(8)
• Kemik İliği	34(91)
Hazırlık Rejimi	
• Myeloablative	33(89)
• Nonmyeloablative	4(11)
• Radyoterapi	5(13)
Akut GvHH	16(43)
Kronik GvHH	1(27)
VOD	9(24)
Hasta Yaşı*	8,51±5,97(1-22)
GvHH	
• Grade 1 -2	15(93)
• Grade >2	1(7)
GvHH Profilaksisi	
• Metotreksat +Siklosporin	37(100)

*Ortalama ±Standart Sapma (En Büyük-En Küçük Değer)

Verici hücrelerinin alıcının kemik iliğine yerleştiği ve üretime başladığı, üretilen hücrelerin periferde izlendiği güne engraftman günü adı verilir. Çalışmamızda ortalama nötrofil engraftmanı 15±4. günde gerçekleşirken trombosit engraftmanı ise ortalama 21±6.günde gerçekleşmiştir.16 hastada akut GvHH ile uyumlu klinik bulgular kaydedilirken, sadece bir hasta kronik GvHH olarak kabul edilmiştir.aGvHH hastalarının 15 tanesi grade 1-2,bir tanesi >grade 2 olarak değerlendirilmiştir. Hastaların 15 tanesinde cilt bulguları, beş tanesinde karaciğer bulguları, üç tanesinde ise gastrointestinal sistem bulguları raporlanmıştır. Venookluzif hastalık kabul edilmiş olan ise dokuz hasta mevcuttur (Tablo 7).

Endotel-ilişkili belirteçlerden olan anjiyogenik faktör (Anjiopietin-2, Endoglin, EGF, Folistatin, HB-EGF, VEGF-A, PlGF ve G-CSF) düzeylerine, henüz

hasar gelişmeden (hazırlama rejimi öncesi) ve hasarın geliştiği erken dönemde (hazırlama rejimi sonrası) bakarak endotel hücrelerinin hasara duyarlılığı hakkında bilgi sağlayabilecek, anjiyojenik bir profil çıkarmak amacıyla yürütmüş olduğumuz çalışmamızda; ilk olarak tüm hastaların (N=37) hazırlama rejimi öncesi (-9. gün) ve hazırlama rejiminden hemen sonra transplantasyon öncesi (0. gün) bakılan anjiyogenik faktör plazma düzeyleri kontrol grubunun faktör plazma düzeyleri ile karşılaştırılmış, faktör düzeylerindeki tespit edilen değişimin kontrol grubu ile istatistiksel açıdan da bir fark teşkil edip etmediği analiz edilmiştir. Hem hastalarda hem de kontrol grubunda plazma PlGF ve G-CSF düzeyleri ölçülebilir değerlerin altında bulunduğu için bu iki faktör değerlendirme kapsamına alınmamıştır. Ardından yine tüm hasta grubunda plazma faktör düzeylerinin hazırlık protokolü öncesinde (-9.gün) ve sonrasındaki (0. gün) değişimleri ve bu değişimlerin anlamlı bir istatistiksel değere sahip olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Bu analizlerin sonucunda, hazırlama rejimi sonrasında Anjiopietin-2, Endoglin, EGF ve VEGF-A plazma düzeylerinde düşme saptanmasına rağmen, sadece Anjiopietin-2, Endoglin düzeylerindeki değişim istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). VEGF-A düzeylerinde belirgin düşme trendi olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p=0.058$) HB-EGF ve Folistatin düzeylerinde ise hazırlama rejimi öncesi ve sonrası düzeyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır ($p > 0.05$). Yine Anjiopietin-2, Endoglin, EGF, HB-EGF, Folistatin ve VEGF-A'nın hazırlama rejimi öncesi (-9.gün) bakılmış olan düzeyleri ile kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşme saptanmış ancak bu faktörlerin düzeylerine hazırlama rejimi sonrası (0. gün) bakıldığında kontrol grubu ile saptanan anlamlı farklılığın ortadan kalktığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Tablo.8. Endotel ilişkili plazma anjiyogenik faktörlerinin ve inflamasyon belirteçlerinin hazırlama rejimi öncesi ve sonrası değerleri

Parametreler	(-9.gün) Ortanca(min-max) ng/ml	(0.gün) Ortanca (min-max) ng/ml	(kontrol) Ortanca (min-max) ng/ml	P1*	P2**	P3***
Ang2	2308,28 (454,29-12871,3)	935,50 (139,6-6231,3)	773,38 (400,7-2106,2)	<0,001	<0,001	0,454
Endoglin	1764,4 (311,5-5257,4)	1280,6 (290,5-4053,12)	968,71 (304,5-3017,8)	<0,001	0,008	0,249
HB-EGF	38,7 (1,33-196,84)	38,6 (3,77-139,04)	23,6 (10,5-48,47)	0,170	0,046	0,065
EGF	20,2 (2,43-131,5)	12,9 (3,81-388,1)	10,8 (2,87-18,6)	0,331	0,024	0,298
Folistatin	10650,6 (2031,3-28021,7)	10990 (2581,7-23266)	2316,5 (2521-10668,9)	0,753	<0,001	<0,001
VEGFA	41,4 (13,6-91,6)	25,05 (9,95-145,54)	17,2 (9,29-31,5)	0,058	0,017	0,246
Ürik Asit	3,09 (1,16-7,49)	3,49 (1,56-9,80)	-	0,68	-	-
Albumin	3,86 (2,37-4,42)	3,75 (2,10-4,99)	-	0,338	-	-
Absolü-lenfosit	1,30 (0,0-8,20)	0,6 (0,0-4,20)	-	0,001	-	-
Absolü-monosit	0,20 (0,0-5,9)	0,10 (0,0-1,30)	-	<0,001		

Folistatin düzeyleri incelendiğinde ise hem hazırlama rejimi oncesinde (-9.gün) hem de sonrasında (0.gün) bakılan plazma duzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı bir fark teşkil ettiği görülmüştür ($p<0.001$) (Tablo 8).

Aynı zamanda hastalardan hazırlama rejimi öncesi ve sonrası bakılan sistemik inflamasyon belirteçleri olarak serum ürik asit ve serum albümin düzeyleri ,mutlak lenfosit ve mutlak monosit sayıları da karşılaştırılmıştır. Hazırlama rejimi sonrası mutlak lenfosit ve monosit sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşme saptanmıştır. Diğer parametrelerde (urik asit ve albumin) ise anlamlı bir değişim görülmemiştir (Tablo 8).

Daha sonra hastalar aGvHH olan ve olmayan hastalar olarak gruplandırmış ve bu gruplar arasında anjiyogenik faktör düzeyleri ve diğer inflamasyon belirteçlerinin açısından farklılıklar olup olmadığı incelenmiştir. 37 hastanın 16 tanesinde izlemde akut GvHH gelişmişken sadece bir hastaya kronik GvHH tanısı konulmuştur . Akut GvHH olan ve olmayan grup arasında yapılmış olan bu kıyaslamada endotel ilişkili parametrelerden Anjiyopoetin-2, VEGF-A, Endoglin, Follistatin, EGF , HB-EGF'in ve inflamasyon belirteçlerinden; ürik asit, albümin, mutlak lenfosit ve mutlak monosit sayımlarının -9. gün (hazırlık rejimi öncesi) ve 0. gün (hazırlık rejimi sonrası) değerleri akut GvHH olup olmama durumuna göre karşılaştırılmıştır. Bu inceleme sonrasında akut GvHH olan grup ile olmayan grup arasında parametrelerin hiçbirisi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 9).

Tablo 9. Akut GvHH ile Faktörlerin Hazırlık Protokolü Öncesi ve Sonrası Plazma Düzeyleri Arasındaki İlişki

Parametreler (ng/mL)	aGvHH Var Ortanca (min-max)	Yok Ortanca (min-max)	P değeri
Ang 2(-9. gun)	2583,2(659,7-12871,3)	2262 (454,3-6662,5)	0,195
Ang2(0.gun)	857,2(139,69-6231,37)	1037,8(152,8-4710)	0,498
Endoglin(-9.gun)	1970,1(623,2-4468,7)	1600(311,5-5257,4)	0,202
Endoglin (0.gun)	1491,6(572,7-4007,4)	1280,6(290,5-4053,1)	0,339
VEGF-A (-9.gun)	43,3(17-85,8)	36,8(13,6-91,6)	0,905
VEGF-A(0.gun)	20,8(9,9-55,8)	26,6(12,8-145,5)	0,604
Folistatin(-9.gun)	9394,3(5145-26517)	12265(2031-28021)	0,765
Folistatin (0.gun)	10666,4(5155-17703)	11525(2581-23266)	0,820
HBEGF(-9.gun)	31,9(10,3-196,8)	50,04(1,3-191,1)	0,331
HBEGF(0.gun)	28,3(9,4-111,7)	41,6(3,7-139)	0,330
Ürik asit (-9.gun)	3,4(1,6-4,8)	3(1,1-7,4)	0,797
Ürik asit (0.gun)	3,3(1,9-7,3)	3,4(1,5-9,8)	0,844
Albumin (-9.gun)	4(2,37-4,3)	3,6(2,8-4,4)	0,404
Albumin(0.gun)	3,8(2,91-4,9)	3,5(2,1-4,5)	0,457
ALS* (-9.gun)	1,2(0-4)	1,6(0-8,2)	0,940
ALS* (0.gun)	0,7(0-4,2)	0,6(0-2,9)	0,554
AMS** (-9)	0,1(0-5,9)	0,1(0-1,3)	0,639
AMS** (0)	0,2(0-2,9)	0(0-0,4)	0,267

Analizlerde man-whitney-u testi kullanılmıştır.

* ALS : Absolü Lenfosit Sayısı

** AMS: Absolü Monosit Sayısı

Tablo 10. Akut Gvhh Olan ve Olmayan Hastaların Plazma Anjiyogenik Faktör ve İnflamasyon Belirteç İndekslerinin Karşılaştırılması

İndeks ***	Akut GVHD		P değeri
	Evet	Hayır	
Ang 2*	3,59±2,98	1,99±1,11	0,033
Endoglin*	1,63±0,81	1,50±0,62	0,63
VEGF-A**	1,93	0,69	0,72
Folistatin*	1,19±0,87	1,05±0,42	0,533
HBEGF**	1,20	2,29	1,00
Ürik Asit*	0,93±0,25	0,97±0,42	0,75
Albumin *	1,02±0,16	1,05±0,14	0,55
Lenfosit**	12,63	15,10	0,42
Monosit**	11,10	9,90	0,68

P değeri <0,05 altında olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

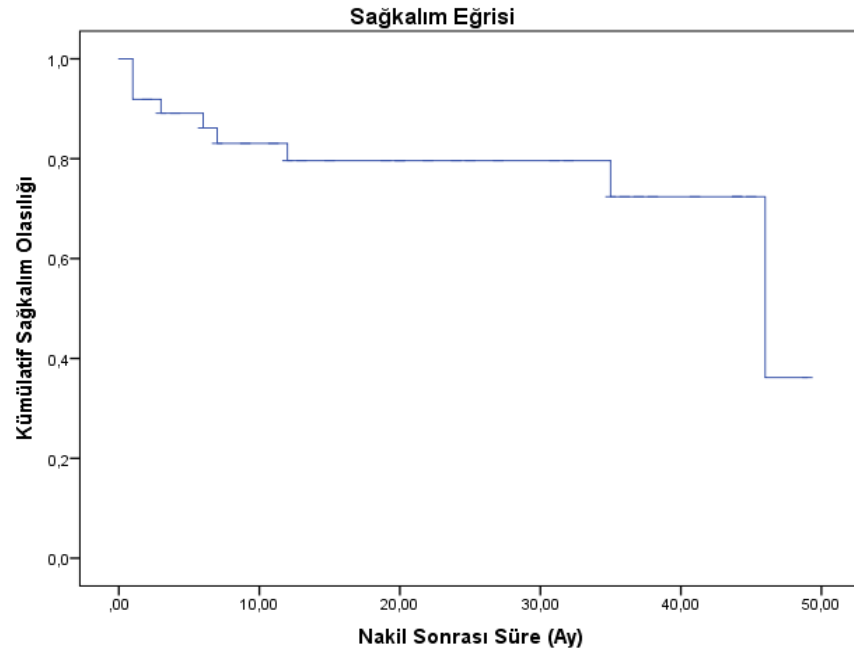
**Bağımsız gruplarda T testi yapılmış olup; mean± SD değerleri belirtilmiştir.*

***Man Whitney U ile hesaplanmış,median değer verilmiştir*

****Index değeri: (-9.gün plazma değeri)/(0.gün plazma değeri)*

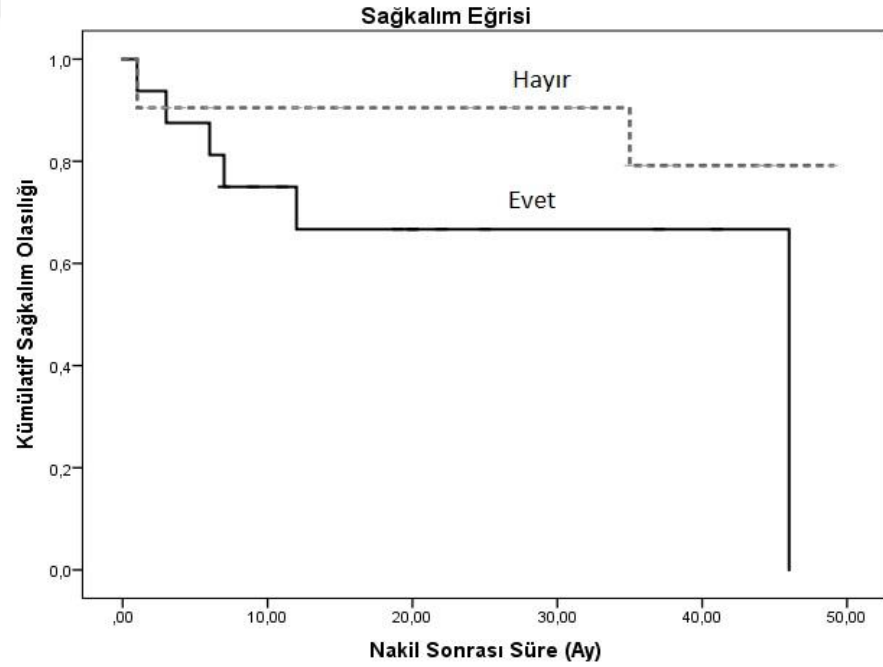
Hastaların indeks değerleri, eksi dokuzuncu günde alınmış olan parametre değerleri, sıfırıncı günde alınmış olan parametre değerlerine oranlanarak elde edilmiştir. Bakılmış olan dokuz parametreden sadece Anjiyopoetin-2 indeksi aGvHH gelişmiş olan hastalarda aGvHH gelişmemiş olan hastalar ile kıyaslandığında gruplar arasında hem sayısal hem de istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur (p=0.033).

aGvHH gelişen grupta Anjiyopoetin-2 indeks ortalama değeri 3,59±2,98 bulunmuşken; GvHH gelişmeyen grupta bu değer 1,99 ±1,11'dir. Bu sonuçlara göre Anjiyopoetin-2 indeksi yüksek olan grupta aGvHH gelişme ihtimalinin daha yüksek olduğu söylenebilir.Endoglin, VEGF-A, Folistatin, HB-EGF, ürik asit, albumin, mutlak lenfosit monosit parametrelerine ait indeks değerlerinde ise; iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05)(Tablo 10).



Şekil 8. Nakil Yapılan Hastalarda Sağkalım Grafiği

(Ortalama sağkalım zamanı $\pm$ Standart hata $37,88 \pm 3.10$ ay)



Şekil 9. aGVHH durumuna Göre Sağkalım Grafikleri

Allojeneik hematopoietik kok hücre nakli yapılan tum hastaların sağ kalım süresi 37.9 ± 3 ay olarak bulunmuştur (Şekil 8). Akut GvHH olan ve olmayan hastaların ortalama sağ kalım süreleri kıyaslandığı zaman aGvHH olan hastaların, olmayan hastalara göre daha uzun süre yaşadığı tespit edilmekle birlikte yaşam süreleri arasındaki bu farklılık (aGvHH, 32.7 ± 5.3 ay vs. aGvHH olmayan, 42.9 ± 3.3 ay) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0,137$) (Şekil 9).



Tablo.11. Akut GVHH için İki durumlu Lojistik Regresyon Analizi Sonuçları

Değişkenler	P değeri	Odds Oranı	Odds Oranı için %95	
			Alt Sınır	Güven Aralığı Üst Sınır
Sınıflama (Malign/Malign Olmayan)	0,032	9,716	1,214	77,747
Ang2 İndeks	0,043	2,245	1,027	4,905
Albumin İndeks	0,025	0,016	0,001	0,586
Absolü Lenfosit İndeks	0,232	0,943	0,856	1,038
Sabit	0,138	41,593		

GVHH için önemli risk faktörleri iki durumlu Lojistik Regresyon Analizi ile incelenmiştir. Tek değişkenli analizlerde aGVHH ile ilişkili olabileceğimiz değişkenlerden bir model elde edilmiştir. Modele bağımsız değişken olarak sınıflama, Ang2, albümin indeks, Absolü lenfosit İndeks değişkenleri alınmıştır. Değişkenlere ilişkin Odds oranları buna ilişkin güven aralığı ve p değerlerinin sonuçları Tablo 11’de sunulmuştur. Lojistik Regresyon Analizi sonucuna göre aGVHH için sınıflama, Ang2, albümin indeks değişkenleri önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Malign nedenle nakil yapılmış olan hastaların malign olmayan nedenle nakil yapılmış olan hastalara oranla akut GvHH görülme riski 9,72 kat fazladır. Ang2 İndeks değeri bir birim arttığı zaman aGvHH hastalığı görülme riski 2,25 kat arttırdığı ve tedavi sonrası albümin değerindeki düşme yani indeks değerindeki bir birimlik artışın ise aGvHH riskini 62 (1/0,016) kat arttırdığı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

HKHT sonrası ortaya çıkan, hastanın sağ kalımını en ciddi şekilde etkileyen erken komplikasyonlardan biri aGvHH'dir ve steroid başta olmak üzere çoklu immünsuppresif tedavilerin kullanımına rağmen hastaların önemli bir grubunda steroid tedavisine direnç ya da bağımlılık geliştirmektedir veya uzun süreli çoklu immünsupresif tedavilerin kullanımına bağlı çok ciddi komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır.

Transplantasyon öncesi verilen kemoterapi ve/veya radyoterapi içeren yoğun hazırlık rejimleri, profilaktik immünsupresif tedaviler, engraftmanı desteklemek için kullanılan büyüme faktörleri ve gelişen enfeksiyonlar endotel hasarına neden olabilmektedir. Endotel hasarı, endotel hücre aktivasyonuna ve anjiyogenezin uyarılmasına yol açar. GvHH erken fazında uyarılmış anjiyogenez ve belirgin ölçüde artmış yeniden damar yapımı (neovaskülarizasyon); inflamatuvar hücrelerin hedef hücre ve organlara taşınmasında kolaylaştırıcı bir rol oynamaktadır [52].

GvHH'nın ilerleyen evrelerinde ise; damar vasküler endotelinin kendisi de alloreaktif T hücrelerinin hedefi olmakla birlikte; artan hasar dolayısı ile anjiyogenez ve bunları takiben artan inflamasyon kendi içinde bir kısır döngüye girmektedir[52].

Anjiyogenezin aGvHH gelişimindeki önemli rolü farklı çalışmaların sonuçları ile gösterilmiş olmasına rağmen bu ilişki hala net olarak aydınlatılabilmemiş değildir ve aGvHH patogenezindeki rolü halen araştırılmaktadır. Bu çalışmalarda genel olarak aGvHH gelişimi sonrası farklı zaman aralıklarında farklı angiogenik faktörlerin düzeylerine bakılmış ve steroid tedavisine dirençli aGvHH'da etyopatogenezi aydınlatma amacıyla bu ilişkili irdelenmiştir.

aGvHH ile ilişkisi en sık araştırılmış olan faktörlerden VEGF-A tıpkı epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi bir trofik bir anjiyogenetik faktördür. HB-EGF ve endoglin ile birlikte doku rejenerasyondan sorumlu olan endotel ilişkili faktörler arasında sınıflandırılmaktadır [26]. Literatürde yer alan bir çok çalışmada HKHN sonrasında düşük serum VEGF-A ve EGF düzeylerinin ilerleyen dönemde tedaviye yanıt alan aGvHH'da arttığı ancak tedaviye yanıtızsız aGvHH ve daha da önemlisi steroide dirençli aGvHH'da düşük kaldığı ve yaşam oranlarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir[26,28,42,43]. Bizim çalışmamızda literatürdeki birçok çalışmadan farklı

olarak bu endotel ilişkili faktörlerin nakil öncesinde, hazırlık rejimi verilmeden ve verildikten sonra bu değerlere bakılmış, bu değerlerin kendi içindeki değişimleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Bu şekilde inflamasyonun erken döneminde endotel hücrelerde gelişen değişim hakkında bilgi verebilecek bir angiogenik profil çıkarılması ve bu profillemeye ile prognostik değeri olabilecek indekslerin hesaplanması amaçlanmıştır. Hasta ve sağlıklı vericilerde bakılan ve geniş bir dağılım gösteren bu faktör düzeylerindeki tedavi sonrası değişimlerini ve bu değişimleri daha objektif olarak değerlendirmek için hesaplanan indeks değerlerinin (-9/0.gün) aGvHH gelişimi açısından uyarıcı olup olmayacağını araştırmış olduğumuz çalışmamızda; yüksek olan plazma VEGF-A ve EGF düzeylerinde hazırlık protokolü sonrasında belirgin bir düşme kaydedilmiştir. Allogeneik HKHN hastalarının büyük bir kısmında nakil öncesi verilen kemoterapiler, immunsuppresif ajanlar veya geçirilen enfeksiyonlar nedeni ile zaten değişen oranlarda devam eden bir doku hasarı-inflamasyon/angiogenez-doku rejenerasyonu siklusu mevcuttur. Buna bağlanabilecek nakil öncesi kontrollere göre daha yüksek olan doku regenerasyonu ile ilişkili faktör düzeylerindeki artış, verilen hazırlama rejimi sonrasında uyarılan vasküler yanıt ve yeniden başlayan doku hasarı onarımında bu trofik faktörlerin kullanımı neticesinde gelişmiş olabilir [70].

Min ve arkadaşlarının 2006 senesinde yapmış oldukları çalışmada bizim çalışmamızı doğrular nitelikte hazırlık rejimi sonrasında +7. güne kadar VEGF serum düzeylerinde belirgin bir düşüklük arkasından artış tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da hazırlık protokolü sonrasında VEGF plazma düzeylerinde düşüş izlenmiş ancak aGvHH gelişen ve gelişmeyen hastalarda arasında VEGF düzeylerindeki değişim açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu durum aGvHH geliştiren hasta sayımızın sınırlı olmasından kaynaklanmış olabilir [55]. Ancak hem aGvHH olan hemde olmayan hastalarda rejim sonrası benzer değişim paternlerinin izlenmiş olması, aGvHH henüz gelişmediği erken dönemde, inflamasyon başlangıcındaki endotel hücre değişim mekanizmalarının, aGvHH geliştikten sonra görülen endotel hücre aktivasyon/hasar mekanizmalarından farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Literatüre baktığımız zaman Folistatin ve PIGF gibi endotel hasarı ve inflamasyon ile ilişkili bulunan faktörlerin nakil öncesi veya nakil sonrası düzeyleri ne

kadar yüksek ise bu hasta gruplarında aGvHH görülme ihtimalinin de o kadar yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu grup hastalarda faktörlerin plazma düzeyi ne kadar yüksek ise aGvHH'nin da o denli şiddetli olduğu yapılmış olan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda baktığımız Folistatin rejim öncesi düzeyleri hem sayısal hem de istatistiksel olarak kontrol grubundan daha yüksek bulunmuş ve rejim sonrasında da yüksek kalmıştır. Holtan ve arkadaşların aGvHH gelişen hastalarda Folistatin düzeylerinin daha yüksek olduğunu ve tedavi sonrası yüksek kalan Folistatin düzeylerinin negatif prognostik bir faktör olduğunu göstermişlerdir [70]

Aynı zamanda hastalardan hazırlama rejimi öncesinde ve sonrasında bakılan sistemik iflasyon ile ilişkili parametrelerden ürik asit, albümin, mutlak lenfosit ve mutlak monosit değerleri de karşılaştırılmıştır. Eksi dokuzuncu gün ve sıfırıncı gün absölu lenfosit ve monosit değerlerindeki azalma yönündeki değişim hem sayısal hem de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Diğer parametrelerde ise sayısal açıdan fark olmakla birlikte istatistiksel açıdan fark tespit edilememiştir. Ancak aGvHH gelişen ve gelişmeyen hastalarda bu parametreler arasında anlamlı fark görülmemiştir. Bu durum hasta sayımızın sınırlı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Bir diğer endotel ilişkili faktör de anjiyopoetin ailesine ait Anjiyopoetin-1'dir ve damar endotelinin korunmasında görev alır. Aynı zamanda lökosit adezyonunu azalttığı ve endotel geçirgenliğini de inhibe ettiği bilinmektedir. Anjiyopoetin-2 (Ang2) ise endotel apoptozisinde Ang1'i inhibe ederek rol almaktadır. Diğer bir deyişle Ang2 damar yapısını stabil olmayan hale getirir ve endotelin hasara gelişimine olan hassasiyetini gösterir . Nakil sonrası aktive olan endotel hücrelerinden hızlıca salındığını bildiren yayınlar bulunmaktadır ve Ang1 inhibisyonu ile aGvHH gelişiminden sorumlu tutulan mekanizmalar arasında raporlanmıştır [61].

Shosaku Nomura ve arkadaşları 2008 yılında Japonya'da yapmış oldukları çalışmada Ang 2 düzeyinin nakil sonrası ilk dört hafta içinde artış gösterdiği ve bu artışın aGvHH şiddeti ve mortalitesi ile yakından ilişkili olduğu göstermişlerdir. Aynı zamanda aGvHH patogenezinde rol oynadığını bildirilen Ang2 düzeyindeki nakil sonrası artışın allojenik nakillerde beklendiği gibi daha belirgin olduğunu ancak otolog nakil yapılmış olan hasta grubunda bu artışın anlamlı olmadığını tespit etmişlerdir[61].

Luft ve arkadaşlarının 2011 senesine yapmış oldukları bir başka çalışmada ise inflamasyon ve doku hasarından sorumlu olduğu düşünülen Ang2 düzeylerinin onarım ve rejenerasyondan sorumlu olduğu bilinen VEGF'in nakil öncesi düzeylerine oranlanması ile bir indeks değer elde edilmiş olup bu indeks değer ile komplikasyonların ilişkisine bakıldığı zaman nakil öncesi hastanın Ang2/VEGF oranı ne kadar yüksek olursa aGvHH gelişme ihtimalinin o kadar arttığı sonucuna varılmıştır [45].

2013'de Dietrich ve arkadaşlarının çalışmasında da yine önceki yayınlara benzer şekilde nakilden önce bakılmış olan Ang2 düzeyleri yüksek olan hastaların daha yüksek oranla steroida dirençli grade2-3 aGvHH tanısı aldıkları ve mortalitenin Ang 2 düzeyi düşük olan hastalara oranla belirgin ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir [2].

Bizim çalışmamızda da hematopoetik kök hücre nakli olan hastaların hazırlık rejimi öncesi ve sonrası, bakılmış olan plazma Ang 2 değerleri hem kendi içinde hem de kontrol grubu ile kıyaslanarak analiz edilmiştir.

Rejim öncesi bakılan Ang2 plazma düzeyinin tüm hastalarda kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu bulunurken, rejim sonrası bakılmış olan plazma değerlerinin düşme eğiliminde olduğu ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile anlamlı farkının kalmadığı gözlenmiştir. Hazırlama rejimi sonrası Ang2 düzeyindeki bu anlamlı düşüş uygulanan kemoterapinin anti-inflamatuvar etkisinden kaynaklanmış olabilir. Ancak hasta sayılarımız sınırlı olduğundan diğer çalışmalarda aGvHH gelişen hastalarda bildirilen düzeyleri ile ilgili yorum yapılması mümkün değildir. aGvHH gelişen ve gelişmeyen hastalarda bu değişimi daha objektif olarak değerlendirebilmek için hesaplanan indeks (Ang -9.gün /Ang2 0.gün) değeri açısından aGvHH olan ve olmayan grupta yer alan hastalar arasında sayısal ve istatistiksel bir farkının olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ve literatürdeki sonuçlara benzer şekilde Ang2 indeks değeri bir birim arttığı zaman aGvHH hastalığı görülme olasılığının 2.24 kat arttığı, Ang2 indeks değerinin aGvHH geliştiren grupta aGvHH geliştirmeyen gruba kıyasla yüksek olduğu ve bu yüksekliğin istatistiksel olarak da anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Literatürde de benzer şekilde Nowicki ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada HKHN sonrası plazma VEGF, Ang1, Ang2, MMP-9 düzeyleri hazırlık protokolü öncesinde, (0), (+7), (+14), (+21) günlerde değerlendirilmiş olup hazırlık

protokolü sonrasında Ang2 düzeyinin bizim çalışmamızla benzer şekilde belirgin olarak düşüşe geçtiği ve nakil sonrası (+7) günde yükselmeye başladığı bildirilmiştir [62]

Palomo ve arkadaşlarının hazırlama rejimi ve nakil tipinin erken dönemde gelişen endotel disfonksiyonu ile ilişkisini proinflatuvar ve protrombotik faktör düzeylerine bakarak inceledikleri çalışmalarında; hazırlık rejim öncesi ve sonrası +21. güne kadar hastalarında endotel hasarı ile ilişkili faktör düzeylerine (VCAM-1, sICMA-1, sTNFRI, vWF, ADAMTS-13) bakılmıştır. Allogeneik HKHT sürecinde tespit edilen endotel ilişkili belirteçlere ait tespit edilen değişimin muhtemelen hastaların almış olduğu yoğun radyoterapi ve kemoterapi içeren hazırlık rejimleri ile immun sistemlerini ve inflamatuvar yanıtın baskılanmış olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir[63].

Katarina ve arkadaşlarının aGvHH gelişimi ile ve anjiyogenez ilişkisini IBH ve GvHH fare modellerinde araştırdıkları çalışmalarında; anjiogenezin aGvHH hedef organlarında lökosit infiltrasyonundan önce başladığını (+2. günde), hazırlama rejimi sonrası anjiyogenik yanıt bulguları gelişmediğini göstermişlerdir. Ayrıca anjiogenezin başlangıç döneminde klasik endotel aktivasyon belirteçlerinde (VEGF, VEGFR1, adezyon molekülleri) değişim olmadığı, hedef organ endotel hücrelerinde metabolik ve sitoskeletal değişimlerin geliştiği, CD4 ve CD8 T lenfosit hücrelerin ise hedef organlarda +7. günden önce ortaya çıkmadığı gösterilmiştir. Bu durumda eğer aGvHH gelişimi ile ve anjiyogenez ilişkisini nakil öncesi anjiyogenik profillemeye ile incelemek için bilinen endotel aktivasyon/hasar belirteçlerinin kullanılması doğru olmayabilir. [64].

Bizim çalışmamızda (-9.) ve (0.) günlerde bakılmış olan plazma endotel ilişkili anjiyogenik faktör düzeylerinde aGvHH açısından anlamlı bir farklılık bulunamamış olması bu faktörlere henüz endotel aktivasyon başlamadan çok erken dönemde bakılmış olmasından ya da daha önce belirtildiği üzere aGvHH olan hasta sayısının sınırlı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca anjiyogenik faktör düzeylerindeki değişimlerin aGvHH şiddetiyle orantili olduğu da bilinmektedir. aGvHH gelişen 16 hastanın 15'inde grade I-II hastalık mevcut olması da bu nedenle sonuçlara etki etmiş olabilir. Buna rağmen Ang 2 düzeyi yüksek olup, hazırlık rejimi ile yeterli düzeyde düşüş elde edilemeyen dolayısı ile Ang 2 indeksi yüksek olan hastaların ilerleyen

dönemde aGvHH gelişimi açısından riskli oldukları tespit edilmistir. Albumin indeksi içinde benzer bir sonuç elde edildiği için, ön görülmesi son derece zor olan ancak mortalite ve morbidite açısından büyük risk taşıyan aGvHH gelişim riskinin değerlendirilmesinde bu indeks değerleri anlamlı olabilir.

Ancak hem aGvHH olan hemde olmayan hastalarda rejim sonrası benzer değişim paternlerinin izlenmiş olması, aGvHH henüz gelişmediği erken dönemdeki inflamasyon başlangıcındaki endotel hücre değişim mekanizmalarının, aGvHH geliştikten sonra görülen endotel hücre aktivasyon/hasar mekanizmalarından farklı olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısı ile transplant öncesi aGvHH gelişme riskini tespit edebilmek için bu mekanizmaların aydınlatılması ve daha geniş kapsamlı klinik araştırmalar ile bu sonuçların doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışma sonunda elde edilen ve aGvHH gelişme riski açısından anlamlı bulunan Ang2 ve Albumin indeksleri aynı zamanda immün regülatuar rolleride olan angiogenik faktörler ile inflamasyon başlangıcı arasındaki bu ilişkinin daha detaylı araştırılması gerekliliğini göstermektedir.



Tablo 12. Literatürdeki GvHH İle Endotel Markerların İlişkisini İnceleyen Çalışmalar

Faktör	Sene	Sonuç	referans
VEGF	2006	Düşük VEGF düzeyleri ile GvHH görülme ihtimali arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır.	[42]
VEGF	2007	Transplantasyon sonrasında serumdaki yüksek VEGF düzeyleri düşük şiddetli GvHH ile ilişkilendirilmiştir.	[43]
VEGF	2008	Düşük VEGF düzeyleri yüksek GVHD riski ile ilişkilidir. VEGF GvHH'na karşı koruyucudur.	[32]
VEGF-A	2011	HKHT sonrası düşük VEGF-A düzeyleri artmış GvHH ile ilişkilendirilmiştir	[26]
VEGF	2013	İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da GvHH olan gruptaki VEGF düzeyleri olmayan gruba oranla daha düşük bulunmuştur.	[44]
VEGF-A	2016	Steroid dirençli GvHH vakalarında VEGF-A belirgin ölçüde düşüktür.	[28]
EGF	2016	Steroid dirençli GvHH vakalarında EGF belirgin ölçüde düşüktür.	[28]
PIGF	2016	Steroid dirençli GvHH vakalarında PIGF belirgin ölçüde yüksektir.	[28]
PIGF	2016	AGvHH olan hastalarda olmayanlara kıyasla düzeyi belirgin yüksektir.	[4]
Folistatin	2016	Steroid dirençli GvHH vakalarında Folistatin belirgin ölçüde yüksektir.	[28]
Folistatin	2016	AGvHH olan hastalarda olmayanlara kıyasla Folistatin oldukça yüksektir aynı zamanda 28. Gün FS düzeyi en iyi prognostik faktördür.	[4]

Tablo 13. Literatürdeki GVHH İle Ang 2 İlişkisini İnceleyen Çalışmalar

Ang2	Sonuç	Kaynak
2008	Nakil sonrasında ilk 4 haftada ang2 düzeyi belirgin oranda artarken,ang1 düzeyleri ise anlamlı değişim göstermemiştir.	[37]
2008	Nakil sonrası dönemde belirgin olarak artan ang2 düzeyi izlemde azalırken,bu artışın düzeyi aGvHH şiddeti ile korelasyon göstermektedir.	[34]
2008	Otolog nakillerde Ang2 düzeyinin nakil sonrası artışı anlamlı değilken allojenik nakil olan hastalarda Ang2 düzeyinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.	[37]
2011	Nakil öncesi Ang2/VEGF oranının yüksek olduğu hastalarda aGVHH görülme ihtimali ve şiddeti artmıştır.	[29]
2013	Transplantasyon öncesinde bakılmış olan yüksek ang2 düzeyleri steroide dirençli grade2-3 GVHH ile ilişkili bulunmuştur.	[3]
2013	Yüksek ang2 düzeyleri hastaların mortalite ve morbidite riski ile pozitif ilişkilidir.	[3]
2017	Ang 2 düzeyi hazırlık protokolü sonrasında düşerken,+7.günden sonra yükselmektedir.	[38]
2017	Erken engraftman olan grupta ang1/ang2 düzeyi +7.günde geç engraftman olan gruba göre daha düşük tespit edilmiştir.	[38]
2018	Ang1/ang2 düzeyi ne kadar düşükse; endotel destabilizasyonu da o kadar fazladır ve bu oran hastanın nötrofil ve trombosit engraftman günleri ile korelasyon göstermektedir.	[39]

6. SONUÇLAR

1. Tüm hastalarda bakılmış olan ang2, endoglin değerlerindeki protokol öncesi ve sonrası değişim hem sayısal hem de istatistiksel açıdan anlamlıdır. ($p^* < 0,05$)

2. Angiopoetin 2, endoglin, EGF, HBEGF, VEGFA değerleri hazırlık rejimi aldıktan sonra (0.günde) ciddi düşüş göstermiştir. Protokol öncesindeki değerler kontrol grubu ile hem sayısal hem de istatistiksel açıdan ciddi fark teşkil etmektedir ancak protokol sonrasında değerlerin kontrol grubu ile istatistiksel bir farkı bulunmamaktadır.

3. Folistatin-like faktör plazma değeri ise protokol öncesinde de (-9.günde) protokol sonrasında da (0.günde) kontrol grubu ile hem sayısal hem de istatistiksel açıdan anlamlı fark teşkil etmektedir.

4. Eksi dokuzuncu gün ve sıfırıncı gün mutlak lenfosit ve monosit değerlerindeki değişim hem sayısal hem de istatistiksel açıdan anlamlıdır.

5. aGvHH gelişen grup ile gelişmeyen grup arasında endotel ilişkili parametrelerden anjiyopoetin 2, VEGF-A, endoglin, follistatin, HB-EGF ve biyokimyasal parametrelerden ürik asit, albümin, absolü lenfosit, absolü monosit plazma düzeylerinde protokol öncesi ve sonrası anlamlı fark bulunmamaktadır.

6. aGvHH gelişen grupta anjiyopoetin 2 indeks ortalama değeri $3,59 \pm 2,98$, GvHH geliştirmeyen grupta bu değer $1,99 \pm 1,11$ 'dir. Anjiyopoetin indeksi yüksek olan grupta aGvHH gelişme ihtimali daha yüksek olarak bulunmuştur. Endoglin, VEGFA, folistatin, HBEGF, ürikasit, albumin, lenfosit, monosit parametrelerine ait indeks değerlerinde ise; iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır.

7. Malign nedenle nakil yapılmış olan hastaların malign olmayan nedenle nakil yapılmış olan hastalara oranla akut GvHH görülme riski 9,72 kat fazladır.

8. Ang2 İndeks değeri bir birim arttığı zaman aGvHH hastalığı görülme riski 2,25 kat artmaktadır ve Albümin indeks değerindeki bir birimlik artış ise aGvHH riskini 0,016 kat arttırmaktadır.

9. Allojeneik hematopoietik kök hücre nakli yapılan tüm hastaların sağ kalım süresi 37.9 ± 3 ay'dır

10. Akut GvHH olan ve olmayan hastaların ortalama sağ kalım süreleri kıyaslandığı zaman aGvHH olan hastaların, olmayan hastalara göre daha uzun süre yaşadığı tespit edilmekle birlikte yaşam süreleri arasındaki bu farklılık (aGvHH, 32.7 ± 5.3 ay vs. aGvHH olmayan, 42.9 ± 3.3 ay) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0,137$)



7. KAYNAKLAR

1. Magenau J, Runaas L, Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2016;173(2):190-205. doi: 10.1111/bjh.13959. PubMed PMID: 27019012.
2. Dietrich S, Falk CS, Benner A, Karamustafa S, Hahn E, Andrulis M, et al. Endothelial vulnerability and endothelial damage are associated with risk of graft-versus-host disease and response to steroid treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(1):22-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2012.09.018. PubMed PMID: 23041600.
3. Blix ES, Husebekk A. Raiders of the lost mark - endothelial cells and their role in transplantation for hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(12):2752-62. doi: 10.1080/10428194.2016.1201566. PubMed PMID: 27396981.
4. Sureda DVaA. Graft Failure. In: Kröger ECCDMMN, editor. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Cham, Switzerland: Springer; 2019. p. 309-10.
5. Ali AM, DiPersio JF, Schroeder MA. The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Risk Stratification of Acute Graft-versus-Host Disease: A Systematic Review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(9):1552-64. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.04.022. PubMed PMID: 27158050; PubMed Central PMCID: PMC5599102.
6. Hofer T, Rodewald HR. Output without input: the lifelong productivity of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;43:69-77. doi: 10.1016/j.jceb.2016.08.003. PubMed PMID: 27620508.
7. Alessandro Aiuti SS, Chabannon aC. Biological Properties of HSC:Scientific Basis for HSCT. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 2019. p. 51.
8. Korbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(24):6411-6. doi: 10.1182/blood-2010-12-322214. PubMed PMID: 21460243.
9. Martino R, Parody R, Fukuda T, Maertens J, Theunissen K, Ho A, et al. Impact of the intensity of the pretransplantation conditioning regimen in patients with prior invasive aspergillosis undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective survey of the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2006;108(9):2928-36. doi: 10.1182/blood-2006-03-008706. PubMed PMID: 16720833; PubMed Central PMCID: PMC1895522.
10. Abou-Mourad YR, Lau BC, Barnett MJ, Forrest DL, Hogge DE, Nantel SH, et al. Long-term outcome after allo-SCT: close follow-up on a large cohort treated with myeloablative regimens. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(2):295-302. doi: 10.1038/bmt.2009.128. PubMed PMID: 19597425.

11. Russell NH, Gratwohl A, Schmitz N. Developments in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Br J Haematol.* 1998;103(3):594-600. PubMed PMID: 9858206.
12. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol.* 1999;36(4 Suppl 7):95-103. PubMed PMID: 10595758.
13. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood.* 1997;89(7):2233-58. PubMed PMID: 9116266.
14. Wagner JE, Jr. Umbilical cord blood stem cell transplantation: current status and future prospects (1992). *J Hematother.* 1993;2(2):225-8. doi: 10.1089/scd.1.1993.2.225. PubMed PMID: 7921979.
15. Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:354-71. doi: 10.1182/asheducation-2004.1.354. PubMed PMID: 15561692.
16. Koh LP, Chao NJ. Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(1):1-22. doi: 10.1016/j.bbmt.2003.09.009. PubMed PMID: 14752775.
17. Soutar RL, King DJ. Bone marrow transplantation. *BMJ.* 1995;310(6971):31-6. PubMed PMID: 7827553; PubMed Central PMCID: PMC2548441.
18. K.Gaur L. Functional Evolution of the Major Histocompatibility Complex In: G.Blume K, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. *Thomas Hematopoietic Cell 3ed*2004. p. 43.
19. Shimoni ANaA. Conditioning. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*2019. p. 99-105.
20. McCarthy NJ, Bishop MR. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation: early promise and limitations. *Oncologist.* 2000;5(6):487-96. PubMed PMID: 11110600.
21. Sorror ML, Giralt S, Sandmaier BM, De Lima M, Shahjahan M, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index as an outcome predictor for patients with acute myeloid leukemia in first remission: combined FHCRC and MDACC experiences. *Blood.* 2007;110(13):4606-13. doi: 10.1182/blood-2007-06-096966. PubMed PMID: 17873123; PubMed Central PMCID: PMC2234788.
22. Bacigalupo A. Hemopoietic stem cell transplantation. Editorial comment. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(6):419. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283322849. PubMed PMID: 19826375.
23. Belkacemi Y, Labopin M, Giebel S, Loganadane G, Mischczyk L, Michallet M, et al. Single-Dose Daily Fractionation Is Not Inferior to Twice-a-Day Fractionated Total-Body Irradiation Before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Leukemia: A Useful Practice Simplification Resulting From the SARASIN Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*

- 2018;102(3):515-26. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.06.015. PubMed PMID: 29928948.
24. Bader P. Documentation of Engraftment and Chimerism After HSCT. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* 2019. p. 143-7.
 25. Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Invest.* 2014;32(7):349-62. doi: 10.3109/07357907.2014.919301. PubMed PMID: 24902046.
 26. Diaz-Ricart E, Carreras E. Early Complications of Endothelial Origin. In: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* 2019. p. 315-22.
 27. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(12):1495-502. doi: 10.1038/bmt.2011.65. PubMed PMID: 21460864.
 28. Spitzer TR. Engraftment syndrome following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27(9):893-8. doi: 10.1038/sj.bmt.1703015. PubMed PMID: 11436099.
 29. Afessa B, Tefferi A, Litzow MR, Krowka MJ, Wylam ME, Peters SG. Diffuse alveolar hemorrhage in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(5):641-5. PubMed PMID: 12204858.
 30. Batts ED, Lazarus HM. Diagnosis and treatment of transplantation-associated thrombotic microangiopathy: real progress or are we still waiting? *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(8):709-19. doi: 10.1038/sj.bmt.1705758. PubMed PMID: 17603513.
 31. Corbacioglu S, Carreras E, Ansari M, Balduzzi A, Cesaro S, Dalle JH, et al. Diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in pediatric patients: a new classification from the European society for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(2):138-45. doi: 10.1038/bmt.2017.161. PubMed PMID: 28759025; PubMed Central PMCID: PMC5803572.
 32. Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, Richardson P. Hepatic veno-occlusive disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Opin Hematol.* 2003;10(6):451-62. PubMed PMID: 14564177.
 33. Ernst Holler HG, and Robert Zeiser. Acute Graft-Versus-Host Disease. In: Enric Carreras CD, Mohamad Mohty, Nicolaus Kröger editor. *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* 2019. p. 323-9.
 34. Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood.* 2014;124(3):363-73. doi: 10.1182/blood-2014-01-514786. PubMed PMID: 24914140; PubMed Central PMCID: PMC4102709.

35. Flowers ME, Kansu E, Sullivan KM. Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999;13(5):1091-112, viii-ix. PubMed PMID: 10553263.
36. Brennan TV, Lin L, Huang X, Cardona DM, Li Z, Dredge K, et al. Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2012;120(14):2899-908. doi: 10.1182/blood-2011-07-368720. PubMed PMID: 22760779; PubMed Central PMCID: PMC3466971.
37. Markey KA, Koyama M, Kuns RD, Lineburg KE, Wilson YA, Olver SD, et al. Immune insufficiency during GVHD is due to defective antigen presentation within dendritic cell subsets. *Blood.* 2012;119(24):5918-30. doi: 10.1182/blood-2011-12-398164. PubMed PMID: 22415754.
38. Briones J, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. *Bone Marrow Res.* 2011;2011:976793. doi: 10.1155/2011/976793. PubMed PMID: 22046574; PubMed Central PMCID: PMC3195325.
39. Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Adv Hematol.* 2011;2011:601953. doi: 10.1155/2011/601953. PubMed PMID: 22110505; PubMed Central PMCID: PMC3216266.
40. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2000;95(9):2754-9. PubMed PMID: 10779417.
41. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295-304. PubMed PMID: 4153799.
42. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15(6):825-8. PubMed PMID: 7581076.
43. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(2):168-73. doi: 10.1038/bmt.2013.107. PubMed PMID: 23892326.
44. Holtan SG, Arora M. Angiogenic factors and inflammation in steroid-refractory acute graft-vs-host disease. *Transl Res.* 2016;167(1):80-7. doi: 10.1016/j.trsl.2015.06.001. PubMed PMID: 26117290; PubMed Central PMCID: PMC5747967.
45. Luft T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, et al. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood.* 2011;118(6):1685-92. doi: 10.1182/blood-2011-02-334821. PubMed PMID: 21636856.

46. Reikvam H, Mosevoll KA, Melve GK, Gunther CC, Sjo M, Bentsen PT, et al. The pretransplantation serum cytokine profile in allogeneic stem cell recipients differs from healthy individuals, and various profiles are associated with different risks of posttransplantation complications. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(2):190-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.10.007. PubMed PMID: 22019725.
47. Wilke C, Holtan SG, Sharkey L, DeFor T, Arora M, Premakanthan P, et al. Marrow damage and hematopoietic recovery following allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemias: Effect of radiation dose and conditioning regimen. *Radiother Oncol.* 2016;118(1):65-71. doi: 10.1016/j.radonc.2015.11.012. PubMed PMID: 26653357; PubMed Central PMCID: PMC4764403.
48. Penack O, Henke E, Suh D, King CG, Smith OM, Na IK, et al. Inhibition of neovascularization to simultaneously ameliorate graft-vs-host disease and decrease tumor growth. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(12):894-908. doi: 10.1093/jnci/djq172. PubMed PMID: 20463307; PubMed Central PMCID: PMC2886094.
49. Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O, Tartour E, Taieb J, et al. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol.* 2014;4:70. doi: 10.3389/fonc.2014.00070. PubMed PMID: 24765614; PubMed Central PMCID: PMC3980099.
50. Brent L, Medawar P. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. VII. The normal lymphocyte transfer reaction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1966;165(1000):281-307. doi: 10.1098/rspb.1966.0069. PubMed PMID: 4380527.
51. Holtan SG, Verneris MR, Schultz KR, Newell LF, Meyers G, He F, et al. Circulating angiogenic factors associated with response and survival in patients with acute graft-versus-host disease: results from Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network 0302 and 0802. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(6):1029-36. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.02.018. PubMed PMID: 25759146; PubMed Central PMCID: PMC4426052.
52. Penack O, Socie G, van den Brink MR. The importance of neovascularization and its inhibition for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011;117(16):4181-9. doi: 10.1182/blood-2010-10-312934. PubMed PMID: 21258010.
53. Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN, et al. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):1931-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1980. PubMed PMID: 19240164; PubMed Central PMCID: PMC2757059.
54. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med.* 2015;212(2):139-48. doi: 10.1084/jem.20140559. PubMed PMID: 25601652; PubMed Central PMCID: PMC4322048.

55. Kim DH, Lee NY, Lee MH, Sohn SK. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms may predict the risk of acute graft-versus-host disease following allogeneic transplantation: preventive effect of vascular endothelial growth factor gene on acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(12):1408-16. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.09.022. PubMed PMID: 19041064.
56. Scuderi R, Failla A. [Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF): myth or reality?]. *Clin Ter.* 2008;159(2):111-6. PubMed PMID: 18463770.
57. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 2011;31(6):2283-90. PubMed PMID: 21737653.
58. Brent L, Medawar PB. Tissue transplantation: a new approach to the "typing" problem. *Br Med J.* 1963;2(5352):269-72. PubMed PMID: 14015250; PubMed Central PMCID: PMC1872428.
59. Linares PM, Chaparro M, Gisbert JP. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *J Crohns Colitis.* 2014;8(3):183-90. doi: 10.1016/j.crohns.2013.06.013. PubMed PMID: 23859759.
60. Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res.* 1998;83(8):852-9. PubMed PMID: 9776732.
61. Nomura S, Ishii K, Inami N, Kimura Y, Uoshima N, Ishida H, et al. Evaluation of angiopoietins and cell-derived microparticles after stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(7):766-74. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.04.005. PubMed PMID: 18541195.
62. Nowicki M, Wierzbowska A, Malachowski R, Robak T, Grzybowska-Izydorczyk O, Pluta A, et al. VEGF, ANGPT1, ANGPT2, and MMP-9 expression in the autologous hematopoietic stem cell transplantation and its impact on the time to engraftment. *Ann Hematol.* 2017;96(12):2103-12. doi: 10.1007/s00277-017-3133-4. PubMed PMID: 28956132.
63. Palomo M, Diaz-Ricart M, Carbo C, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Martine C, et al. Endothelial dysfunction after hematopoietic stem cell transplantation: role of the conditioning regimen and the type of transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(7):985-93. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.02.008. PubMed PMID: 20167280.
64. Riesner K, Shi Y, Jacobi A, Krater M, Kalupa M, McGearey A, et al. Initiation of acute graft-versus-host disease by angiogenesis. *Blood.* 2017;129(14):2021-32. doi: 10.1182/blood-2016-08-736314. PubMed PMID: 28096092
65. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol.* 1965;12(3):394-407. PubMed PMID: 5884352.

66. Playford RJ. Peptides and gastrointestinal mucosal integrity. *Gut*. 1995;37(5):595-7. PubMed PMID: 8549930; PubMed Central PMCID: PMC1382859.
67. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Manolakis AC, Tsiopoulos FD, Germenis AE, et al. Downregulation of serum epidermal growth factor in patients with inflammatory bowel disease. Is there a link with mucosal damage? *Growth Factors*. 2010;28(6):461-6. doi: 10.3109/08977194.2010.527967. PubMed PMID: 20969541.
68. Zachary I. Vascular endothelial growth factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30(11):1169-74. PubMed PMID: 9839443.
69. Dietrich S, Falk CS, Benner A, Karamustafa S, Hahn E, Andrulis M, et al. Endothelial vulnerability and endothelial damage are associated with risk of graft-versus-host disease and response to steroid treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(1):22-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2012.09.018. PubMed PMID: 23041600.
70. Holtan SG, Verneris MR, Schultz KR, Newell LF, Meyers G, He F, et al. Circulating angiogenic factors associated with response and survival in patients with acute graft-versus-host disease: results from Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network 0302 and 0802. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(6):1029-36. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.02.018. PubMed PMID: 25759146; PubMed Central PMCID: PMC4426052.

8. EKLER

EK 1. Hasta Veri Toplama Formu

HASTA KODU: DOSYA NUMARASI: CİNSİYET: DOĞUM TARİHİ: YAŞI:	
TANISI: TANI YAŞI: TANI İLE KİT ARASINDA GEÇEN SÜRE:	
KİT YAŞI: KİT TARİHİ: KAÇINCI KİT OLDUĞU: DONOR TİPİ: KÖK HÜCRE KAYNAĞI:	
GvHH PROFLAKSİSİ İÇİN ALDIĞI İLAÇLAR: HAZIRLIK REJİMİ İÇİN ALDIĞI İLAÇLAR:	
AKUT GvHH: KRONİK GvHH: NÖTROFİL ENGRAFTMAN: TROMBOSİT ENGRAFTMAN: VOD: ENGRAFTMAN SENDROMU:	

KCFT BOZUKLUĞU: HEMORAJİK SİSTİT: EK HASTALIKLARI: ENFEKSİYON: KATETER ENFEKSİYONU:	
-9./0.GÜN PLAZMA FAKTÖRLERİ: EGF Ang2 G-CSF Endoglin Follistatin HB-EGF PIGF VEGF-A	
-9 ve 0. GÜN Absolü Lenfosit Sayısı Absolü Monosit Sayısı Ürik Asit Albumin	

EK 2. Biyobanka Onam Formu



HACETTEPE UNİVERSİTESİ

KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ

EK-1

BIYOBANKA ONAM FORMU

Biyobankalar: Hücre/ doku/ DNA/ serum/ plazma/ idrar gibi biyolojik örnek tanımına giren tüm örneklerin saklandığı ve bu örneklerle ilgili bilgilerin veri tabanlarında arşivlenerek gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli korunduğu alt yapıdır.

H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Kök Hücre ve Hücre Bankası: Kan, kemik iliği veya diğer dokulardan elde edilen ve farklı dokulara farklılaşabilen, kendi kendini yenileme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre denilmektedir. Kök Hücre ve Hücre Bankası; söz konusu biyolojik örneklerden geliştirilen kök hücrelerin ve bu örneklerle ilişkili bilgilerin özellikle çocukluk çağı hastalıklarında hastalık mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni tedavi yöntemlerinin bulunması için uzun süre depolandığı birimdir.

Kişisel Bilgilerin Korunması

- Size/çocuğunuza ait kişisel ve tıbbi bilgiler şifreli bir bilgisayarda korunacaktır ve bu bilgisayara erişim sadece yetkilendirilmiş biyobanka çalışanları tarafından mümkündür.
- Biyolojik örnekler kodlanarak saklanacaktır, bireyi tanımlayıcı kişisel bilgiler (isim, soyadı, gibi kimlik bilgileri) laboratuvar sonuçlarında ve araştırma sonuçlarının çıktılarında kullanılmayacaktır
- Kişisel ve tıbbi bilgileriniz iş yeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır. Örnekler gönüllük esasına dayalı olarak toplanmaktadır. Ticari bir karşılığı yoktur.
- Sizden alınan örnekler en az 10 yıl süre ile saklanacaktır.

Örneklere erişim

- Örnek bankalama şu anda size/çocuğunuza bir tanı hizmeti vermeyebilir ancak uzun vadede sizin/çocuğunuzun hastalığı ile ilgili elde edilebilecek bilgiler size ve bu hastalıktan etkilenmiş diğer kişilere/ ailelere/ topluma tanı ve tedavi açısından yarar sağlayabilecektir
- Örnekler araştırma amaçlı kullanıldığı durumda kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli tutulacaktır.
- Biyolojik örnek bankalama sistemi gönüllülük esasına dayalıdır. Örneklerin bankalanma süresi içerisinde onamınızı ve sizin biyolojik örneğinizi çekme hakkına sahipsiniz. Bu durumda talebinize bağlı olarak örneğiniz ve verileriniz imha edilecektir. Çocuğunuz 16 yaşına geldiğinde örneklerin saklanması ya da imhası için tekrar onayına başvurulacaktır.

Sonuç Bildirimi

Olası araştırma sonuçlarının geri dönüşümü hakkında aşağıdakilerden hangisini kabul ediyorsunuz

☐ Bildirilmesini istemiyorum.

☐ Tanı ve tedaviye yol açmasa bile bildirilmesini istiyorum.

☐ Sonuçların önleyici veya tedaviye yönelik olduğu durumlarda bildirilmesini istiyorum.

Sonuçların veri bankalarına eklenmesi Tıbbi bilgileriniz kimlik bilgileriniz ile ilişkilendirilmeden veri bankalarına eklenebilir ve ulusal/uluslararası araştırma çalışmalarında kullanılabilir. Veri bankalarına eklenme konusunda aşağıdakilerden hangisini kabul ediyorsunuz

☐ Tıbbi bilgilerimin veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLAMİYORUM

☒ Tıbbi bilgilerimin veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLIYORUM

Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden/çocuğunuzdan tanı ya da tıbbi izlem amacı ile alınan kan, kemik iliği, biyopsi materyallerinin bir kısmı ile kök hücre/hücreler geliştirilerek saklanılacaktır. Bunun için size/çocuğunuza örnek alma amaçlı olarak ek bir girişim yapılmayacaktır.

Sizden alınan biyolojik örnek halen devam eden bir araştırmada kullanılabileceği gibi henüz tanımlanmamış ileride yapılacak araştırmalarda da kullanılabilecektir. Ancak bu araştırmalar şu anda tanımlanmamış olsa bile sizin ya da çocuğunuzun hastalığının tanı ve tedavisine yönelik olacaktır.

Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde lütfen bu formu imzalayınız.

- **Çocuğunuz 16 yaşına geldiğinde; örneklerin saklanması, araştırmalarda kullanılması, imhası ve sonuç bildirimi konularında onun iznine de başvurulacaktır.**

Yukarıdaki bilgileri okudum Kök Hücre/Hücre Bankası amaç ve içeriği hakkında açıklamalar yapıldı. Örnek vermeyi kabul ediyorum:

_____ İsim Soyadı, İmza (Katılımcı/Ebeveyn)	Tarih
	5.2.2018
_____ İsim Soyadı, İmza (Tanık)	Tarih
Koray Yılmaz	
Katılımcı/ebeveyne yukarıdaki bilgiler sözel olarak verilmiş KökHücre/Hücre bankası amaç ve içeriği açıklanmıştır.	5.2.2018
_____ İsim Soyadı, İmza (Klinik Sorumlusu/Araştırma Sorumlusu)	Tarih
Sorularınız için 0 312-305-2821 no'lu telefondan bilgi alabilirsiniz.	
Müdür: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya	
Sorumlular:Klinik Araştırma Hemşiresi:Hacer Cüzdanlı	

Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya
Genetik Hastalıkları ve Kök Hücreler
Üniversite Hastanesi
Tıbbi Bilimler Fakültesi

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Sıhhiye Kampüsü, 06100, Ankara.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

KÖK HÜCRE ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ

EK-1

BİYO BANKA ONAM FORMU

Biyobankalar: Hücre/ doku/ DNA/ serum/ plazma/ idrar gibi biyolojik örnek tanımına giren tüm örneklerin saklandığı ve bu örneklerle ilgili bilgilerin veri tabanlarında arşivlenerek gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli korunduğu alt yapıdır.

H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi Kök Hücre ve Hücre Bankası: Kan, kemik iliği veya diğer dokulardan elde edilen ve farklı dokulara farklılaşabilen, kendi kendini yenileme özelliğine sahip olan hücrelere kök hücre denilmektedir. Kök Hücre ve Hücre Bankası; söz konusu biyolojik örneklerden geliştirilen kök hücrelerin ve bu örneklerle ilişkili bilgilerin özellikle çocukluk çağı hastalıklarında hastalık mekanizmalarının aydınlatılması ve yeni tedavi yöntemlerinin bulunması için uzun süre depolandığı birimdir.

Kişisel Bilgilerin Korunması

- Size/çocuğunuza ait kişisel ve tıbbi bilgiler şifreli bir bilgisayarda korunacaktır ve bu bilgisayara erişim sadece yetkilendirilmiş biyobanka çalışanları tarafından mümkündür.
- Biyolojik örnekler kodlanarak saklanacaktır, bireyi tanımlayıcı kişisel bilgiler (isim, soyadı, gibi kimlik bilgileri) laboratuvar sonuçlarında ve araştırma sonuçlarının çıktılarında kullanılmayacaktır.
- Kişisel ve tıbbi bilgileriniz iş yeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır. Örnekler gönüllük esasına dayalı olarak toplanmaktadır. Ticari bir karşılığı yoktur.
- Sizden alınan örnekler en az 10 yıl süre ile saklanacaktır.

Örneklere erişim

- Örnek bankalama şu anda size/çocuğunuza bir tanı hizmeti vermeyebilir ancak uzun vadede sizin/çocuğunuzun hastalığı ile ilgili elde edilebilecek bilgiler size ve bu hastalıktan etkilenmiş diğer kişilere/ ailelere/ topluma tanı ve tedavi açısından yarar sağlayabilecektir.
- Örnekler araştırma amaçlı kullanıldığı durumda kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli tutulacaktır.
- Biyolojik örnek bankalama sistemi gönüllülük esasına dayalıdır. Örneklerin bankalanma süresi içerisinde onamınızı ve sizin biyolojik örneğinizi çekme hakkına sahipsiniz. Bu durumda talebinize bağlı olarak örneğiniz ve verileriniz imha edilecektir. Çocuğunuz 16 yaşına geldiğinde örneklerin saklanması ya da imhası için tekrar onayına başvurulacaktır.

Sonuç Bildirimi

Olası araştırma sonuçlarının geri dönüşümü hakkında aşağıdakilerden hangisini kabul ediyorsunuz

☐ Bildirilmesini istemiyorum.

☐ Tanı ve tedaviye yol açmasa bile bildirilmesini istiyorum.

☐ Sonuçların önleyici veya tedaviye yönelik olduğu durumlarda bildirilmesini istiyorum.

Sonuçların veri bankalarına eklenmesi Tıbbi bilgileriniz kimlik bilgileriniz ile ilişkilendirilmeden veri bankalarına eklenebilir ve ulusal/uluslararası araştırma çalışmalarında kullanılabilir. Veri bankalarına eklenme konusunda aşağıdakilerden hangisini kabul ediyorsunuz

☐ Tıbbi bilgilerimin veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLAMİYORUM

☐ Tıbbi bilgilerimin veri bankalarına eklenmesini, başka araştırmalarda kullanılmak üzere veri değişimi yapılmasını ONAYLIYORUM

Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden/çocuğunuzdan tanı ya da tıbbi izlem amacı ile alınan kan, kemik iliği, biyopsi materyallerinin bir kısmı ile kök hücre/hücreler geliştirilerek saklanılacaktır. Bunun için size/çocuğunuza örnek alma amaçlı olarak ek bir girişim yapılmayacaktır.

Sizden alınan biyolojik örnek halen devam eden bir araştırmada kullanılabileceği gibi henüz tanımlanmamış ileride yapılacak araştırmalarda da kullanılabilecektir. Ancak bu araştırmalar şu anda tanımlanmamış olsa bile sizin ya da çocuğunuzun hastalığının tanı ve tedavisine yönelik olacaktır.

Katılmayı kabul ettiğiniz takdirde lütfen bu formu imzalayınız.

- **Çocuğunuz 16 yaşına geldiğinde; örneklerin saklanması, araştırmalarda kullanılması, imhası ve sonuç bildirimi konularında onun iznine de başvurulacaktır.**

Yukarıdaki bilgileri okudum Kök Hücre/Hücre Bankası amaç ve içeriği hakkında açıklamalar yaptım:

_____ İsim Soyadı, İmza (Katılımcı/Ebeveyn) _____ 27-12-2017
Tarih

_____ İsim Soyadı, İmza (Tanık) _____ 27/12/17
Tarih

Katılımcı/ebeveyne yukarıdaki bilgiler sözel olarak verilmiş KökHücre/Hücre bankası amaç ve içeriği açıklanmıştır.

_____ İsim Soyadı, İmza (Klinik Sorumlusu/Araştırma Sorumlusu) _____
Tarih

Sorularınız için 0 312-305-2821 no'lu telefondan bilgi alabilirsiniz.

Müdür: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya

Sorumlular:Klinik Araştırma Hemşiresi:Hacer Cüzdancı

Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Sıhhiye Kampüsü,
06100, Ankara.

EK 3. Etik Kurul Onam Form

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-380

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 20 ŞUBAT 2018 SALI
Toplantı No : 2018/06
Proje No : GO 18/235 (Değerlendirme Tarihi: 20.02.2018)
Karar No : GO 18/235-29

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Fatma Visal OKUR'un sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA, İnci CEVHER ile birlikte çalışacakları ve Arş. Gör. Dr. Özlem ŞATIRER'in uzmanlık tezi olan, GO 18/235 kayıt numaralı, "*Hematopoetik Kök Hücre Nakli Yapılan Hastalarda Anjiogenik Faktör Düzeylerinin GvHH Riski ile İlişkisi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan) | 10. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Üye) | 11. Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SAKA (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Necla SAGLAM (Üye) | KATILMADI |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BULUTLU (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye) |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye) | İZİNLİ |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye) | 15. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye) | 16. Yrd. Doç. Dr. Müge DEMİR (Üye) |
| | 17. Öğr.Gör.Dr. Meltem ŞENGEL (Üye) |
| | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye) |