



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ NAKLİ YAPILAN PEDIATRİK
HASTALARDA NAKİL ÖNCESİ VE NAKİL SONRASI
SERUM HEPsİDİN, İNTERLÖKİN-6 VE TÜMÖR
NEKROZ FAKTÖR-ALFA DÜZEYLERİNİN
ENFEKSİYONLA İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

MERAL AKBIYIK (DİNÇ)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Bahar GÖKER

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyokimya

Tez Sahibi : Meral Akbıyık (Dinç)

Tez Başlığı : Kemik İliği Nakli Yapılan Pediatrik Hastalarda Nakil Öncesi ve Nakil Sonrası Serum Hepsidin, İnterlökin-6 ve Tümör Nekroz Faktör-Alfa Düzeylerinin Enfeksiyonla İlişkisinin Belirlenmesi

Sınav Yeri :

Sınav Tarihi :

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

1.1.1. Kurumu

İmza

Yard. Doç. Dr. Bahar GÖKER

M.Ü. ECZACILIK FAK.

1.1.2. Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Sema ANAK

İ.Ü. İSTANBUL TIP FAK.

Doç.Dr Azize ŞENER

M.Ü. ECZACILIK FAK.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 18/03/2010 tarih ve 24 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09.02.2010

Meral AKBIYIK (DİNÇ)



TEŞEKKÜR

İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji/Onkoloji Bilim Dalı Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nde çalıştığım ilk günden itibaren yüksek lisans yapmam için teşvik eden ve çalışmamda da desteğini her zaman hissettiğim sevgili hocalarım Prof.Dr. Sema ANAK ve Prof.Dr. Gülyüz ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında elinden gelen tüm fedakarlığıyla ve güler yüzüyle her zaman yanımda olan sevgili danışmanım Yrd. Doç.Dr. Bahar GÖKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ders aldığım dönemlerde ve her zaman yardımlarını gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Turay YARDIMCI, Prof. Dr. Fikriye URAS'a, Doç.Dr. Azize ŞENER'e, Yrd.Doç.Dr. Rabia OBA'ya, Yrd.Doç.Dr. Derya ÖZSAVCI'ya, Yrd.Doç.Dr. Şermin TETİK'e ve Öğr.Gör.Dr. Halil AKSOY' a ve Araştırma Görevlileri Özlem Özakpınar ve Özge Dağdeviren' e teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında manevi desteklerini esirgemeyen Doç.Dr. Hakan EKMEKÇİ, Biyokimya Uzmanı Dr.Özlem BALCI EKMEKÇİ, çalışmam sırasında her zaman yanımda olan iş arkadaşım Uzm.Bio. Çağrı GÜLEÇ'e

Yüksek lisansa başlamamda en büyük teşvik ve desteği yapan, çalışmalarımda bana gönülden destek veren biricik eşim Erdal AKBIYIK ve canım kızlarım Dilge ve Melike'ye sabır ve desteklerinden dolayı, çocuklarıma sahip çıkarak bana rahat bir çalışma ortamı hazırlamaya gayret gösteren canım annem Latife DİNÇ ve babam Mehmet Ali DİNÇ'e,

İstatistiksel yöntemin çalışmalarında yardımcı olan Doç. Dr. Ufuk ÇAKATAY'a, kan alımında yardımcı olan Laborant Tülin TUNÇ ve K.İ. Ünitesi hemşirelerine,

Bizden desteklerini esirgemeyen ve onların sayesinde böyle bir çalışma ortaya çıkarabildiğimiz için tüm hasta ve ailelerine teşekkür ederim.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: SAG-C-YLP-070808-0193

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
SUMMARY	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kök Hücre ve Kemik İliği Nakli.....	2
2.1.1. Aplastik Anemi (AA):	5
2.1.2. Fanconi Anemisi (FA)	5
2.1.3. Lösemiler	6
2.1.3.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL).....	7
2.1.3.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	7
2.1.4. Lenfomalar.....	8
2.1.4.1. Hodgkin Dışı Lenfoma (HDL)	8
2.1.4.2. Hodgkin lenfoma (HL)	9
2.1.5. Hemofagositik Lenfhistiositoz (HLH).....	9
2.2. Kök Hücre Uygulama Süreci	10
2.3. Sitokinler.....	15
2.3.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri	16
2.3.2. Tümör Nekrozitan Faktör (TNF)	16
2.3.3. İnterlökin-6 (IL-6).....	18
2.4. Hepsidin	18
2.4.1. Hepsidinin biyolojik işlevleri.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Olguların Seçimi	26

3.2. Metod	26
3.3. İstatistiksel Yöntem	33
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6. KAYNAKLAR	50
7. ÖZGEÇMİŞ	55
8. EKLER.....	57
8.1. Ek 1: Bilgilendirilmiş Hasta Onam Formu	57
8.2. Ek 2: Etik Kurul Kararı.....	58
8.3. Ek 3: Test Çalışma İzin Belgesi	59

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Kemik iliği naklinin uygulanabildiği hastalıklar.....	4
Tablo 2: Nakil yapılan hastalara ait genel bilgiler (Kİ: Kemik İliği, PKH: Periferik Kök Hücre)	34
Tablo 3: TNF alfa, interlökin 6, serum prohepsidin ve idrar prohepsidinin nakil öncesi değerleri	35
Tablo 4 : TNF alfa, interlökin 6, serum prohepsidin ve idrar prohepsidinin nakil sonrası üç aşamadaki değerleri.....	35
Tablo 5: Nakil öncesi ve sonrası, 4 aşamada ölçülen önemli bazı biyokimyasal ve hematolojik değerler	36
Tablo 6: Nakil öncesi ve sonrası ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi. (NO: nakil öncesi – 10’uncu gün, NS: nakil sonrası + 3’üncü gün, ES: engrafman sonrası + 15 ile 20’nci gün , T: taburcu olurken + 30’uncu gün ve sonrası).....	37
Tablo 7: Nakil öncesi, nakil sonrası, engrafman sonrası ve taburcu zamanı, serum prohepsidin (a),	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: TNF-alfa standart eğrisi.....	29
Şekil 2 : IL-6 standart eğrisi	31
Şekil 3: Hepsidin standart eğrisi	32
Şekil 4 : TNF-alfa ve IL-6 için kullanılan ELISA yönteminin aşamaları.	32
Şekil 5: Prohepsidin için kullanılan ELISA yönteminin aşamaları.	33
Şekil 6: Nakil öncesi ve sonrası ölçümleri arasında istatistiksel fark bulunan serum prohepsidin (a), WBC (b), hemoglobin (c), hematokrit (d) ve trombosit (e) değerlerine ait ortalama ve standart sapmaları.	37
Şekil 7: Nakil öncesi ve sonrası aşamalarda, TNF-alfa (a), IL6 (b) ve CRP (c) değerlerindeki değişim.....	38
Şekil 8: Nakil öncesi (a), engrafman sonrası (b) ve taburcu olma döneminde (c) serum prohepsidin ve CRP düzeyleri arasında gözlenen korelasyon.	39
Şekil 9: Nakil öncesi ve sonrası aşamalarda bazı ölçümler arasında gözlenen korelasyonlar (devam)	40
Şekil 10: Nakil sonrası sağ kalım gösteren (a) ve göstermeyen (b) hastalarda nakil öncesi (1), nakil sonrası (2), engrafman zamanı (3) ve taburculuk zamanındaki (4) serum prohepsidin düzeylerinin karşılaştırılması.	42
Şekil 11: Allojenik (a) ve otolog (b) nakil yapılan hastalarda nakil öncesi (1), nakil sonrası (2), engrafman zamanı (3) ve taburculuk zamanındaki (4) serum prohepsidin düzeylerinin karşılaştırılması.....	42
Şekil 12: Tüm hastalarda serum prohepsidin ve Hct değerleri.	43

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Aplastik Anemi
AKİT	: Allojenik Kemik iliği Transplantasyonu
ALD	: Adenolökodistrofi
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Miyeloblastik Lösemi
FA	: Fankoni Anemisi
G-CSF	: Granülosit Makrofaj- Koloni Uyarıcı Faktör
GVHH	: Graft Versus Host Hastalığı
HKHT	: Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
HL	: Hodgkin Lenfoma
HLA	: İnsan lökosit Antijenleri
HLH	: Hemofagositik Lenfositosis
HSV	: Herpes Simpleks Virüs
IL	: İnterlökin
KİT	: Kemik İliği Transplantasyonu
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
SCID	: Ağır Kombine İmmün Yetmezlik
STAT	: Sinyal Transduktörleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
VOD	: Veno-oklüziv Hastalık

ÖZET

Kemik iliği transplantasyonu malign, malign olmayan birçok hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. İşlevi bozulan kemik iliği, dolaşan kandaki eritrositler, lökositler ve trombositlerde azalmalara neden olur. Tedavi amaçlı yapılan kemik iliği nakillerinde verilen kök hücrelerin yerleşip çalışmaya başlamasına kadar geçen zaman içinde trombosit azlığı dolayısıyla kanamalar, lökosit azlığı dolayısıyla enfeksiyonlar oluşabilir. Hastaların savunma sistemi baskılandığı için ciddi enfeksiyonlar meydana gelebilir. Kemik iliği naklinde hedef engrafman elde etmek ve GVHH (Graft Versus Host Hastalığı) gelişiminden kaçınmaktır. TNF-alfa (Tümör Nekroz Faktör-alfa), sistemik enflamasyonu tetikleyen önemli bir sitokindir. TNF-alfa'nın direkt olarak IL-6 yapımını arttırdığı ve IL-6'nın da hepatositlerden hepsidin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda kemik iliği nakli yapılan hastalarda ortaya çıkan enfeksiyonlarda, IL-6 ve TNF-alfa'nın yanı sıra hepsidinin de etkili bir rol oynadığını düşünmekteyiz. Bu amaçla çalışmamızda nakil yapılan hastalarda nakil öncesi bir, nakil sonrası üç aşamada serum prohepsidin, TNF-alfa ve IL-6 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Aynı dönemlerde idrar prohepsidin düzeyi ve hastaların bu dönemdeki rutin testleri de değerlendirildi. Çalışmamız sonucunda, nakil sonrası serum prohepsidin düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı ve bu artışın CRP düzeyi ile ilişkili olduğu bulundu. Bu ilişki, bize serum prohepsidin düzeyinin nakil hastaları için önemli bir parametre olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların, ileride daha geniş, homojen bir hasta grubu ve daha spesifik ölçümlerin kullanılacağı başka çalışmalarla da doğrulanması, hepsidinin klinik önemini destekleyecektir.

Anahtar Sözcükler: Kök hücre nakli, hepsidin, inflamasyon

SUMMARY

Definition of Relationship between Infection and, Pre- and Post-Transplantation Levels of Serum Hecpidin, IL-6 and TNF-Alpha Levels of Pediatric Patients Subject to Bone Marrow Transplantation

Bone marrow transplantation is used in management of many malignant and benign disorders. Infiltration and malfunction of bone marrow causes anemia, leukopenia and thrombocytopenia. In bone marrow transplantation, within the duration in which transplanted stem cells are engrafted into bone marrow and begin to renew hematopoiesis, bleeding and infections may appear due to thrombocytopenia and leukopenia, respectively. Since immune system of patient is suppressed before transplantation, severe infections might occur in this period. The aim of bone marrow transplantation is to ensure engraftment and to avoid GvHD (Graft versus Host Disease). TNF-alpha is an important cytokine which triggers systemic inflammation. TNF-alpha was shown to stimulate IL-6 production and IL-6 to increase hepcidin expression in hepatocytes. We propose that, in addition to IL-6 and TNF-alpha, hepcidin has an important role in infections during bone marrow transplantation. We measured serum levels of prohepcidin, TNF-alpha and IL-6 once before transplantation and three times post-transplantation. We also followed urine prohepcidin levels and standard biochemical parameters. As a preliminary study, results of our study have demonstrated that serum prohepcidin level was significantly increased through post-transplantation period, and this increase was related to CRP level. This relationship suggests that serum prohepcidin level might be an important parameter for transplantation patients. Verification of these results by new studies with more homogenous patient groups and more specific measurements will support the clinical importance of hepcidin.

Key words: Stem cell transplantation, hepcidin, inflammation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tedavi amaçlı yapılan kemik iliği nakillerinde verilen kök hücrelerin yerleşip çalışmaya başlamasına kadar geçen zaman içinde trombosit azlığı nedeniyle kanamalar, lökosit azlığı nedeniyle enfeksiyonlar oluşabilir. Nakil yapılan kişilerin savunma sistemi daha önce baskılandığı için ciddi enfeksiyonlar ortaya çıkabilir (Dilek İ, Üstün C, Gürman G 1998).

Hepsidin esas olarak karaciğerden sentezlenen, dolaşımda bulunan ve idrarla atılan bir peptid hormon olup sistemik demir dengesinin ana düzenleyicisidir. Son çalışmalarla bakteriyel patojenlere karşı miyeloid hücrelerde de sentezlendiği gösterilmiştir (Uysal 2007).Yapılan araştırmalarda hepsidin üretiminin artmasına enflamasyonun da neden olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra talasemi hastalarında hepsidinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Ganz 2003). Enflamasyonla ilişkili sitokinlerden TNF-alfa, sistemik enflamasyonu tetiklemekte ve bununla ilgili belirtilerin (örn: Ateş) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. TNF-alfa'nın direkt olarak IL-6 genine etki ederek IL-6 yapımını arttırdığı gösterilmiştir (Patestos, Haegeman, Vandevoorde and Fiers 1993). IL-6'nın da, in vivo ve in vitro olarak yapılan çalışmalarda hepatositlerden hepsidin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Falzacappa et al 2007). Sitokinlerin aşırı sentezinin enfeksiyon hastalıklarıyla ilişkisi kesin olarak gösterilmiştir (Dinarello 1993). Allojenik kemik iliği nakli yapılan hastalarda daha önce bakılmış olan sitokinlerden IL-6 ve TNF-alfa'nın yanı sıra hepsidinin de enfeksiyonla ilişkisinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda nakil yapılan hastalarda nakil öncesi ve nakil sonrası serum hepsidin, TNF alfa ve IL-6 düzeyleri ölçülerek bu parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunların dışında idrar hepsidin düzeyi ve TKS (tam kan sayımı) sonuçları da çalışmamızda değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre ve Kemik İliği Nakli

Kök hücreler sınırsız bölünebilme, her türlü vücut hücresine dönüşebilme ve yeni görevler üstlenebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Hangi tip dokuya ihtiyaç varsa ona dönüşürler (Armitage 1994). Bir kök hücrenin hangi hücre tipine dönüşeceğini, o hücrenin içinde bulunduğu mikroçevreden gelen uyarılarla aktivitesi değişen genler belirlemektedir. Diğer hücreler ölünce veya hasar görünce, kök hücreler ihtiyaç duyulan bu hücre türüne dönüşürler. Kendilerini yenileme gücüne sahip olan kök hücreler bir bakıma diğer hücre türleri için tükenmez bir kaynak görevi üstlenirler (www.tpog.org.tr, Erişim tarihi: 19 Ekim 2009).

Kök hücreler üç kaynaktan elde edilmektedir. Bunlardan bir tanesi insan ve hayvan embriyosudur. Bu hücreler, “embriyonal kök hücre” olarak adlandırılır. Embriyonun büyümesiyle, ileride sperm ve yumurtaya da dönüşecek olan embriyonel kök hücreler, bu potansiyeli nedeniyle, kullanımı tartışmalı bir kök hücre kaynağıdır. Kök hücrelerin diğer bir kaynağıysa erişkinlerde bulunan ve bir kaç hücre tipine dönüşebilen “erişkin kök hücreler”dir. Erişkin kök hücrelere en iyi örnek, her insanın kemik iliğinde bulunan kan kök hücreleridir (Şenel 2002, Ural 2006).

Günümüzde yapılan transplantasyonlarda hematopoetik kök hücre kaynakları olarak genellikle “kemik iliği”, “periferik kan” veya “kordon kanı” kullanılmaktadır. Bu nedenle yapılan işlemin Kemik İliği Transplantasyonu (KİT) olarak adlandırılması yerine Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu (HKHT) olarak adlandırılması daha doğrudur. Ancak, daha alışılmış bir tanımlama olduğu için KİT terimi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bazı çalışmalar, periferik kök hücre nakillerinin bakteriyemi gibi bazı komplikasyon risklerinin daha düşük olması ve engrafman süresinin daha kısa olması gibi avantajları nedeniyle kemik iliğine göre daha uygun olduğunu göstermiştir (Arai S and Klingemann HG 2003). Ancak, çocukluk çağındaki

donörlerden periferik kök hücre toplayabilmek için tamamen sağlıklı olan bir çocuğa dışarıdan hematopoetik büyüme faktörü (G-CSF veya GM-CSF) verilmesinin neoplastik (tümöral doku) oluşumları kolaylaştırdığının anlaşılması nedeniyle, son zamanlarda bu uygulamanın çocuk donörler için çok uygun olmadığı görüşü kabul edilmektedir. Ayrıca aferez için uygun damar yolunun sağlanamaması da sorun yaratabilmektedir. Bu nedenle, genellikle donörleri çocuk olan pediatrik hastalarda periferik kök hücre nakli pek tercih edilmemektedir. (Çocukluk Çağı Hastalıklarında Ulusal Kemik İliği Transplantasyon Endikasyonları. Pediatrik Hematoloji Derneği Pediatrik KİT Alt Komitesi 2001,2002).

Kan kanseri kan hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu gelişmektedir. Bu hastaların bir kısmı ilaçlarla tedavi edilebilmekte ancak bir kısmına da kök hücre nakli (kemik iliği nakli) yapılması gerekmektedir. Bu durumda hastanın kendi kemik iliğindeki kan hücreleri çeşitli ilaçlarla veya radyasyonla yok edildikten sonra sağlıklı bir kişiden alınan kemik iliği hücreleri kanserli hastaya nakledilmektedir. Eğer her iki doku arasında uyum sağlanırsa kısa bir süre içerisinde sağlıklı kişiden nakledilen kan kök hücreleri, hastada normal kan hücreleri üretmeye başlar (Şenel 2002).

Kemik iliği transplantasyonu (KİT) uygulama yöntemleri üç şekilde yapılmaktadır. Hastaya başka bir kişiden elde edilen kök hücrelerin nakledilmesi allojenik KİT (AKİT) olarak bilinir. Hastanın kendi kemik iliğinden elde edilen materyalin, yabancı hücrelerden temizlenerek veya sadece temiz hücrelerin ayrılmasıyla kendisine tekrar verilmesi ise otolog KİT (OKİT) olarak adlandırılır. Tek yumurta ikiz kardeşi olduğunda onun kemik iliği veya kök hücresi kullanılarak yapılan allojenik nakil ise singenetik KİT olarak bilinir (Anak 2003).

Son yıllarda KİT, giderek artan sıklıkta malign (kötü huylu) ve malign olmayan birçok hastalık tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Dilek ve ark.1998). Malign hastalıklar içine lösemiler, lenfomalar, solid tümörler, myelodisplastik sendrom; Malign olmayan hastalık grubuna ise osteopetrosis, ciddi immün yetmezlik, Fanconi anemisi, aplastik anemi ve talasemi girmektedir. Aşağıdaki

tabloda da hangi hastalık için hangi nakillerin yapılabileceği gösterilmiştir (Yılmaz 2004).

Tablo 1: Kemik iliği naklinin uygulanabildiği hastalıklar

Malign Hastalıklar	Allojenik	Otolog
AML (Akut Miyeloblastik Lösemi)	+	+
ALL (Akut Lenfositik Lösemi)	+	+
KML (Kronik Miyeloid Lösemi)	+	+
MDS (Miyelodisplastik Sendrom)	+	-
Non-Hodgkin Lenfoma	+	+
Hodgkin Lenfoma	+	+
Multiple Miyelom	+	+
Solid Tümörler (Nöroblastom, Primitif Nöroektodermal Tümör)	-	+
Malign Olmayan Hastalıklar	Allojenik	Otolog
Aplastik Anemi, Fanconi Anemisi	+	-
Talasemi, Orak Hücreli Anemi	+	-
Osteopetrozis	+	-
Kalıtsal Depo Hastalıkları (ALD v.b.)	+	-
Ciddi Kombine İmmün Yetmezlik	+	-
Wiskott-Aldrich Sendromu	+	-

2.1.1. Aplastik Anemi (AA):

Aplastik anemide kemik iliğinde hematopoetik dokunun yerini yağ dokusu almıştır ve ilik üniform olarak aplaziktir. Aplastik anemide esas kusur, eritrosit, trombosit ve lökositleri içine alan kan hücrelerinin yapım yetersizliğidir. Kemik iliğindeki ana hücrelerin (hematopoetik kök hücre) sayısal yetersizliği sonucu yeterli kan üretilmemesi ile karakterize bir hastalıktır (Gaman A, Gaman G and Bold A 2009). Tam kan sayımında eritrosit, lökosit ve trombositlerin azalmasına pansitopeni denir. Çeşitli nedenlere bağlı olarak kan yapan ana hücreler tahrip olur. Kemik iliğinin yerini yağ dokusu alır ve yeterli kan üretilemez. Erkekler ve kızlar eşit oranda tutulurlar. Yıllık sıklığı milyonda 2-6 arasındadır. AA nedenlerinin %70'i idiyopatik (nedeni belli olmayan)'tır. %30'u sekonder nedenlere bağlıdır. Sekonder nedenler ilaçlar (siklofosamid, busulfan), kimyasal ajanlar (insektisitler, benzen), toksinler, radyasyon, enfeksiyonlar (viral hepatitler, HIV enfeksiyonu, kızamıkçık, influenza, kızamık, kabakulak, CMV, herpes virus, kronik parvovirus, immün hastalıklar, genetik vs.) Aplastik anemide kemik iliğinde kök hücre hasarına bağlı olarak hem eritrositer serinin hem miyelositer serinin hem de megakaryositer serinin yetersizliği söz konusudur. Ağır aplastik anemi hastalarında en etkin tedavi seçeneği allojenik kemik iliği transplantasyonudur. Kemik iliği transplantasyonu ile tedavi şansı %80-100 arasındadır. Aplastik anemide vücudun savunma sistemleri çalışmadığından kansızlığa ek olarak enfeksiyona eğilim riski artar ve trombositler azaldığından kanama eğilimi olur (Yalman 2003).

2.1.2. Fanconi Anemisi (FA)

Kemik iliği yetersizliği bir veya daha fazla hemotopoetik serinin yapımında azalma olarak tanımlanabilir. Çocukluk çağında gelişen kemik iliği yetersizliklerinin %30-35'i kalıtsal nedenlere bağlıdır. Lökositler, eritrositer ve megakaryositer seri tutulumları olabilir. Bunlar içinde en sık görülenleri Fanconi Anemisi, Diamond-Blackfan Anemisi, Diskeratozis Konjenita, Schwachmann-Diamond Sendromu'dur. Fanconi Anemisinde esas problem pluripotent kök hücrelerinde DNA zincir tamir defekti olmasıdır. Tamir mekanizmasındaki bozukluk nedeniyle serbest oksijen radikalleri detoksifiye edilemez ve hücrelere zarar verir. Bu hastalarda spontan kromozom kırıkları oluşabileceği gibi iyonize

radasyona, alkillayicilere, kimyasal ajanlara karşı artmış hassasiyet de söz konusudur. Bu ajanlara maruz kalma sonucu indüklenmiş kromozom kırıkları meydana gelebilir. Hastalarda kısa boy, başparmak ve kol anomalileri, iskelet anomalileri, mikrosefali ve mikroftalmi, deride pigment bozuklukları, böbrek anomalileri, mental gerilik, cinsel organ anomalileri, kalp defektleri, GIS (gastro intestinal sistem) anomalileri görülebilir. Hiçbir anomalisi olmayan Fanconi hastaları da olabilir. Sıklıkla ilk bulgu megakaryositer serinin eksikliğine bağlı olarak gelişen trombositopenidir. Daha sonra nötropeni ve anemi, en belirgin bulgu haline gelir. Bulgular sıklıkla 7 yaş civarı ortaya çıkar. Hastalarda trombositopeniye bağlı kanama, nötropeniye bağlı enfeksiyonlar, anemiye bağlı halsizlik ve taşikardi gelişebilir. Fanconi anemili hastalar destek tedavileri ile ortalama 25 yıl yaşayabilirler. Tek etkin tedavi seçeneği Kemik iliği nakli'dir. Nakilde de HLA doku grubu uygun vericilerin kullanılması başarı şansını artırır. Nakil yapılmayan hastalarda androjen ve steroid tedavi yanında kan ve kan ürünleri ile destek tedavi yapılır (Yalman, Sarıbeyoğlu 2003).

Fanconi anemisi %90'ın üzerinde aplastik anemi, %10 civarında lösemi veya solid tümörler ve multipl konjenital defektler ile birlikte olabilen otozomal resesif bir hastalıktır (Glanz, Fraser 1982). FAA bulgularında %20 kanser gelişmektedir (Alter, Young, Nathan, Oski 1993).

2.1.3. Lösemiler

Kelime anlamı "kanda beyazlaşma" olan lösemi, normal miyeloid ya da lenfoid hematopoezin spesifik bir kademesindeki duraklama ve klonal çoğalma sonucu neoplastik hücrelerin kemik iliği ve diğer dokuları istila etmesi ve periferik kanda birikmesi ile karakterize, etiyolojisi bilinmeyen ve tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanan geniş bir hastalık grubudur (Neimer and Sallan 1993, Poplack and Morgalin 1997, Lankowsky 1999). Lösemik hücrelerin kemik iliği dışındaki dokularda birikmesiyle oluşan kitleler miyeloblastom veya lenfoblastom olarak tanımlanmış olup bu ekstramedüller tutulumun en sık görüldüğü yerler, MSS, cilt, paranasal sinüsler, kemikler, meme dokusu, gonadlar, lenf nodülleridir. Çocukluk çağı lösemileri akut, kronik ve konjenital olarak sınıflandırılabilir. Akut ve kronik

terimleri hastalığın doğal seyrindeki relatif süreyi yansıtır. Bununla beraber burada akut lösemide immatür hematopoetik veya lenfoid öncü hücrelerin hakim olduğu, kronik lösemide ise matür kemik iliği elamanlarının hakim olduğu anlatılmaktadır. Konjenital lösemi ise hayatın ilk 4 haftası içinde ortaya çıkan hastalığı tanımlamaktadır. Akut lösemiler, çoğalan hücrelerin morfolojik, immunolojik ve sitogenetik özelliklerine göre başlıca iki ana sınıfa ayrılırlar

1-Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

2-Akut Nonlenfoblastik veya Myeloid Lösemi (ANLL veya AML)

Nadir olgularda, lösemik hücrelerin mevcut tekniklerle ayrımı yapılmamakta ve bu iki sınıftan birisine sokulamamaktadır. Böyle olgularda “Akut Farklılaşmamış Hücreli Lösemi” (AFHL) veya “Kök hücreli lösemi”den söz edilir(Kutanis 2005).

2.1.3.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Lenfositik progenitörlerin malign hastalığı olup tek bir B ya da T hücre klonundan köken alır. Blastik hücrelerin kemik iliğinde birikimi ve çoğalması kemik iliği baskılanmasına neden olur. Anemi, nötropeni, trombositopeni ve bunlara ilişkin semptomlar ana bulgulardır. Gonadlar, lenf nodları, santral sinir sistemi gibi birçok hücrenin ekstrasmedullar bölgenin tutulumu söz konusu olabilir. Çocukluk çağında sık olmamakla birlikte herhangi bir yaşta görülebilir. Muhtemelen farklı biyolojik davranış özellikleri nedeni ile çocukluk çağında prognoz daha iyidir. Tanıda kemik iliği aspirasyonu ve sitokimya oldukça önemlidir (Özsan 2007).

2.1.3.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Erken hematopoetik hücrelerde bir dizi genetik değişiklikler sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozulup, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal immatür (tam gelişmemiş) miyeloid hücrenin birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır. Blastik hücrelerin bölünme ve proliferasyon özellikleri devam ederken, matür hücrelere farklılaşma kapasitelerinde kayıp söz konusu olmaktadır. AML gelişiminde genetik değişikliklerin (tümör supresör gen

kaybı, onkogen mutasyonu gibi) yanısıra hematopoetik sitokinlerinde spesifik hücre yüzey reseptörleri yoluyla lösemilerde hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde, prognozunda ve patobiyolojisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Baştürk, Evke, Karakuş ve Tunalı 2005).

Akut lösemilerin tedavisinde amaç lösemik blastların oluşumunu durdurmak ve yok etmek aynı zamanda normal kemik iliği hücrelerinin çoğalıp görev yapmasını sağlamaktır.

2.1.4. Lenfomalar

Çocukluk çağı kanserlerinde ülkemizde en sık görülen tümörler sırası ile, lösemiler, lenfomalar, santral sinir sistemi (SSS) tümörleridir. Bu üç grup kanser çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık %60-70'ini oluşturur. TPOG (Türk Pediatrik Onkoloji Grubu) 2002 yılı ulusal çocukluk çağı kanserleri kayıtlarına göre solid tümörler içinde %26,8 oranı ile lenfomalar ilk sırayı almaktadır. Genel olarak lenfomaların %60'ı Hodgkin dışı lenfomalar (HDL)'ı, %40'ı Hodgkin Hastalığı veya Hodgkin lenfoma (HL)'dır (Özkan 2005).

2.1.4.1. Hodgkin Dışı Lenfoma (HDL)

Farklı davranış paterni ve tedaviye cevabı ile lenfoproliferatif hastalıkların heterojen bir grubudur. HL gibi HDL lenfoid dokulardan çıkar ve diğer organlara yayılabilir. Bununla birlikte HDL, Hodgkin hastalığına göre daha çok ektranodal yayılım eğilimi gösterir. Prognoz histolojik tipe, evreye ve tedaviye bağlıdır. (Zhong 2006).

HDL'nın tedavisi ilaçlarla (kemoterapi), ışın tedavisiyle (radyoterapi) veya ikisi birlikte yapılmaktadır. Ayrıca hastadan kök hücre toplanarak yüksek doz kemoterapi sonrası bu kök hücreleri tekrar hastaya verme işlemi (insentif kombinasyon kemoterapi ve otolog kök hücre nakli),yapılan araştırmalara göre, allojenik kök hücre nakli daha önceden tedavisiz olarak bilinen nüks mantle hücreli

lenfoma ve çeşitli küçük hücreli lenfomalar da dahil olmak üzere pekçok lenfomada şifa sağlayan bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir (Foster 2006).

2.1.4.2. Hodgkin lenfoma (HL)

Retiküloendotelyal sistem ve lenfatik sistemin malign hastalığıdır. Birbirini izleyen lenf nodaları aracılığı ile yayılır. Ekstralenfatik organ yayılımı nadirdir. HL hastalığında birçok sitokin salınımı sözkonusudur ve bunların hastalık semptom tablosunun oluşmasında da etkileri vardır. IL-1; lenfoproliferasiyona (lenfosit sayılarının hızlı artması), ateş, gece terlemesine, IL-2; immün yetmezliğe, IL-5; eozinofilik infiltrasyona (eozinofil birikimi), TNF-alfa; kilo kaybına, TNF-beta; fibroze (hücreler arası bağ dokusunun artması) etki ederler (Özkan 2005).

2.1.5. Hemofagositik Lenfhistiositoz (HLH)

Hemofagositik sendrom (hemofagositik lenfhistiositoz, HLH) histiositoz grubu hastalıklar içinde makrofajlarla ilişkili olan grupta yer alır. HLH tek bir hastalığı değil, farklı durumların aynı tipte inflamatuvar yanıt fenotipini oluşturduğu bir klinik sendromu temsil eder. Sitotoksik T-lenfositler ve doğal katil (natural killer, NK) hücrelerin fonksiyonlarında bozulma, makrofaj ve T-lenfositlerin aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi ve hemofagositoz sonucu ateş, hepatosplenomegali ve sitopeninin ön planda olduğu klinik tablo ile karakterizedir. HLH primer ve sekonder olmak üzere iki farklı gruba ayrılır (Ören 2007, Filipowich 2009).

HLH hastalarında deksametazon, cyclosporin A ve etoposidden oluşan HLH protokolü kullanılarak remisyon (hastalık belirtilerinin sönmesi) sağlanabilir. Tam kür ancak kök hücre transplantasyonu ile mümkündür. Kök hücre transplantasyonu yapılmayan olgular hastalık belirtilerinin tekrar ortaya çıkması (relaps) ile kaybedilir. Balangıç bulguları hafif olan ailevi HLH'li olgular steroid ve immunglobulin ile remisyona girebilir. HLH'da kök hücre transplantasyonu ilk kez 1986 yılında uygulanmış ve başarılı olmuştur. HLA uygun kardeşten yapılan transplantasyon sonuçları daha iyidir. Haploidentik veya aile dışı donörden yapılan

transplantasyon başarısı daha azdır. Kordon kanı transplantasyonu ile kür sağlanmış olgular vardır. Transplantasyon sonrası yaşam %50 dolayındadır. %32 olguda evre II-IV akut GvHD (Graf versus Host Hastalığı), %9 olguda kronik GvHD geliştiği, transplantasyona bağlı ölüm oranının yüksek olduğu, pulmoner ve hepatik komplikasyonlarla olguların kaybedildiği, hazırlık rejiminde daha düşük doz sitotoksik ilaç kullanımı ile sağ kalımın arttığı bildirilmektedir (Ören 2007).

2.2. Kök Hücre Uygulama Süreci

Kök hücre uygulama süreci (transplantasyon) toplam beş aşamadan oluşur.

- 1- Değerlendirme-katater yerleştirme
- 2- Mobilizasyon ve kök hücre toplanması (Allojenik kemik iliği toplandığında hastaya dondurmadan direkt verilebilir.)
- 3- Yüksek doz kemoterapi tedavisi (kondisyon tedavisi)
- 4- Kök hücrelerin verilmesi (transplant)
- 5- Engraftman ve iyileşme

Hasta genellikle iki veya üç gün tıbbi yönden değerlendirilmektedir. Tıbbi değerlendirmenin amacı nakil öncesi klinik ve laboratuvar verileri sağlamaktır. Nakil öncesi günler “ - ”den başlar (-8. gün vb), nakil yapılan gün sıfırıncı gün ve sonraki günler “ + ” (+3. gün vb.) olarak sayılır. Bu süreçte özellikle enfeksiyonun önlenmesi konusuna yönelik aileye eğitim verilmektedir. Kök hücreler periferik olarak bir donör veya hastadan aferez denilen işlemle toplanmaktadır. Hastanın kanı hücre ayıran araç yardımıyla alınmakta ve kök hücreler ayrılmaktadır. Yeterli kök hücre toplanması için mobilizasyon rejimine bağlı olarak genellikle iki veya daha çok aferez işlemi gerekebilmektedir. Aferez (kan içindeki bileşenlerin ayrılması) işlemine başlamadan önce mobilizasyon ilaçlarının verilmesi gerekmektedir. Mobilizasyonun amacı daha çok kök hücre üretmek ve periferik kana daha çok kök hücre katılımını sağlamak için kemik iliğini uyarma işlemidir. Bu amaçla koloni stimulan faktör (CSF) (Neupogen, lequine vb.) kullanılmaktadır. Kemoterapiden 24 saat sonra CSF uygulanmaktadır. Kan sayımları en alt seviyeye düşerek, iyileşme ve aferez başlayacaktır. CSF tek başına kullanılırsa 6-7 gün verilebilmektedir. 5.gün veya beyaz kan sayımları normal değerlerde olduğunda

afereze başlanmaktadır. Bir aferez işleminde kök hücreler sayılmakta ve dondurulmaktadır. Kök hücrelerin yaşam ömrü 6-7 gündür. Bu dondurma işlemi infüzyon zamanına kadar hücrelerin zarar görmesini önlemek için yapılmaktadır. Yoğun ve yüksek doz kemoterapi hastayı nakile hazırlamaktadır. Bu rejimin amacı rezidüel (kalan) malign hücreler kadar kendi kemik iliğini de tamamıyla yok etmektir. Son doz kemoterapiden 24-48 saat sonra, hastaya kök hücrelerin yeniden verilmesi en uygun dönem olup bu güne “reinfüzyon günü ” denmektedir. Engrafman için tam kan sayımları takip edilmekte ve engrafmanın gerçekleşmesi, nakledilen kök hücrelerin hasta tarafından kabul edildiğini göstermektedir. Enfeksiyon olmadığı, absolute (mutlak, saf) nötrofillerin 1000’in üzerinde olduğu zaman engrafmanın gerçekleştiği kabul edilebilmektedir. Birçok otolog transplant alıcısı, kök hücrelerin verilmesinden 20-30 gün sonra evlerine gidebilmektedirler. Allojenik transplant alıcıları daha uzun süre hastanede kalmaktadırlar. Birçok hasta, nakil sonrasının 4. günü ile 10. günü arasında (akut dönem) bulantı-kusma, diyare ve mukozit gibi yaşamı tehdit edici boyutta ciddi yan etkiler yaşayabilmektedir. Bu nedenle, tedavi düzenine +1. günden başlayarak profilaktik antibiyotikler, antidiyareikler, antifungal ve antiviral ajanlar, antiemetikler ve CSF uygulaması eklenebilmektedir (Yılmaz 2004).

Kemik iliği, başlangıçta sternum, kostalar ve iliak kemik gibi kemiklerde uygulanmış olsa da, günümüzde iliak kemikten ilik toplama daha yaygın hale gelmiştir. Steril koşullarda, genel anezstezi altında gerçekleştirilen kemik iliği toplama işleminde kemik iliği, bu amaç için özel olarak üretilmiş metal iğnelerle iliak kemikten aspirasyon yolu ile alınır. Donörün kilosuna göre (yaklaşık kg başına 200 ml kemik iliği) hesaplanan miktarda toplanan ilik, allojenik nakillerde genellikle doğrudan infüzyon yolu ile hastaya verilirken, otolog nakil durumunda dondurularak saklama aşamasına geçilir.

Kemik iliği transplantasyonu öncesi, donörün (vericinin) rapel aşısı ile aşılınması, alıcılarda spesifik antikor (Ab) seviyelerini yükseltmekte veya spesifik antikor geliştirme oranlarını arttırmaktadır. Allojenik KİT alıcılarına donör immunitésinin transferi gösterilmektedir. Sağlıklı veya GvHH (Graft Versus Host

Hastalığı) gelişimi gözlenen KİT alıcıları, transplantasyon sonrası bir yıla kadar spesifik antikor geliştirememektedir. KİT alıcılarını enfeksiyona karşı korumak ve spesifik antikor titrelerini arttırmak için uygun aşılarda immunize edilmeleri önerilmektedir (Yılmaz 2004). Hematopoetik kök hücre transplatasyon alıcıları, miyeloablatif (yüksek doz) tedavi sonucu birkaç hafta pansitopenik (kandaki lökosit, eritrosit ve trombositlerde azama) kalmakta ve altta yatan hastalık, kemo-radyoterapi, graft rejeksiyonunu (verilen ürün reddi) önlemek ve GvHH profilaksisi için immünosupresif (bağışıklık sistemini baskılayıcı) tedavinin aylarca sürmesi gibi nedenlerle uzun dönem immünosüprese kalmaktadırlar. Bu özellikler nedeniyle allojenik ve otolog kök hücre transplant hastaları yüksek enfeksiyon riski taşımaktadır (Dilek ve ark. 1998).

Hematolojik malignitelerin çoğunda allojenik nakil için standart endikasyonlara bakıldığında remisyonda olma şartı vardır. Remisyon, hastalık belirti ve bulgularının ortadan kalkması, hastanın düzelme göstermesi halidir. Kalıcı veya geçici olabilir. Allojenik nakil için doku grubu uyumu gereklidir. Anne ve babadan gelen HLA (İnsan lökosit antijenleri) A, B ve DR antijenlerinin alıcı ve verici arasında bire bir uygunluk (6/6) göstermesi full-match, tek bir antijen uygunsuzluğu (5/6) tek mis-match olarak ifade edilmektedir. HLA uyumsuzluğu arttıkça graft versus host hastalığı (GVHH) gelişimi, graft yetmezliği ve transplanta bağlı ölüm olasılığı artmaktadır. Hazırlama rejimiyle, hastalıklı kemik iliği ve tümör dokusunun yok edilmesi amaçlanırken, alıcının immün sisteminin baskılanmasıyla da vericiden alınan kök hücrelerin reddi engellenmektedir. En sık kullanılan hazırlama protokolleri siklofosfamid, busulfan, tüm vücut ışınlaması (TVI), sitozin, arabinozid, etoposid ve nitrozürelerin değişik kombinasyonlarından oluşmaktadır. Hastaya infüze edilen kök hücrelerin kemoterapiden etkilenmemesi için, kemoterapinin son dozu ile nakil arasında en azından 36 saatlik süre bırakılmaktadır. Kemik iliği kaynaklı kök hücreler, genel anestezi altında genellikle pelvis kemiğinden, aspirasyon ile elde edilmektedir. Transplant sonrası erken dönemde bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlar sıktır. Transplant ilişkili ölümlerin çoğu ilk 100 günlük dönemde gerçekleşmektedir. Başlangıçta komplikasyonlar hazırlama rejimiyle ilgiliyken, engrafman sonrası dönemde transplant ile ilişkili diğer komplikasyonlar gözlenmeye başlar. Nakil sırasında

kondüsyon rejimi ve ek tedaviler yaşamsal bazı organlara zarar verebilmektedirler. Nakil için kondüsyon rejimi öncesi ve sırasında kemoterapi alan hastalarda görülen, genellikle naklin ilk üç haftasında meydana gelen Veno-oklüziv hastalık (VOD), bir karaciğer hastalığıdır. Ani kilo alma, asit, sarılık ve sağ üst kadranda ağrı gibi klinik bulguları vardır. Otolog nakil hastalarında VOD oranı düşük olup allojeniklerde daha çok görülmektedir. Karaciğer üzerindeki baskıyı azaltmaktan başka tedavisi yoktur. İlk on günden başlayarak aGVHH (akut graft versus host hastalığı) gelişebilmektedir. Yani hastaya verilen sağlıklı hücrelerin bir kısmı, bu yeni ortamı yabancı olarak algılar ve savunmasız olan yeni vücuda zarar vermeye başlar, bir anlamda alıcıyı reddeder. Bu durum da barsaklar, karaciğer, cilt ve akciğerleri öncelikle hedef almaktadır. Alıcının aktive olmuş hücreleri hazırlama rejimine reaktif olarak IL-1 (İnterlekün-1), TNF-alfa ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinleri salgılamaktadırlar. İnflamatuvar sitokinlerin varlığı ve cilt veya mukozadaki lipopolisakkarit artışı ikincil immün uyarıyı artırır. Hücre ölümüne katkıda bulunan sitokin salınımı aktive lenfositlerden kaynaklanmaktadır. Bu hücreler daha sonra alıcının çeşitli hücrelerine “Fas ve perforin” vasıtasıyla saldırmaktadırlar. “Fas ve perforin” ise, alıcının hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne yol açmaktadır. Th1 hücreleri diğer taraftan makrofajları uyarak TNF, IL-1 gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ve nitrik oksitin yapımını arttırmaktadır. Bu durum da dokulardaki hasarı artırır. Hasta taburcu olduktan aylar sonra veya nakli izleyen haftalarda cGVHH (kronik graft versus host hastalığı) ortaya çıkabilmektedir. Bu da, kişinin bağışıklık sisteminin daha da zayıflaması, büsbütün savunmasız kalması demektir. Yani kolayca enfeksiyon kapabilir. Basit bir uçuk veya boğaz enfeksiyonundan ölebilmektedir. Cilt esmerleşmektedir. Gözde görme kaybına giden iltihabi olaylar gelişebilmektedir. Nakli takiben gelişen majör organ yetmezlikleri olan VOD ve GvHD yanında birde renal yetmezlik vardır. Allojenik nakil yapılan hastalarda sık gelişmektedir. Renal yetmezliğin önlenmesi için serum kreatin düzeyini izlemek ve çocuğun aldığı ve çıkardığı sıvı izlenimini yapmak son derece önemlidir. Renal kan akımı açısından günlük sıvı yönetimi önemlidir (Yalman 2003, Yılmaz 2004).

Kök hücre nakli için uygun donörü olan hastalar transplantasyona hazırlanmaktadır. Bu çerçevede hastaların ve donörlerin organ fonksiyonları, virüs

vb (ör: CMV, HIV, toksoplazma vb) enfeksiyonlar için serolojik durumları, hastanın enfeksiyon odakları (ör: dişler, paranasal sinüsler, akciğerler vb) açısından değerlendirilmektedir, donörün işleme uygun olup olmadığı incelenmektedir. Donör ile hasta arasında kan grubu uyumsuzluğu nakile engel olmaz ancak durumuna uygun çözümsel prosedürler planlanmaktadır. Nakilden önce hastalara hazırlık rejimi adı altında yüksek doz kemoterapi (bazen ek olarak radyoterapi) uygulanmaktadır. Bu uygulamanın bir amacı, malign hastalıklarda hastanın habis klonunu, malign olmayan hastalıklarda ise hematopoietik dokuyu ortadan kaldırmaktır. Bir diğer amaç ise alıcı (hasta) immün sistemini baskılayıp donör kök hücrelerinin reddedilmesini önlemektir (Soysal 2005).

Kemik İliği Transplantasyonu; hasta iyileşmesi için çok önemli bir gelişme olmakla birlikte, gerek transplantasyon öncesi, gerekse transplantasyon sonrası var olan ciddi ve kombine yetmezlik nedeni ile enfeksiyonlar önemli morbidite ve mortalite nedeni olarak karşımıza çıkabilmektedir. Gerek “periferik kök hücre” gerekse “kemik iliği” nakli uygulanan hastalarda, nakil sonrası karşılaşılan enfeksiyonlar, hakim olan immün yetmezlikle ilişkili olmak üzere başlıca 3 evrede incelenebilir. Bunlardan I. dönem; Engrafman öncesi dönem veya nakil sonrası erken dönem olarak da tanımlanmaktadır. Transplantasyonla başlar ve 30 gün civarında, engrafmana kadar sürmektedir. Bu dönemde enfeksiyon riski ile yakın ilişkisi olan 2 ana defekt söz konusudur. Bunlar, “Nötropeni” ve “Anatomik bariyer hasarı”dır. Kataterler de enfeksiyon kaynağı olarak önem taşımaktadır. Bu dönemdeki bir KİT alıcısı, hematolojik maligniteli bir nötropenik hasta gibi düşünülmelidir. Febril nötropenik epizodların (yüksek ateşin eşlik ettiği nötropenik ataklar) yaklaşık %60’ı enfeksiyonla ilişkilidir ve sıklıkla bakteriyel etkenlerle karşılaşılmaktadır. Ayrıca bu dönemde, HSV reaktivasyonu ve ikincil enfeksiyonlarla ilişkili mantarlar sorun olabilmektedir. Bu dönemde enfeksiyon riski transplantasyon tipinden bağımsızdır ancak otolog alıcılarda engrafman daha erken gerçekleşmektedir. II. dönem, Engrafman sonrası erken dönem (30-100. günler) olarak da tanımlanmaktadır. Bu dönemde enfeksiyon riski ile yakın ilişkisi olan en önemli sorun “Hücrel immün yetmezlik” ve “Anatomik bariyer hasarı”dır. Sıklıkla viral ve protozoer etkenlerle karşılaşılmaktadır. Bu etkenler arasında CMV çok önemlidir. KİT alıcılarının %50’sinde CMV enfeksiyonu gelişmektedir.

İnfeksiyonun hastalığa dönüşmesi ile en sık gelişen tablo ise “intersisyonel pnömonit” tablosudur. Ayrıca bu dönem “Aspergillus” infeksiyonları için 2. pik dönemdir. Gene hepatosplenik kandidiazis ve *P. carinii* infeksiyonları sorun olabilmektedir. Alojenik KİT alıcılarında bu dönemde infeksiyon gelişme insidansı daha yüksektir. Ayrıca GVHH (graft-versus host hastalığı) olup olmadığı ve şiddeti de infeksiyon riski ile yakın ilişkilidir. III. dönem, engraftman sonrası geç dönem (>100. gün) olarak da tanımlanmaktadır. Bu dönem pek çok infeksiyon sıklığının azaldığı dönemdir. Ancak kronik GVHH gelişenlerde immun sistemdeki iyileşme gecikmektedir. Bu nedenle hücresel ve humoral immun yetmezlik ve anatomik bariyerlerdeki bozukluk ve fonksiyonel aspleni ile ilişkili infeksiyonlar, etkin antiviral profilaksi nedeni ile bu dönemde geç CMV infeksiyonları görülebilmektedir (Engels, Ellis and Supran 1999, Leather and Wingard 2001).

2.3. Sitokinler

Sitokinler vücudun tüm hücreleri arasındaki iletişimi sağlamada majör rol oynayan küçük proteinlerdir. Bunlar üretimlerinden hemen sonra salınır ve daha sonra aynı hücrede, komşu hücrede ve aktif transport sonrası lenfatik sistem veya kan dolaşımı yolu ile uzak mesafelerde spesifik membran reseptör bağlantıları ile etkileri ortaya çıkmaktadır. Sitokinler farklı gruplara bölünmüştür. Bunlar interlökinler, interferonlar, koloni stimüle eden faktörler, kemokinler ve büyüme faktörleridir (Gündüz ve Er 2000).

Sitokin salınımı kısa, kendini sınırlayan bir olgudur. Genel olarak sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve yeni gen transkripsiyonu ile başlatılmaktadır. Bu nedenle sitokin salınımı geçici ve hızlı gerçekleşmektedir. Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatmaktadırlar. Söz konusu hücre, sitokini salgılayan hücrenin kendisi (otokrin etki), komşu hücre (parakrin etki) veya diğer gerçek hormonlarda olduğu gibi dolaşıma salınan sitokinler tarafından uyarılan uzaktaki bir hücre olabilmektedir (Güneri, Özmen, Bayındır 1997).

2.3.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Sitokinler çok geniş bir protein grubu olmakla birlikte bu moleküllerin ortak birçok özellikleri vardır (Güneri, Özmen, Bayındır 1997).

1- Sitokinler doğal ve spesifik immünitinin efektör fazında üretilmektedirler. Bağışıklığı, inflamatuvar yanıtların oluşmasını ve düzenlenmesini sağlamaktadırlar.

2- Salınımı hızlı ve geçicidir.

3- Çeşitli hücreler tarafından üretilmektedirler.

4- Birçok hücre tipine etki etmektedirler.

5- Aynı hedef hücrede farklı birçok etkileri vardır. Bazı etkiler aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla oluşabilmektedir.

6- Etkinliği genellikle gereğinden fazladır.

7- Bir sitokin diğer sitokinlerin sentezini etkilemektedir.

8- Genellikle diğer sitokinlerin fonksiyonunu etkilemektedirler. İki sitokin birbirini antagonize edebilmekte, additif etki gösterebilmekte veya bazı durumlarda sinerjistik etki gösterebilmektedirler.

9- Diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatmaktadırlar.

10- Sitokinlere verilen hücresel yanıtların çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir.

11- Sitokinler hücre bölünmesini düzenler ve böylece büyüme faktörü gibi etki etmektedirler.

12- Birçok sitokin reseptörü özel sinyaller tarafından oluşturulmaktadırlar.

Tüm sitokinler arasında inflamasyonun fizyopatolojisinde başlıca önemli rol oynayanlar arasında TNF-alfa. IL-6 (interlökin-6), IL-1, IL-2, IL-8 gelmektedir (Güneri, Özmen, Bayındır 1997).

2.3.2. Tümör Nekrozitan Faktör (TNF)

TNF mononükleer fagositlerden kaynağını almaktadır. T hücreleri aktive “naturel killer” (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri bu proteini

salgılamaktadırlar. İki çeşit TNF vardır. Bunlar genelde aktif makrofajlardan salınan TNF-alfa (orijinal olarak kasektin de denir) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF-beta (lenfotoksin)'dır (Güneri, Özmen, Bayındır 1997, Gündüz ve Er 2000). TNF düşük yoğunluklarda lökosit ve endotel hücreleri için lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Sağlıklı bireylerde plazma TNF düzeyleri 0-35 pg/ml arasında değişmektedir. TNF'nin başlıca biyolojik etkileri şunlardır (Gündüz ve Er 2000):

1- Lökositlere karşı endotel hücre yüzeyini adezyon molekülleri aracılığı ile daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzey reseptörlerinin dışı salmalarına neden olmaktadır.

2- Enflamatuvar lökositleri özellikle nütrofilleri mikroorganizmaları öldürecek şekilde aktive etmektedir.

3- IL-1, IL-6, kemokinleri ve TNF'nin kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarmaktadır. IL-6 ile sinerjik etki göstermektedir.

4- Viruslara karşı interferon benzeri koruyucu etki göstermektedir.

5- Endojen pirojen olarak etki ederek ateşi yükseltmektedir. Bu etkiyi IL-1 ile birlikte yapmaktadır.

6- Mononükleer fagositler ve vasküler endotel hücrelerine etki ederek IL-1 ve IL-6'nın salınımını uyarmaktadır.

7- Hepatositlere etki ederek akut faz proteinlerinin (eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), C reaktif protein (CRP) gibi sentezini uyarmaktadır.

8- Damar endotelinin prokoagulan ve antikoagulan aktiviteleri arasındaki dengeyi değiştirerek pıhtılaşma sistemini aktive etmektedir.

9- Kemik iliğini baskılayarak ana hücre bölünmesini engellemektedir.

10- Deney hayvanlarına uzun süre verildiğinde kaşektik metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Kaşeksi, TNF ile uyarılan iştah azalması sonucu oluşmaktadır.

11- Damar düz kasını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltmaktadır. Bu etkiyi prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi damar genişleticileri uyarak indirekt yoldan yapmaktadır.

12- İnvasküler koagulyona neden olarak doku perfüzyonunu azaltmaktadır.

13- Miyokard kasılabilirliğini azaltarak doku perfüzyonunu azaltmaktadır (Gündüz ve Er 2000).

2.3.3. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilen, yaklaşık 26 kD ağırlığında bir proteindir. IL-6'nın en iyi tanımlanan etkileri hepatositler ve B lenfositleri üzerinedir. IL-6, B lenfositlerinin immunoglobulin salınımı için bir kofaktör olarak rol oynamaktadır. Yani B lenfositlerinin ayrışma sıralamasının geç dönemlerinde, B lenfositleri için büyüme faktörü olarak rol oynamaktadır. IL-6'nın monositler tarafından sentezi, IL-10 tarafından baskılanmaktadır (Gündüz ve Er 2000).

2.4. Hepsidin

Hepsidin ilk olarak insan idrarında ve serumda keşfedilmiş, karaciğerden sentezlenen, dolaşımda bulunan idrarla atılan bir peptid hormondur. Bağırsaklardaki demir emiliminin, makrofajlardaki demir döngüsünün ve hepatik depolardan demir salınımının homeostatik düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır (Başol, Barutçuoğlu, Bozdemir 2007).

2001 yılında Park ve arkadaşları (Park, Valore, Waring, Ganz 2001) çeşitli insan vücut sıvılarının antimikrobiyal özelliklerini incelerken, idrarda karaciğer kaynaklı (hep-) ve invitro antibakteriyal özelliklere (-cidin) sahip yeni bir peptid bulmuş ve onu hepsidin (hepatik bacteriocidal protein) olarak adlandırılmıştır. Eş zamanlı fakat bağımsız olarak 2000'de Krause ve arkadaşları (Krause, Neitz, Magert 2000) aynı peptidi plazma ultrafiltratından izole etmiştir. LEAP-1 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptid) olarak keşfedilen hepsidinin sistemik demir homeostazındaki rolü, diyetle demir yüklenen farelerin karaciğerinde hepsidin

mRNA'sının aşırı eksprese olduğunun gözlenmesi ile fark edilmiştir (Pregon, Ilyin ve Courselaud 2001).

19q13.1 kromozomal bölgede yer alan insan hepsidin geni (HAMP; OMIM 606464), 84 amino asitlik öncül bir protein olan pre-prohepsidini kodlamaktadır. Pre-prohepsidin, enzimatik ayrılma sonrası 64 amino asitlik pro-hepsidin peptidi olarak endoplazmik retikulum lümenine aktarılmaktadır. 39 amino asitlik öncü peptidin posttranslasyonel olarak ayrılması sonucu, 25 amino asitlik matür (olgun) biyoaktif hepsidin-25 oluşmaktadır. Karaciğerde sentezlenen, plazmada bulunan ve idrarla atılan hepsidinin 25 amino asitlik formun yanı sıra idrarda, muhtemelen 25 amino asitlik formun yıkım ürünleri olan 20 ve 22 amino asitlik formları da bulunmaktadır (Ganz ve Nemeth 2006, Kemna, Tjalsma, Willems, Swinkels 2008).

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda biyoaktif hepsidinin, 4 disülfid bağı ile stabilize olan beta-tabaka fırcete yapısına sahip olduğu ve bu ağlardan birinin alışılmışın dışında, dönüşte yer alan, komşu bir disülfid bağı olduğu gösterilmiştir (Hunter, Fulton, Ganz, Vogel 2002).

2.4.1. Hepsidinin biyolojik işlevleri

Hepsidinin vücutta antimikrobial ve demir düzenleyici olmak üzere en az iki işlevi vardır (Başol ve ark. 2007).

İnsan hepsidini invitro olarak, 10-30 mM gibi çok yüksek konsantrasyonlarda antibakterial ve antifungal özellikler göstermektedir. İdrar hepsidin konsantrasyonu 3-30 nM (10-100 ng/ml) aralığındadır ve enfeksiyonlar sırasında 10 kata kadar artabilmektedir. Bu yüzden hepsidinin idrarda antimikrobiyal etki göstermesi olası değildir (Ganz 2005).

Diyetsel demir ile hepsidin sentezinin arttığı gözlenmesi ile hepsidinin demir metabolizmasında yer aldığı düşünülmüş ve transgenik fare modellerinde hepsidin eksikliği ve fazlalığının etkileri incelenerek hepsidinin, barsakta demir

emiliminin, plasentadan demir taşınmasının ve makrofajlardan demir salınımının negatif düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Ganz 2005).

Hepsidin, vücut savunması, inflamasyon ve demir metabolizması arasında önemli bir bağ oluşturmaktadır. Enfeksiyon ve enflamasyonla hepsidin sentezinin belirgin olarak arttığı ve IL-6'nın bu artıştan sorumlu uyarıcı olduğu çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir. IL-6 infüzyonu yapılan gönüllü kişilerde saatler içerisinde idrarda hepsidin atılımının 7,5 kat arttığı, bu artışa serum demirinde ve transferrin saturasyonunda %30 azalmanın eşlik ettiği görülmüştür (Ganz 2006). Benzer şekilde subkutan turbentin (terebentin, petrol yağı) enjeksiyonu ile oluşan inflamasyon sırasında, normal farelerin serum demirinde belirgin bir azalma görülürken, hepsidinden yoksun ve IL-6'dan yoksun farelerde bu cevabın kaybolduğu gözlenmiştir (Ganz 2006, Flanagan, Truksa, Peng, Lee, Beutler 2007).

Nemeth ve arkadaşları 2003 yılında yaptığı bir çalışmada transfüzyonla indüklenmiş demir yüklenmesi enfeksiyonu ve inflamatuvar hastalığı olan hastalarda idrarda hepsidinin atılımının belirgin olarak arttığı, invitro IL-6 ile hepsidin mRNA'sının belirgin olarak indüklendiği gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, insan hepsidinin bir tip 2 akut-faz proteini olduğunu göstermiştir (Nemeth, Valore, Territo, Schiller, Lichtenstein, Ganz. 2003).

Kemna ve arkadaşları 2005 yılında 10 sağlıklı gönüllüye lipopolisakkarid enjeksiyonu yaparak oluşturdıkları invivo insan endotoksemi modelinde, enjeksiyon sonrası 3 saatte IL-6 düzeylerinin, 6 saatte idrar hepsidin düzeylerinin arttığını, bunu takiben serum demir düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gözlemlemiştir (Kemna, Pickkers, Nemeth, van der Hoeven, Swinkels 2005).

İnflamasyon sırasında artan hepsidin düzeyleri, makrofajlar, hepatositler ve duodenal enterositlerde ferroportinin hücre içine alınımını ve yıkımını uyarmakta, böylece demirin bu hücrelerde tutulmasına ve plazmaya demir akışının önlenmesine yol açmaktadır. Saatler içerisinde, genç eritrositler tarafından demirin

sürekli kullanılması plazma demirini azaltarak, hipoferreminye yol açmaktadır (Ganz ve Nemeth 2006).

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar IL-6 – hepsidin aksının hipoferrin cevapta kritik bir öneme sahip olduğunu ve hepsidin inflamasyondaki hipoferrinide rol alan temel aracı olduğunu göstermektedir (Başol ve ark. 2007).

İnsan karaciğer hücre kültürleri, fareler ve gönüllülerle yapılan bir çalışmada IL-6'nın inflamasyon sırasında hepsidin üretimi için gerekli bir sitokin olduğu ve IL-6 ile hepsidin aksının inflamasyondaki hipoferriniden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Lee, Peng, Gelbart, Wang, Beutler 2005).

Enfeksiyon, inflamasyon anemisinde oluşan hipoferrinemi hastanın savunma mekanizmalarından biridir. Bu durumdan sorumlu hormon da hepsidindir. IL-6 ve diğer sitokinlerle hepsidin arttığı, hemoglobin sentezi ve eritropoez için kullanılacak demiri, demir emilimini engelleyerek ve retikuloendotelial sistemde demir blokajı yaparak azalttığı, hepsidin arttığı bütün durumlarda anemi olduğu klinik durumlarda gösterilmiştir (Wrighting, Andrew, Lichtman 2003, Falzacappa, et al. 2007). Talasemi majör hastalarında da üriner hepsidin düzeyi transfüzyondan sonra önemli derecede artmaktadır (Kearney et al 2007).

Hepsidin sentezi inflamasyonda veya aşırı demir yüklenmesinde büyük oranda artmaktadır. Transgenik fare modellerinden elde edilen kanıtlarda hepsidin ince barsaklarda demir emiliminde, plasentadan demir taşınmasında ve makrofajlar (kan dokusundaki monositlerden farklılaşarak oluşan mikroorganizmaları fagosite edip yok eden bağ dokusu hücresi)'dan demir açığa çıkmasında negatif düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Hepsidin anahtar rolü juvenil (gençliğe ait) hemokromatozisi olan iki ailede homozigot olarak etkilenmiş hepsidin gen mutasyonu ile doğrulanmıştır (Ganz 2003). İnflamasyon anemisinde hepsidin yüz kat artış göstermektedir ve makrofajlarda demir sekresyonunda ve bu tür anemilerin tespitinde ölçülebilmektedir. Hepsidin keşfi ve demir metabolizmasındaki rolünün tespiti, inflamasyon anemisinde ve hemokromatoziste yeni tedavi

yaklaşımlarında yol gösterici olabilmektedir (Ganz 2003). Kronik inflamasyonlarda demirin makrofajlara geçişi özellikle eritrofagositosis ve protein divalent metal transporter 1 (DMT-1) transmembran proteini yoluyla gerçekleşmektedir (Andrews 1999).

Mikroorganizmaların invazyonu, malign hücrelerin dolaşımında bulunması veya otoimmün disregülasyon T-hücrelerinin (CD3+) ve monositlerin aktivasyonuna neden olarak kronik hastalık anemisinin altında yatan temel patofizyolojik mekanizmayı oluşturmaktadırlar. Bu hücreler immün mekanizmayı uyarmakta ve T hücrelerinden interferon, monosit ve makrofajlardan TNF-alfa, IL-1, IL-6 ve IL-10 salgılanmasına yol açmaktadırlar. IL-6 ve liposakkaritler akut faz reaktanı olarak hepsidinin hepatik sekresyonunu arttırmaktadırlar ve hepsidin de demirin duodenal emilimini engeller. İnterferon-gama, lipopolisakkaritler ve her ikisi de makrofajlardaki DMT-1 ekspresyonunu ve ferröz demir (Fe^{+2}) alımını arttırmaktadırlar (Ludwiczek, Aigner, Theurl, Weiss 2003).

TNF-alfa'nın etkilediği makrofajlar, eritrositlerin membranlarını hasara uğratmakta ve fagositoza neden olmaktadır. İnterferon-gama ve lipopolisakkaritler makrofajlardaki demir transportunu sağlayan ferroportin-1 ekspresyonunu baskılamakta ve bunu da hepsidin aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Aynı zamanda TNF-alfa, IL-1, IL-6 ve IL-10 ferritin ekspresyonunu artırarak makrofajlarda demir retansiyonunu stimüle etmektedir. Özet olarak bu mekanizmalar dolaşımdaki demir konsantrasyonunu azaltmakta ve böylece eritrositlerde demir kullanımını azaltmaktadır. TNF-alfa ve interferon-gama böbreklerdeki eritropoetin üretimini inhibe etmektedir. TNF-alfa, interferon-gama ve IL-1 direkt olarak eritroid progenitör hücrelerin çoğalmasını ve olgunlaşmasını inhibe etmektedir. Ek olarak demir kullanımının sınırlanması, eritropoetinin biyolojik aktivitesinin inhibisyonu ile anemi gelişmektedir. Kronik hastalık anemili hastalarda eritroid prokürsörlerinin proliferasyonunu sağlayan "Erythroid Burst-Forming Unit (E-BFU)" ve Erythroid Colony Forming Unit (E-CFU)" bozulmuştur (Means 2003). Bu durum hücrelerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu sağlayan bu yapıların IFN-alfa (interferon-alfa), IFN-beta, IFN-gama, TNF-alfa ve IL-1'in

inhibitör etkisiyle ilişkilendirilmektedir. IFN-gama, hemoglobin konsantrasyonları ve retikülosit sayımlarıyla ters ilişki göstermesi nedeniyle en potent inhibitör olarak görülmektedir. Altta yatan mekanizma olarak muhtemelen sitokin aracılı artmış apoptoza bağlı ve özellikle de seramid oluşumu gibi progenitör hücrelerdeki eritropoetin yapısı ve aktivitesi de kök hücre faktörü gibi diğer hematopoetik faktörlerin ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır (Whang, Udopa, Lipschitz 1995).

TNF, IL-1 ile birlikte ya da ayrı ayrı sistemik enflamasyonu tetiklemekte ve bununla ilgili belirtilerin (örn. Ateş) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan ve aynı zamanda bir endotoksin olan lipopolisakkarid (LPS), TNF-alfa üretimini tetikler. Ayrıca, nötrofil ve monositler için kemotaktiktir ve nötrofil aktivitesini arttırmaktadır. TNF'nin lokal olarak konsantrasyonunun artması, bakteriyel enfeksiyonlarla ilişkili olan belirtilere (septik şok, ateş, karın ağrısı, uyuşukluk, baş ağrısı, mide bulantısı ve enflamasyon) neden olmaktadır. Hipotalamusta, kortikotropin salgılatıcı hormon (corticotropin relasing hormone, CRH) salınımını uyarak “hipotalamus-hipofiz-adrenal” aksını uyarır. İştahı baskılamaktadır. Ateşe neden olur. Karaciğerde, akut faz yanıtını uyarmakta ve kanda C-reaktif proteinin artmasına neden olmaktadır. Nötrofilleri çekmekte ve migrasyon için endotelyum hücrelerine yapışmalarına yardım etmektedir. Makrofajlarda, fagositozu ve IL-1, oksidanlar, enflamasyon lipidleri ve prostaglandin E2 üretimini uyarmaktadır. Diğer hücrelerde, insülin direncini arttırmaktadır (Sağnak 2008).

Enflamasyon olduğunda IL-6 (interlökin-6) salınır ve reseptörüne bağlanmaktadır. IL-6 ligand-reseptör ilişkisi “Janus kinazların” (JAK) aktivasyonuna yol açmaktadır. Bunlar da STAT (Sinyal Transdusörleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri) proteinlerinin fosforilasyonuna sebep olmaktadır. Özellikle fosforile olan STAT3 hücre çekirdeğine giderek hedef genlerinin transkripsiyonuna neden olmaktadır. IL-6, hepsidinin geni olan HAMP (9.kromozomda) transkripsiyonunu STAT3, HAMP promotorundaki regülasyon elemente bağlanması ile hepsidin ekspresyonu indüklenmektedir. Yani

enflamasyonda hepsidin artışı IL-6/STAT yolu ile olmaktadır. Enflamasyon anemisinde hepsidinin IL-6 ile artması yanında bazı malignitelerde olduğu gibi sitokinlerin artmadığı durumlarda da karaciğerdeki STAT3 deki değişikliklerin hepsidin artışına yol açmasını ve anemiye neden olmasını açıklamaktadır. Ayrıca hepsidinin enflamasyon durumlarında artmasında STAT3'ün anahtar rol oynadığı, STAT3 inhibe edildiğinde hepsidinin artmadığı da gösterilmiştir (Ganz 2003, Uysal 2007).

Karaciğer tarafından üretilen ve prohormon olarak kan dolaşımına salınan hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesinde kilit rol oynayan antimikrobiyal bir proteindir. Artan demir düzeyine ve iltihabi uyarılara yanıt olarak karaciğer tarafından üretilen hepsidin, demir hemostazı ile iltihabi yanıt arasında bağlayıcı bir görev üstlenmektedir. Bu özelliğinden dolayı hepsidin, demir hemostazındaki değişimlere bağlı gelişen anemiler ve iltihabi yanıtla bağlı gelişen immün (bağışıklık) sistem hastalıkları ve enfeksiyon hastalıkları için önemli bir aday proteindir (Uysal 2007).

Hematopoetik kök hücre naklinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri, nakil öncesinde hastaya uygulanan transfüzyonlara bağlı gelişen demir birikimidir. Sık transfüzyonlar uygulamalarından dolayı, özellikle talasemi gibi eritroid seri ile ilgili bozukluklarda demir birikimi, kök hücre naklinin başarısını da etkileyebilmektedir (Uysal 2007). Hematopoetik kök hücre nakillerinde karşılaşılan diğer bir sorun da, allojenik nakillerin başarısını önemli ölçüde düşüren graft reddi ve GvHH'dir. Nakledilen kök hücrelerin konak (hasta) tarafından kabul edilmemesi olarak tanımlanan graft reddi, hastanın nakil sonrasında nötropeniye bağlı fırsatçı enfeksiyonlar ya da trombositopeniye bağlı kanamalar nedeniyle kaybedilmesine neden olabilmektedir. Nakledilen kök hücrelerin konağı (hastayı) yabancı kabul etmesi ve immün yanıt başlatması sonucu konakta doku hasarlarının oluşması olarak tanımlanan GvHH ise, oluşan doku hasarının yerleşimi ve yaygınlığına bağlı olarak ölümlere yol açabilmektedir. Allojenik ve otolog hematopoetik kök hücre nakillerinde karşılaşılan başka bir sorun da, nakil öncesi ya da sonrası ortaya çıkan fırsatçı enfeksiyonlardır (Yalman 2003, Yılmaz 2004).

Hematopoetik kök hücre naklinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri, nakil öncesinde hastaya uygulanan transfüzyonlara bağlı gelişen demir birikimidir. Sık transfüzyonlar uygulamalarından dolayı, özellikle talasemi gibi eritroid seri ile ilgili bozukluklarda demir birikimi, kök hücre naklinin başarısını da etkileyebilmektedir (Uysal 2007). Hematopoetik kök hücre nakillerinde karşılaşılan diğer bir sorun da, allojenik nakillerin başarısını önemli ölçüde düşüren graft reddi ve GvHH'dir. Nakledilen kök hücrelerin konak (hasta) tarafından kabul edilmemesi olarak tanımlanan graft reddi, hastanın nakil sonrasında nötropeniye bağlı fırsatçı enfeksiyonlar ya da trombositopeniye bağlı kanamalar nedeniyle kaybedilmesine neden olabilmektedir. Nakledilen kök hücrelerin konağı (hastayı) yabancı kabul etmesi ve immün yanıt başlatması sonucu konakta doku hasarlarının oluşması olarak tanımlanan GvHH ise, oluşan doku hasarının yerleşimi ve yaygınlığına bağlı olarak ölümlere yol açabilmektedir. Allojenik ve otolog hematopoetik kök hücre nakillerinde karşılaşılan başka bir sorun da, nakil öncesi ya da sonrası ortaya çıkan fırsatçı enfeksiyonlardır (Yalman 2003, Yılmaz 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Seçimi

Bu çalışmaya, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Pediatrik KİT Ünitesi'nde 2008-2009 yılları arasında nakil yapılan 2-17 yaş arası 10 çocuk dahil edildi. Çalışma için, 16.04.2008 tarihli, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Toplantısı'nda 2008/918 nolu dosya ile onay alındı. 4 hasta lösemi, 3 hasta anemi, 2 hasta lenfoma, 1 hasta hemofagositik sendrom hastalık grubuna girmektedir.

Hematopoetik kök hücre nakillerinin zor ve uzun süreçlerden oluşması ve 3 yatak kapasiteli bir ünite olması nedeniyle bu tez çalışmasına alınan hasta grubu homojen seçilemedi. Farklı hastalık tanıları hastalardan oluşan grubun hazırlık rejimlerinde farklılık gösterir (örneğin aplastik anemi tanıları hastalarımıza yüksek doz siklofosfamid ve anti-timosit globulin (ATG) kullanılırken lösemi tanıları olgularda yüksek doz siklofosfamid ve busulfan kullanıldı. Ayrıca GVHH önlemi için hastaya uzun süreli siklosporin ve/veya metatoraksat kullanıldı.

Hasta grubundaki her çocukta (nakil öncesi 1, nakil sonrası 3 olmak üzere) 4 basamakta kan ve idrar örnekleri alındı. Nakil öncesi aldığımız ilk basamak kan ve idrar örnekleri daha sağlıklı olma açısından uygulanan kemoterapiden önce (-10'uncu gün) alındı. Alıcının immün sisteminin baskılandığı dönemde (nakil sonrası 3-5'inci gün) ikinci basamak kan ve idrar örnekleri alındı. Yeterli hematopoezin yeniden tesisinin sağlandığı dönem engraftman dönemi olup üçüncü basamak kan ve idrar örnekleri engraftman sonrası (15-20'nci gün) alındı. Dördüncü basamak kan ve idrar örnekleri ise hastaların taburcu oldukları dönemde (30'uncu gün ve ya sonrası) alındı.

3.2. Metod

Kan alma aşamasında özel vakumlu tüpler ve vakuteynir, idrar ve kan serumlarının saklanması için ependorf tüpleri kullanıldı. Standart olarak kan sayımı tüpü ve kuru tüpe alınan kan örneklerinin yanında serum prohepsidin, IL-6 ve TNF-

alfa ölçümü için ayrı bir kuru tüpe 5cc kan ve idrarda hepsidin için santrifüj tüpüne 10cc idrar örneği alındı. Alınan idrar ve kan örnekleri en geç yarım saat içinde santrifüj edilerek kanın serum kısmı, idrarında üste kalan kısmı ependorflara konularak (her parametre için ayrı) ELISA çalışmak üzere -80 °C derecede saklandı. Kan ve idrar örnekleri tamamlanınca oda ısısında çözülerek Elisa yöntemiyle serum prohepsidin, IL-6 ve TNF-alfa düzeyleri çalışıldı.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırma temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür.

Hepsidin, IL-6 ve TNF-alfa kitleri ile gerçekleştirilen ELISA yöntemi aşamasında hasta materyali, hedef moleküle (hepsidin prohormon) karşı üretilmiş poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklara eklendi. İnkübasyon ve yıkama sonrasında kuyulara işaretli antikorlar eklendi. Bağlanmayan antikorların yıkama ile uzaklaştırılmasının ardından, kuyu duvarındaki sabit poliklonal antikora, antijen (hedef molekül) aracılığı ile bağlanan işaretli antikor miktarı plate okuyucusunda (ELx800) ölçüldü. Standartların konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan standart eğriler (Şekil 1, 2 ve 3) yardımıyla, örneklerdeki antijen (hedef molekül) konsantrasyonu hesaplandı. ELISA çalışmasında (DRG Diagnostics'in Hepsidin Prohormon ELISA kiti ve Bender MedSystems'in Human TNF-alpha ile IL-6 ELISA kitleri kullanıldı.) aşağıdaki basamaklar izlendi.

TNF-alfa; Önce kullanacağımız solüsyonlar hazırlandı. (Oda sıcaklığında)

- Yıkama Tamponu (Wash Buffer Concantrate) (20x)
(50 ml Yıkama Tamponu, 950 ml distile su ile sulandırıldı.)
- Test Tamponu (Assay Buffer) (20x)
(5ml Test Tamponu, 95 ml distile su ile sulandırıldı.)
- Bağlı Biotin (Biotin Conjugate) (işlem yapılırken hazırlanıp hemen kullanıldı.)

(0,06ml Bağlı Biotin'e sulandırılmış Test Tamponundan 5,94 ml ilave edildi)

-Streptavidin-HRP (işlem yapılırken hazırlanıp hemen kullanıldı.)

(0,06 ml Streptavidin-HRP üzerine sulandırılmış Test Tamponundan 11,94 ml ilave edildi.

- İnsan TNF-alfa Standart

(Distile suyla kapağında yazılı yere kadar sulandırıldı.)

- Kontrol

(800 µl distile su ile çözüldü.)

İzlenen basamaklar:

1- Standart, 1 kör ve 40 (her hasta için 4 kademe olduğundan 10 hasta için 40) örnek, toplam 48 olmak üzere kuyu sayımız belirlendi. Kuyular (400 µl) sulandırılmış yıkama solüsyonuyla 2 defa yıkandı.

2- Standartların konulacağı 7 kuyudan ilk kuyuya 100 µl dilüe edilen Örnek Çözücü (Sample Diluent) solüsyonundan konuldu ve karıştırılarak 100 µl pipetle alınarak ikinci kuyuya konuldu. İkinci kuyudan 100 µl çekilerek üçüncü kuyuya konuldu. Bu işlem standart kuyuları bitene kadar devam edildi.

3- Kör olarak seçtiğimiz kuyuya 100 µl dilüe edilen Örnek Çözücü solüsyonundan konuldu.

4- Örnek kuyularına dilüe edilen Örnek Çözücü solüsyonundan 50 µl konuldu.

5- Hastaya ait kuyulara 50 µl kendi serumları konuldu.

6- Bağlı-Biotin hazırlandı.

7- Hazırlanan Bağlı-Biotin çözeltisinden bütün kuyulara 50 µl konuldu.

8- Kuyuların üzeri streçle kapatılarak 2 saat 18-25 derecede enkübe edildi.

9- Streptavidin-HRP hazırlandı.

10- 2 saat sonunda kuyular boşaltılıp 4 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı.

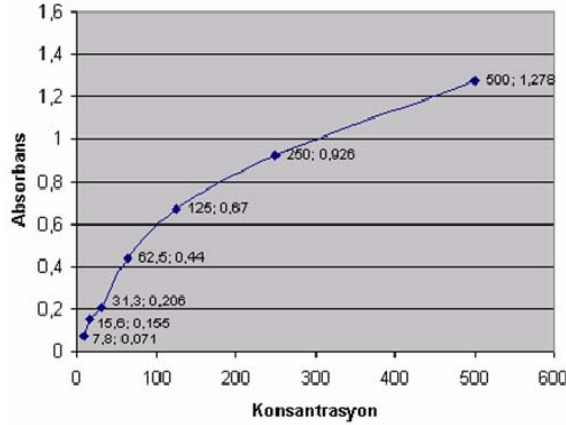
11- Hazırlanan Streptavidin-HRP solüsyonundan bütün kuyulara 100 µl konuldu ve üzeri streçle örtülerek 1 saat (oda sıcaklığında) enkübe edildi.

12- 1saat sonunda kuyular boşaltılıp 4 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı.

13- Bütün kuyulara TMB-Substrat Solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi.

14- Bütün kuyulara Stop Solüsyonundan 100 µl konularak ELISA (ELx800) cihazında kör ayarı yapıldıktan sonra 450 nm’de okundu.

15- Dilüsyon işlemi yapıldığı için sonuçlar 2 ile çarpılarak standart eğrisi oluşturuldu.



Şekil 1: TNF-alfa standart eğrisi

IL-6: Önce kullanacağımız solüsyonlar hazırlandı. (Oda sıcaklığında)

- Yıkama Tamponu (Wash Buffer Concantrate) (20x)

(50 ml Yıkama Tamponu, 950 ml distile su ile sulandırıldı.)

- Test Tamponu (Assay Buffer) (20x)

(5ml Test Tamponu, 95 ml distile su ile sulandırıldı.)

- Bağlı Biotin (Biotin Conjugate) (işlem yapılırken hazırlanıp hemen kullanıldı.)

(0,06ml Bağlı Biotin’e sulandırılmış Test Tamponundan 5,94 ml ilave edildi)

- Streptavidin-HRP (işlem yapılırken hazırlanıp hemen kullanıldı.)

(0,06 ml Streptavidin-HRP üzerine sulandırılmış Test Tamponundan 11,94 ml ilave edildi.

- İnsan IL-6 Standart

(Distile suyla kapağında yazılı yere kadar sulandırıldı.)

- Kontrol

(800 µl distile su ile çözüldü.)

İzlenen basamaklar:

1- Standart, 1 kör ve 40 (her hasta için 4 kademe olduğundan 10 hasta için 40) örnek, toplam 48 olmak üzere kuyu sayımız belirlendi. Kuyuları (400 µl) sulandırılmış yıkama solüsyonuyla 2 defa yıkandı.

2- Standartların konulacağı 7 kuyudan ilk kuyuya 100 µl dilüe edilen Test Tamponundan (Assay Buffer) konuldu ve karıştırılarak 100 µl pipetle alınarak ikinci kuyuya konuldu ve tekrar 100 µl çekilerek üçüncü kuyuya konuldu. Bu işlem standart kuyuları bitinceye (7.) kadar devam edildi.

3- Kör olarak seçtiğimiz kuyuya 100 µl dilüe edilen Test Tamponundan konuldu.

4- Örnek kuyularına dilüe edilen Test Tamponundan 50 µl konuldu.

5- Hastaya ait kuyulara 50 µl kendi serumları konuldu.

6- Bağlı Biotin çözeltisi hazırlandı.

7- Hazırlanan Bağlı Biotin çözeltisinden bütün kuyulara 50 µl konuldu.

8- Kuyuların üzeri streçle kapatılarak 2 saat 18-25 °C derecede enkübe edildi.

9- Streptavidin-HRP hazırlandı.

10- 2 saat sonunda kuyular boşaltılıp 4 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı.

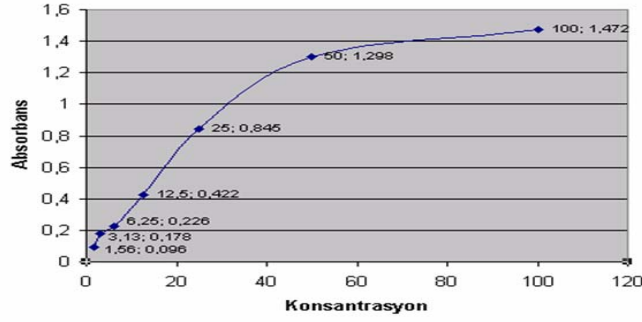
11- Hazırlanan Streptavidin-HRP solüsyonundan bütün kuyulara 100 µl konuldu ve üzeri streçle örtülerek 1 saat (oda sıcaklığında) enkübe edildi.

12- 1 saat sonunda kuyular boşaltılıp 4 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı.

13- Bütün kuyulara TMB-Substrat Solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi.

14- Bütün kuyulara Stop Solüsyonundan 100 µl konularak ELISA (ELx800) cihazında kör ayarı yapıldıktan sonra 450 nm'de okundu.

15- Dilüsyon işlemi yapıldığı için sonuçlar 2 ile çarpılarak standart eğrisi oluşturuldu.



Şekil 2 : IL-6 standart eğrisi

Serum Prohepsidin

Konsantre olarak bulunan Yıkama (Wash) Solüsyonu hazırlandı. (30 ml Yıkama Solüsyonu 1170 ml deiyonize su ile dilüe edilerek 1200 ml'ye tamamlandı).

İzlenen basamaklar:

1- 14 kuyu standart (her standart için 2 kuyu seçildi), 1 kuyu kör, 40 kuyu serum prohepsidin ve 40 kuyu idrar prohepsidin olmak üzere 95 kuyu seçildi.

2- Her kuyuya 100 µl kullanıma hazır olan Test Tamponu (Assay Buffer) konuldu.

3- Standart, kontrol ve örnekten her kuyuya 50 µl konuldu ve 10 sn iyice karıştırıldı.

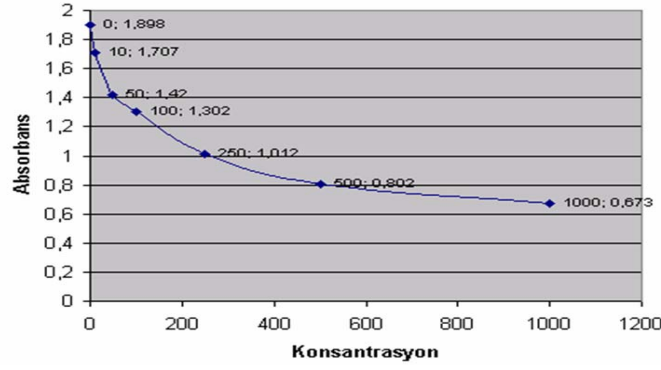
4- 120 dakika enkübasyona bırakıldı.

5- Kuyu içeriği silkelenerek Yıkama Solüsyonuyla 5 kez seyreltildi (her kuyuya 400 µl) ve emici kağıda artan damlacıkları çıkartmak için vuruldu.

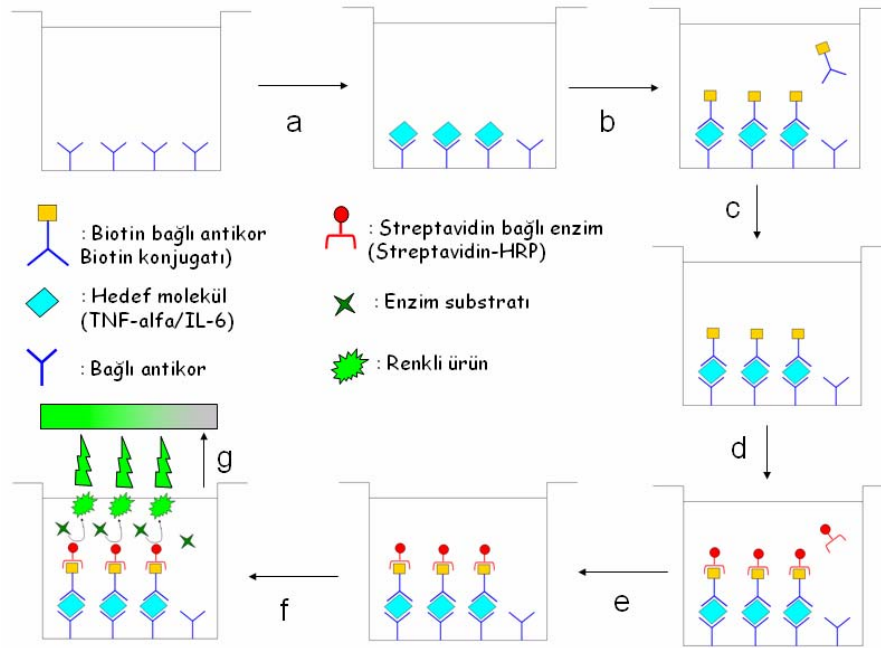
6- Her kuyuya Enzim Kompleksinden 100 µl konuldu ve 60 dakika oda ısısında enkübe edildi. Enkübasyon sonunda kuyu içeriği iyice silkelendi ve her kuyu 400 µl yıkama solüsyonuyla seyreltildi. Emici kağıda artan damlacıkları çıkartmak için vuruldu.

7- Her kuyuya 100 µl Substrat Solüsyonundan konularak oda ısısında 30 dakika enkübasyona bırakıldı.

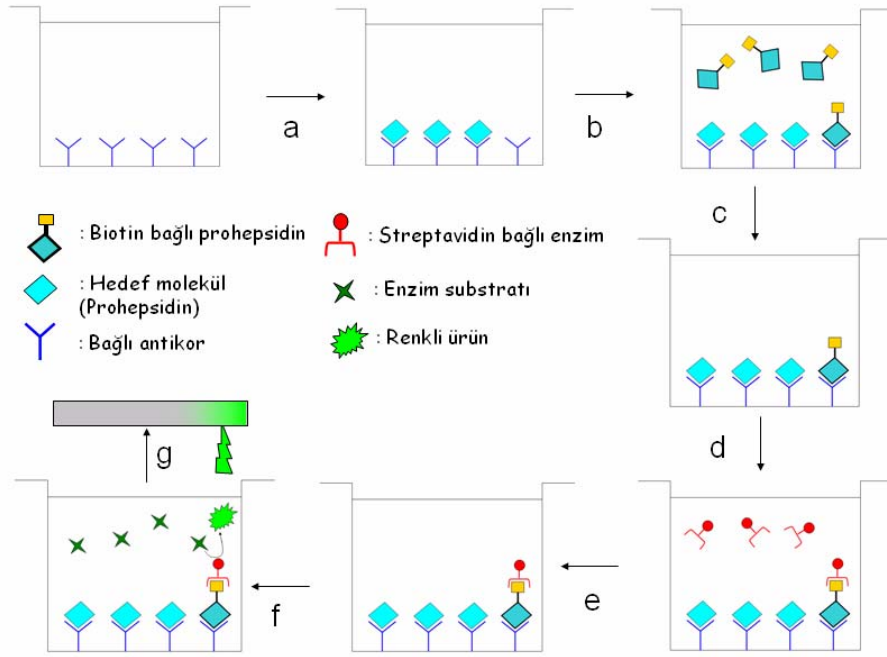
8-100 µl Stop Solüsyonundan konularak enzimatik reaksiyon durduruldu. 10 dakika içinde ELISA (ELx800) cihazında kör ayarı yapıldıktan sonra 450 nm'de okundu.



Şekil 3: Hepsidin standart eğrisi



Şekil 4 : TNF-alfa ve IL-6 için kullanılan ELISA yönteminin aşamaları.



Şekil 5: Prohepsidin için kullanılan ELISA yönteminin aşamaları.

3.3. İstatistiksel Yöntem

İstatistik analizler, GraphPad InStat programı kullanılarak one-way ANOVA ve Spearman Non-parametrik testleri ile yapıldı. Analizlerde $p < 0,05$, anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi pediatrik KİT ünitesinde 2008-2009 yılları arasında kök hücre nakli yapılan ve çalışma grubumuza katılan 10 hasta ile ilgili genel bilgiler tablo 2 'de verilmiştir.

Tablo 2: Nakil yapılan hastalara ait genel bilgiler (Kİ: Kemik İliği, PKH: Periferik Kök Hücre)

Hasta Adı	Nakil Yaşı	Tanısı	Nakil Tipi	Kök Hücre Kaynağı	Sağ Kalım
C.Ş.	4	AA	Allojenik	Kİ	+
S.F.	3	AA	Allojenik	Kİ	+
S.Y.	7	FA	Allojenik	Kİ	-
F.B.	11	ALL	Allojenik	Kİ	+
E.D.	9	ALL	Allojenik	Kİ	+
C.K.	8	AML	Allojenik	Kİ	+
M.K.	17	AML	Allojenik	Kİ	-
A.A.	9	NHL	Otolog	Kİ	+
M.E.T.	16	HL	Otolog	Kİ + PKH	+
Y.A.S.	2	HLH	Allojenik	Kİ	-

. Bu hasta grubumuzda TNF-alfa, IL-6, serum prohepsidin, idrar prohepsidin testlerini ELISA yöntemiyle çalışıldı. Bu standartlar doğrultusunda çalışılan 10 hastaya ait TNF alfa, IL-6, serum prohepsidin ve idrar prohepsidin konsantrasyonları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3: TNF alfa, interlökin 6, serum prohepsidin ve idrar prohepsidinin nakil öncesi değerleri

NAKİL ÖNCESİ				
Hastalar	TNF-alfa	IL-6	Serum Prohepsidin	İdrar Prohepsidin
C.Ş	2,6	0	91,8	0,5
S.F	3,4	1,8	131,5	253,6
S.Y	2,5	0	90,4	70,9
F.B	4,5	0,8	65,2	346,4
M.K	7,4	2,6	102,1	0,9
A.A	2,4	0	59,1	0,5
E.D	3,7	0,4	67,4	152,3
Y.A.S	2,4	0	88,4	221,6
M.E.T	4,2	5	119,6	49,1
C.K	11,6	0	70,1	53,8

Tablo 4 : TNF alfa, interlökin 6, serum prohepsidin ve idrar prohepsidinin nakil sonrası üç aşamadaki değerleri

Hastalar	NAKİL SONRASI											
	3.- 5. gün				Engrafman sonrası (15. - 20. gün)				Taburcu (30. günden sonra)			
	TNF-alfa	IL-6	Serum Prohep.	İdrar Prohep.	TNF-alfa	IL-6	Serum Prohep.	İdrar Prohep.	TNF-alfa	IL-6	Serum Prohep.	İdrar Prohep.
C.Ş	2,3	0	130,2	58,9	2,9	0,6	158,7	45,2	2,5	0,2	187,9	164,3
S.F	3	1,8	119,6	41,4	3,2	1,2	118,3	1,9	3,1	1,2	133,4	456,4
S.Y	3	0,8	119,2	11,9	2,7	1,2	125,2	95,2	4,9	1,4	127,4	18,8
F.B	2,4	81,8	58,6	27,4	8,3	39,8	92,8	77,6	8,9	1	133,9	33,7
M.K	2,3	2,2	108	125,7	2,1	1,4	97	81	2,1	1,4	67,7	41,7
A.A	2,4	1,8	139,1	32,5	4,4	25,6	118,7	69	35,6	46,2	137,6	133,4
E.D	2,4	0	103,9	24,4	6,2	244,8	158,7	5,4	3,7	0,06	150,7	95,2
Y.A.S	2,9	0	134,3	189,7	3,3	0	54,5	94,2	352,2	320,4	120,4	175,9
M.E.T	3,3	0,8	102,5	42,8	3,6	1,2	35,6	117,5	3,7	4,8	131,9	98,4
C.K	2,6	0	91,8	206,1	22,7	0,6	165,9	152,8	2,9	0	185,9	253,6

Hastalarımızın yattığı sürede bakılan rutin tetkikleri tablo 5’de görülmektedir.

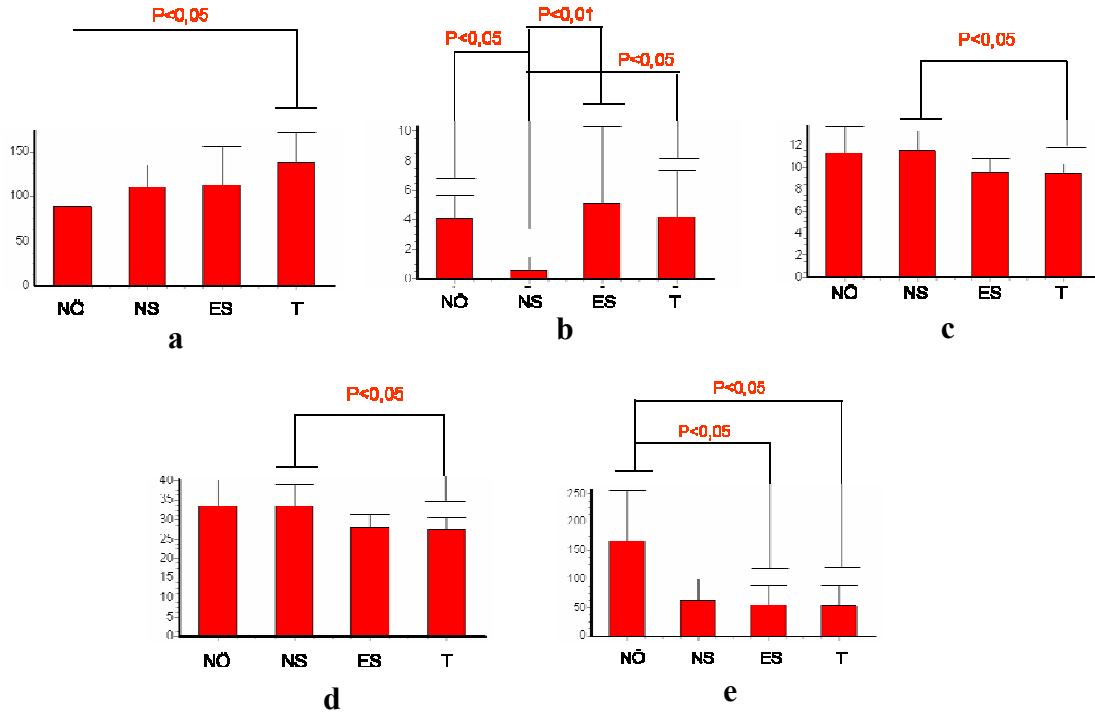
Tablo 5: Nakil öncesi ve sonrası, 4 aşamada ölçülen önemli bazı biyokimyasal ve hematolojik değerler

		CRP (mg/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	WBC (10e3/ul)	Hb (g/dL)	Hct (%)	Plt (10e3/ul)
C.Ş.	Nakil Öncesi	59,6	21	26	517	2,2	9,2	26,3	9
	Nakil Sonrası	5,3	57	161	516	0,1	11,6	33	18
	Engrafman Sonrası	0,9	41	37	459	3,6	8,2	24	109
	Taburcu	0,3	30	19	430	3,3	8,7	25,7	130
S.F.	Nakil Öncesi	25,4	31	21	572	2,7	14,4	42,4	194
	Nakil Sonrası	9,3	32	37	442	0,3	13,7	40,3	45
	Engrafman Sonrası	14,7	167	211	655	3,9	8,5	23,8	25
	Taburcu	7,4	52	35	469	4,6	9,8	28,8	32
S.Y.	Nakil Öncesi	12,2	67	42	406	2,7	10,2	29,6	77
	Nakil Sonrası	14,4	85	99	3639	0,1	11,4	32,5	119
	Engrafman Sonrası	17,9	25	18	478	7,7	8,4	24,5	103
	Taburcu	98,5	164	125	2795	11,3	10,4	31,3	34
F.B.	Nakil Öncesi	0,3	15	16	235	5,6	16,3	47,5	212
	Nakil Sonrası	16,6	17	31	284	0,1	10,8	30,4	80
	Engrafman Sonrası	33,7	21	18	256	0,7	9	27,2	34
	Taburcu	21,1	24	22	344	2,1	8	24,5	20
E.D.	Nakil Öncesi	0,2	26	64	304	3,5	12	35,6	211
	Nakil Sonrası	5,7	23	25	258	0,7	14,3	42,6	86
	Engrafman Sonrası	1,3	28	20	445	17	10,4	30,1	59
	Taburcu	1,9	36	23	573	6,6	9,7	29	95
C.K.	Nakil Öncesi	3,2	49	60	653	2,7	11,1	32,6	158
	Nakil Sonrası	13,6	171	254	459	2,2	10,6	31,6	84
	Engrafman Sonrası	12	28	34	505	8,5	10,7	30,9	63
	Taburcu	6,4	49	52	564	5,1	10,2	30,2	20
M.K.	Nakil Öncesi	2,1	13	13	369	4,6	10	30,9	196
	Nakil Sonrası	5	28	29	413	2,28	3,3	38,2	110
	Engrafman Sonrası	122,9	8	13	162	0,2	10,3	30,5	3
	Taburcu	247,4	8	5	271	0,1	9,4	28	50
A.A.	Nakil Öncesi	0,3	15	20	219	6,8	11,3	33,3	249
	Nakil Sonrası	8,7	8	17	690	0	10,4	30,2	17
	Engrafman Sonrası	5,1	34	78	204	0,4	8,7	24,8	83
	Taburcu	1,8	34	58	352	2,5	10,1	29,7	80
M.E.T.	Nakil Öncesi	27,2	50	100	462	4,2	8,5	25,3	67
	Nakil Sonrası	23,4	23	35	644	0	8,5	24,9	44
	Engrafman Sonrası	37,3	356	493	644	2,6	11,7	33,7	38
	Taburcu	17,3	28	45	351	1,9	9,8	28,1	42
Y.A.S.	Nakil Öncesi	5,8	26	9	414	5,9	9,5	29,5	293
	Nakil Sonrası	46	37	21	288	0,1	10,8	33,5	31
	Engrafman Sonrası	47,5	87	29	455	6,6	9,8	29,1	30
	Taburcu	4,7	43	16	389	4,4	7,8	22,4	30

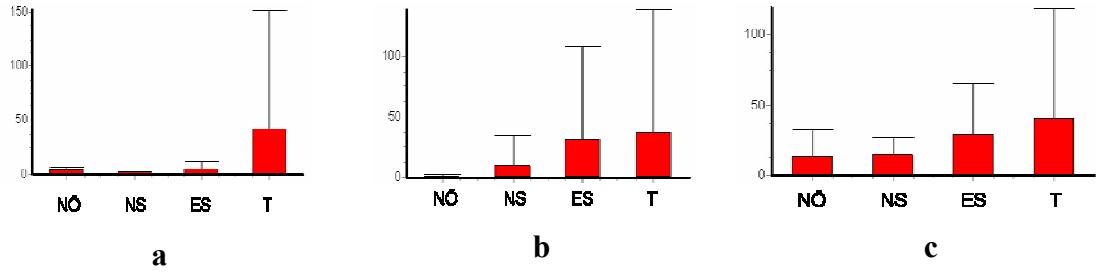
Nakil öncesi 10'uncu günde (NÖ), nakil sonrası 3-5'inci günlerde (NS), engrafman sonrasında (nakil sonrası 15-20'nci günlerde) (ES) ve hasta taburcu olurken (nakil sonrası 30-35'inci günlerde) (T) alınan serum ve idrar örneklerindeki ölçümlerin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Anlamlı bulunanlar tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Nakil öncesi ve sonrası ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi. (NO: nakil öncesi – 10'uncu gün, NS: nakil sonrası + 3'üncü gün, ES: engrafman sonrası + 15 ile 20'nci gün, T: taburcu olurken + 30'uncu gün ve sonrası)

	NÖ-NS	NÖ-ES	NÖ-T	NS-ES	NS-T	ES-T
Serum Prohepsidin	P<0.05					
WBC	P<0.05			P<0.01	P<0.05	
Hb					P<0.05	
Hct					P<0.05	
Plt	P<0.05		P<0.05			



Şekil 6: Nakil öncesi ve sonrası ölçümleri arasında istatistiksel fark bulunan serum prohepsidin (a), WBC (b), hemoglobin (c), hematokrit (d) ve trombosit (e) değerlerine ait ortalama ve standart sapmaları.



Şekil 7: Nakil öncesi ve sonrası aşamalarda, TNF-alfa (a), IL6 (b) ve CRP (c) değerlerindeki değişim.

Tablo 7: Nakil öncesi, nakil sonrası, engraftman sonrası ve taburcu zamanı, serum prohepsidin (a), IL6 (b) ve TNF – alfa (c) düzeylerinin istatistiksel dağılım özellikleri (devam)

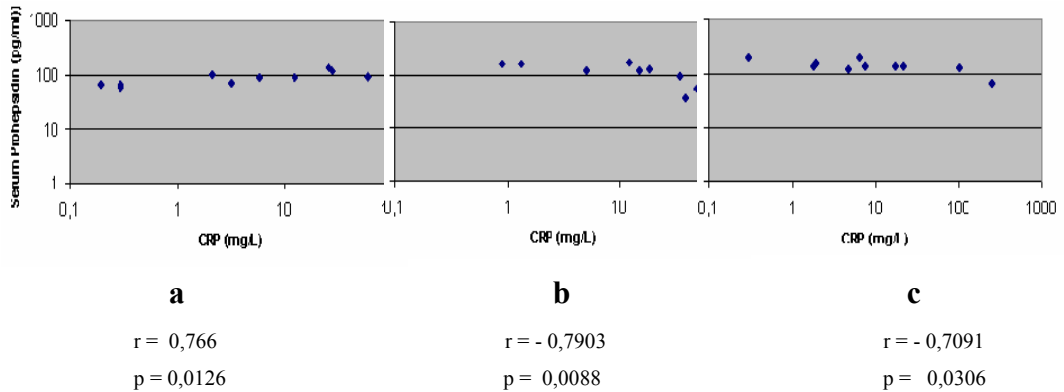
a				
Serum Prohepsidin				
Col. title	NO	NS	ES	T
Mean	88.56	110.78	112.54	137.68
Standard deviation (SD)	24.052	23.769	43.792	33.968
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	7.606	7.516	13.848	10.742
Lower 95% conf. limit	71.355	93.778	81.215	113.38
Upper 95% conf. limit	105.78	127.78	143.86	161.98
Minimum	59.100	58.800	35.600	87.700
Median (50th percentile)	89.400	113.90	118.50	133.65
Maximum	131.50	139.10	165.90	187.90
Normality test KS	0.1786	0.1638	0.1540	0.2055
Normality test P value	>0.10	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test?	Yes	Yes	Yes	Yes
b				
IL6				
Col. title	NO	NS	ES	T
Mean	1.065	8.924	31.841	37.867
Standard deviation (SD)	1.849	25.620	76.130	100.35
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	0.5213	8.102	24.074	31.734
Lower 95% conf. limit	-0.1142	-9.402	-22.815	-34.114
Upper 95% conf. limit	2.244	27.250	86.097	109.45
Minimum	0.01000	0.01000	0.01000	0.01000
Median (50th percentile)	0.2050	0.8000	1.200	1.300
Maximum	5.000	81.800	244.80	320.40
Normality test KS	0.2639	0.5035	0.3573	0.4284
Normality test P value	0.0469	<0.0001	0.0007	<0.0001
Passed normality test?	No	No	No	No

Tablo 7: Nakil öncesi, nakil sonrası, engrafman sonrası ve taburcu zamanı, serum prohepsidin (a), IL6 (b) ve TNF – alfa (c) düzeylerinin istatistiksel dağılım özellikleri (devam)

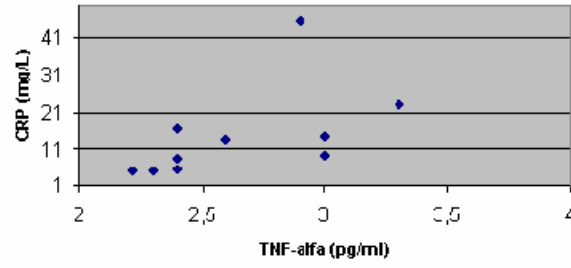
c

TNFα				
Col. title	NO	NS	ES	T
Mean	17258	24139	34455	41.96
Standard deviation (SD)	2928	0.3596	6177	108.48
Sample size (N)	10	10	10	10
Std. error of mean (SEM)	0.9280	0.1137	1953	34819
Lower 95% conf. limit	2375	2403	1522	-38349
Upper 95% conf. limit	6565	2917	10358	120.27
Minimum	2400	2300	2100	2100
Median (50th percentile)	3550	2500	3450	3700
Maximum	11600	3300	22700	352.20
Normality test KB	0.2959	0.2651	0.2984	0.4232
Normality test P value	0,0132	0,0448	0,0119	<0.0001
Passed normality test?	No	No	No	No

Ölçülen farklı parametreler arasında nakil öncesi ve sonrası aşamalarda herhangi bir korelasyonun olup olmadığını anlamak için, nonparametrik Spearman analizi uygulandı. Analiz sonucunda, nakil öncesi, engrafman sonrası ve taburculuk dönemine ait serum prohepsidin ve CRP düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulundu (Şekil 8). Diğer ölçüm değerleri arasından bazılarında ise, dört ölçüm aşamasının hepsinde olmasa da, en az birinde anlamlı korelasyon gösterilmiştir (Şekil 9).

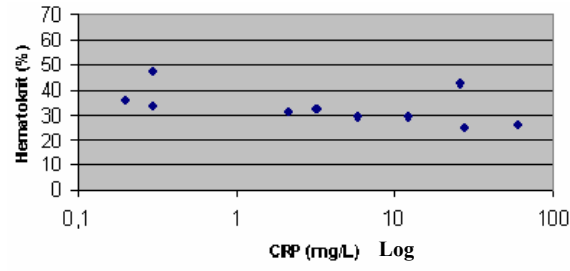


Şekil 8: Nakil öncesi (a), engrafman sonrası (b) ve taburcu olma döneminde (c) serum prohepsidin ve CRP düzeyleri arasında gözlenen korelasyon.



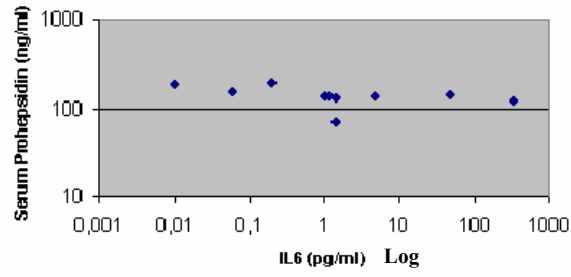
a

Nakil sonrası
($r = 0.7409$, $p = 0.0174$)



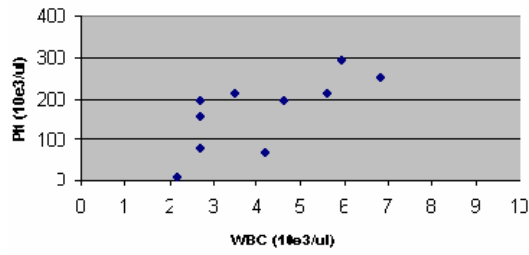
b

Nakil öncesi
($r = -0.6687$; $p = 0.039$)



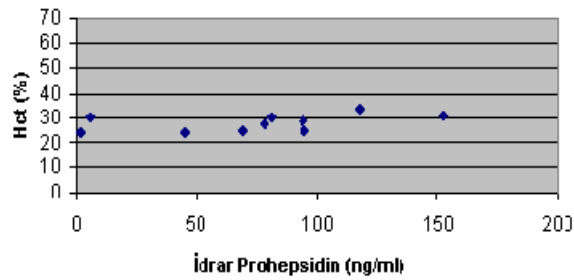
c

Taburcu
($r = -0.6991$; $p = 0.0306$)



d

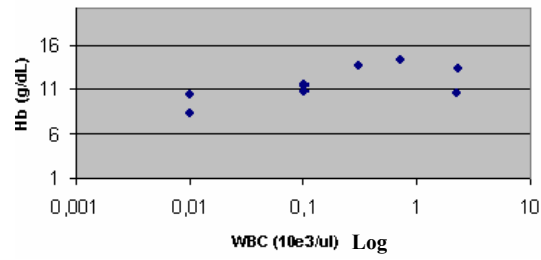
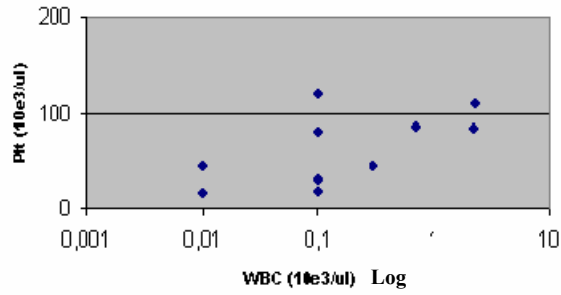
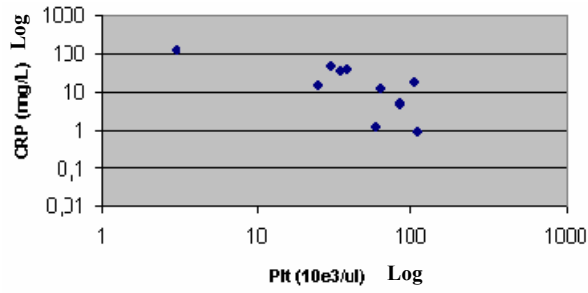
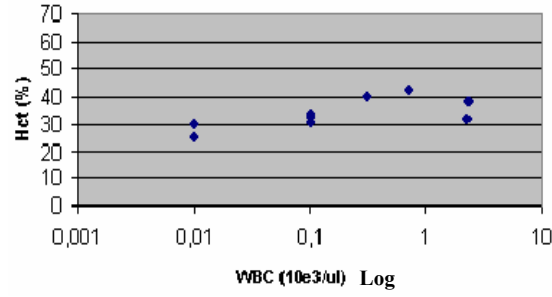
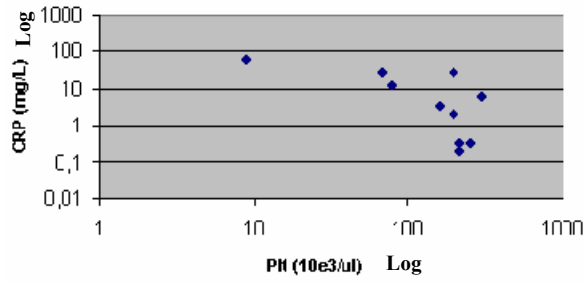
Nakil öncesi
($r = 0.8283$; $p = 0.0047$)



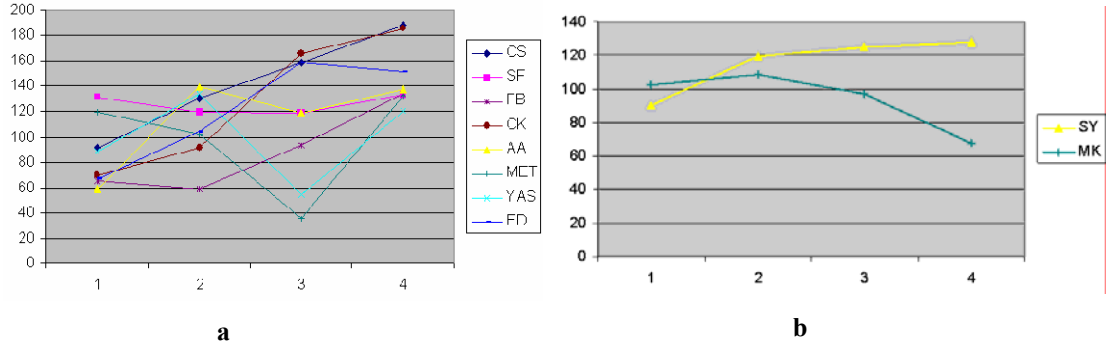
e

Engrafman sonrası
($r = 0.6485$; $p = 0.049$)

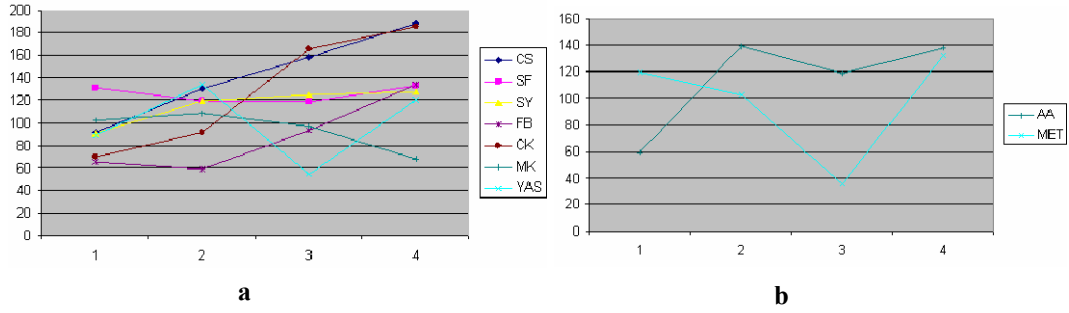
Şekil 9: Nakil öncesi ve sonrası aşamalarda bazı ölçümler arasında gözlelen korelasyonlar (devam)



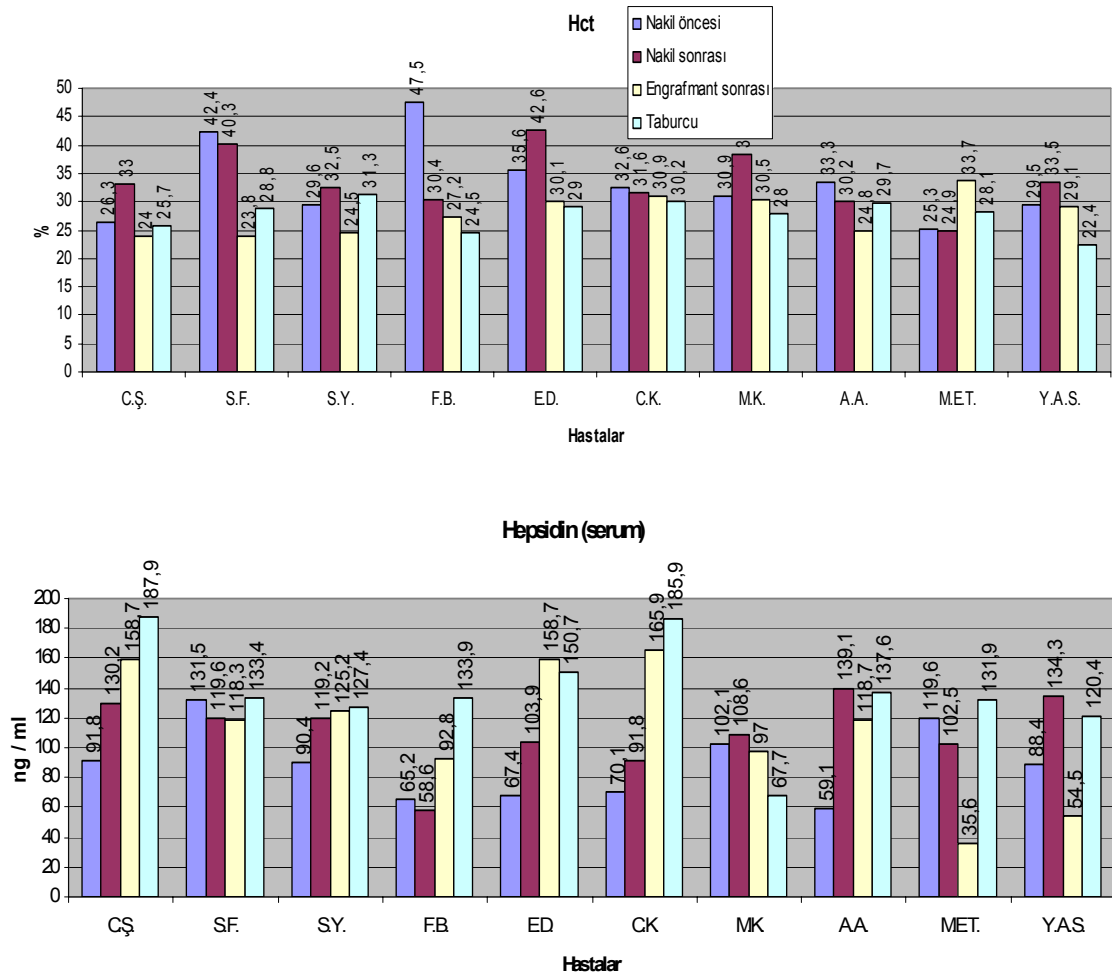
Şekil 9: Nakil öncesi ve sonrası aşamalarda bazı ölçümler arasında gözlelen korelasyonlar (devam)



Şekil 10: Nakil sonrası sağ kalım gösteren (a) ve göstermeyen (b) hastalarda nakil öncesi (1), nakil sonrası (2), engraftman zamanı (3) ve taburculuk zamanındaki (4) serum prohepsidin düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 11: Allojenik (a) ve otolog (b) nakil yapılan hastalarda nakil öncesi (1), nakil sonrası (2), engraftman zamanı (3) ve taburculuk zamanındaki (4) serum prohepsidin düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 12: Tüm hastalarda serum prohepsidin ve Hct değerleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karaciğer tarafından üretilen ve prohormon olarak kan dolaşımına salınan hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesinde kilit rol oynayan antimikrobiyal bir proteindir. Artan demir düzeyine ve iltihabi uyarılara yanıt olarak karaciğer tarafından üretilen hepsidin, demir hemostazı ile iltihabi yanıt arasında bağlayıcı bir görev üstlenir. Bu özelliğinden dolayı hepsidin, demir hemostazındaki değişimlere bağlı gelişen anemiler ve iltihabi yanıtla bağlı gelişen immün (bağışıklık) sistem hastalıkları ve enfeksiyon hastalıkları için önemli bir aday proteindir (Uysal 2007).

Nakil yapılan hastalardan bazılarında işlem başarılı olurken, bazılarının graft reddi, GvHH, ve enfeksiyonlar nedeniyle kaybedilmesi, yapılacak nakillerin de başarısını öngörmeyi engellemektedir. Bu farklı reaksiyonların mekanizmaları tam olarak aydınlatılamadığı için hastaların nakil sonrası prognozu önceden tahmin edilememektedir. Bu nedenle son zamanlardaki araştırmalar, başta GvHH olmak üzere bu tür reaksiyonların mekanizmasını anlamaya yönelmiştir (Vogelsang, Lee and Bensen-Kennedy. 2003).

Nakil sonrası gelişen enfeksiyonlar, graft reddi ve GvHH gibi reaksiyonların en önemli ortak noktası, hematopoetik kök hücrelerden köken alan immün sistem hücrelerinin bu süreçlerde kilit rol almasıdır. Ayrıca, nakil sonrasında hematopoezin yeniden başlaması, demir metabolizmasında da kısa sürede büyük değişikliklerin oluşmasına yol açmaktadır (Ganz 2003). Bu nedenle, immün uyarılara ve demir birikimine duyarlı bir akut faz proteini olan hepsidinin, hematopoetik kök hücre nakillerindeki davranışı incelenmesi gereken bir konudur.

Karaciğer tarafından 64 aminoasidlik bir prohormon olarak salınan prohepsidin, proteolitik kesim ile 39 aminoasidlik bir inaktif parça ve 25 aminoasidlik aktif bir parçaya ayrılır (Frazer DM and Anderson GJ 2009). Asıl aktif kısım olan 25 aminoasidlik parça aktif hepsidin olarak çalışır. Bu aktif parçanın, farklı uzunlukta 25, 22 ve 20 aminoasidlik çeşitleri (Hep25, Hep22 ve

Hep20) tanımlanmıştır. En aktif biçimi olan hepsidin-25, küçük bir peptid olduğu için bu peptide karşı antikor üretmek uzun bir zaman mümkün olmamıştır (Ganz ve Nemeth 2006, Kemna, Tjalsma, Willems, Swinkels 2008). Bu nedenle hepsidin ile ilgili çalışmalarda, 25 aminoasidlik hepsidin yerine genellikle 64 aminoasidlik prohepsidin incelenmiştir. Tez çalışmasında da, serum ve idrardaki hepsidin düzeyini ölçmek için kullanılan ELISA kiti, prohepsidine özgüdür.

Tez çalışmasında, tanıları farklılık gösteren 10 pediatrik hastanın serum ve idrarlarında nakil öncesi ve sonrası prohepsidin düzeyleri ölçüldü ve IL-6 ve TNF-alfa gibi diğer immün düzenleyicilerin düzeyleri ile karşılaştırıldı.

TNF-alfa ve IL-6 düzeylerine paralel olarak, serum prohepsidin düzeyinin nakil sonrasında artış gösterdiği ve bu artışın nakil öncesine göre hastanın taburcu olduğu dönemde istatistiksel olarak anlamlılık kazandığı gözlenmiştir (Şekil 6a). Nakil öncesine göre nakil sonrası TNF-alfa ve IL-6 düzeylerinde de kademeli bir artış gözlenmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 7). IL-6 ve TNF-alfa düzeylerindeki artışın anlamlı bulunmaması, her ikisinin de sitokin niteliğinde olması ve düzeylerinin normal dağılım göstermemesi ile açıklanabilir (Tablo 7 b ve c) (Güneri ve ark.1997).

Antimikrobiyal bir peptid olmasından dolayı prohepsidinin nakil sonrasında gösterdiği artışın, enfeksiyonlara bağlı olması da olasıdır. Bu olasılığı test etmek için, doku yaralanması veya enfeksiyona yanıt olarak IL-6 uyarısıyla karaciğerden üretilen bir akut faz proteini olan CRP düzeyleri incelendi. CRP düzeyindeki artış inflamasyonun klasik bir bulgusudur (Tünger 2007). Ng ve arkadaşları neonatal sepsis tanısında IL-6, TNF-alfa, CRP ve E-Selektin düzeylerinin duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında çok erken fazda IL-6'nın en yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ancak yarılanma ömrünün çok kısa olması nedeniyle 24 saat içinde normal değerlere döndüğünü, 24-48 saat içinde ise %84 duyarlılık ile en iyi göstergenin CRP olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da, istatistiksel olmasa da nakil sonrası aşamalarda CRP düzeyinin arttığı görülmüştür (Şekil 7c).

Klinik bulgularda hastalarımızın enfeksiyon belirteçlerinin de pozitif olması bu artışın enfeksiyona bağlı olduğunu düşündürmektedir.

İnsan karaciğer hücre kültürleri, fareler ve gönüllülerle yapılan bir çalışmada IL-6'nın enflamasyon sırasında hepsidin üretimi için gerekli bir sitokin olduğu ve IL-6 –hepsidin aksının inflamasyondaki hipoferremiden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Lee, Peng, Gelbart, Wang, Beutler 2005). Bu çalışmada da olduğu gibi, bir akut faz proteini olmasından dolayı serum düzeyleri normal dağılıma uyan (Tablo 7a) prohepsidindeki anlamlı artış, aslında TNF-alfa ve IL-6'daki artışın (Şekil 7a ve b) da istatistiksel olmasa da biyolojik olarak anlamlı olabileceğini akla getirmektedir. Prohepsidin üretiminin TNF-alfa ve IL-6 tarafından düzenleniyor olması, bu görüşü desteklemektedir (Ludwiczek et al 2003, Uysal 2007).

Nakil sonrası serum prohepsidin düzeyindeki artışın, demir metabolizma değişikliklerine de bağlı olabileceği için, nakil öncesi ve nakil sonrası hematokrit değerleri de incelendi. Nakil sonrası aşamalarda hematokrit değerinde anlamlı bir düşüş gözlenmesine rağmen, serum prohepsidin düzeyi ile aralarında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir ($p>0,05$). Hematokrit değerinin, nakle bağlı değişen eritopoezden doğal olarak etkilenmesi beklendiğinden dolayı, demir hemostazını sağlıklı bir biçimde yansıtmayacağı söylenebilir. Bu nedenle; ferritin, demir, demir bağlama kapasitesi gibi demir metabolizmasının daha spesifik parametrelerinin ölçüldüğü, ya da talasemi gibi homojen bir hasta grubunu kapsayan benzer bir çalışma daha aydınlatıcı olacaktır.

Çalışmamızda, prohepsidin ile sitokinler arasında, dört aşamada da olacağı varsayılan korelasyon gözlenememiştir. Dört aşamadan üçünde korelasyon gözlenen ölçümler; nakil öncesi, engrafman sonrası ve taburculuk dönemi serum prohepsidin düzeyi ile CRP düzeyleri arasındadır (Şekil 8). Bir ya da iki aşamada gözlenen korelasyonlardan (Şekil 9) ise prohepsidin ile ilgili olanların sınırda anlamlı olmaları, literatürlerde gösterilen ilişkiyi desteklemek için bu bulguların yeterli olmayacağını akla getirmektedir. Ancak, nakil hastalarında enfeksiyon açısından prohepsidinin tanı metodu olarak kullanılıp kullanılamayacağının

anlaşılması için daha geniş ve homojen hasta gruplarında çalışılması uygun olabilir. Nemeth ve arkadaşları özellikle kronik enfeksiyon ve ağır enfeksiyon olgularında idrarda hepsidin düzeylerini incelemiş ve hafif olgulara göre daha ağır enflamasyon bulgusu olanlarda hepsidin düzeylerinde 100 kata varan farklılıkları saptamışlardır (Nemeth ve ark. 2003). Çalışmamızda kullandığımız hastalar, demir yüklenmesi ve enfeksiyon bulguları dikkate alınarak seçilmiş homojen bir grup olmadığı için, Nemeth ve arkadaşlarının bulguları ile paralel bulgular elde edilememiştir.

Nakil sonrasında klinik gidişatı kötü olan ve taburcu edilmeden kaybedilen 2 hastada serum prohepsidin düzeyinin düşüş eğilimi göstermesi ve nakilde başarı sağlanan hastalarda serum prohepsidin düzeyinin nakil sonrasındaki bir aşamada artış göstermesi (şekil 10), serum prohepsidin düzeyindeki artışın, nakil sonrası sağkalım ile ilişkili olabileceğini de akla getirmektedir. şekil 10-a'daki "YAS" kodlu hastanın klinik durumu, nakil sonrası dönemde düzelme göstermiş, taburcu olduktan sonra ise klinik durumu kötüye gitmiş ve nakilden 3 ay sonra intestinal GvHH nedeniyle kaybedilmiştir. Bu nedenle bu hasta, nakil sonrası sağ kalım gösteren hastalar arasında değerlendirilmiştir.

Donör ve hasta arasındaki HLA doku uyumu tam olsa da, allojenik nakillerde iki farklı kişiye ait hücrelerin karşılaşması nedeniyle az ya da çok, immün sistemde bir uyarılma olmaktadır. İmmün sistemdeki bu uyarılma, sitokinlerin salınımında büyük değişiklikler şeklinde kendini gösterir (Tanaka et al 1994, Chasty, Lamb, Gallati, Roberts, Brenchley and Liu Yin. 1993). Çalışmamızda, nakil sonrasında serum prohepsidin düzeyinde gözlenen artışın da, yabancı dokuların (konak-graft) karşılaşması sonucu gelişen bir immün reaksiyondan kaynaklanıyor olma olasılığını dikkate alarak, yapılan 10 nakil, otolog ve allojenik olarak değerlendirildi (şekil 11). Allojenik nakil yapılan 8 hastada olduğu gibi otolog nakil yapılan 2 hastada da benzer bir artışın görülmesi, prohepsidin düzeyindeki söz konusu artışın; graft ve konak arasındaki bir immün çatışmanın göstergesi değil, konağa ait immün sistemin graft hücreleri tarafından yeniden inşasının bir göstergesi olabileceğini düşündürmektedir (Holler et al 1990).

Bunun yanında hasta grubumuz heterojen bir grup olmasına karşın hastalıkları nedeniyle hepsinde anemi görülmektedir. Yapılan araştırmalarda da IL-6 ve diğer sitokinlerle hepsidinin arttığı hemoglobin sentezi ve eritropoez için kullanılacak demiri, demir emilimini engelleyerek sistemde demir blokajı yaparak azalttığı, bütün durumlarda anemi olduğu klinik olarak gösterilmiştir (Wrighting, Andrew, Lichtman 2003, Falzacappa, Spasic, Kesler, Stolte, Henze 2007). Çalışmamızda serum prohepsidin ve hematokrit arasında korelasyon gözlenmemiştir. Ancak, bazı hastalarda serum prohepsidindeki artışa hematokritteki düşüşün eşlik ettiği grafiklerde görülebilmektedir (Şekil 12) Bu da, hepsidin düzeyinin anemi ile ilişkili olduğu yönündeki literatürleri destekler niteliktedir. Kemna ve arkadaşları 2005 yılında 10 sağlıklı gönüllüye lipopolisakkarid enjeksiyonu yaparak oluşturdıkları in vivo insan endotoksemi modelinde, enjeksiyon sonrası 3 saatte IL-6 düzeylerinin, 6 saatte idrar hepsidin düzeylerinin arttığını, bunu takiben serum demir düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gözlemlemiştir (Kemna, Pickkers, Nemeth, van der Hoeven, Swinkels 2005). Benzer şekilde, idrar prohepsidin düzeyi ile hematokrit değeri arasında zayıf bir korelasyon (Şekil 9f) gözlenirse de, ELISA yönteminde kullanılan antikorun aktif hepsidine özgü olmaması nedeniyle bu korelasyonun, literatürlerde bildirilen ilişkiyi yansıtmayabileceği düşünülmüştür (Ganz 2005).

Hematopoetik kök hücre nakillerinin zor ve uzun süreçlerden oluşması nedeniyle tez kapsamında 10 hasta çalışılabilinmiştir. Tez çalışmasının başladığı tarihe kadar hepsidine özgü ELISA üretilmediği için de, prohepsidin düzeylerine bakılmıştır. Akut faz proteini olduğu için hepsidinin, belirli uyarılar karşısında kısa zamanda etki göstermesi gerekmektedir. Karaciğer tarafından sentezlenmesi zaman alan hepsidin, bu nedenle inaktif olarak seruma salınır. Serumda inaktif öncül prohormon (prohepsidin) olarak bulunan hepsidinin, kısa sürede aktif hepsidin-25'e (Hep-25) dönüşmesi, proteolitik kesilme ile gerçekleşmektedir (Ganz and Nemeth 2006, Kemna et al. 2008). Bu nedenle serum prohepsidin düzeyi, serumdaki hepsidin aktivitesini doğrudan yansıtmamaktadır. Hepsidin aktivitesini göstermese de, serum prohepsidin düzeyinde gözlenen artış, IL-6 ve TNF-alfa ile paralellik gösterdiği için, prohepsidin sentezinin nakil sonrasında arttığı sonucuna

varılabilir. İleride benzer bir çalışmanın aktif hepsidin düzeyi ile de tekrarlanması, daha güvenilir sonuçlar sağlayacaktır.

Aktif hepsidin yerine öncül prohepsidin ve inaktif peptidi ölçülmüş olması dışında, bu çalışmada kullanılan hasta sayısının az olması, otolog ve allojenik nakil sayılarının eşit olmaması ve heterojen bir hasta grubunun kullanılmış olması, istatistiksel analiz ve yorum yapmayı güçleştirmektedir. Ancak, ele alınan hasta grubunun toplanması zor olan kök hücre nakli hastalarından oluşması ve hastalıktan bağımsız olarak serum prohepsidin düzeyinin kök hücre nakline bağlı değiştiğini göstermemesi nedeniyle, sonraki çalışmalara öncülük edebilecek bir ön çalışma olabilir.

6. KAYNAKLAR

- 1- Alter BP, Young NS, Nathan DG, Oski FA. . (1993). The bone marrow failure syndromes İn: *Hematology of infancy an Childhood*. Eds: Nathan DG; Oski FA 4 th ed.Philadelphi, W.B Saunders CO. 316-316.
- 2- Aria S, Klingemann HG (2003). Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Archives of Medical Research*, Vol 34, Issue 6.
- 3- Anak S. (2003). Kemik iliği transplantasyonu. İ.Ü.İ.Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitabı.(487-488).
- 4- Anak S, Kansoy S, Ertem M, Çetin M. (2001-2002). Çocukluk çağı hastalıklarında ulusal kemik iliği transplantasyon endikasyonları. Pediatrik Hematoloji Derneği Pediatrik KİT Alt Komitesi.
- 5- Andrews N C. (1999) The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem Cell Biol*; 31: 991-4.
- 6- Armitage JO. (1994). Bone Marrow Transplantation *N Engl J Med*; 330(12):827-838,
- 7- Başol G, Barutçuoğlu B, Bozdemir AE. (2007). Demir Homeostazının Yeni Düzenleyicisi Hepsidin. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 5(3): 117-125.
- 8- Baştürk B, Evke E, Karakuş S, Tunalı A. (2005). Interlökin 10 gen polimorfizmi akut miyeloid lösemi gelişiminde bir risk faktörü olabilir. *THOD Sayı / Number:2 Cilt / Volume:15*
- 9- - Chasty RC, Lamb WR, Gallati H, Roberts TE, Brenchley PEC and Liu Yin JA. (1993) Serum cytokine levels in patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 12, 331-336.
- 10- Dilek İ, Üstün C, Gürman G. (1998). Hematopoietik kök hücre transplantasyon sonrası immünizasyon. *Van Tıp Dergisi* (2):114-119,.
- 11- Dinarello CA. (2003) Anti-cytokine therapeutics and infections *Vaccine*, Volume 21, Supplement 2, 1 June, Pages S24-S34
- 12- Engels EA, Ellis CA, Supran SE, Schmid CH, Barza M, Schenkein DP, Koc Y, Miller KB, Wong JB. (1999). Early infection in bone marrow transplantation: quantitative study of clinical factors that affect risk. *Clin Infect Dis*. Feb;28(2):256-66.
- 13- Falzacappa M V V, Spasic M V, Kesler R, Stolte J, Henze M V (2007); Muckenthaler M V: STAT 3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory. Stimulation. *Blood*. 109 :353-358 ,.
- 14- Filipowich AH. (2009). Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology*

- 15- Flanagan JM, Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler E. (2007). In vivo imaging of hepcidin promoter stimulation by iron and inflammation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases. Volume 38, Issue 3, Pages 253-257*
- 16- Foster I. (2006) The role of stem cell transplantation in the management of Non-Hodgkin's lymphoma *Radiography*, Volume 12, Issue 3, Pages 203-208
- 17- Frazer DM and Anderson GJ. (2009). Hepcidin compared with prohepcidin: an absorbing story. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 89: 475-6
- 18-Gaman A, Gaman G, Bold A. (2009). Acquired aplastic anemia: correlation between etiology, pathophysiology, bone marrow histology and prognosis factors. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 50(4): 669-674.
- 19- Ganz T. (2003). Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*; 102 (3) : 783-8.
- 20- Ganz T. (2005) Hepcidin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Practice and Research Clinical Haematology*;18(2): 171-82.
- 21- Ganz T. (2006) Hepcidin and Its Role in Regulating Systemic Iron Metabolism. *Hematology*; 29-35.
- 22- Glanz A, Fraser FC. (1982). Spectrum of anomalies. in Fanconi's anemia. *Journal of Medical Genetics*. 19: 412-416.
- 23- Ganz T, Nemeth E. (2006). Regulation of iron acquisition and distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 1763(7): 690-9.
- 24- Gündüz A, Er H. (2000). Sitokinler ve Oftalmolojideki Yerleri. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol*. 9:53-58.
- 25- Güneri İ, Özmen D, Bayındır O. (1997). Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*. 17.65-74.
- 26- Holler E, Kolb HJ, Moeller A, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H, Lehmacher W, Ruckdeschel G, Gleixner B, Riedner C, Ledderose G, Brehm G, Mittermueller J And Wilmanns W. (1990). Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood*, 75, 1011-1016.
- 27- Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*.; 277(40): 37597-603.
- 28- Kearney SL, Nemeth E, Neufeld EJ, Thapa D , Ganz T , Weistein DA , Cunningham MJ. (2007) Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr Blood Cancer*.; 48 (1) : 57-63.

- 29- Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. (2005) Time- course analysis of hepcidin, serum iron and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*; 106(5): 1864-6.
- 30- Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. (2008). Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*. Jan; 93(1): 90-7.
- 31- Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters* 480:147-50.
- 32- Kutanis A. (2005). Çocukluk Çağı Akut Lösemi Vakalarının Retrospektif Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul. (Danışman: Başhekim Dr. Hüseyin Aldemir)
- 33- Lanzkowsky P. (Ed) (1999). Leukemias. San Diego: Academic press, 359-411.
- 34- Leather HL., Wingard JR. (2001). Infections Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation *Infectious Disease Clinics of North America*, Volume 15, Issue 2, 1 June, Pages 483-520
- 35- Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* Feb. 8;102(6):1906-10.
- 36- Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. (2003) Cytokine mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*; 101: 4148-54.
- 37- Neimeyer CM, Sallan SE. (1993). Acute Lymphoblastic leukemia in: *Hematology of Infancy and Childhood II*. Eds: Oski FA, Nayhan DG Philadelphia, Saunders. 1249-1353.
- 38- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. (2003) Hepcidin a putative mediator of anemia of inflammation is a type II acute-phase protein. *Blood*; 100(7): 2461-3.
- 39- Ng PC, Cheng SH, Chui KM. (1997). Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecules and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child*. 77:F221-7.
- 40- Ören H. (2007). Hemofagositik Sendrom. *Türk Çocuk Hematoloji Dergisi*. 1(4):7-13
- 41- Özkan A. (2005). Çocuk çağı lenfomaları. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Hematolog Olmayanlar için Hematolojik Maligniteler Sempozyum Dizisi No:45 Kasım; s:161-170
- 42- Özsan GH. (2007). Akut Lenfoblastik Lösemi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 3(2) : 20-22

- 43- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. (2001). Hecpidin, a Urinary Antimikrobiai Peptid Syntheized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(11) : 7806-10.
- 44- Patestos NP, Haegeman G, Vandevoorde V, Fiers W. (1993) Activation of the nuclear factor kappa B is not sufficient for regulation of tumor necrosis factor-induced interleukin-6 gene expression. *Biochimie*. 75(11):1007-18
- 45- Poplack DG, Morgalin.(1997). Management of common cancers of childhood. In *Principles and Practice of Pediatric Oncology I*. Ed: Poplack DG, Philadelphia: Saunders,409-504.
- 46- Pregion C, Ilyin G, Courselaud B, et al.(2001). Anew Mouse liver-specifregene, encoding aprotein homologousto human antimicrobial peptide hecpidin is over expressed during iron overload. *Journal of Biological Chemistry*. 276:7811-9.
- 47- Sağnak N. (2008) Preoperatif Oral Karbonhidrat Solüsyonu Kullanımının Stres Yanıtı Etkisi. Uzmanlık Tezi. İstanbul, Danışman: Uzm. Dr.Gülsüm Oya Hergünsel
- 48- Soysal T. (2005) ;Hematolojik Malignitelerde Kök Hücre Destekli Yüksek doz Tedaviler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Hematolog olmayanlar için Hematolojik Maligniteler. Sempozyum Dizisi No: s.93-101.
- 49- Şenel F. (2002). Kök Hücreler. *Bilim ve Teknik-Yeni Ufuklara-*. Şubat (ücretsiz eki).
- 50- Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Kobayashi S, Hashino S, Kobayashi H, Sakurada K, Miyazaki T.(1994). Cytokine gene expression in the mixed lymphocyte culture in allogenic bone marrow transplants as a predictive method for transplantation-related complications. *Br J Haematol*. Jun;87(2):415-8
- 51-Theurl I, MattleV, Seifert M, Mariani M, Marth C and Weiss G (2006). Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood*; Vol 107, No 10, pp 4142-4148.
- 52- Tünger Ö. (2007). Sepsisin Tanı ve İzleminde Prokalsitonin, CRP ve Diğer Göstergeler. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.
- 53- Ural AU. (2006). Kök Hücreler.*TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*. Cilt:5,sayı 3-4
- 54- Uysal Z. (2007) Hepsidin ve Demir Metabolizması. 33. Ulusal Hematoloji Derneği Kongresi 6. Hematoloji İlk Basamak Kursu Eğitim Kitabı , (17-18-19).
- 55- Vogelsang GB, Lee L and Bensen-Kennedy DM. (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant, *Annual Review of Medicine* 54, pp. 29–52.

- 56- Whang CQ, Udopa KB, Lipschitz DA. (1995) Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol*; 162: 134-8.
- 57- Wrighting DM, Andrew H, Lichtman (2003) Cellular and Molecular Immunology 5th Ed. Saunders. 243-275.
- 58- Yalman N. (2003). İ.Ü.İ.Tıp Fak. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitabı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ders Kitabı. 444-445
- 59- Yalman N, Sarıbeyoğlu E. (2003). İ.Ü.İ.Tıp Fak. Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitabı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ders Kitabı. 476-477.
- 60- Yılmaz MÇ. (2004). Pediatrik hastalarda periferik kök hücre nakli uygulamaları ve hemşirelik bakımı.XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı..
- 61- Zhong Y. (2006) Non-Hodgkin Lymphoma: What Primary Care Professionals Need to Know *The Journal for Nurse Practitioners*, Volume 2, Issue 5, Pages 309-338

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Meral	Soyadı	Akbıyık (Dinç)
Doğum Yeri	Doğanhisar	Doğum Tarihi	01.01.1966
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	32023437464
E-mail	meral-akbiyik@hotmail.com	Tel	0534 635 68 12

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1990-1991
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	7.1.1. Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Biyolog	İ.Ü.İ.Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. A.B.D. Hematoloji /Onkoloji B.D. KİT Ünitesi	2004-Halen çalışmaktayım
	Biyolog	İ.Ü. İ.Tıp Fak. İç Hastalıkları Merkez Acil Lab	2002 - 2004
	Biyolog	İ.Ü. İ.Tıp Fak. Acil Dahiliye Lab. Sorumlusu	1992 – 2002
	Biyolog	İ.Ü. İ.Tıp Fak. İç Hastalıkları Poliklinik Lab	1990 - 1992

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	zayıf	orta

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Excel	iyi
Microsoft Word	iyi
Microsoft Power Point	iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

8. EKLER

8.1. Ek 1: Bilgilendirilmiş Hasta Onam Formu

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Biyolog Meral AKBIYIK (DİNÇ)



Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

8.2. Ek 2: Etik Kurul Kararı



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 16/04/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 4

Sorumlu araştırmacılığını Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D Hematoloji/Onkoloji Bilim Dalı Kemik İliği Ünitesi Öğretim Üyesi Prof.Dr.Sema ANAK'ın, üstlendiği Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard.Doç.Dr.Bahar GÖKER'in tez danışmanlığını üstlendiği Biyolog Meral AKBIYIK (DİNÇ)'in yürüteceği 2008/918 dosya no'lu "Kemik İliği Nakli Yapılan Pediatrik Hastalarda Nakil Öncesi ve Nakil Sonrası Serum Hepsidin, IL-6 ve TNF-ALFA Düzeylerinin Enfeksiyonla İlişkinin Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN (Katılmadı)

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ (Katılmadı)

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU (Katılmadı)

Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR

Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D.

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)

Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR (Katılmadı)

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER (Katılmadı)

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek Temiz ÖZBEK

Hukukçu

8.3. Ek 3: Test Çalışma İzin Belgesi



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya Anabilim Dalı



Sayı: 111

Tarih: 24.03.2008

Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Fakültemiz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı kemik iliği ünitesinde görevli Yüksek Lisans öğrencisi Meral Akbıyık (DİNÇ)'in "Kemik iliği nakli yapılan pediatrik hastalarda nakil öncesi ve sonrası serum hepsidin, IL-6 ve TNF alfa düzeylerinin enfeksiyonla ilişkinin belirlenmesi" başlıklı tezi için gerekli olan hepsidin, IL-6 ve TNF-alfa analizlerinin Anabilim Dalımızda yapılması uygundur.

Saygılarımla arz ederim.

Prof. Dr. Müjdat Uysal
Biyokimya Anabilim Dalı
Başkanı