

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI GÖNÜLLÜ VERİCİLERDE G-CSF UYGULANMASI VE KÖK
HÜCRE AFEREZİ İŞLEMİNİN İNFLAMATUAR BELİRLEYİCİLER,
OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem İLHAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Hatice PAŞAOĞLU

ANKARA
Haziran 2012

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SAĞLIKLI GÖNÜLLÜ VERİCİLERDE G-CSF UYGULANMASI VE KÖK
HÜCRE AFEREZİ İŞLEMİNİN İNFLAMATUAR BELİRLEYİCİLER,
OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem İLHAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Hatice PAŞAOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 01/2011–46 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Haziran 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 04/07/2012


Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Gülsan TÜRKÖZ SUCAK
Gazi Üniversitesi


Prof. Dr. Neslihan BUKAN
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
GRAFİKLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.2. Kök Hücre Türleri	4
2.2.1. Totipotent Kök Hücre	4
2.2.2. Pluripotent Kök Hücre	5
2.2.3. Multipotent Kök Hücre.....	5
2.2.3.1. Erişkin Kök Hücreler	5
2.2.3.1.1. Hematopoetik Kök Hücreler	7
2.3. Hematopoetik Kök Hücre Kaynakları	7
2.3.1. Kemik iliği.....	8
2.3.2. Kordon Kanı.....	8
2.3.3. Periferik Kan	9
2.4. Hematopoetik Kök Hücre Nakli Çeşitleri	9
2.4.1. Singenik	9
2.4.2. Otolog	9
2.4.3. Allojenik	9
2.5. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli.....	10
2.6. Sağlıklı Vericilerden Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Toplanması	11
2.6.1. Kök Hücre Mobilizasyonu	11
2.6.1.1. G-CSF (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör).....	11

2.6.1.1.1. G-CSF Etkisi ile Hematopoetik Kök Hücrelerin Mobilizasyonu	13
2.6.2. Kök Hücre Toplanması (Aferez).....	14
2.6.2.1. Toplama Zamanı.....	17
2.7. Yan Etkiler	17
2.7.1. Mobilizasyona Bağlı Yan Etkiler.....	17
2.7.2. Afereze Bağlı Yan Etkiler	18
2.7.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	19
2.7.3.1. Serbest Radikal Türevleri.....	22
2.7.3.1.1. Superoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	23
2.7.3.1.2. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	25
2.7.3.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	26
2.7.3.1.4. Hipoklorik Asit ($HOCl$)	26
2.7.3.1.5. Singlet oksijen (1O_2).....	27
2.7.3.1.6. Perhidroksil radikali ($OOH^{\cdot}$)	27
2.7.3.1.7. Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$)	27
2.7.3.1.8. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$).....	28
2.7.3.1.9. Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)	28
2.7.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu	29
2.7.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan Protein Oksidasyonu	31
2.7.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	33
2.7.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	36
2.7.5. İnflamatuar Mediyatörler ve Akut Faz Proteinleri	38
2.7.5.1. İnterlökin-6 (IL-6)	39
2.7.5.2. hs-CRP	39
2.7.5.3. Ferritin.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Çalışmaya Alınacak Donörlerin Belirlenmesi	42
3.1.1. Donörlerin Çalışmaya Alınma Kriterleri	42
3.1.2. Donörlerin Çalışmaya Alınamama Kriterleri	42
3.1.3. Örneklem	43

3.2. Donörlerin Mobilizasyonu	43
3.3. Aferez İşlemi (Allojenik Periferik Kök Hücre Toplanması)	44
3.4. Deneyler	44
3.4.1. Çalışmada Kullanılan Araçlar	44
3.4.2. Çalışmada Uygulanan Yöntemler	45
3.4.2.1. CD34+ Kök Hücre Sayım Protokolü.....	45
3.4.2.2. Serum Malondialdehit (MDA) Analizi	46
3.4.2.3. Serum İleri Oksidasuyon Protein Ürünleri (AOPP) Analizi	48
3.4.2.4. Serum Total Antioksidan Kapasite (TAK) Analizi	50
3.4.2.5. Serum Albümin, Total Protein (TP), Demir (SD), Demir Bağlama Kapasitesi (SDBK) Analizi.....	53
3.4.2.6. Serum Ferritin Analizi.....	54
3.4.2.7. Serum İnterlökin-6 (IL-6) Analizi	54
3.4.2.8. High Sensitive C-Reactive Protein (hs-CRP) Analizi	56
3.5. Verilerin Analizi	59
4. BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ	79
7. ÖZET	81
8. SUMMARY	83
9. KAYNAKLAR	85
10. EKLER	102
11. ÖZGEÇMİŞ	105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kök Hücrelerin Özellikleri

Şekil 2: Çeşitli Kök Hücre Tipleri

Şekil 3: Hematopoetik kök hücre

Şekil 4: İnsan G-CSF' nin moleküler yapısı

Şekil 5: HKH' lerin G-CSF ile mobilizasyonu

Şekil 6: Periferik kök hücre toplanması

Şekil 7: Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi

Şekil 8: ROS ve RNS' nin birbirleriyle etkileşimleri

Şekil 9: Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu

Şekil 10: Metallerin katalizlediği bölge spesifik protein oksidasyonu

Şekil 11: Memeli hücrelerinde antioksidan system

Şekil 12: Oksidan-antioksidan denge

GRAFİKLER LİSTESİ

- Grafik 1: Absorbansa karşı MDA konsantrasyonunun standart eğrisi
Grafik 2: Absorbansa karşı AOPP konsantrasyonunun standart eğrisi
Grafik 3: Absorbansa karşı TAK konsantrasyonunun standart eğrisi
Grafik 4: Absorbansa karşı IL-6 konsantrasyonunun standart eğrisi
Grafik 5: Absorbansa karşı hs-CRP konsantrasyonunun standart eğrisi
Grafik 6: Tüm gruplar için SD ortancaları grafiği
Grafik 7: Tüm gruplar için SDBK ortancaları grafiği
Grafik 8: Tüm gruplar için albümin ortancaları grafiği
Grafik 9: Tüm gruplar için ferritin ortancaları grafiği
Grafik 10: Tüm gruplar için IL-6 ortancaları grafiği
Grafik 11: Tüm gruplar için hs-CRP ortancaları grafiği
Grafik 12: Tüm gruplar için TAK ortancaları grafiği
Grafik 13: Tüm gruplar için MDA ortancaları grafiği
Grafik 14: Tüm gruplar için AOPP ortancaları grafiği

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Enzimatik antioksidanlar

Tablo 2: Nonenzimatik antioksidanlar

Tablo 3: Donörlere ait CD34+ hücre sayıları ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Tablo 4: Serum örneklerine ait istatistiksel sonuçlar ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Tablo 5: Donörlere ait SD düzeyleri ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Tablo 6: Donörlere ait SDBK düzeyleri ortanca (min-max) olarak Verilmiştir.

Tablo 7: Donörlere ait albümin düzeyleri ortanca (min-max) olarak Verilmiştir.

Tablo 8: Donörlere ait ferritin düzeyleri ortanca (min-max) olarak Verilmiştir.

Tablo 9: Donörlere ait IL-6 düzeyleri ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Tablo 10: Donörlere ait hs-CRP düzeyleri ortanca (min-max) olarak Verilmiştir.

Tablo 11: Donörlere ait TAK düzeyleri ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

Tablo 12: Donörlere ait MDA düzeyleri ortanca (min-max) olarak Verilmiştir.

Tablo 13: Donörlere ait AOPP düzeyleri ortanca (min-max) olarak Verilmiştir.

KISATMALAR

G-CSF: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
HKHN: Hematopoetik Kök Hücre Nakli
IV: İntra Venöz
SD: Serum Demir
SDBK: Serum Demir Bağlama Kapasitesi
Hs-CRP: Yüksek Duyarlı C- Reaktif Protein
IL-6: İnterlökin 6
AOPP: İleri Oksidasyon Protein Ürünleri
MDA: Malondialdehit
TAK: Total Antioksidan Kapasite
HKH: Hematopoetik Kök Hücre
GVHH: Graft Versus Host Hastalığı
HLA: Human Lökosit Antijen
MMP: Matriks Metaloproteinaz
PKHN: Periferik Kök Hücre Nakli
OKHN: Otolok Kök Hücre Nakli
AKHN: Allojenik Kök Hücre Nakli
HCT: Hematokrit
BK: Beyaz Küre
ACD-A: Asit Sitrat Dekstroz-A
İ.Ca: İyonize Kalsiyum
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
GSH: İndirgenmiş Glutasyon
RNS: Reaktif Nitrojen Türleri
MPO: Myeloperoksidaz
HOCl: Hipoklorik Asit
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
TCA: Trikloroasetik Asit

TBA: Tiobarbitürik Asit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler “kök hücreler” olarak bilinmektedir.

Hematopoetik kök hücreler; üzerinde en çok çalışılan ve tedavide yaygın olarak kullanılan erişkin kök hücrelerdir. Kendi kendini yenileyebilme ve bütün matür kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri vardır. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilebilirler.

Allojenik hematopoetik kök hücre nakli, malign veya malign olmayan hastalığı olanlara sağlıklı vericiden kemik iliği, kordon kanı veya granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ile mobilize periferik kan hematopoetik kök hücrelerinin verilmesi ile hastanın immün ve hematopoetik hücrelerinin yerini verici kökenli hücrelerin almasıdır. Hematolojik hastalıklar, immün yetmezlikler ve lösemilerde amaç, patolojik immüno-hematopoezin eradike edilmesi iken diğer malign olmayan hastalıklarda verici kökenli hücrelerden salınan çözünür faktör ve enzimlerin eksik olan faktörü yerine koyması ya da hasarlı hücrenin rejenerasyonuna katkıda bulunması hedeflenir. Hematopoetik kök hücre, kendini yenileme, prolifer ve diferansiye olma kapasitesi sayesinde hematopoetik sistemi ortadan kaldırılmış olan hastada hayat boyu verici orijinli sağlıklı hematopoez sağlayabilir. Başarılı bir nakil sonrası hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) yapılan hasta, hematopoetik hücreleri verici orijinli olan kimerik bir organizma haline gelir.

Kök hücrelerin mobilizasyonu (kemik iliğinden ayrılıp kana geçmeleri), klinikte kök hücre nakil hastalarına ve donörlerine verilen

G-CSF uygulamasıyla kolaylıkla gerçekleşir. G-CSF; granülosit seriyeye ait progenitör hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonlarını arttıran büyüme faktörüdür.

Sağlıklı donörlere hematopoetik kök hücre mobilizasyonu amacı ile G-CSF 10 µg/kg/gün 5 gün boyunca subkutan veya intravenöz (IV) verilerek 5 ve gerekirse 6. günlerde kök hücreler toplanmaktadır. G-CSF etkisi ile kemik iliğinden periferik kana salınan hematopoetik kök hücreler donörden aferez denilen işlemle toplanır. Aferez işleminde genel prensip; periferik kanın santrifüj edilmesi, hücrelerin yer çekiminin etkisiyle çökmesi, en altta kalan eritrosit tabakasının üzerindeki lökosit tabakasının dedektör tarafından tespiti ve ayrı bir torbaya toplanmasıdır.

Bu çalışma Ekim 2010 – Mart 2011 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kök Hücre Nakil Ünitesine başvuran 25 hastanın, yaşları 18–65 arasında değişen, 9 kadın ve 16 erkek, sağlıklı gönüllü kök hücre donörü ile yürütülmüştür. Çalışmada; G-CSF ile mobilizasyon işlemi öncesi, G-CSF ile mobilizasyonun 4. Günü (aferez işlemi öncesi), aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş ve dondurulmuş kan örneklerinden; serum albümin, serum demir(SD), serum demir bağlama kapasitesi (SDBK), ferritin, hs-CRP, interleukin-6 (IL-6), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasitesi (TAK) düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin sağlıklı donörlerde inflamatuvar belirteçler, oksidatif stres ve antioksidan kapasite üzerine etkileri irdelenmek istenmiştir.

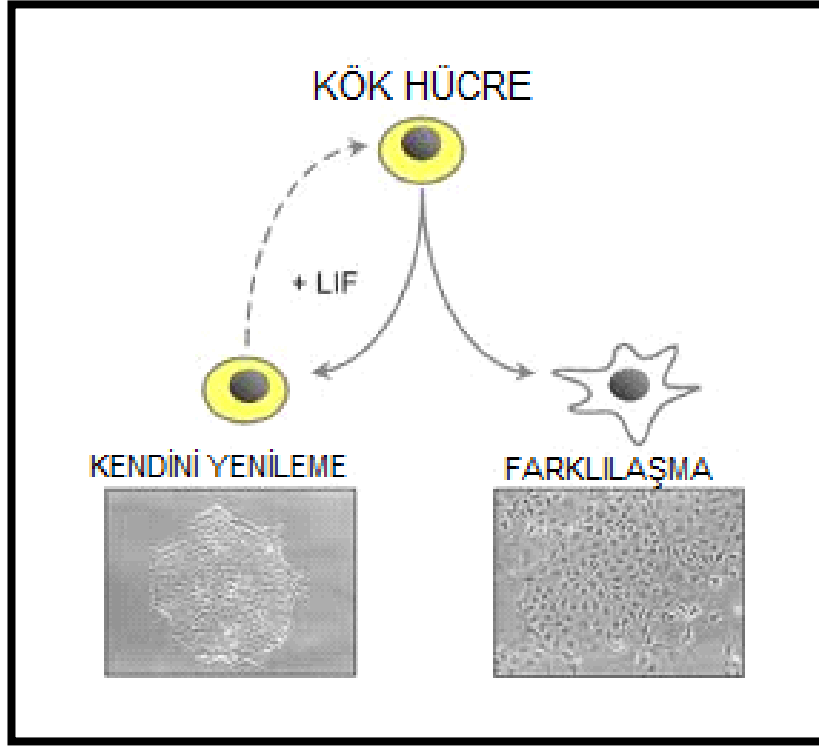
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Organizmayı oluşturan hücreler çoğalma, bölünme ve büyüme özellikleri açısından birbirlerinden farklılıklar göstermektedirler. İleri farklanma gösteren eritrositler ve sinir hücrelerinin bölünmedikleri kabul edilir ve bu hücreler post mitotik hücreler olarak tanımlanır. Bazı hücreler, uygun sinyaller ile uyarıldıklarında bölünmek üzere sessiz kalırlar. ¹

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler “kök hücreler” olarak bilinmektedir. Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (selfrenewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (Şekil 1). ²

Yapılan çalışmalar sonunda, bir dokudan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam şartlarında, uygun uyarılarla farklı doku hücrelerine dönüşebilme yetenekleri gösterilmiştir. Bu kavram *plastisite* (*transdiferansiyasyon*) olarak tanımlanmıştır. ³



Şekil 1: Kök Hücrelerin Özellikleri ⁴⁸

2.2. Kök Hücre Türleri

Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında tanımlanmaktadır (Şekil 2). ⁴

2.2.1. Totipotent Kök Hücre :

Totus-Tam, bölünmemiş; *Potentia*-Güç. Fertilizasyon ile spermium ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücredir. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamında “*totipotent hücre*” denir. Bu terim embriyonun 5. gününe kadar olan tüm blastomerleri için geçerlidir (erken embriyonik dönem). Tam ve işlev gören bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler. Plasenta ve amniyon kesesi gibi embriyo dışı dokulara da

farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Totipotent hücreler gelişmenin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilirler.⁵

2.2.2. Pluripotent Kök Hücre :

Fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminde 5. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Blastosist; trofoblastik hücreler, blastosöl ve iç hücre kitlesi olmak üzere 3 yapıdan oluşmuştur. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler *pluripotent kök hücreler* olup, gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptir; ancak işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar.⁵

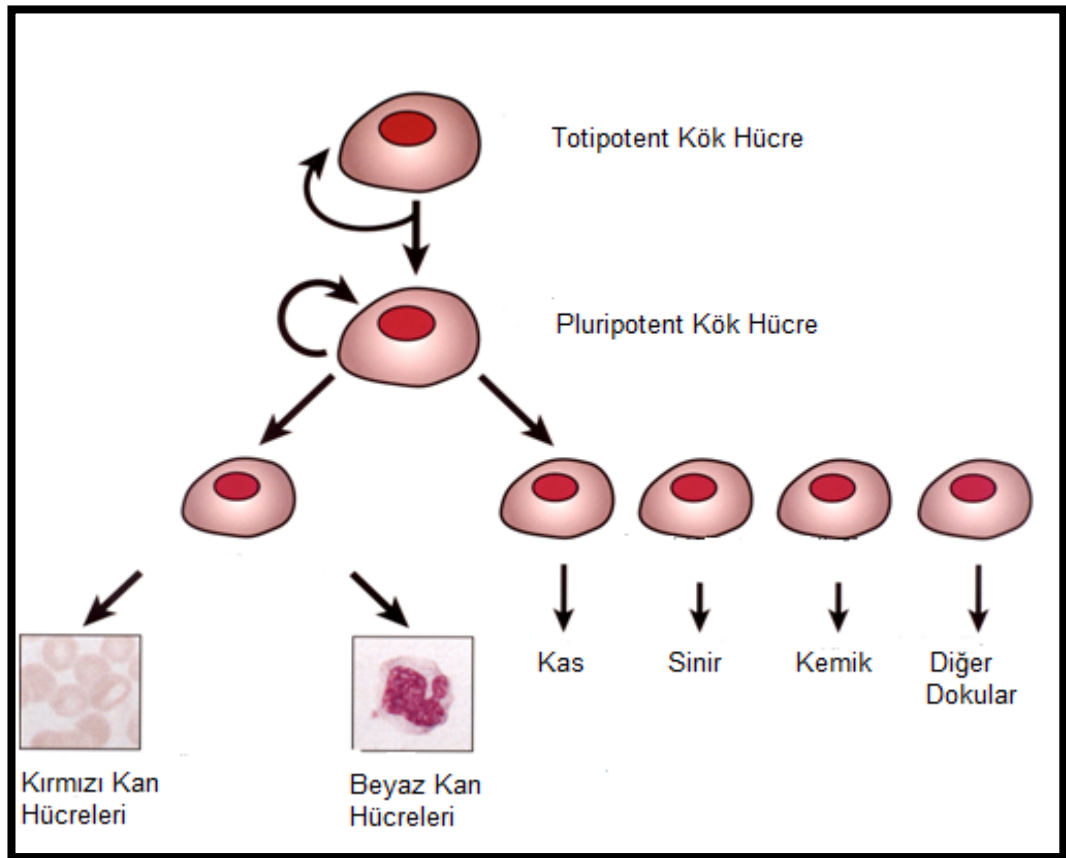
2.2.3. Multipotent Kök Hücre:

Bu hücreler, embriyonik gelişmenin daha ileri evresine ait hücreler olup, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Erişkin kök hücreleri de, bulundukları dokunun hücre tipini üretirler. Örneğin, multipotent bir kan hücresi, özelleşmiş kan hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Multipotent hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar.⁵

2.2.3.1. Erişkin kök hücreler:

Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir. Bu hücrelerin, vücut dışında embriyonik kök hücreler kadar uzun süre özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri

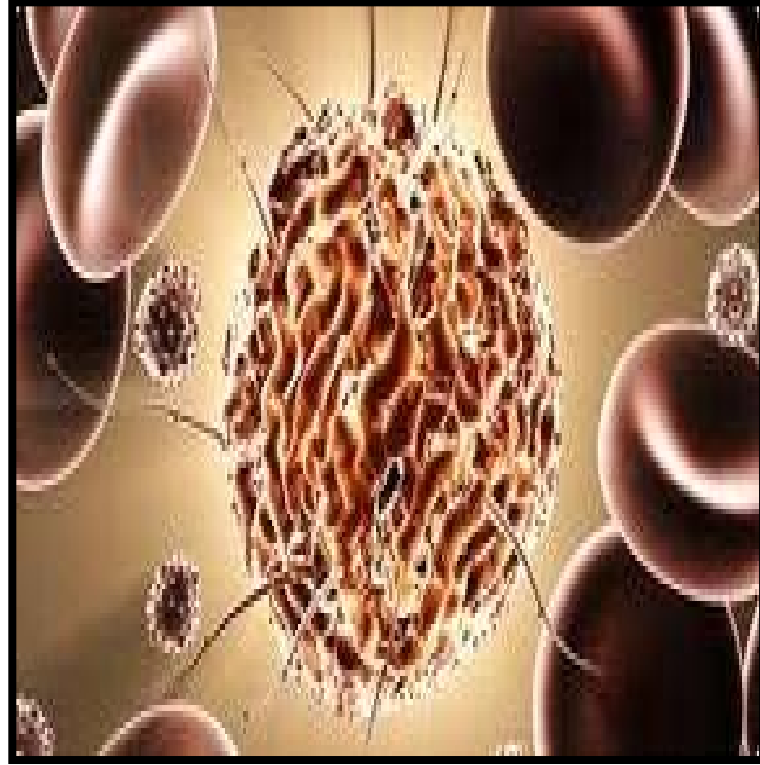
yoktur. Kişinin immün sistemine uyum gösterirler, ancak tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için kullanımları sınırlıdır. Günümüzde, erişkin kök hücrelerin diğer organ ve dokulara farklılaşması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Organizmada ancak belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen erişkin kök hücreleri, laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne dönüşebilmektedirler. En iyi tanımlanmış embriyonik olmayan kök hücreler hematopoetik kök hücreler olmakla birlikte, erişkin kök hücrelerin beyin, barsak, kas, deri/kıl follikülü, kalp, akciğer ve son zamanlarda meme bezi gibi çeşitli doku ve organlarda varlığı gösterilmiştir, hücresel fenotipik yüzey belirteçleri ile ayırt edilebilmektedirler. Erişkin kök hücrelerin fizyolojik işlevi doku homeostasisini sağlamakla birlikte doku hasarından sonra rejenerasyonu sağlarlar.⁶⁻¹²



Şekil 2 : Çeşitli Kök Hücre Tipleri ⁴

2.2.3.1.1. Hematopoetik Kök Hücreler (HKH):

 zerinde en çok çalışılan ve tedavide yaygın olarak kullanılan erişkin kök hücrelerdir (şekil 3).^{6,7} Kendi kendine yenileyebilme ve bütün matür kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri vardır. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilebilirler. Yüzey belirteçleri başlıca, CD34, CD14, CD45 ve CD133'd r. İntrensek ve ekstrensek sinyaller ile farklılaşmaları düzenlenmektedir.^{6,7}



şekil 3: Hematopoetik Kök H cre⁵⁰

2.3. Hematopoetik Kök Hücre Kaynakları

Hematopoetik kök hücre kaynakları; kemik iliği, periferik kan, kord kanıdır.

2.3.1. Kemik İliği:

Kemik iliği, kemiklerin içini dolduran yumuşak ve süngerimsi dokudur. Kök hücre naklinde ilk kullanılan kaynak kemik iliğidir. Genel anestezi altında özel aspirasyon iğneleri ile posterior iliak kemiğinden (genelde tercih edilen kaynak olarak) aspire edilerek toplanan ürünün içinde hematopoetik kök hücrelerin (HKH) yanı sıra stroma hücreleri, kan progenitor hücreleri, olgun lökosit ve eritrositler de bulunur. Kemik iliği toplanması işlemi yeni yapılmaya başlandığı zamanlarda, kemik iliği sıklıkla posterior ve anterior iliak çıkıntı ve sternumdan toplanmaktaydı. Günümüzde posterior iliak çıkıntından toplanan kemik iliğinin doz açısından yeterli olduğu anlaşılmış ve kemik iliği toplanması için bu bölgenin kullanılmasına başlanmıştır.¹³⁻¹⁵

2.3.2. Kordon Kanı:

Kordon kanı, hematopoetik kök hücrelerden zengin olmasına rağmen yıllarca ihmal edilmiş önemli bir kaynaktır. Kordon kanı, kemik iliği gibi hematopoetik kök hücrelerden çok zengin bir kaynaktır. Hatta bu hücrelerin proliferasyon hızı perifer kandakilerden daha yüksektir. Hücre sayıları erişkindekine benzer olmakla birlikte hücrelerin çoğu immatürdür ve sitokin yapımı düşüktür. Yeni doğanın, bağışıklık sistemi henüz şekillenmediği için kordon kanı verilen hastada uyum daha kolay olur. Bu nedenlerden dolayı kordon kanı transplantasyonlarında rejeksiyon ve graft versus host hastalığı (GVHD) gibi istenilmeyen reaksiyonlar daha az gelişmektedir. Ancak kordon kanındaki kök hücre miktarının az olması kullanım alanını azaltmaktadır. Kordon kanı sadece kök hücre ürününün yeterli olduğu hastalarda kullanılmaktadır. Bu nedenle daha çok çocuklarda tercih edilmektedir.¹⁴⁻¹⁷

2.3.3. Periferik Kan:

Periferik kanda, kemik iliğinden 10 defa daha az kök hücre bulunduğu belirlenmiştir. Kök hücre vericilerine bazı sitokinler (G-CSF-Granulosit koloni uyarıcı faktör) enjekte edilerek HKH'ler kemik iliğinden dolaşıma mobilize edilir. Periferdeki HKH'ler programlanmış hücre ayırıcı cihazlar yardımıyla toplanır. Toplanan hücrelerin %5-20'si gerçek HKH'lerdir. Periferik kanda sitokinle mobilize edilmiş HKH'ler, kemik iliğindekiilerden 2 kat daha fazladır. Bu nedenle alıcıda HKH yamalanması (engraftman) daha çabuk olur.¹³⁻¹⁵

2.4.Hematopoetik Kök Hücre Nakli Çeşitleri

2.4.1. Singenik:

Genetik olarak tam uyumlu bireyler arasında yapılır.^{18,19} Tek yumurta ikizleri buna örnek olarak verilebilir.²⁰

2.4.2. Otolog:

Hastanın kendisinden toplanan hemotopoetik kök hücrelerin kemoterapi ve/veya radyoterapiden sonra geri verilmesi esasına dayanır.^{20,21,23} Özellikle daha yüksek doz kemoterapiye daha çok cevap veren tümörlerde kullanılmaktadır.^{20,21}

2.4.3. Allojenik:

Aynı tür arasında yapılır ancak alıcı ve verici arasında genetik ilişki yoktur.^{20,21,23} Kardeşler arasında, aile içindeki diğer bireylerden veya akraba dışı bireylerden kemik iliği bankaları aracılığı ile yapılır. Bu tip HKHN' de alıcı ve verici arasında HLA (human leukocyte

antigen) uyumu aranır.²¹⁻²³ Graft versus tümör etkisinin görüldüğü maliniteler ve malin olmayan hastalıklarda (talasemi major, aplastik anemi vb) tercih edilmektedir. ^{20,23}

2.5. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Allojenik hematopoetik kök hücre nakli, malign veya malign olmayan hastalığı olan hastaya sağlıklı donörden kemik iliği, kordon kanı veya granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ile mobilize periferik kan hematopoetik kök hücrelerinin verilmesi ile hastanın immün ve hematopoetik hücrelerinin yerini verici kökenli hücrelerin almasıdır. Hematolojik hastalıklar, immün yetmezlikler ve lösemilerde amaç, patolojik immüno-hematopoezin eradike edilmesi iken diğer malign olmayan hastalıklarda verici kökenli hücrelerden salınan çözünür faktör ve enzimlerin eksik olan faktörü yerine koyması yada hasarlı hücrenin rejenerasyonuna katkıda bulunması hedeflenir. Hematopoetik kök hücre, kendini yenileme, prolifer ve diferansiye olma kapasitesi sayesinde hematopoetik sistemi ortadan kaldırılmış olan hastada hayat boyu verici kökenli sağlıklı hematopoez sağlayabilir. Başarılı bir nakil sonrası HKHN yapılan hasta, hematopoetik hücreleri verici kökenli olan kimerik bir organizma haline gelir. ^{24,25}

2.6. Sağlıklı Donörlerden Allojeneik Kök Hücre Toplanması

2.6.1. Kök Hücre Mobilizasyonu

Son dekat içerisinde özellikle hematolojik malignitelerin küratif tedavisi amacı ile allojeneik kök hücre transplantasyonları önemli ölçüde bir ivme kazanmıştır.^{26,27} Allojeneik kök hücrenin kullanımı ile GVHD oranlarında anormal bir artışın olmadığı ve kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğunun gösterilmesi, ve bu yöntemle graftın daha hızlı tutması nedeni ile son birkaç yıl içerisinde allojeneik kök hücre, kemik iliğinin yerini almaya başlamıştır.²⁸

Sağlıklı donörlere G-CSF 10 µg/kg/gün 5 gün boyunca subkutan veya intravenöz (IV) verilerek 5 ve gerekirse 6. günlerde kök hücreler toplanmaktadır. Donörlerin sağlıklı olması nedeni ile allojeneik kök hücre mobilizasyonu otologlardan daha kolay ve başarılı olmaktadır.²⁸

Dreger ve arkadaşları²⁹; 10 µg/kg/gün G-CSF vererek normal sağlıklı donörlerden ortalama 5.5×10^6 /kg CD34+ hücre topladığını bildirmiştir. ²⁹ Almanya dan Schmitz ve arkadaşları³⁰; sağlıklı donörlerden yine aynı dozda G-CSF kullanımı ile ortalama 6.7×10^6 CD34+ hücre/kg elde ettiklerini bildirmişlerdir. ³⁰ Bu rakamlar bütün dünyada ve ülkemizde genellikle 5 ile 10×10^6 /kg aralığında değişmektedir.

2.6.1.1. G-CSF (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör)

İnsan G-CSF geni, 17. kromozomun q11-q22 bölgesinde kodlanır. 174 aminoasit içeren ve 20 kD'luk moleküler ağırlıkta, sistein (Cys) 36 ve 42 ile 64 ve 74 arasında bulunan iki adet disülfid bağına sahip,

treonin 133 (Thr133)' den glikolizasyona uğramış bir glikoproteindir. ^{32,33}
(Şekil 4) ³¹



Şekil 4 : İnsan G-CSF'inin Moleküler Yapısı ³¹

G-CSF; granülosit seriye ait progenitör hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonlarını arttıran büyüme faktörüdür. Kemik iliğinin uyarılması ile prekürsör ve olgun nötrofilik granülositlerin üretilmesi ve fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlar. Endotelyum, makrofajlar ve diğer immün sistem hücreleri tarafından üretilir. ³²

Normalde, G-CSF üretimi çok düşük bir miktarda gerçekleştirilir ve nötrofil sayısına bağlı olarak feed-back mekanizması ile kontrol edilir. ³² Moleküler kontrol cyclin-D1'in aktivasyonu ile sağlanır. Cyclin-D1, hücre döngüsü sırasında G0/G1 fazını kısaltarak S fazına geçişi hızlandırır. Ayrıca, hücre olgunlaşmasını indükleyerek olgun

granülositlerin aktivasyonlarını arttırır, apoptozisi engelleyerek granülositik hematopoetik hücrelerin canlılığını sağlar. ³⁴

G-CSF, etkisini spesifik reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Bu reseptörler, 759-812 aminoasit içeren tek zincirli polipeptidlerdir, intrinsik tirozin kinaz aktivitesi yoktur ve G-CSF'ye yüksek affinite ile bağlanırlar. ³²

G-CSF;

- Nötrofil koloni hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını,
- Megakaryositik ve granülosit-makrofaj koloni büyüme faktörlerinin (M-CSF, GM-CSF) uyarılmasını,
- Myelositlerin kısa süreli çoğalıp gelişmesini,
- HKH'lerin sayısının arttırılmasını,
- Nötrofillerin olgunlaşma süresinin kısalması, kana geçmelerinin tetiklenmesi, yaşam süreleri ve aktivitelerinin arttırılmasını sağlar. ³⁵

2.6.1.1.1. G-CSF Etkisi ile Hematopoetik Kök Hücrelerin Mobilizasyonu

HKH'lerin fonksiyonlarını ve karakteristiklerini düzenleyen ve yetişkin hematopoezinin stabil düzeyde kalmasını sağlayan özelleşmiş mikro çevreler, 'Niş (Niche)' olarak adlandırılır. ^{36,37}

Kök hücrelerin mobilizasyonu (kemik iliğinden ayrılıp dolaşıma girmeleri), kemik iliği hasarında veya klinikte kök hücre nakil hastalarına verilen G-CSF uygulamasıyla kolaylıkla gerçekleşir. G-CSF, en önemli myeloid seri büyüme faktörü olarak endostel nişteki osteblastlar üzerinde eksprese edilen CXCL 12 yi mRNA düzeyinde kontrol ederek azaltır, aynı zamanda nişte kalımı sağlayan sinyalleri ve adezyon bağlantılarını yıkan nötrofil proteazları, elastaz, atepsin D, matriks

1971 yılında, insan periferik kanında kök/progenitör hücrelerin görülmesi, daha sonrasında aferez cihazlarının kullanıma girmesi ve büyüme faktörleri ile mobilize edilmiş periferik kandan yüksek miktarda kök hücre toplanabildiğinin gösterilmesi ile 1985-86 yıllarından sonra periferik kök hücre nakli (PKHN) kullanımının önemi artmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: Periferik Kök Hücre Toplanması

Günümüzde, otolok kök hücre nakli (OKHN)'nin neredeyse tamamı, allojenik kök hücre nakli (AKHN)'nin ise büyük bir bölümü periferik kan kök hücreleri ile yapılmaktadır. Bunun en önemli nedenleri;

- Kemik iliği toplama işleminin genel anestezi altında gerçekleştirilmesi,
- Toplama (aspirasyon) işlemine bağlı uzun süreli ağrı ve enfeksiyon tehlikesi,

- Ürünün işlenmesi sırasında meydana gelen kök hücre kayıpları,
- Otolog kök hücre nakillerinde, rezidüel tümörlerden kaynaklanan metastaz/relaps görülme olasılığı,
- Periferik kandan toplanan üründe daha fazla CD34+ hücre bulunması ve buna bağlı olarak trombosit ile nötrofil engrafman süresinin daha kısa olmasıdır.
- Ayrıca, PKHN'de daha yüksek oranda akut ve kronik GVHH görülmesine rağmen, birçok çalışmada transplanta bağlı mortalite, relaps oranı ve yaşam süresi üzerinde önemli farklılıklar olmadığı gösterilmiştir.³⁸

Periferik kandan kök hücre toplama işlemlerinde kullanılan çeşitli aferez cihazları bulunmasına rağmen, tüm cihazlar, antikoagüle edilen kanın santrifüj yöntemi kullanılarak komponentlerine ayrılması prensibi ile çalışmaktadır. Hasta/donörden alınan tam kan, antikoagüle edilir ve cihazın santrifüj sistemine gönderilir. Santrifügasyon ile tam kan; plazma, trombosit, lenfosit-monosit-granülosit (Buffy coat) ve eritrosit tabakası olarak, spesifik ağırlıklarına göre, farklı katmanlara ayrılır. Kök/progenitör hücrelerin morfolojik olarak lenfositlere benzediği düşünüldüğünden, toplama işlemlerinde trombosit ile granülositlerin arasındaki tabaka toplanır.³⁸

Toplanan ürünün Hematokrit düzeyi (Hct) %2-3 arasında olmalıdır. Burada amaç, dondurularak saklanan ve daha sonra eritilen ürünlerin infüzyonunda hemolizi ve hemolize bağlı gelişen böbrek fonksiyon bozukluğunu önlemektir. Ayrıca Hct yükseldikçe ürünün granülosit içeriği artmakta ve lenfosit içeriği azalmaktadır. Bu da, aferez tekniğiyle elde edilen ürünün CD34+ hücre miktarında düşüşe neden olmaktadır. Üründe trombosit içeriği de düşük tutulmalıdır. Böylece,

hasta/donörün trombositopeniye girmesi ve üründe agregasyon/pıhtılaşma olasılığı engellenmiş olmaktadır.³⁸

2.6.2.1. Toplama Zamanı

Toplama işlemlerinde temel amaç, az sayıda aferez işlemi ile yeterli miktarda CD34+ hücre toplanmasını sağlamaktır. Bundan dolayı, uygun toplama zamanına karar vermek çok önemlidir. OPKHN ile ilgili yapılan çok merkezli çalışmalar; günlük 5-10 µg/Kg G-CSF enjeksiyonunu takiben ve hasta nötropeniden çıkarken, beyaz küre (BK) sayısı $\geq 1.0 \times 10^9/L$ ve CD34+ kök hücre sayısı $\geq 20/\mu L$ olduğunda afereze başlamanın gerektiğini ortaya koymuştur. APKHN' de ise, donöre 10µg/Kg/gün'den 5 gün G-CSF verildiğinde ve 5-6. günler de toplama işlemi yapıldığında, tek seansta yeterli miktarda ($4-5 \times 10^6/Kg$) CD34+ hücre toplanabileceği gösterilmiştir.³⁸

2.7. Yan Etkiler

APKHN' de donörde görülebilecek yan etkiler mobilizasyona bağlı olabileceği gibi aferez işlemine de bağlı olabilir.

2.7.1. Mobilizasyona Bağlı Yan Etkiler:

Mobilizasyonda kullanılan, G-CSF'e bağlı olarak sık görülen yan etkiler kemik ağrısı, miyalji, atralji, baş ağrısı, ateş, döküntü, gastrointestinal rahatsızlık, parestezi, göğüs ağrısı, üşüme, titreme ve yorgunluktur.³⁹ G-CSF ile yan etkiler sıktır; allojeneik donörlerde hematopoetik kök hücre mobilizasyonu için G-CSF kullanımıyla %90 oranında görülür.⁴⁰ Sıklıkla hafiftir ve semptomatik olarak tedavi edilir. Örneğin kemik ve baş ağrısı için hafif analjezikler verilir. G-CSF nin yan

etkileri, bulantı, kusma ve baş ağrısı hariç doz ilişkili olmaya meyillidir.^{40,41} G-CSF ile dalak rüptürü, retinal hemoraji, akut iritis, gut artriti, trombotik olaylar gibi daha ciddi yan etkilerde bildirilmiştir.^{39,42} Bu durumlar olasılıkla donörün altta yatan hastalığının alevlenmesiyle ilişkilidir ve donörler, önceden iyi değerlendirilmelidir.^{42,43} Bir allojeneik periferik kan kök hücre donöründe, G-CSF uygulanmasını ve periferik kan kök hücre toplanmasını takiben hipoksi, asit, perikardial ve plevral efüzyon, şok ve hepatoselüler hasarlanma ile karakterize hayatı tehdit eden kapiller sızıntı sendromu da bildirilmiştir.⁴⁴ Bu durum, G-CSF nin nötrofilleri aktive etmesine bağlanmıştır.⁴⁴ G-CSF ile mobilizasyon sürecinde kemik iliğinden kök hücrelerin fizyolojik salınım hareketi boyunca oluşan inflamasyon ve yaralanma nedeniyle doğal olarak stres sinyalleri ortaya çıkar.⁴⁵

2.7.2. Afereze Bağlı Yan Etkiler:

Aferez işlemleri sırasında ise, iğne giriş yerlerinde kızarıklık, şişlik ve hafif kanama olabilir. İşlemlerde genellikle antikoagülan olarak Asit-Sitrat-Dekstroz formül-A (ACD-A) kullanılır. ACD-A; etkinliğini, bileşiminde bulunan sitratın kandaki iyonize kalsiyumu (İ.Ca) bağlaması sonucu, koagülasyon kaskadını bozarak gösterir. Bundan dolayı, aferez işlemleri sırasında, kandaki İ.Ca seviyesi düşeceğinden, donörlerde hipokalsemi gözlelenebilir. Hipokalsemi sonucunda, bulantı kusma, kas krampları, hipotansiyon da gelişebilir. Bu tarz durumlarda, damar içine ve/veya oral alım ile kalsiyum desteği yapılması önerilmektedir.⁴⁵ Donörün total kan hacmine bağlı olarak, ekstrakorporeal dolaşımdaki kan miktarının yüksek olması da hipotansiyon riskini artırır. Ayrıca, toplanan aferez ürününün hacmine, içeriğine ve kullanılan aferez cihazının ekstrakorporeal hacmine bağlı olarak, geçici bir süre için, hematokrit (Hct) ve trombosit sayısı da azalabilir.⁴⁵

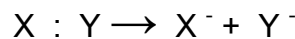
Ayrıca kök hücre aferezi in vivo oksidatif stres için potansiyel bir risktir.⁴⁶ Akım sitometri teknikleri kullanılarak aferez prosedürü boyunca farklı kan hücrelerinin (RBCs, lenfositler, monositler, ve PMNs) oksidatif stres altında olduğu gösterilmiştir. Aferez işlemi öncesi ile karşılaştırıldığında reaktif oksijen türleri (ROS) nin arttığı ve indirgenmiş glutatyon (GSH)' un azaldığı gösterilmiştir.^{46, 47}

2.7.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller:

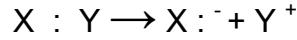
Oksidatif stres, pro-oksidan (reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri) maddeler ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin, prooksidan ve oksidan maddelerin lehine kaymasıdır.⁵¹ Miyokard enfarktüsü gibikardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stresle ilişkisi gösterilmiştir.⁵²⁻⁵⁷

Serbest radikaller; dış orbitallerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir.⁵⁸ Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir.^{59,60} Serbest radikaller üç temel mekanizmayla oluşmaktadır.⁶⁰

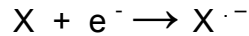
1. Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise; her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır ve iki adet serbest radikal oluşur.



2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken; kendilerinin radikal formu oluşur. Bu tipteki bölünmede kovalen bağı oluşturan her iki elektron; atomların birinde kalır ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelir.



3. Normal bir moleküle elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan süperoksidin oluşumuna neden olur.

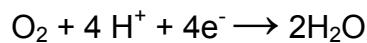


Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir ve serbest radikallerin çoğu oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+3} gibi bazı geçiş metalleri de serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.⁶¹ Serbest radikaller; normal metabolik olaylar sırasında meydana gelebildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler.^{62,63} Ekzojen kaynaklar; hava kirleticiler, doğal zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, patojenik bakteri ve virüslerdir.⁶⁴ Endojen kaynaklar ise; mitokondriyal

elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, araşidonik asit metabolizması, redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelyal hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır.⁶⁵

Organizmanın yapısında bulunan proteinler, serbest amino asitler, DNA, lipidler ve nükleik asitler gibi makro moleküller bu sistemler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerine maruz kaldıklarında hasara uğramaktadırlar.⁶⁶ Oksidatif hasar oluşturan türler (reaktif oksijen türleri, nitrojen ve klorin türleri); metabolizma ürünleri, fizyolojik mediyatörler ve sinyal molekülleri olarak ortaya çıkabilirler. Serbest radikaller kalsiyum metabolizmasına etki ederek hücre içi kalsiyumun kontrolsüz yükselmesine, dolayısıyla hücrenin zarar görmesine ya da ölmesine neden olmaktadır.⁶⁷ Aerobik organizmalar için O₂ esansiyel bir moleküldür. Aynı zamanda O₂ oksidan bir ajandır. Normal koşullar altında moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda ünivalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan bir çok reaktif ürün ortaya çıkar. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır.⁶⁸

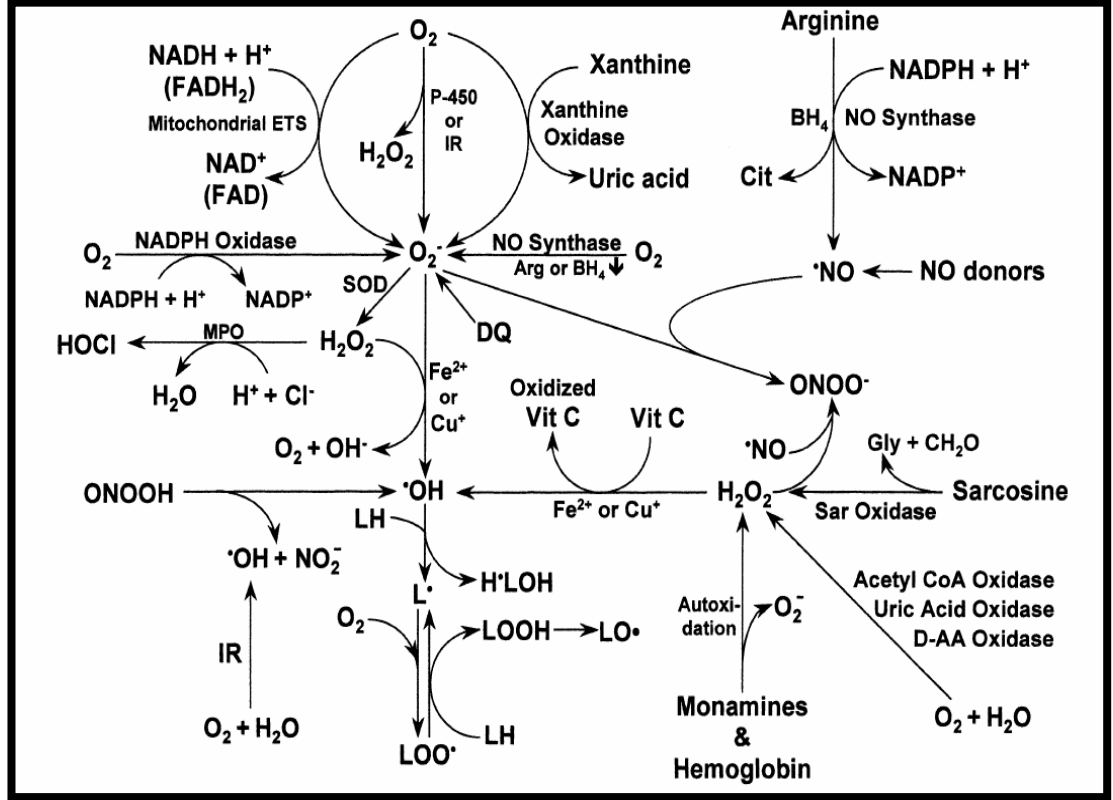
Fizyolojik koşullarda O₂' nin %98'i mitokondride bulunan sitokrom oksidaz tarafından indirgenmekte ve 4 elektron alarak suya dönüşmektedir.



Serbest oksijen radikallerinin oluşum basamaklarında öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen süperoksit radikaline dönüşmektedir. Süperoksite iki elektronun eklenmesi ile hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksit; radikal olmamasına karşın elektron almasıyla son derece toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidroksil radikali de univale redüksiyon ile suya dönüşmektedir. Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve zararlı maddeler olarak değerlendirilmemelidir. Zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli bir çok fonksiyonun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynarlar.⁶⁹ Steroid yapıdaki çok sayıda bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.⁵⁹ Serbest radikallerin en iyi bilinen zararlı etkileri; hücre membranı, yağ asitleri ve lipoproteinlere saldırarak lipid peroksidasyonu olarak bilinen bir zincir reaksiyonunu başlatmalarıdır. Lipid peroksidasyonunun ürünleri ileri ki aşamalarda membran proteinlerinde de hasara yol açarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olurlar.⁶⁰

2.7.3.1. Serbest Radikal Türevleri

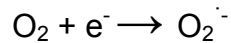
Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) oluşumu için oksijen gereklidir. Serbest oksijen radikallerine süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) ve hidroperoksil radikali ($OOH^{\cdot}$) örnek verilebilir. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) radikalleri de RNS' yi oluşturur. Oksijen ve nitrojen serbest radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), hipoklorik asit ($HOCl$), hipobromoz asit ($HOBr$) gibi diğer reaktiflere dönüşebilir (Şekil 7).



Şekil 7. Memeli hücrelerinde reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin meydana gelişi (İR: İyonize radyasyon, Sit: Sitrullin, D-AA: D-Amino asit, BH4: Tetrahidrobiopterin, Gly: Glisin, L': Lipit radikali, SOD: Süperoksit dismutaz, MPO: Myeloperoksidaz)⁶²

2.7.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$):

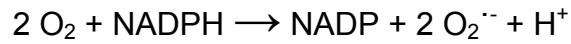
Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikal anyonu meydana gelir.



Mitokondriyal elektron transport zinciri sırasında O_2 'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O_2 varlığında; ksantin oksidaz'ın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle, NADPH'nin NADPH

oksidaz ile oksidasyonu, mitokondriyal elektron transport sistemi ile NADH₂ ve FADH₂'nin NAD ve FAD'ye dönüşümü sırasında, O₂'nin iyonize radyasyonla, sit P450 ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur.^{70,71}

Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositler tarafından gerçekleştirilen fagositoz sırasında O₂ tüketimi artar ve bu durumda plazma membranında bulunan NADPH oksidaz tarafından O₂^{••} oluşumu tetiklenir.



O₂^{••} 'nin kimyasal davranışı nerede çözündüğüne göre değişmektedir. Suda çok reaktif değildir. Bazen bir elektron alarak, okside edici ajan olarak davranabilir. Örneğin askorbik asidi okside etmektedir.⁶⁴



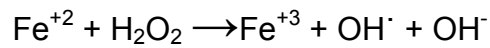
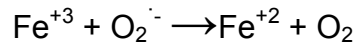
Organik solventlerde daha reaktif ve tehlikelidir. Biyolojik membranlarda oluştuğunda oldukça fazla hasar meydana getirmektedir. O₂^{••} çeşitli organik ya da inorganik bileşiklerle de reaksiyona girebilir. Nitrik oksit ile reaksiyona girebilir. Nitrik asit ile reaksiyona girip peroksinitriti oluşturması önemlidir.⁷²

2.7.3.1.2. Hidroksil Radikali (OH[·]):

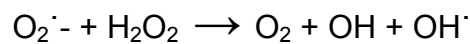
Yarılanma ömrü kısa ve güçlü bir serbest radikal olan hidroksil radikali; kuvvetli hasar oluşturur. Tüm biyolojik substratlarla reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir. Oluşan hasar üç şekilde meydana gelir.

- 1) Protein ve lipidler arası çapraz bağlar oluşturarak,
- 2) Proton çıkararak,
- 3) Elektron transferi yaparak.

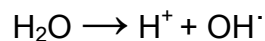
Toksik OH[·] oluşumunda demir, bakır gibi bazı metal iyonları da rol oynar. Asıl olarak Fe⁺² molekülünün de katıldığı Fenton reaksiyonu ile oluşur.⁷³ Fe⁺³'ün O₂^{·-} ile indirgenmesi sonucu oluşan Fe⁺², H₂O₂ ile reaksiyona girerek OH[·] radikalini meydana getirir. Bu reaksiyon 'Fenton Reaksiyonu' olarak adlandırılır.



Ayrıca demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu da OH[·] oluşur.⁷⁴

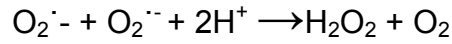
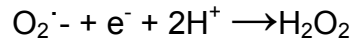
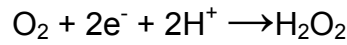


İyonize radyasyon etkisi ile de OH[·] oluşur.⁴⁶



2.7.3.1.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂):

Oksijen molekülünün iki elektron alarak indirgenmesi veya yapıya iki hidrojen atomunun eklenmesiyle oluşur.⁷⁵ Süperoksit radikalının yapısına bir elektron katılmasıyla da meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde daha sık olarak iki süperoksit molekülü, iki protonla birleşerek hidrojen peroksit ve oksijen oluşturur.



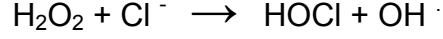
H₂O₂ bir serbest radikal olmamasına karşın yüksüz bir molekül olduğundan hücre içerisine kolaylıkla girebilir.

H₂O₂, O₂ ' den iki elektronun sit p450, yağ-acil KoA oksidaz, asetil KoA oksidaz, ürik asit oksidaz, α-hidroksiasit oksidaz veya D-amino asit oksidaz ile redüksiyonu ile oluşabilir. Ayrıca monoaminler (dopamin, epinefrin, nörepinefrin), hemoglobinin otooksidasyonu ve glisin sentezinde de H₂O₂ oluşur.⁷⁶ Peroksizomlar fazla miktarda oksidaz içerdiklerinden hücresel H₂O₂ için potansiyel kaynaktır. H₂O₂ özellikle Fe ve Cu gibi geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla yıkılır. Bu yıkım sonucu en reaktif radikal olan OH[·] oluşur.⁶²

2.7.3.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl):

Nötrofiller, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluştururlar.⁷⁷

MPO

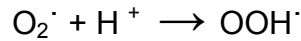


2.7.3.1.5. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$):

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmaması sebebiyle serbest oksijen radikali olmayıp reaktif oksijen türleri grubunda yer alan bir moleküldür. Singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır. $^1\text{O}_2$, oksijen elektronlarının dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün ters yönündeki farklı bir yörüngeye geçmesi ile oluşabileceği gibi, O_2^- radikalinin dismutasyonu ve MPO'nun katalizlediği H_2O_2 'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir.⁷⁸

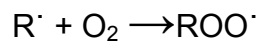
2.7.3.1.6. Perhidroksil radikali (OOH^-):

O_2^- radikali asidik ortamda daha reaktif olup protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan OOH^- radikalini oluşturur.⁷⁹



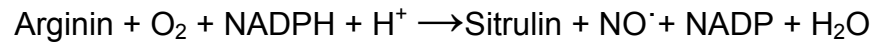
2.7.3.1.7. Peroksil radikali (ROO^-)

R^- radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek ROO^- 'yi oluştururlar.⁷⁹ ROO^- , lipid peroksidasyonunu başlatan radikal olup çok uzun ömürlüdür.⁷⁹



2.7.3.1.8. Nitrik Oksit (NO[•]):

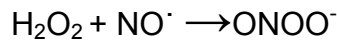
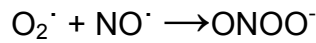
Memeli hücrelerinde NO başlıca nitrik oksit sentaz (NOS)'ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden; sitrulin ve NO'yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar.⁸⁰



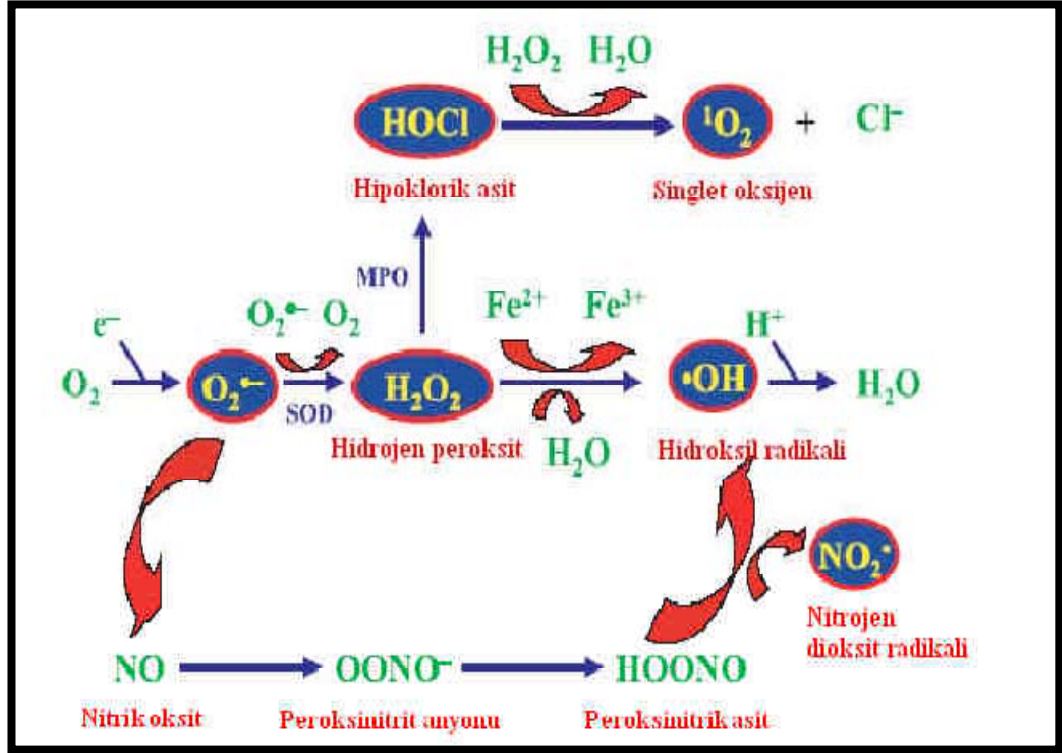
Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; damar tonusunun kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır.⁸⁰

2.7.3.1.9. Peroksinitrit (ONOO⁻):

Süperoksit radikali veya hidrojen peroksitin NO[•] ile reaksiyona girmesi ile oluşur.⁸¹



Oluşan peroksinitrit radikalinin oksidatif potansiyeli O₂[•] ve H₂O₂'ye göre daha yüksektir.⁶²



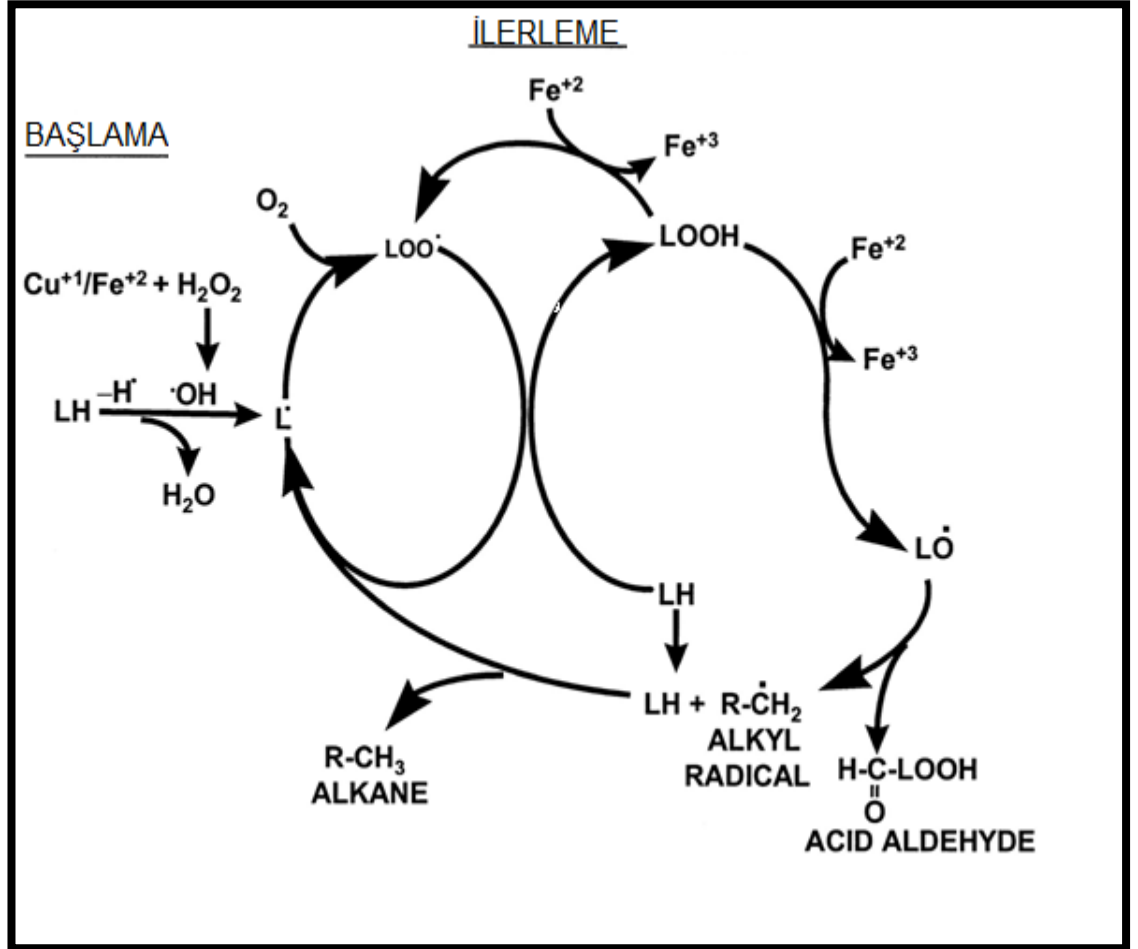
Şekil 8. ROS ve RNS'nin birbirleriyle etkileşimi ⁸²

2.7.3.2. Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Organizmanın yaşam sürecinde karşılaştığı radikal türlerinin çeşitli olması nedeniyle, serbest radikallerin biyolojik etkilerini genellemek zordur. Oluşan serbest radikaller, ortamdan uzaklaştırılamadığı takdirde pek çok yolla metabolik bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açarlar.⁸³ Serbest radikaller, kimyasal modifikasyonlarla protein, lipid, karbonhidrat ve DNA'da hasar oluştururlar.⁸³

Lipidler; reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerine en fazla maruz kalan biyolojik moleküllerdir. Hücre membranı serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girebilen çoklu doymamış yağ asitlerinden oldukça zengindir. Bu yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olur (Şekil 9). Membran akışkanlığı, membran lipidlerinin yan zincirlerinde bulunan doymamış yağ

asitleri ile sağlanır. Doymamış yağ asitlerinin hasarı, membran akışkanlığını azaltıcı etki gösterir.^{84,85}



Şekil 9. Metallerin katalizlediği lipid peroksidasyonu⁸⁴

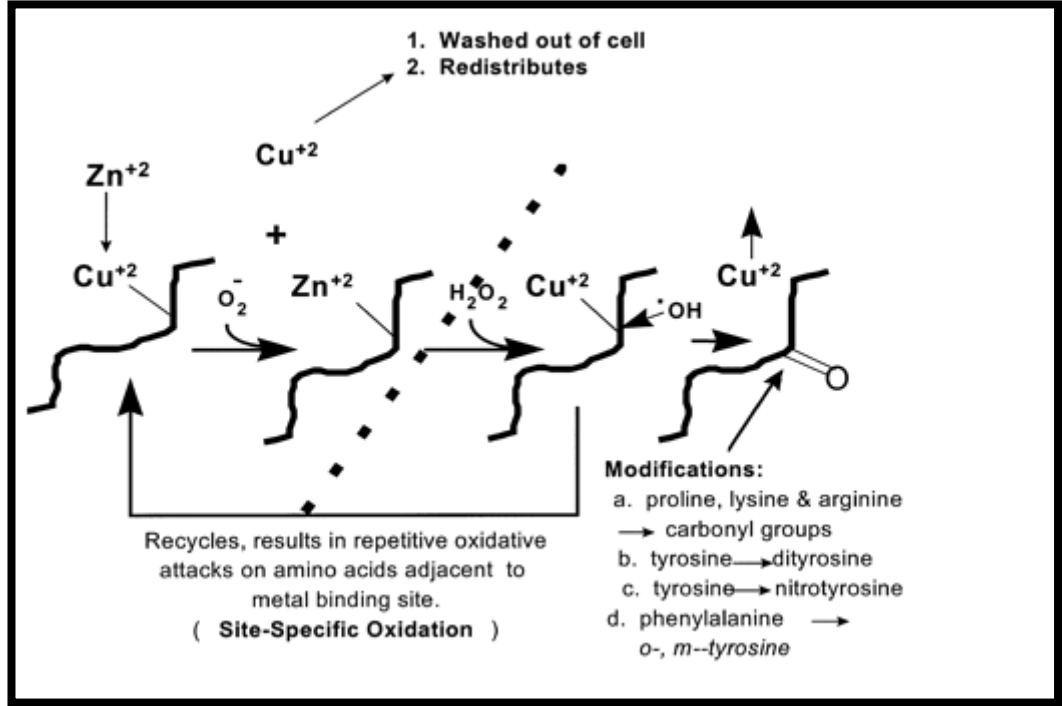
Lipid peroksidasyonu, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden birisidir. Üç karbonlu bir ketoaldehid olan Malondialdehid normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile CO_2 'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir.⁸⁵

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metod MDA ölçümüdür. MDA, proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer.⁸⁶ MDA, kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir. Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehydler; serbest radikallere göre daha stabildirler. Hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzak bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilirler. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilirler.⁸⁶

2.7.3.3. Serbest Radikallerle Oluşan Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu; hem ROS ile direkt hem de oksidatif stresin sekonder ara ürünlerinin reaksiyonlarıyla indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenirler.⁸⁷

Protein oksidasyonu, bir çok mekanizmayla gerçekleşebildiği ve amino açıl yan zincirlerinin hepsi oksidatif olarak modifiye olabildiği için çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonları vardır.⁸⁸ Oksidatif protein modifikasyonlarının biyokimyasal sonuçları; yan zincir gruplarının oksidasyonu, kırılmalar, çapraz bağlanmalar, yanlış katlanmalar, hidrofobik yapıda değişiklikler ve proteolitik enzimlerde aktivite kaybı olarak sıralanabilir⁸⁹ (Şekil 10).

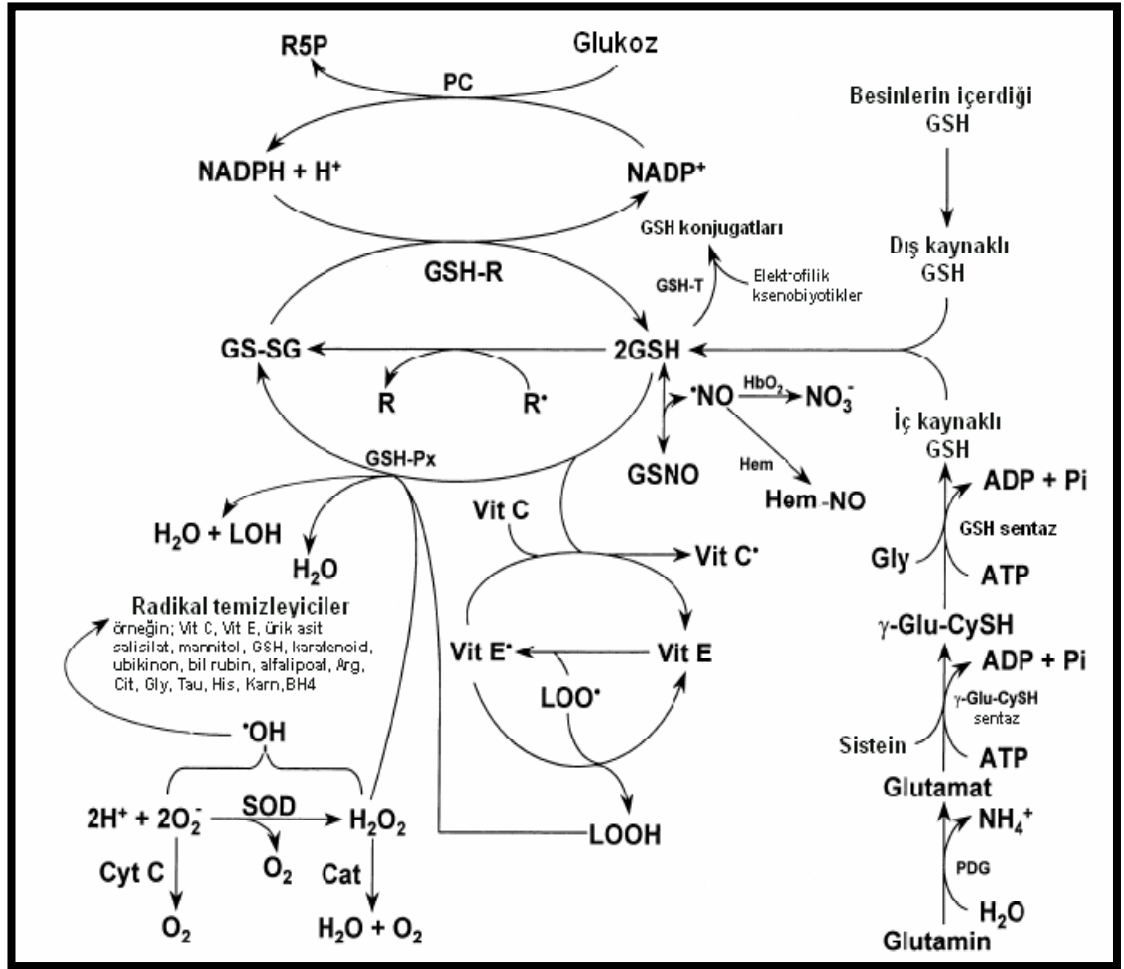


Şekil 10. Metallerin katalizlediği bölge spesifik protein oksidasyonu.⁸⁴

ROS'un proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin, ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve / veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucunda protein karbonilleri (PCO) ürünleri meydana gelir. Protein oksidasyonunun en yaygın olarak ölçülen ürünü protein karbonilleridir. PCO düzeylerinin saptanması, oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olmasına rağmen belirli bir aminoasit için spesifik değildir.⁹⁰

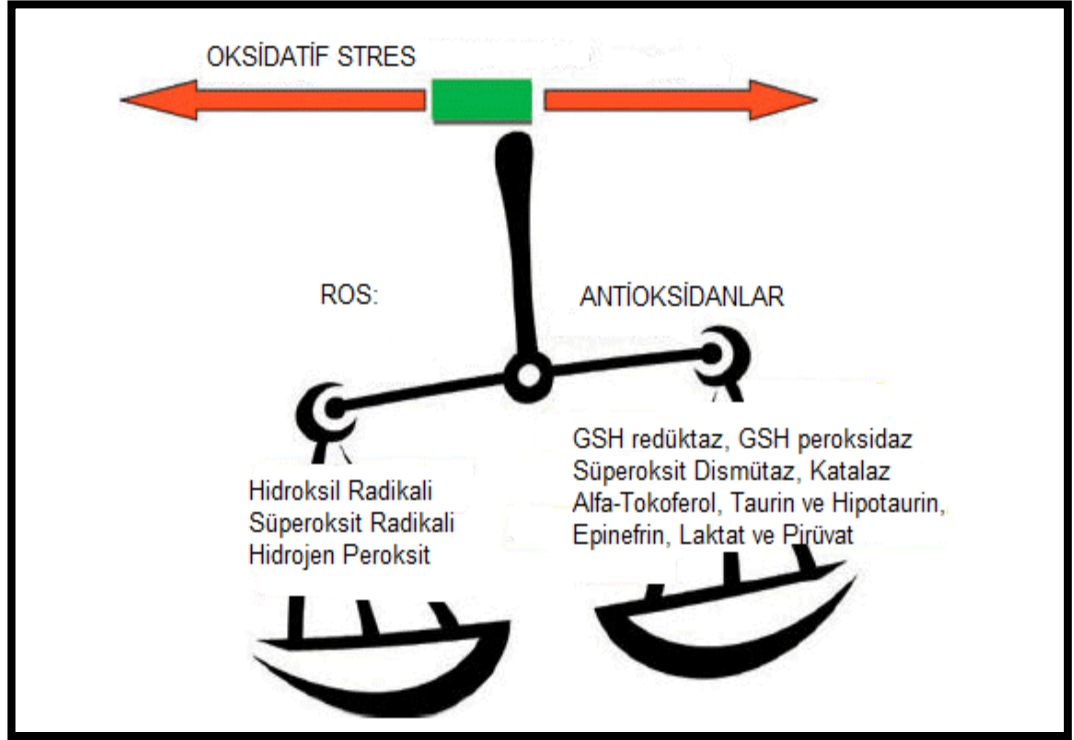
2.7.4. Antioksidan savunma sistemleri

Vücutta reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı geciktirmek ya da önlemek için geliştirilen savunma sistemleri; antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar endojen (organizma tarafından sentezlenen) ve eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı olmak üzere baslıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi; serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de sınıflandırılırlar.⁹¹ Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynayan antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler.⁹² Hücre dışı savunma; albümin, bilirubin, seruloplazmin, ürik asit gibi molekülleri içermektedir. Asıl antioksidan savunmayı hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler sağlamaktadır. Bu enzimler superoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalazdır. Bu enzimlerin fonksiyonları için bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler gereklidir⁹³ (Şekil 11).



Şekil 11. Memeli Hücrelerinde Antioksidan Sistem.⁷⁸

Organizmada; serbest oksijen radikalleriyle (oksidan) antioksidan savunma sistemleri arasındaki var olan dengenin, oksidanların lehine kayması değişik düzeylerde hücresel hasarlara neden olmaktadır (Şekil 12).⁹⁴



Şekil 12. Oksidan-antioksidan dengesi.⁹⁵

Antioksidanların; oksidatif hasardan koruma mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir.⁹⁶

- Enzim aktivitesi üzerinden veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla,
- Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu en az düzeye indirerek,
- Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek,
- Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,
- Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,
- Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla, Hasar çok büyük olduğunda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak.

Antioksidan ajanlar, oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler⁸³

1. Süpürücü etki gösterenler: Oluşturdukları etki ile yeni radikal oluşumunu engelleyip; oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Bu gruba örnek olarak superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimler; ferritin, seruloplazmin ve metallothionein gibi metal bağlayıcı proteinler verilebilir.

2. Giderici etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini inhibe eden bileşiklerdir. β -karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3. Zincir kırıcı etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak bazı vitaminler, mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin verilebilir.

4. Onarıcı etki gösterenler: Bu gruba örnek olarak DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz verilebilir.

2.7.4.1..Antioksidanların sınıflandırılması

Tablo 7 ve 8'de enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 1. Enzimatik Antioksidanlar

Endojen Antioksidanlar
1-Enzimatik Antioksidanlar
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi
Superoksit dismutaz(SOD)
Katalaz (KAT)
Glutatyon peroksidaz(GSH-Px)
Glutatyon reduktaz (GR)
Glutatyon S-transferaz (GST)
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH)

Tablo 2. Nonenzimatik Antioksidanlar

a) Yağda çözünen radikal tutucuları: α - tokoferol (E vitamini), β -karoten, Bilirubin, Ubikinol.
b) Suda çözünen radikal tutucuları: Glutasyon, Askorbik asit (C vitamini) ürik asit.
c) Metal iyonlarını bağlayan proteinler: Ferritin, transferrin, haptoglobin, serüloplazmin, albümin.
d) NADPH oksidaz inhibitörleri: Adenozin, Ca^{+2} kanal blokörleri, lokal anestezikler
e) Ksantin oksidaz inhibitorleri : Allopürinol, oksipurinol, folik asit, tungsten
f) Fe redoks döngüsünün inhibitörleri : Desferoksamin, serüloplazmin
g) Sitokinler: TNF ve IL-1
h) Nötrofil adezyon inhibitörleri
ı) Barbituratlar
i) Stobadin

2.7.5. İNFLAMATUAR MEDİYATÖRLER VE AKUT FAZ PROTEİNLERİ

G-CSF' nin sağlıklı donörlerdeki kısa süreli yan etkileri iyi tanımlanmıştır. Kemik ağrısı, baş ağrısı, miyalji, bitkinlik, mide bulantısı ve enjeksiyon bölgesinde şişlik ve kızarıklık gibi bu etkiler kısa süreli ve geçicidir.⁹⁷⁻⁹⁹ Daha az görülen yan etkiler arasında dalak rüptürü, akut akciğer hasarı, vasküler olaylar, inflamatuvar durumlar ve otoimmün alevlenmedir ki bunlar nadir fakat ciddi ve hayatı tehdit edici olabilir.⁹⁹

Akut faz proteinleri, akut veya kronik inflamatuvar olay sonucunda artmış olan sitokinlerin, başlıca IL-6' nın etkisi ile en çok karaciğerden salgılanan çeşitli proteinlerdir. Bunlar arasında fibrinojen, CRP, haptoglobulin, komplemanlar, seruloplazmin, ferritin ve serum amiloid A sayılabilir. Bu akut faz proteinleri, inflamatuvar durumlarda arttığından pozitif akut faz proteinleri olarak da adlandırılırlar. İnflamatuvar durumlarda serumdaki seviyeleri azalan albumin, transferrin, transtiretin gibi akut faz proteinlerine ise negatif akut faz proteinleri denir.¹⁰⁰

2.7.5.1. İnterlökin 6:

Kronik inflamatuvar süreçte rol oynayan IL-6, önemli inflamatuvar hücrelerin ve proteazların sayılarını ve aktivitelerini modüle eder.¹⁰¹ IL-6 sigara ve benzeri çevresel streslere yanıt olarak havayolu epitelinde, makrofajlarda ve vücudun birçok inflamatuvar hücrelerinde sentezlenir.^{102,103}

2.7.5.2. hs-CRP:

CRP bu ismi, *Streptococcus pneumoniae*' nin C-polisakkaridini presipite edebildiği için almıştır. CRP; enfeksiyonun, travmanın, inflamatuvar, romatizmal ve malign hastalıkların yol açtığı inflamasyonu en iyi gösteren testtir.¹⁰⁴ Salınımı esas olarak karaciğerde, inflamasyon olan dokudan salgılanan sitokinlerin (en önemlisi IL-6) etkisi ile gerçekleşir. CRP ölçümü özgül olmayan, inflamasyonu gösteren bir test olmasına karşın, bazı hastalıkların tanısında, riskin belirlenmesinde ve izlenmesinde çok önemlidir. Sağlıklı bireylerde serum CRP düzeyi ortalama 1 mg/L'dir. CRP kadınlarda erkeklerden biraz daha yüksektir. Sağlıklı bireylerin % 90'da CRP<3,0 mg/L olarak saptanır.¹⁰⁵ CRP inflamasyonu çok iyi kantite eder. Dolaşımdaki CRP'nin hemen tamamı hepatositlerden salgılanır. İnflamasyondan sonra kısa sürede yükselmeye başlayıp, 6 saat

sonra CRP düzeyi >5 mg/L olur. CRP 48 saatte maksimuma ulaşır. CRP'nin yarı ömrü 19 saat kadardır.¹⁰⁶ Hastalıklı ve sağlıklı kişilerde CRP'nin yarı ömrü değişmez. Bu nedenle CRP yüksek olan bir kişide, ertesi gün CRP düzeyinde değişiklik olmazsa, "CRP'nin yükselmesine yol açan inflamatuvar durumda değişiklik olmamıştır" diye yorum yapılır. İnflamatuvar neden ortadan kalktığında CRP düzeyinde, diğer akut faz proteinlerinden daha hızlı bir azalma olur. Yarı ömrü 19 saat olduğundan, inflamatuvar neden ortadan kalkmışsa, CRP düzeyinin ertesi gün belirgin olarak azalması beklenir.¹⁰⁷ CRP yaşla birlikte bir miktar yükselmektedir. Ancak akut inflamatuvar hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkan yükselmeler hariç tutulacak olursa, CRP düzeyleri genel olarak stabildir. Yani sağlıklı bir kişide CRP 2 mg/L ise daha sonra yapılan kontrol ölçümlerde de CRP bu düzeyde saptanır. CRP'de mevsimsel değişiklik, diurnal varyasyon olmaz, açlık ve toklukla düzeyi değişmez. Ayrıca CRP'nin ölçümü eritrositlerin şekil ve sayısından, immunoglobulin seviyelerinden, renal fonksiyondan etkilenmez. Ancak karaciğerden sentezlendiğinden, karaciğer yetmezliği olanlarda beklenenden daha az yükselebilir.¹⁰⁸ Eş yumurta ikizlerinde benzer CRP düzeyleri saptanmaktadır. Bu nedenle sağlıklı bireyler arasında CRP düzeylerinde görülen farkların genetik yapı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.^{109,110}

2.7.5.3. Ferritin:

Tüm vücut demirinin % 15-20' sini oluşturan ferritin, hemoglobinden sonra organizmada en fazla demir bulunduran yapıdır. Depo demirinin % 65'i ferritin, % 35'i ise hemosiderin şeklindedir. Ferritin demir ve apoprotein kompleksidir.¹¹¹ Demiri çok hızlı bir şekilde bağlayan ferritin, metabolizma için gereksinim duyulan demiri de sağlar. Küresel bir molekül olan ferritin, bir apoferritin kabuğuna ve bir de iç kısımda demir-III-oksihidroksit (FeOOH) kristal çekirdeğe sahiptir. Apoferritin kabuğu 24 alt birimden oluşur ve 460.000 dalton ağırlığındadır. L ve H olarak

adlandırılan iki tip zinciri vardır. L zincirinden zengin olan bazik ferritin, karaciğerde ve dalakta bulunurken, kalp, eritrositler, lenfositler, monositler ve bazı tümör dokularında H zincirinden zengin olan asidik ferritin fazla bulunmaktadır. Ferritin en fazla kupfer hücrelerinde, karaciğer parankim hücrelerinde, kemik iliğindeki retikuloendotelial sistem ve dalak hücrelerinde bulunur. ¹¹² Genellikle vücut demirinin yaklaşık % 0,1' i transferrin içindedir. Depo demiri olan ferritin, kanda çok düşük konsantrasyonda (12-250 ng/ml) bulunur. Serum ferritin düzeyi kadınlarda daha düşük seviyededir. Ferritin ile depolanmış demir konsantrasyonu arasında direkt ilişki vardır. Normal kişilerde plazma ferritini ile demir emilimi arasında negatif ilişki vardır. ¹¹² Ferritin seviyesi, demir eksikliği anemisinde terapötik flebotomi sonrasında, retikuloendotelial sistem demir depolarında bir azalmaya neden olan kan kaybında düşer. Bununla beraber birçok hastalıkta serum ferritin konsantrasyonu artmıştır ki bu hastalıklar; lösemi, lenfoma, pankreas, akciğer, inflamatuvar hastalıklar, kronik börek yetmezliği, folik asit eksikliği, polistemi, akut miyokard infarktüsü, aşırı demir ve transfüzyon tedavisi, hemosiderozis ve hemakromatozistir. ¹¹² Viral hepatit ve toksit karaciğer hastalığında da ferritin yükselir. Karaciğer serum ferritin düzeylerinde artma, plazmadan ferritin klirensinin azalmasına ve harap olan karaciğer hücrelerinde ferritin kana karışmasına bağlıdır. Kanseri hastalarında serum ferritin seviyesindeki artışın sebebi ise tümör hücrelerinin ferritin sentez etmesiyle ilgili olabileceği gibi ineffektif eritropoeze bağlı olarak artmış demir depoları ile de ilgili olabilir. ¹¹²

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ankara Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kök Hücre Nakil Ünitesine gelen allojenik periferik kök hücre nakli donörlerinden, rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş kan örnekleri Ankara Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında çalışılmıştır. Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulundan bilimsel araştırma izni alınmış olup, bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi (01/2011-46 No'lu Proje) tarafından desteklenmiştir.

3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi

Bu çalışma Ekim 2010 – Mart 2011 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kök Hücre Nakil Ünitesine başvuran 25 hastanın, yaşları 18–65 arasında değişen, 9 kadın ve 16 erkek, sağlıklı gönüllü kök hücre donörü ile yürütülmüştür.

3.1.1. Donörlerin Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Sağlıklı, gönüllü kök hücre donörü olması.
2. Gönüllü onam formunu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul etmesi
3. 18 yaşın üzerinde olması
4. Ek hastalığının olmaması

3.1.2. Donörlerin Çalışmaya Alınamama Kriterleri

1. Yeterli mobilizasyon sağlanamayan ve aferez işlemi yapılmayan donörler.
2. Onam izni vermeyenler

3. 18 yaşın altında olanlar.

3.1.3. Örnekleme

Analizler için donörlerden rutin olarak tam kan sayımı ve CD34+ hücre sayımı için;

- G-CSF ile mobilizasyon işlemi öncesi,
- G-CSF ile mobilizasyonun 4. Günü (aferez işlemi öncesi),
- Aferez işleminden hemen sonra,
- Aferez işleminden 24 saat sonra ve
- Aferez işleminden 1 hafta sonra,

olmak üzere toplam 5 kez alınan örneklerden arta kalan kanlar kullanılmıştır. Kan örnekleri, 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örnekleri, çalışılacağı güne kadar -80 ° C' de saklanmıştır. Bu çalışma için donörlerden rutin olarak alınan; serum albümin, serum demir(SD), serum demir bağlama kapasitesi (SDBK), ferritin değerleri ve saklanan serum örnekleri ile çalışılmış olan; hs-CRP, interlekin-6 (IL-6), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasitesi (TAK) değerleri incelenmiştir.

3.2. Donörlerin Mobilizasyonu:

G-CSF (granülosit koloni uyaran faktör) beyaz kan hücrelerinin yapımını artırır. G-CSF hematopoetik kök hücre naklinde aferez işlemi öncesi vericinin kök hücre sayısını arttırmak için kullanılmaktadır. Çalışmadaki donörlere nakil için gerekli kök hücre mobilizasyonu amacı ile 4 gün süreyle 10 µg/kg G-CSF (Neupogen,

Roche) uygulanmıştır. Mobilizasyonun 4.gününde, G-CSF infüzyonundan 2 saat sonra yeterli kök hücre elde edilen donörler aferez işlemine alınmıştır.

3.3. Aferez İşlemi (Allojeneik Periferik Kök Hücre Toplanması)

Aferez işlemi, devamlı akım tekniği ile çalışan Cobe Optia marka cihaz ile dakikada 50-60 ml kan ayırma protokolü uygulanarak yapılmıştır. Mobilizasyon rejiminin (G-CSF) ilk uygulamasını takip eden 4. günde aferez işlemi ile donörlerin kök hücrelerini içeren mononükleer hücreler toplanmıştır. Toplama işlemi sırasında donörlere antikoagulan (ACD), izotonik solüsyon ve kalsiyum desteği verilmiştir. İşlemlerde donörlerin kan hacimlerinin ortalama 2-3 katı (yaklaşık 15 lt) kan işlenmiştir.

3.4. Deneyler

3.4.1. Çalışmada Kullanılan Araçlar

1. Hassas terazi (Shimadzu AX200)
2. Vorteks (IKA MS3)
3. Benmari (Aethung)
4. Santrifüj (Sigma)
5. pH metre (Jenway 3510)
6. Tecan Eliza okuyucu ve yıkayıcı
7. Otomatik ve cam pipetler
8. Manyetik karıştırıcı
9. Diğer labaratuvar gereçleri

3.4.2. Çalışmada Uygulanan Yöntemler

3.4.2.1. CD 34+ Hücre Sayım Protokolü:

Allojenik kök hücre naklinde aferez işlemi öncesi rutin olarak yapılan CD34+ kök hücre sayımı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Erişkin Hematoloji Laboratuvarında akım sitometri (ASM) yöntemi ile yapılmıştır.

- 3.500-10.000 arası beyaz küre içerdiği bilinen örnekten (işlem öncesi periferik kan veya aferez ürünü) 100 µl alınır. BD falcon tüpüne konur.
- 10 µl CD 45 FITC / 10 µl CD 34 PE falcon tüpündeki örneğe pipetlenir 2-3 sn vortexlenir. 15 dk oda ısısında inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası vortexlenir 5 dk lysis buffer ile (vortexlenir) oda ısısında inkübe edilir.
- 1200 rpm de 5 dk. Santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır. Vortexlenir. 1.5 ml cell wash eklenir. Vortexlenir.
- 1200 rpm de 5 dk. Santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır. Vortexlenir. 500 ml ml cell wash eklenir. Vortexlenir.
- Cihazda okutulur (Becton Dickinson-Akım Sitometri). Okununcaya kadar +4 derecede bekletilebilir. Ancak bu süre 30 dk.'yı aşmamalıdır.)
- Cihaz açılıp gerekli işlemler yapıldıktan sonra CD 34 sayımı için özel acquisition açılır. 75.000 hücre saydırılır.
- Ardışık kapı alma yöntemi ile CD 34 pozitif hücre yüzdesi (A) bulunur.

Periferik kanda CD 34 + hücre hesaplanması:

100 A

WBC X

$$X = WBC \times A / 100$$

(A= CD 34 YÜZDESİ)

Aferez Ürününde CD 34 pozitif hücre hesaplanması:

WBC x 10⁹ x Ürünün Hacmi x CD 34 yüzdesi

$$10^4 \times \text{Hastanın kilosu} \times 10^3$$

3.4.2.2. Serum Malondialdehit (MDA) Analizi

Serum MDA düzeyleri Yoshioka ve arkadaşları,¹²⁸ nın tarifledikleri yöntemle göre analiz edildi. Yöntemin temel ilkesi serumdaki proteinlerin trikloroasetik asit (TCA) ile çöktürülmesinden sonra MDA nın tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksin kolorometrik olarak ölçümüne dayanır.

Standart Hazırlanması

Standart olarak 1,1,3,3 tetrametoksipropan (% 97, FW:220,3) stok olarak kullanıldı. 25 µl stok MDA alınarak 50 ml ye tamamlandı. 2 saat oda ısısında bekletilen standardın konsantrasyonu 20 nmol/ml dir. Bu standart dH₂O ile sulandırılarak 10 nmol/ml ve 5 nmol/ml lik konsantrasyonlar elde edildi.

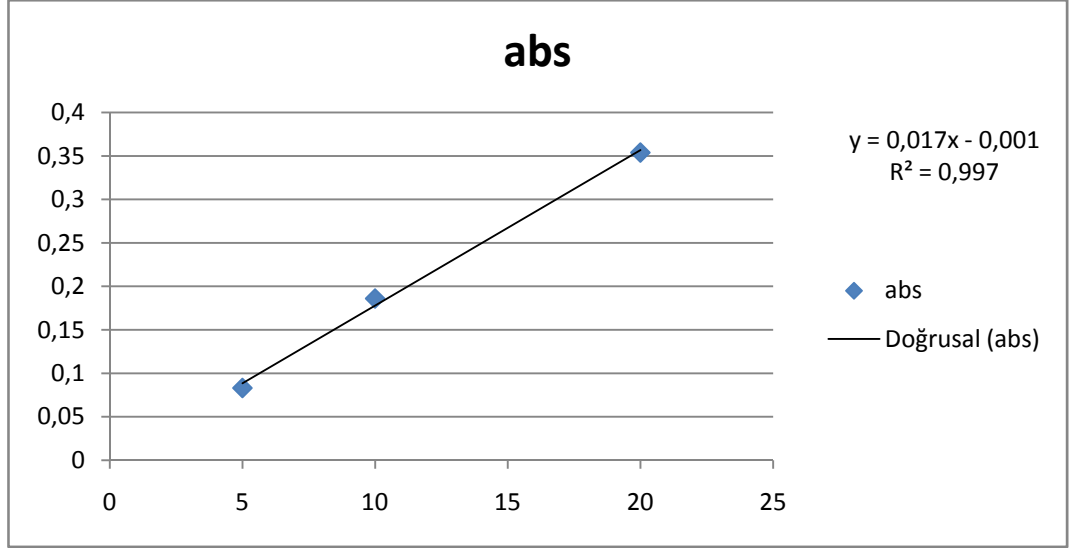
Kullanılan Reaktifler:

- % 20 TCA; distile su içinde hazırlandı.
- % 0,67 TBA; distile su içinde hazırlandı.
- n-butanol (1-butanol)

Metod:

	Numune	Standart 1	Standart 2	Standart 3
Standart		250 µl	125 µl	62.5 µl
dH ₂ O			125 µl	187.5 µl
Numune	250 µl			
TCA	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
TBA	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
30 dk sıcak su banyosunda (95 °) de kaynatılıp su altında soğutuldu.				
n-butanol	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.				
Üstdeki fazdan 200 µl alınıp 532 nm de köre (n- butanol) karşı okundu.				

20, 10 ve 5 nmol/ml' lik MDA sdantartlarından standart grafik elde edildi ve örneklerin absorbans değerlerinin "nmol/ml" cinsinden MDA miktarı tesbit edildi.



Grafik-1 MDA Standart Eğri Grafiği

3.4.2.3. Serum ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) Analizi

Serum AOPP düzeyleri Witko-Sarsat ve arkadaşları,¹²⁹ nın tanımladığı spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür.

Reaktifler:

- **PBS:** Phosphate Buffer Saline (10x) →Stok (0,1M)

80 gr NaCl

2 gr KCl

14.4 gr Na₂HPO₄ ve

2.4 gr KH₂PO₄ , 800 ml dH₂Oda çözüldü. pH: 7.4 e ayarlandı (HCL ile) ve dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çalışma solusyonu olarak (1x) haline getirilmiş formu kullanıldı.

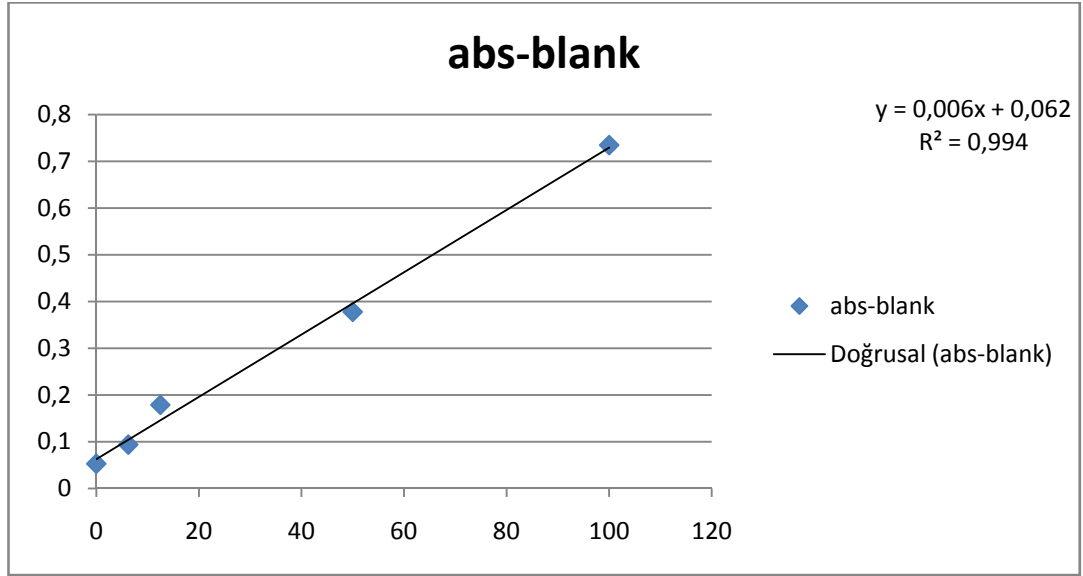
- **KI (Potasyum İyodür)** 1.16 M: 9.628 gr KI, dH₂O ile 50 ml ye tamamlandı.
- **(Glasial) asetik asit**
- **Choramine T** standart olarak kullanıldı (100 µM, 500 ml için; 11 mg Cl T)

Numunelerin Hazırlanışı: Serum örnekleri PBS ile 1/5 dilue edilmelir. Bunun için 40 µl serum örneğinin üzerine 160 µl PBS ilave edildi.

Metod

	Standart	Kör	Numune
Standart (Cl T)	200 µl		
PBS		200 µl	160 µl
Numune			40 µl
KI	10 µl	10 µl	10 µl
Asetik asit	20 µl	20 µl	20 µl

Absorbanslar 340 nm de okutuldu. 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 0 µM' lık Cl T standartları kullanılarak standart grafiği çizildi, numuneler buna göre hesaplandı ve sonuçlar 5 ile çarpıldı.



Grafik-2 AOPP Standart Eğri Grafiği

3.4.2.4. Serum Total Antioksidan Kapasite (TAK) Ölçümü:

Serum TAK düzeylerinin belirlenmesinde spektrofotometrik prensibe dayanan ticari kit (CAYMAN chemical, USA, cat no: 709001) kullanıldı

Prensip:

Serumda bulunan ve antioksidan özelliği olan vitaminler, proteinler, lipidler, glutatyon, ürik asit vb. maddeler total olarak tayin edildi. Ortama konulan metmiyoglobin yardımıyla gerçekleşen ABTS'nin oksidasyonu, örnekteki anti oksidanlar tarafından inhibe edildi. Oluşan absorbans 630 nm dalga boyunda okundu. Örnekteki antioksidan düzeyi absorbans azalışıyla doğru orantılıdır.

Ayır   ların Hazırlanması:

- 96 kuyucuklu boş plaka.
- Konsantre seyreltme tamponu (5 mM potasyum fosfat, pH:7.4) 10 kat deiyonize su ile seyreltildi.
- Liyofilize Azino-benzo-tiazolidin-sülfat (ABTS) kromojen 6 ml deiyonize suyla   z  l  p vortekslendi.
- Liyofilize metmiyoglobin 600   l seyreltme tamponu ile   z  ld   ve vortekslendi.
- Konsantre hidrojen peroksit (8.82 M) 100   l deiyonize su ile seyreltildi.
- Liyofilize Troloks standardı 1 ml deiyonize suyla   z  ld   ve vortekslendi

Standartların hazırlanması:

- 0.044 – 0.330 mM konsantrasyon aralığında bir standart eğri çözebilmek için stok standarttan belli hacimlerde alınıp seyreltme tamponu ile sulandırma yapılarak     itli konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı.
- 7 adet standart t  p   hazırlandı 1.tüpte sadece seyreltme tamponu bulunduğundan bu t  p k  r olarak kullanıldı.

Tüp no	Troloks standart (µl)	Tampon (µl)	Konsantrasyon (mM)
1	0	1000	0
2	30	970	0.044
3	60	940	0.088
4	90	910	0.135
5	120	880	0.18
6	150	850	0.225
7	220	780	0.330

Örneklerin hazırlanması:

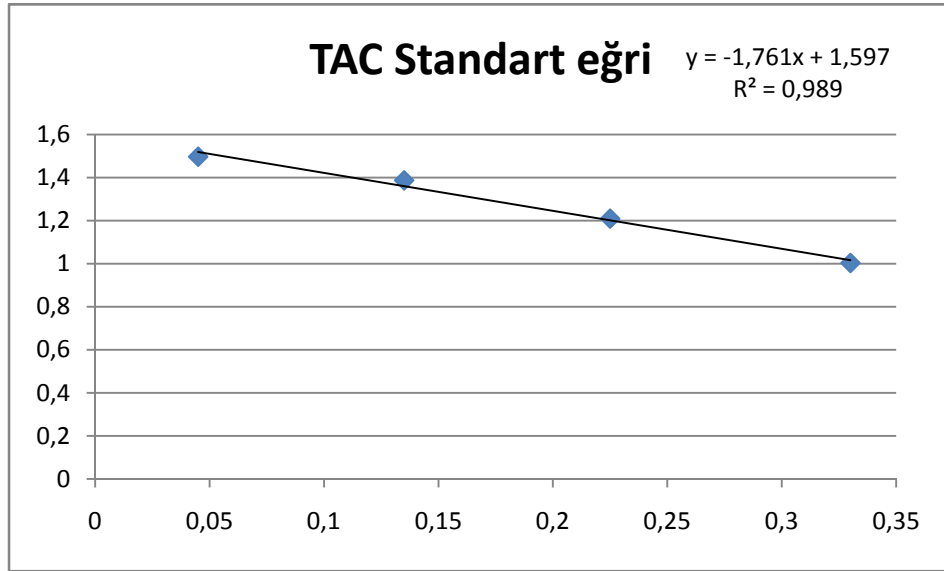
Hasta ve kontrol serumları seyreltme tamponu ile 20 kat sulandırıldı.

Yöntem Uygulanışı:

- Her kuyucuğa standart ve seyreltilmiş serum örnekleri 10 µl olarak pipetlendi.
- Her kuyucuğa 10 µl metmiyoglobin pipetlendi.
- Her kuyucuğa 150 µl kromojen pipetlendi.
- Her kuyucuğa 40 µl çalışma hidrojen peroksit pipetlendi.
- Plaka 5 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- 630 nm dalga boyunda okundu.

Hesap:

Standart konsantrasyonları X eksenine, standartlara ait absorbanlar ise Y eksenine yerleştirilerek lineer regresyon eğrisi çizildi. Örneklerin konsantrasyonları standart eğrisinden hesaplandı. Bulunan sonuçlar dilüsyon faktörü olan 20 ile çarpılıp gerçek TAK düzeyleri mM olarak bulundu.



Grafik-3 TAK Standart Eğri Grafiği

3.4.2.5 Serum Albümin, Serum Demir (SD), Serum Demir Bağlama Kapasitesi (SDBK):

Otoanalizör ile (Olympus AU 2700 plus, Beckman Coulter) ile spektrofotometrik yöntem kullanılarak çalışılmıştır.

Total protein ile albumin arasındaki fark hesaplanarak, globulin miktarı tayin edilmiştir.

3.4.2.6. Ferritin :

Serum ferritin düzeyleri otoanalizör ile (Advia Centaur, Siemens) ile kemilüminesan immünoassay yöntem kullanılarak çalışılmıştır.

3.4.2.7. İnterlökin 6 (IL-6) Ölçümü:

Çalışmamızda serum IL-6 düzeyleri DiaSource marka ticari kit (KAP1261) ile sandwich ELİSA metodu kullanılmıştır. Konjugat dışında tüm ELİSA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELİSA plağı ve serum örnekleri çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir.

Metodun Uygulanışı:

1. Çalışma için gerekli olan mikro kuyucuk bantları belirlenir. Kullanılmayan bantlar 2-8 °C de saklanır.
2. Mikro kuyucuk bantları güvenli bir çerçevede tutulur.
3. Her bir kuyucuğa 50 µl standart seyreltici eklenir.
4. Uygun kuyucuklara 100 µl kalibratör, kontrol ve serum eklenir.
5. Oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakılır.
6. 1 saatlik inkübasyon aşamasından sonra plağın yıkama aşamasına geçilir. Yıkama işlemi otomatize ELİSA yıkayıcısı (Columbus plus- ABBOTT) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem plaktaki sıvılar aspire edildikten sonra otomatize olarak her bir kuyucuğa verilen 0,4 ml yıkama solusyonu ile 3 kez tekrarlanmıştır.

Yıkama aşamasını takiben her bir kuyucuğa 100 µl anti- IL-6- HRP ve

50 µl numune seyreltici konulmuştur.

7. Plağın yüzeyi şeffaf örtüyle kaplanmış ve 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.

8. Her bir kuyucuktaki sıvı aspire edilmiştir.

9. Aspirasyon aşamasını takiben plak 3 kez ELİSA yıkayıcısında yıkanmıştır.

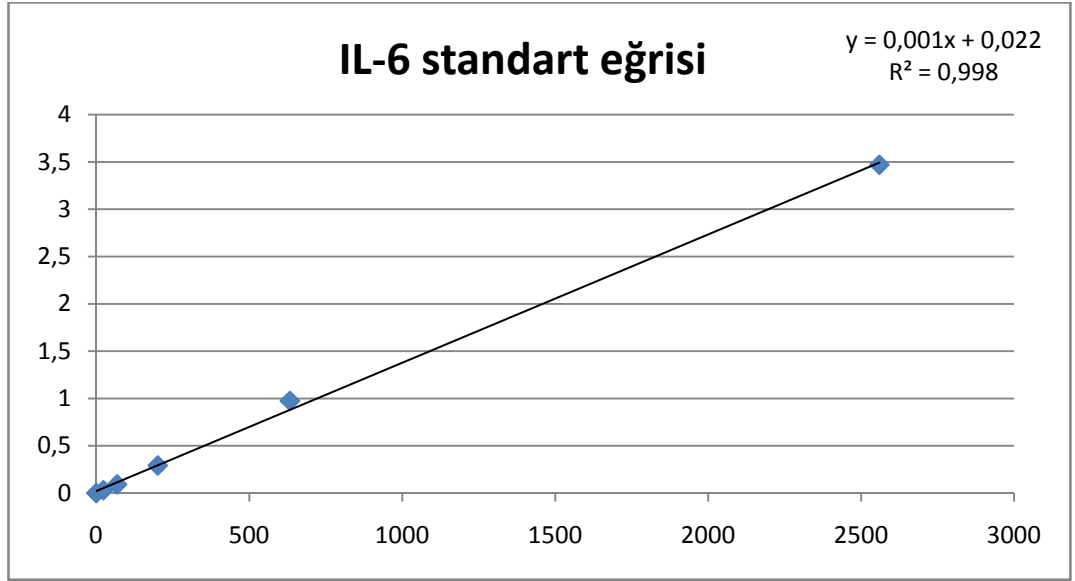
10. Yıkama aşamasını takiben 15 dakika içerisinde her bir kuyucuğa 200 µl kromojenik solüsyon ilave edilmiştir.

11. Oda ısısında, karanlık ortamda, 15 dakika boyunca plağın inkübasyonu yapılmıştır.

12. Bütün kuyucuklara 100 µl, 2N HCL içeren stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur.

13. Plaktaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELİSA okuyucusunda (Columbus plus-ABBOTT) değerlendirilmiştir.

14. Her bir standart için çift kuyucuk kullanılarak optik dansite degerleri hesaplanmış ve ortalamaları alınarak standart grafiği çizilmiştir (Sekil 3.1). Bu grafikteki denklemden yararlanılarak örneklerin optik dansiteleri doğrultusunda sonuçlar hesaplandı.



Grafik 4: IL-6 Standart Eğri Grafiği

3.4.2.8. High Sensitive C-Reaktif Protein (Hs-CRP) Ölçümü:

Çalışmamızda hs-CRP düzeyleri DiaSource marka ticari kit (KAPDP 4360) kullanılarak ölçülmüştür.

Prensip

Enzim immunoassay testin prensibi, tipik olarak iki basamaklı sandwich tip bir çalışmayı izlemesidir. Analiz oldukça spesifik iki monoklonal antikorun kullanımını içerir: CRP için spesifik monoklonal antikor, mikrowell plate üzerine immobilizedir ve CRP'nin farklı bir bölgesi için spesifik diğer monoklonal antikor, HRP'ye konjuge vaziyettedir. Numune ve standartlardaki CRP, plate'e bağlanmak için serbest bırakılır, yıkanır ve ardından HRP konjugatı ile inkübe edilir. İkinci bir yıkama işleminden sonra, enzim substratı ilave edilir. Durdurma solüsyonu ile enzimatik reaksiyon tamamlanır. Microtiter plate reader ile absorbans ölçülür. Enzimatik reaksiyon vasıtasıyla, oluşan rengin yoğunluğu; direkt olarak örnekteki CRP'nin konsantrasyonuyla orantılıdır

Reaktifler

1. Anti-CRP antikor kaplanmış tabaka (Plate)
2. Anti-CRP antikor-horseradish peroksidaz (HRP)
3. CRP standartları
4. Kontroller
5. Yıkama solüsyonu
6. Tampon çözelti
7. Tetrametilbenzidin (TMB)
8. Stop solüsyonu (reaksiyonu sonlandırıcı reagent: 1M sülfürik asit)

Çalışma

Hs-CRP miktarının tayini için -80 C° deki numuneler, +4 C° deki Elisa kiti reaktifleri, numuneler ve kontroller, oda sıcaklığına getirilerek analize başlandı.

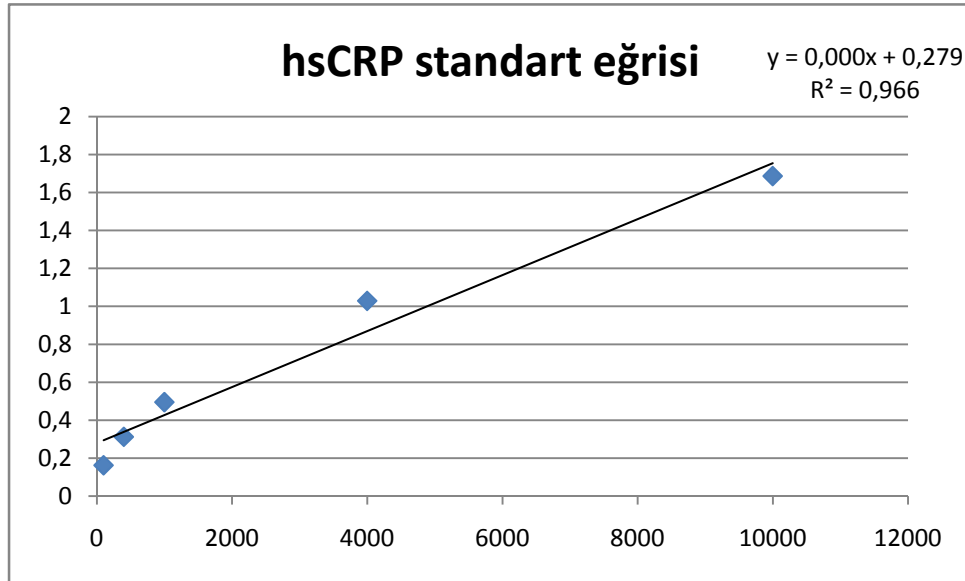
Hs-CRP Elisa Testi Çalışma Prosedürü

1. Bütün örnekler önce standart A ile 1:20 oranında seyreltildi
2. Çalışma solüsyonu olan anti-CRP-HRP için konjugate ve yıkama solüsyonu hazırlandı.
3. 20 µl kontrol ve seyreltilmiş numuneler numaralandırılmış kuyucuklara çift olarak koyuldu
4. 200 µl tampon çözelti her bir kuyucuga eklendi.
5. 30 dakika oda sıcaklığında 200 rpm de plate shaker üzerinde inkübasyona bırakıldı.
6. 3 kez otomatik yıkayıcı ile (her seferde 300 µl seyreltilmiş yıkama solüsyonu) yıkama yapıldı.
7. 100 µl konjugate çalışma solüsyonu her bir kuyucuga eklendi.

8. 15 dakika oda sıcaklığında 200 rpm de plate shaker üzerinde inkübasyona bırakıldı.
9. 3 kez otomatik yıkayıcı ile (her seferde 300 µl seyreltilmiş yıkama solüsyonu) yıkama yapıldı.
10. 100 µl TMB her bir kuyucuga eklendi.
11. 10- 15 dakika (standart F koyu mavi renge dönünceye kadar) inkübasyona bırakıldı.
12. 50 µl, 1M sülfürik asit her bir kuyucuga eklenerek reaksiyon sonlandırıldı.
13. 450 nm dalga boyunda Optik Dansite degerleri okundu.

Hesaplama

Her bir standart için çift kuyucuk kullanılarak optik dansite degerleri hesaplandı ve ortalamaları alınarak standart grafiği çizildi (Sekil 3.1). Bu grafikteki denklemden yararlanılarak hastaların optik dansiteleri doğrultusunda sonuçlar hesaplandı.



Grafik 5: hs-CRP Standart Grafiği

3.5. Verilerin Analizi:

Bu çalışmada elde edilen veriler, SPSS 15 istatistik programında değerlendirilmiştir. Deneklerin karakteristikleri için tanımlayıcı istatistik yapılmıştır. Donörlerde serum demir, demir bağlama kapasitesi, albumin, ferritin, IL-6, hs-CRP, TAK, MDA, AOPP değişimi Wilcoxon ilişkili ikili örneklem testi kullanılarak değerlendirilmiştir. G-CSF ile mobilizasyon işlemi öncesi serum değerleri bazal olarak alınmıştır ve G-CSF ile mobiliasyonun 4. Günü (aferez işlemi öncesi), aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra bulunan sonuçlar bazal değerler ile karşılaştırılmıştır. P değerinde 0.05, anlamlılık değeri olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada; vericilerin G-CSF ile mobilizasyonun 4. günü, aferezden hemen sonra, aferezden 24 saat sonra ve aferezden 1 hafta sonraki serum demir, demir bağlama kapasitesi (DBK), albümin, ferritin, interlökin-6, hs-CRP, total antioksidan kapasite (TAK), malondialdehit (MDA) ve ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP) düzeyleri G-CSF öncesi ölçümlere bakılarak aralarındaki ilişki karşılaştırılmıştır.

- Sonuçlar tüm tablo ve grafiklerde ortanca (min-max) olarak verilmiştir.
- $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Vericilerin aferez işlemi öncesi perifer kanından ve işlem sonrası toplanan üründen elde edilen CD34+ kök hücre sayısı tablo 1' de sunulmuştur.

Tablo 3. Donörlere ait aferez işlemi öncesi (perifer kanından) ve işlem sonrası (üründen) elde edilen CD34+ kök hücre sayıları istatistiksel olarak ortanca (min-max) olarak verilmiştir.

	İşlem Öncesi CD34+ Kök Hücre(/ μ l)	İşlem Sonrası CD34+ Kök Hücre($\times 10^6$ /kg)
Sağlıklı Gönüllü Vericiler N=25	28,10 (10,6-70,0)	3,47 (1,20-14,9)

Serum örneklerine ait demir (ug/dl), demir bağlama kapasitesi (ug/dl), transferin saturasyonu (ug/dl), albumin (g/dl), globulin (g/dl), ferritin (ng/ml), interlökin-6 (pg/dl), hs-CRP (mg/dl), total antioksidan kapasite (mM), malondialdehit (nmol/ml), protein ileri oksidasyon ürünleri (μ mol/l) düzeylerinin istatistiksel sonuçları ortanca (min-max) olarak tablo 2' de sunulmuştur.

Tablo 4. Serum örneklerine ait istatistiksel sonuçlar ortanca (min-max) olarak verilmiştir (•: bazal değere göre istatistiksel olarak anlamlı, P<0.05)

	G-CSF öncesi	G-CSF'nin 4. Günü(aferez öncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
Demir	69 (17-181)	84 (38-251)	82 (40-185)	113(73-209)•	74 (33-154)
DBK	255(98-500)	240(146-357)•	184 (123-285)•	184(61-267)•	262(186-456)
Albumin	4,39 (3,89-4,98)	4,2 (3,71-7,81)•	3,61 (3,04-4,48)•	3,97 (3,52-4,64)•	4,34 (3,73-4,91)
Ferritin	49,4 (2,7-435,4)	107,2 (34,6-653,3)•	93,3 (27,1-528,4)•	126,2 (41,1-610)•	100,2 (5,2-912,5)•
IL-6	6,35 (0,64-85,64)	7,07 (0,64-94,21)	7,07 (2,07-82,78)	8,5 (2,78-75,64)	3,5 (1,35-57,07)•
hs-CRP	0,20 (0,00-0,51)	0,34 (0,00-0,54)•	0,33 (0,00-0,60)•	0,47 (0,05-0,60)•	0,13 (0,00-0,57)•
TAK	2,15 (0,19-5,74)	5,00 (0,20-8,38)•	7,12 (4,57-9,72)•	8,03 (4,89-9,97)•	8,66 (3,56-9,98)•
MDA	4,60 (2,78-6,42)	4,54 (3,46-8,86)	3,98 (3,12-5,28)•	3,29 (1,31-5,28)•	3,64 (1,59-29,42)•
AOPP	211,34 (15,82-532,24)	168,06 (48,66-497,16)•	185,22 (59,10-447,91)	310,60 (38,96-1155,37)•	334,48 (67,31-1500,9)•

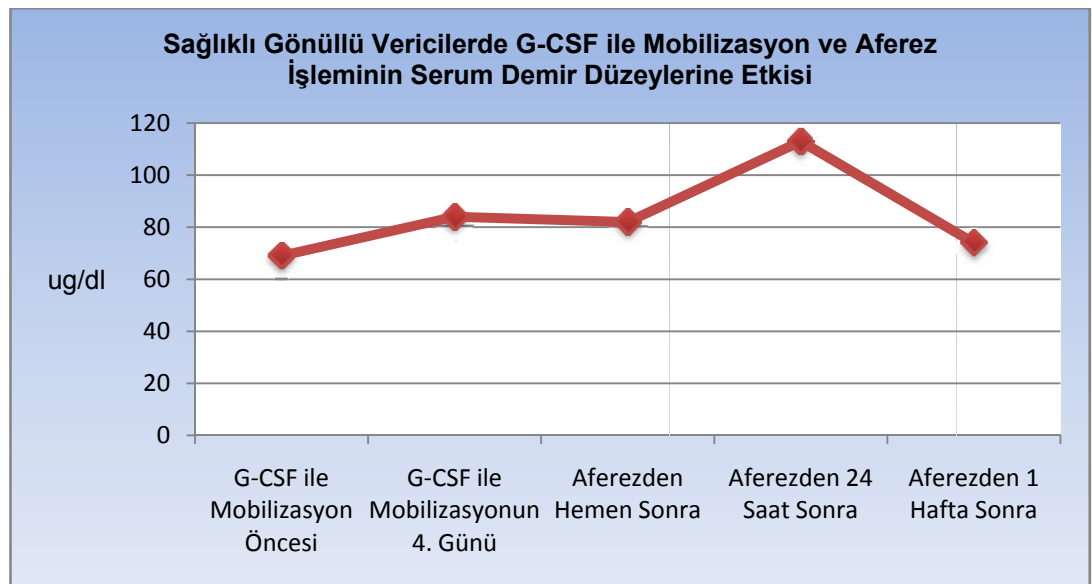
4.1. Serum Demir Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum demir düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 3’ de verilmiştir.

Tablo 5. Serum Demir Düzeyleri (ortalama, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF’nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
Demir	69 (17-181)	84 (38-251)	82 (40-185)	113 (73- 209)	74 (33-154)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu, G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonra ki serum demir düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki serum demir değerleri karşılaştırıldığında ise anlamlı istatistiksel fark mevcuttu ($p<0,05$).



Grafik 6. Serum demir düzeyleri

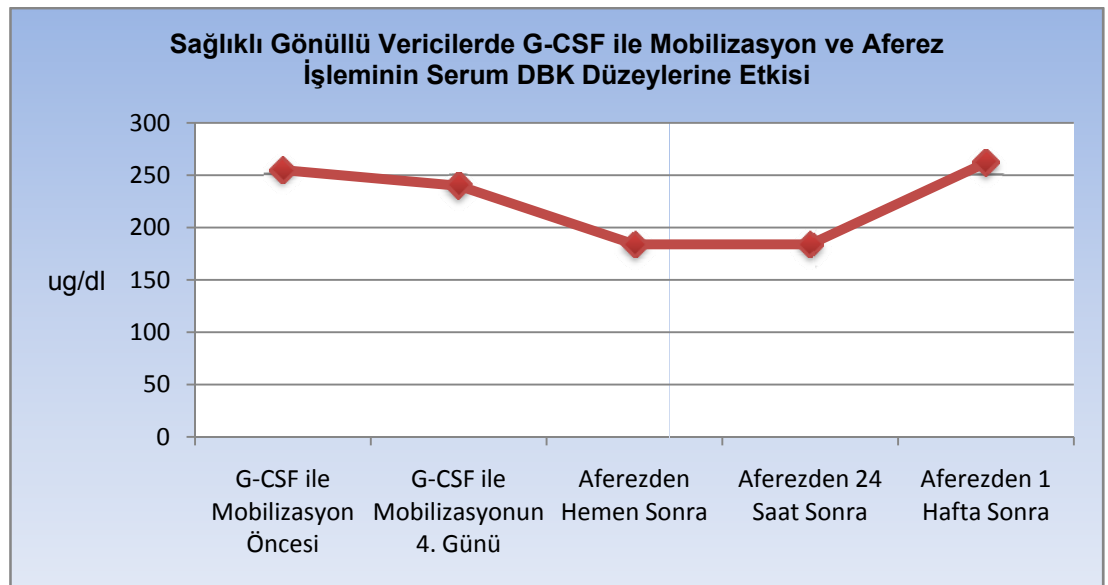
4.2. Serum DBK Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum DBK düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 4’ de verilmiştir.

Tablo 6. Serum DBK düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF’nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
DBK	255 (98-500)	240 (146-357)	184 (123-285)	184 (61-267)	262 (186-456)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki serum DBK düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum DBK düzeyleri arasında ise anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Grafik 7. Serum DBK düzeyleri

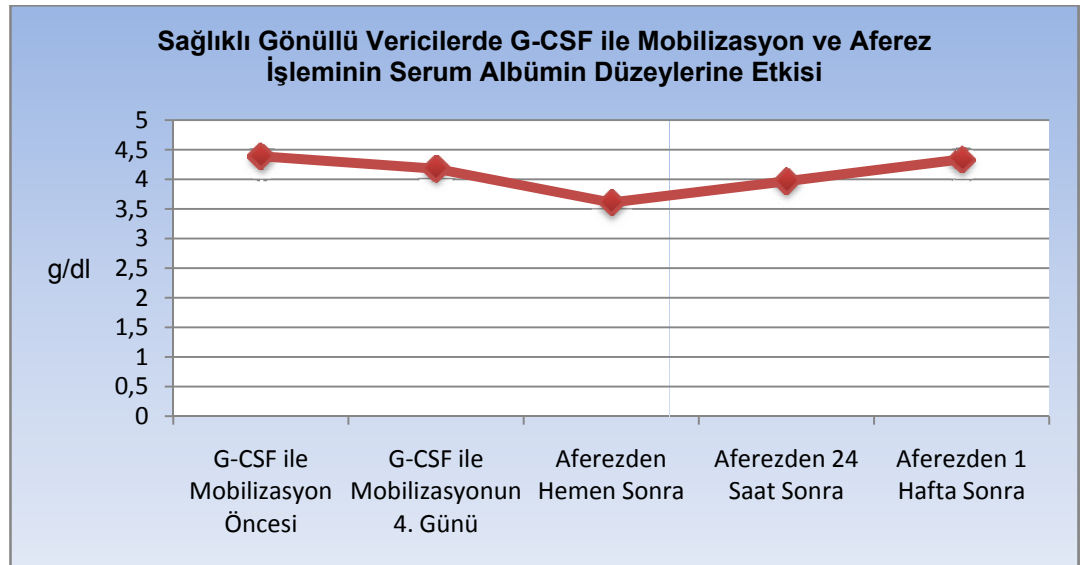
4.3. Serum Albumin Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum albumin düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 6' de verilmiştir.

Tablo 7. Serum Albümin Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF'nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
Albumin	4,39 (3,89-4,98)	4,2 (3,71-7,81)	3,61 (3,04-4,48)	3,97 (3,52-4,64)	4,34 (3,73-4,91)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki serum albumin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum albümin düzeyleri arasında ise anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Grafik 8. Serum Albümin Düzeyleri

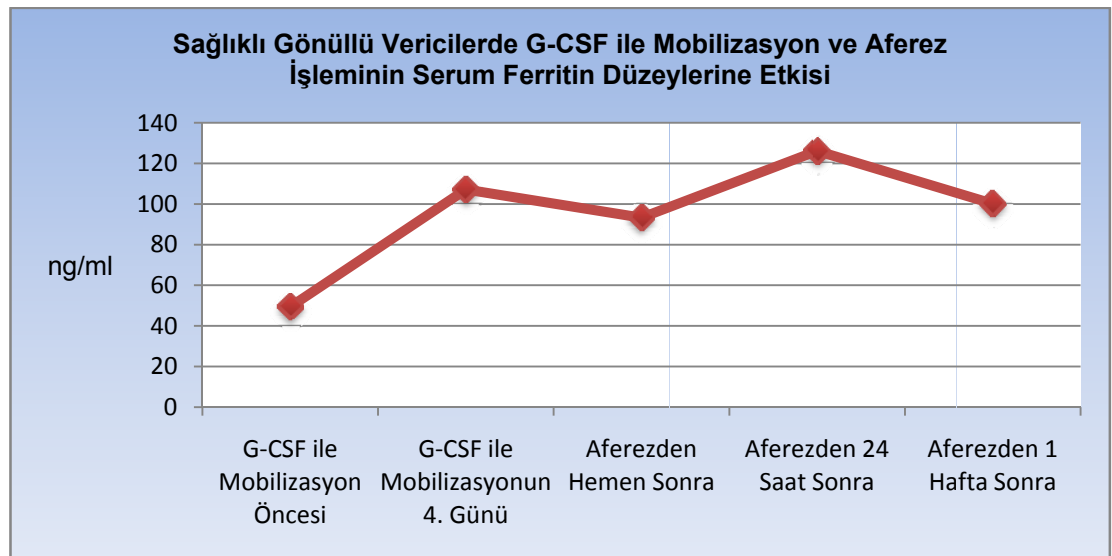
4.4. Serum Ferritin Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum ferritin düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. Serum Ferritin Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF’nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
Ferritin	49,4 (2,7-435,4)	107,2 (34,6-653,3)	93,3 (27,1- 528,4)	126,2 (41,1-610)	100,2 (5,2-912,5)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki ve G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum ferritin düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).



Grafik 9. Serum Ferritin Düzeyleri

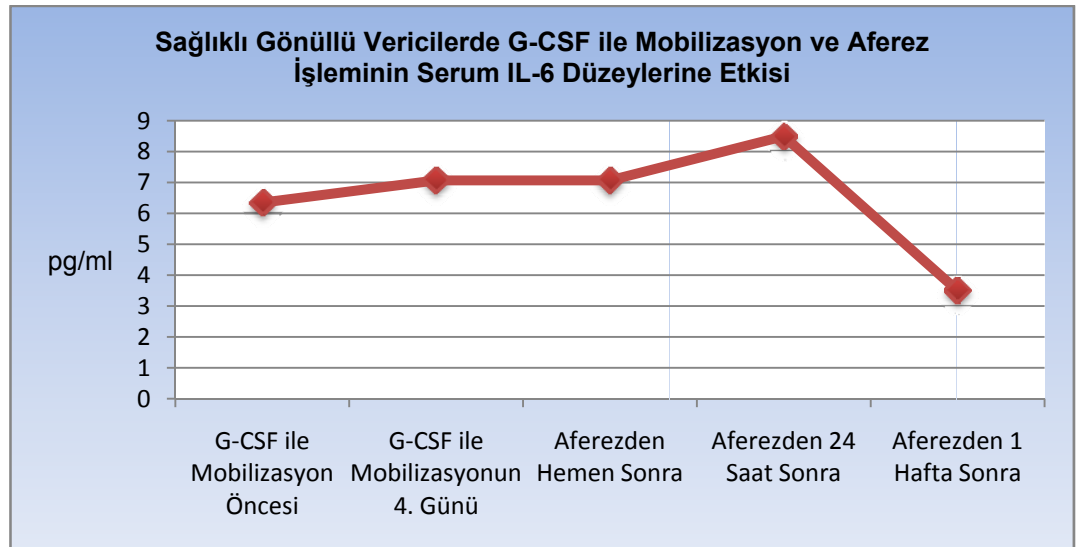
4.5. Serum IL-6 Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum IL-6 düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 9. Serum IL-6 Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF'nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
IL-6	6,35 (0,64-85,64)	7,07 (0,64-94,21)	7,07 (2,07-82,78)	8,5 (2,78-75,64)	3,5 (1,35-57,07)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki serum IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum IL-6 düzeyleri arasında ise anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).



Grafik 10. Serum IL-6 Düzeyleri

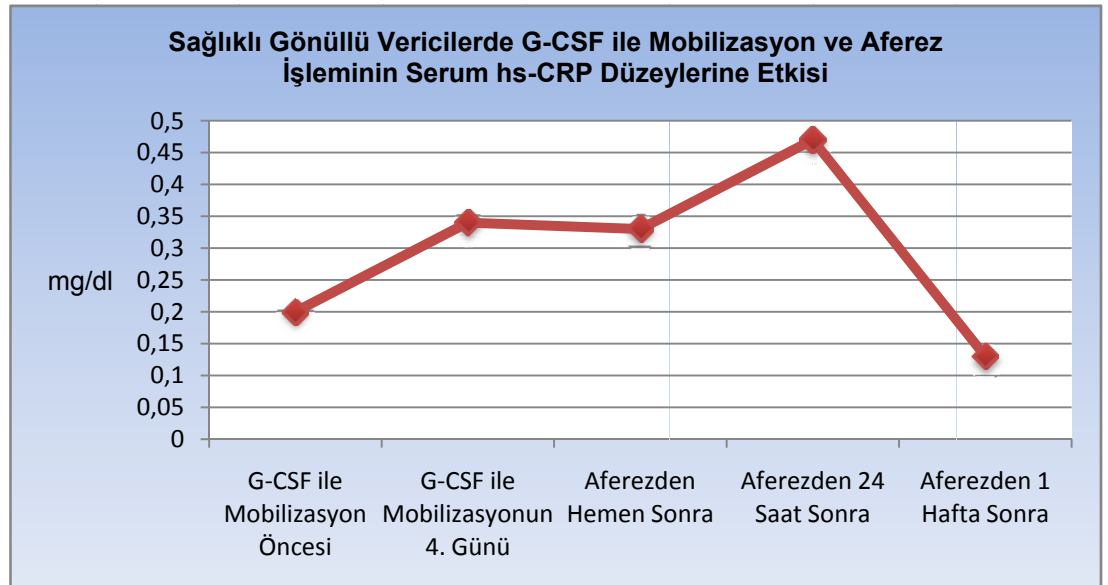
4.6. Serum hs-CRP Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum hs-CRP düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 9’ da verilmiştir.

Tablo 10. Serum hs-CRP Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF’nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
hs-CRP	0,20 (0,00-0,51)	0,34 (0,00-0,54)	0,33 (0,00-0,60)	0,47 (0,05-0,60)	0,13 (0,00-0,57)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki serum hs-CRP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$), ve G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum hs-CRP düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Grafik 11. Serum hs-CRP Düzeyleri

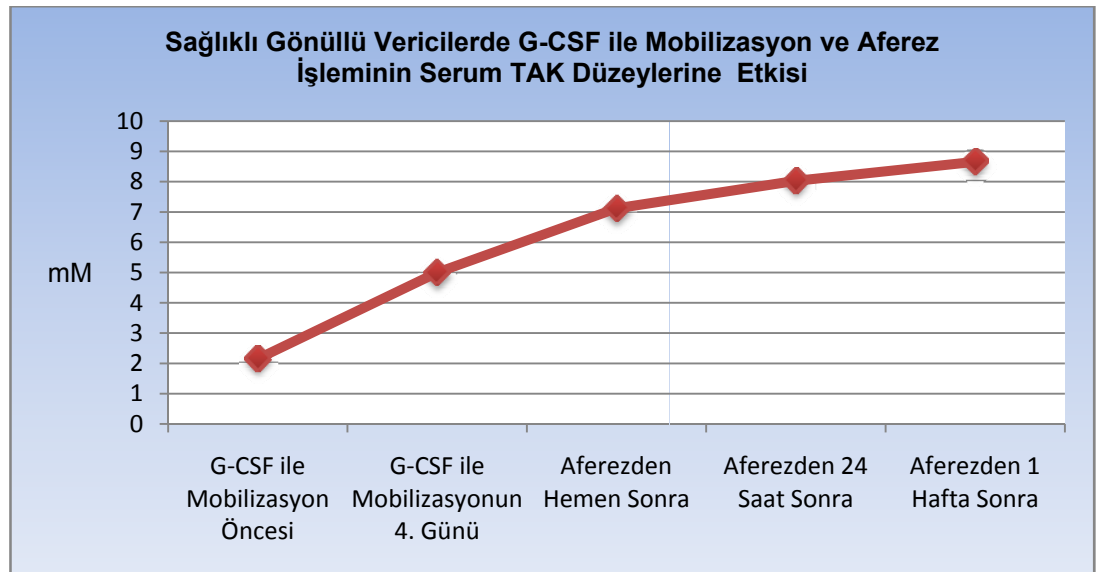
4.7. Serum TAK Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum TAK düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 11’ de verilmiştir.

Tablo 11. Serum TAK Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF’nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
TAOK	2,15 (0,19-5,74)	5,00 (0,20-8,38)	7,12 (4,57-9,72)	8,03 (4,89-9,97)	8,66 (3,56-9,98)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonraki ve G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum TAK düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).



Grafik 12. Serum TAK Düzeyleri

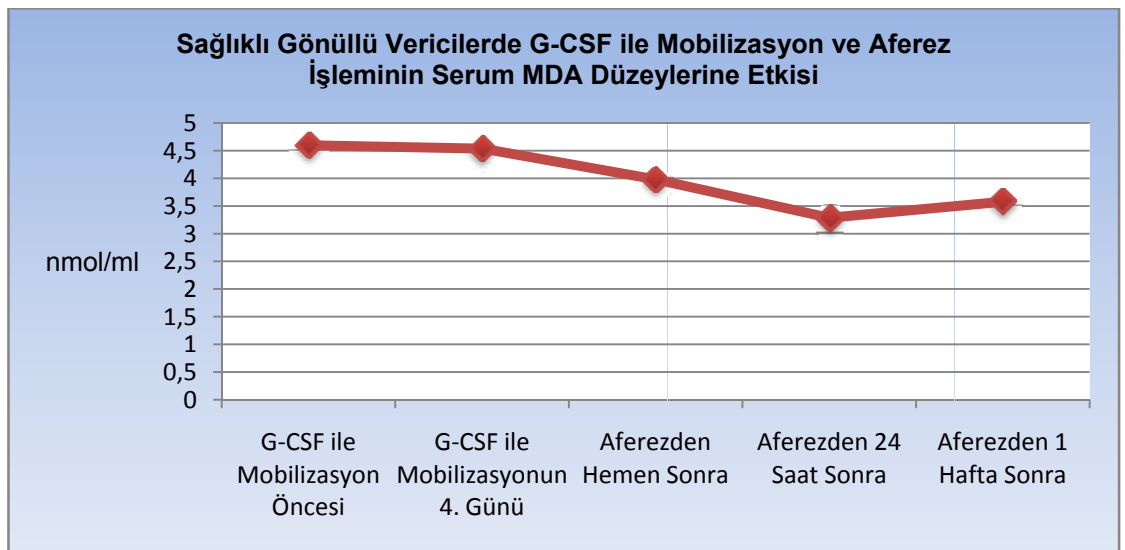
4.8. Serum MDA Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum MDA düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 10' da verilmiştir.

Tablo 12. Serum MDA Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF'nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
MDA	4,60 (2,78-6,42)	4,54 (3,46-8,86)	3,98 (3,12-5,28)	3,29 (1,31-5,28)	3,64 (1,59-29,42)

G-CSF öncesi ile aferez öncesi, serum MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$), G-CSF öncesi ile aferez sonu ve G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonar ve G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum MDA düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$).



Grafik 13. Serum MDA Düzeyleri

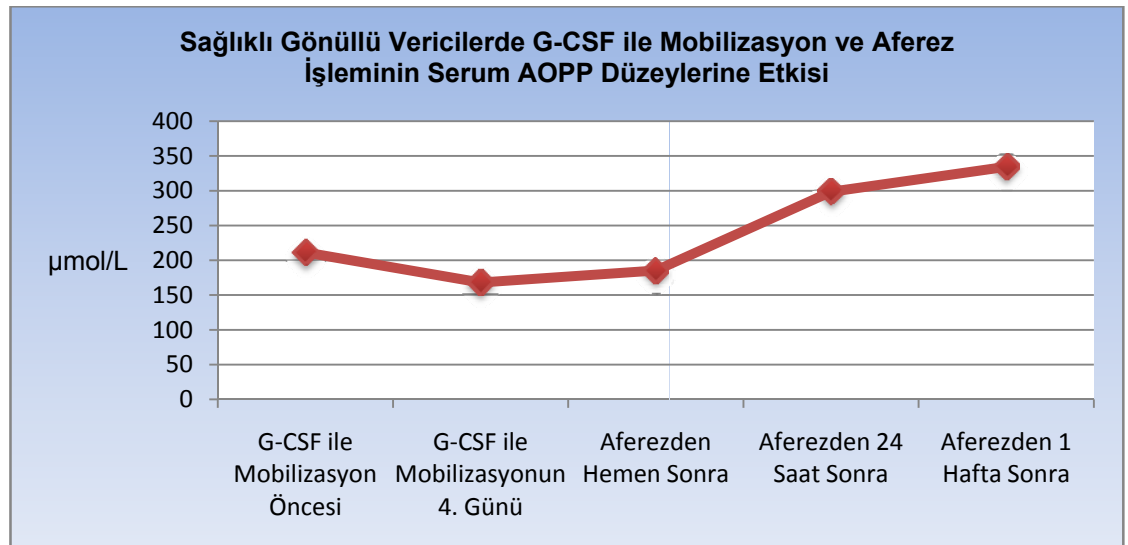
4.9. Serum AOPP Düzeyleri

G-CSF öncesi, aferez öncesi, aferez sonrası, aferezden 24 saat sonra, aferezden 1 hafta sonra serum AOPP düzeyleri istatistiksel olarak ortanca (min-max) şeklinde tablo 11’ da verilmiştir.

Tablo 13. Serum AOPP Düzeyleri (ortanca, min-max)

	G-CSF öncesi	G-CSF’nin 4.Günü (aferezöncesi)	Aferez Sonu	Aferezden 24 saat sonra	Aferezden 1 hafta sonra
AOPP	211,34 (15,82- 532,24)	168,06 (48,66-497,16)	185,22 (59,10- 447,91)	310,60 38,96- 1155,37)	334,48 (67,31- 1500,9)

G-CSF öncesi ile aferez sonu serum AOPP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$), G-CSF öncesi ile aferez öncesi, G-CSF öncesi ile aferezden 24 saat sonra ve G-CSF öncesi ile aferezden 1 hafta sonraki serum AOPP düzeyleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).



Grafik 14. Serum AOPP Düzeyleri

5. TARTIŞMA

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler “kök hücreler” olarak bilinmektedir.²

HKH’ler; kemik iliğinde, göbek kordonu kanında ve periferik kanda bulunan, erişkinde özel yöntemlerle ve belli büyüme faktörlerinin yardımı ile çoğaltılabilen ve kan hücrelerine dönüşebilen kök hücrelerdir.³³

Allojenik hematopoetik kök hücre naklinin; malign veya malign olmayan hastalığa sahip kişilere yapıldığı belirtilmiştir. Bunun için sağlıklı donörden elde edilen kemik iliği, kordon kanı veya granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ile mobilize (kök hücrelerin kemik iliğinden ayrılıp dolaşıma girmeleri) olan periferik kan hematopoetik kök hücrelerinin verilmekte olduğu söylenmiştir. Buna takiben hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastada, immün ve hematopoetik hücrelerin yerini verici kökenli hücrelerin aldığı ileri sürülmüştür.^{24,25}

Kök hücrelerin mobilizasyonu, klinikte kök hücre nakil hastalarına ve donörlerine verilen G-CSF uygulamasıyla kolaylıkla gerçekleşir. G-CSF; granülosit seriye ait progenitör hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonlarını arttıran büyüme faktörüdür.^{36,37}

G-CSF en önemli myeloid seri büyüme faktörü olarak endotel nişteki osteblastlar üzerinde eksprese edilen CXCL 12 yi mRNA düzeyinde kontrol ederek azaltır, aynı zamanda kök hücrelerin nişte kalımını sağlayan sinyalleri ve adezyon bağlantılarını yıkan nötrofil proteazları, elastaz, katepsin D, matriks metaloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 gibi proteolitik enzimlerin salınımlarını sağlar. MMP’ lar membrana

bağımlı CXCL 12' yi uçlarından keser ve adeziv etkilerini yok ederler. Ayrıca G-CSF etkisi ile HKH' ler üzerindeki CXCL12' ye bağlanan CXCR 4 ler de inaktive olurlar.^{36,37}

G-CSF etkisi ile kemik iliğinden periferik kana salınan hematopetik kök hücreler donörden aferez denilen işlemle toplanır. Aferez işleminde genel prensip; periferik kanın santrifüj edilmesi, hücrelerin yer çekiminin etkisiyle çökmesi, en altta kalan eritrosit tabakasının üzerindeki lökosit tabakasının dedektör tarafından tespiti ve ayrı bir torbaya toplanmasıdır.¹¹⁵

Sağlıklı donörlere 10 µg/kg/gün G-CSF, 5 gün boyunca subkutan veya intravenöz (IV) verilerek 5 ve gerekirse 6. günlerde kök hücreler toplanmaktadır.³⁸

Dreger ve arkadaşları;²⁹ 10 µg/kg/gün G-CSF vererek normal sağlıklı donörlerden ortalama 5.5×10^6 /kg CD34+ hücre toplandığını bildirmiştir. Schmitz ve arkadaşları;³⁰ sağlıklı donörlerden yine aynı dozda G-CSF kullanımı ile ortalama 6.7×10^6 CD34+ hücre/kg elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Biz çalışmamızda; vericilere 4 gün süreyle 10 µg/kg/gün G-CSF (Neupogen, Roche) uyguladık ve çalışmada yer alan 25 sağlıklı vericiden ortalama 4.11×10^6 CD34+ hücre/kg elde ettik. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin önceki çalışmalardan farklı olmasının nedeni, periferik kök hücre mobilizasyonu amacı ile uygulanan G-CSF gün sayısının farklı olmasından kaynaklanabilir.

G-CSF; granülosit seriye ait progenitör hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonlarını arttıran büyüme

faktörüdür. Kemik iliğinin uyarılması ile prekürsör ve olgun nötrofilik granülositlerin üretilmesi ve fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlar.³²

Haas ve arkadaşları;¹¹⁶ G-CSF' in kemik iliğinden nötrofil salınımını hızlandığını ve myeloid öncülerinin çoğalarak sitokin salınımını uyardığını ileri sürmüşlerdir. G-CSF' in sekretuar vezikülleri mobilize ettiğini ve azurofilik granüllerin ve içeriklerinin salınımını uyardığını belirtmişlerdir. Demetri ve Griffin;¹¹⁷ G-CSF' in inflamatuvar uyarılara karşı nötrofil yanıtını kontrol etmede ve nötrofil üretiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Weiss ve arkadaşları;¹¹⁸ eksojen G-CSF alımının sitokin salınımına neden olarak sistemik inflamatuvar cevap oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Sağlıklı allojenik kök hücre donörlerinde G-CSF alımına bağlı gelişen sitokin cevabı ve inflamasyon üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Yapılan bir çalışmada sağlıklı donörlerde G-CSF' in plazma sitokinleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. G-CSF uygulanan donörlerin mobilizasyon öncesi ve mobilizasyonun 5. günündeki plazma sitokin ve hücre adezyon molekülü düzeyleri ölçülmüş ve IL-6, MMP-9, E-selektin ve fibronektin düzeylerinin G-CSF alımından sonra arttığı bulunmuştur.¹¹⁹

Carstanjen ve arkadaşları;¹²⁰ potansiyel mediatör olarak sitokinlerin G-CSF' ye bağlı salınımını incelemişlerdir. G-CSF ile mobilize edilen hematopoetik kök hücre donörlerinin serum ve idrar örneklerinden mobilizasyon tedavisi boyunca ve toplamadan önce interlökin-6 (IL-6), C-reaktif protein (CRP), lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LPB) ve alkalen fosfataz (ALP) düzeylerini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak IL-6 ve CRP düzeylerinin G-CSF tedavisinin 4. ve 5. günlerinde yükseldiğini bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda; serum IL-6 düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra ve aferez işleminden 24 saat sonra bazal duruma göre (G-CSF öncesi) artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aferezden 1 hafta sonra ise IL-6 düzeyleri bazal değerlere göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. Serum hs-CRP düzeyleri; G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra ve aferez işleminden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aferezden 1 hafta sonra düşüş göstererek bazal duruma yakın bir değer almıştır. Elde ettiğimiz verilere dayanarak daha önce bahsedilen çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin sitokin salınımına ve akut bir inflamatuvar cevaba yol açtığını söylenebilir. IL-6 ve hs-CRP düzeylerinin aferez işleminden 1 hafta sonra bazal değere yaklaşması sonucu bu inflamasyonun geçici olduğu ifade edilebilir.

Sağlıklı allojenik kök hücre donörlerinde G-CSF uygulanması ve aferez işleminin demir parametrelili ile ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık. Özgürtaş ve arkadaşları;¹²¹ Serum ferritin düzeylerinin hem demir metabolizması bozukluklarında, hem de inflamasyon sürecini içeren pek çok durumda artabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda sağlıklı donörlerde serum ferritin düzeyleri, G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonar bazal değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. IL-6 ve hs-CRP nin aksine ferritin düzeylerinin aferezden 1 hafta sonrada yüksek kalmaya devam etmesi ve donörlerin serum demir düzeylerinin aferezden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulunması aferez işleminin demir metabolizmasında değişiklik yapabileceğini düşündürmektedir. Ancak bizim çalışmamız sağlıklı donörlerde periferik

kök hücre aferezi işleminin demir parametreleri üzerine etkisini irdeleyen ilk çalışmadır. Konunun detaylarının açıklanması için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) oksidatif stresin protein oksidasyonu üzerine etkisini gösteren en önemli göstergelerden biridir. Witko-Sarsat ve arkadaşları¹²⁹ tarafından ilk defa üremik hastaların plazmasında tanımlanan yüksek dereceli okside proteinler olarak tanımlanan AOPP' nin güvenilir bir oksidatif stres markırı olduğu kabul edilmektedir. Kimyasal yapısı halen araştırılmakta olan AOPP' nin, kendi klirensini de önleyebilen yüksek molekül ağırlığına sahip olduğunu, disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albümin agregatlarından oluştuğunu ve saf albüminden farklı olduğunu kromotografik ve elektroforetik tekniklerle tespit etmişlerdir. Bu nedenle oksidatif modifikasyona uğrayan albümin' in son çapraz bağlanma ürünleri, AOPP olarak tanımlanmıştır.¹²⁹ AOPP' nin, invitro şartlarda H₂O₂'den çok HOCl' ye maruz kalan saf/plazma albümin örneklerinde oluştuğu belirlendiğinden, in vivo olarak aktif nötrofillerce üretilen HOCl'nin AOPP oluşturabileceği düşünülmektedir.¹²³

Michelis ve arkadaşları,¹²⁴ hemodiyaliz hastalarında oksidatif stres ve hipoalbüminemi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Serum albümin ve AOPP düzeyleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu, hipoalbüminemi ve oksidatif stresin direk olarak bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir.

Sağlıklı kök hücre donörlerinde, G-CSF ile mobilizasyon ve periferik kök hücre aferezi işleminin, serum AOPP düzeyleri üzerine etkisini irdeleyen bir çalışmaya rastlamadık. G-CSF' nin nötrofil aktivasyonu ve degranülasyonu yaptığı ve nötrofillerin, sitoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü

oksidatif bir yapı olan hipokloridi (HOCl) oluşturduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir.^{77,36,37} Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin protein oksidasyonuna etkisini değerlendirmek için serum albümin ve AOPP düzeylerini inceledik. Çalışmamızda serum AOPP düzeylerini G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde (aferez işlemi öncesi) bazal değerlere göre anlamlı olarak düşük bulduk. Aferez sonu yükselmeye başlayan AOPP düzeylerini aferezden 24 saat sonra ve aferezin 1. haftasında anlamlı olarak yüksek kalmaya devam ettiğini tespit ettik. Serum albümin düzeylerini G-CSF ile mobilizasyonun 4. Günü, aferez sonu ve aferezden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak düşük bulduk. Aferezden 1 hafta sonra ise yükselerek bazal duruma yakın bir değer aldığını gördük. Serum AOPP düzeylerinin aferez sonunda yükselmeye başlaması, aferezden 24 saat sonra ve aferezden 1 hafta sonra anlamlı olarak yüksek bulunması ayrıca serum albümin düzeylerinin G-CSF ile mobilizasyonun 4. günü, aferez sonu ve aferezden 24 saat sonra bazal duruma göre anlamlı olarak düşük bulunması Michelis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzemektedir. Bu sonuçlara dayanarak G-CSF ile mobilizasyonun ve aferez işleminin hemen sonrasında oksidatif stresin olduğu söylenebilir. Ancak G-CSF uygulanması ve aferez işleminin uzun vadede etkisini bu çalışmada değerlendirmek mümkün olmayabilir. Bu konuda da daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde kullanılan en yaygın metod MDA ölçümüdür.¹²⁸ Uchida ve arkadaşları;⁸⁶ lipid peroksidasyonunun, oksijen türevi serbest radikaller tarafından tetiklenen oksidatif stresin en önemli organik göstergelerinden biri olduğunu bildirmişlerdir. Serbest oksijen radikalleri çok reaktif olmaları nedeni ile direkt olarak ölçülememekte, lipid peroksidasyonu sırasında açığa çıkan daha stabil moleküllerin ölçümü yapılmaktadır. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak en sık kullanılan ve doku hasarı

konusunda fikir veren bu moleküllerden birisi MDA'dır.^{125,126,128} Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu ve hücresel hasarı değerlendirmek üzere MDA düzeylerini inceledik. G-CSF ile mobilizasyonun 4. Gününde serum MDA düzeyleri bazal değerlere göre düşük bulunmakla birlikte bu düşüş anlamlı bulunmamıştır. Aferez sonu, aferezden 24 saat sonra ve aferezden 1 hafta sonra ise serum MDA düzeyleri anlamlı bir şekilde düşmeye devam etmiştir.

Serbest oksijen radikallerine karşı majör korunma sistemi antioksidan enzim sistemidir. Evans ve arkadaşları;¹²⁷ plazmada bulunan antioksidanların ayrı ayrı ölçülebilirler de; çok sayıda antioksidan olması ve birbiriyle in vivo etkileşimleri nedeniyle, oksidatif stresin ortaya konulmasında, total antioksidan kapasite (TAK)' yi gösteren testlerin daha değerli olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda serum TAK düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. Gününde, aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra bazale göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda serum MDA düzeylerinin düşmesi ve TAK' ın artması, G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyinde düşüşe yol açarak plazma antioksidan kapasitesini desteklediği ortaya konulabilir. Literatürde G-CSF uygulanması ve aferez işleminin serum MDA ve TAK üzerine etkilerini inceleyen çalışmaya rastlamadık. Bu konuda da daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin sağlıklı periferik kök hücre donörlerinde oksidatif stres ve inflamasyona sebep olmakla birlikte doku yıkımına neden olmadığını göstermektedir. Bu konuda çalışmaların devam etmesinin, G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin sağlıklı donörlerdeki potansiyel zararlarının 6 ay ve 1 yıllık dönemlerde de araştırılması ile daha da güvenilir sonuçlara ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Çalışmamızda allojenik periferik kök hücre nakli donörlerinde G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin etkilerini inceledik.

Kök hücre donörlerinde serum IL-6 düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra ve aferez işleminden 24 saat sonra bazal duruma göre (G-CSF öncesi) önemsiz artış göstermiştir. Aferezden 1 hafta sonra ise IL-6 düzeyleri bazal değerlere göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. Serum hs-CRP düzeyleri; G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra ve aferez işleminden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aferezden 1 hafta sonra düşüş göstererek bazal duruma yakın bir değer almıştır.

Serum ferritin düzeyleri, G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda serum AOPP düzeylerini G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde (aferez işlemi öncesi) bazal değerlere göre anlamlı olarak düşük bulduk. Aferez sonu yükselmeye başlayan AOPP düzeylerini aferezden 24 saat sonra ve aferezin 1. haftasında anlamlı olarak yüksek kalmaya devam ettiğini tespit ettik. Serum albümin düzeylerini G-CSF ile mobilizasyonun 4. Günü, aferez sonu ve aferezden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak düşük olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda serum MDA düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde bazal değerlere göre düşük bulunmakla

birlikte bu düşüş anlamlı bulunmamıştır. Aferez sonu, aferezden 24 saat sonra ve aferezden 1 hafta sonra ise serum MDA düzeyleri anlamlı bir şekilde düşmeye devam etmiştir.

Serum TAK düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. Gününde, aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra bazale göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

7. ÖZET

Sağlıklı Gönüllü Vericilerde G-CSF ile Mobilizasyon ve Aferez İşleminin İnflamatuvar Belirteçler, Oksidatif Stres ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi

Allojenik hematopoetik kök hücre nakli; malign veya malign olmayan hastalığa sahip kişilere yapılır. Bunun için sağlıklı donörden elde edilen kemik iliği, kordon kanı veya granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ile mobilize (kemik iliğinden ayrılıp dolaşıma girmeleri) olan periferik kan hematopoetik kök hücreleri kullanılmaktadır.

Çalışmamızda G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin, sağlıklı gönüllü donörlerdeki inflamatuvar belirteçler, oksidatif stres ve antioksidan kapasite üzerine etkilerini inceledik.

Bu çalışmada; serum IL-6 düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra ve aferez işleminden 24 saat sonra bazal duruma göre (G-CSF öncesi) istatistiksel olarak önemsiz bir artış göstermiştir. Aferezden 1 hafta sonra ise IL-6 düzeyleri bazal değerlere göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. Serum hs-CRP düzeyleri; G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra ve aferez işleminden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Aferezden 1 hafta sonra düşüş göstererek bazal duruma yakın bir değer almıştır.

Sağlıklı donörlerde serum ferritin düzeyleri, G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde, aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda serum ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) düzeylerini G-CSF ile mobilizasyonun 4. gününde (aferez işlemi öncesi) bazal değerlere göre anlamlı olarak düşük bulduk. Aferez sonu yükselmeye başlayan AOPP düzeylerini aferezden 24 saat sonra ve aferezin 1. haftasında anlamlı olarak yüksek kalmaya devam ettiğini tespit ettik. Serum albümin düzeylerini G-CSF ile mobilizasyonun 4. Günü, aferez sonu ve aferezden 24 saat sonra bazal değerlere göre anlamlı olarak düşük bulduk. Aferezden 1 hafta sonra ise yükselerek bazal duruma yakın bir değer aldığını gördük.

Serum malondialdehit (MDA) düzeyleri, G-CSF ile mobilizasyonun 4. Gününde bazal değerlere göre düşük bulunmakla birlikte bu düşüş anlamlı bulunmamıştır. Aferez sonu, aferezden 24 saat sonra ve aferezden 1 hafta sonra ise serum MDA düzeyleri anlamlı bir şekilde düşmeye devam etmiştir.

Serum total antioksidan kapasite (TAK) düzeyleri G-CSF ile mobilizasyonun 4. Gününde, aferez işleminden hemen sonra, aferez işleminden 24 saat sonra ve aferez işleminden 1 hafta sonra bazale göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Bu çalışma G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin sağlıklı periferik kök hücre donörlerinde oksidatif stres ve inflamasyona sebep olmakla birlikte doku yıkımına neden olmadığını göstermektedir. Ayrıca bu işlem demir metabolizmasını etkilemektedir. Bu konuda çalışmaların devam etmesinin, G-CSF ile mobilizasyon ve aferez işleminin sağlıklı donörlerdeki potansiyel zararlarının 6 ay ve 1 yıllık dönemlerde de araştırılması ile daha da güvenilir sonuçlara ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.

8. SUMMARY

In healthy voluntary donor mobilization with G-CSF and effects of apheresis process on inflammatory marker, oxidative stress and antioxidant capacity

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; is done to patients have malign or nonmalign disorders. For this stem cells are taken from the healthy donor, cord blood or peripheric blood hematopoietic stem cells which are mobilized (separated from bone marrow and entering circulation) with granulocyte colony stimulating factor, are used.

In our study we examined the effects of the mobilization with G-CSF and apheresis process's on inflammatory marker, oxidative stress and antioxidant capacity.

In this study; mobilization with G-CSF in 4. th day, immediately after apheresis and 24 hours after apheresis process compared to basal condition (before G-CSF) showed a statistically insignificant increase in serum IL-6 levels. 1 week after apheresis compared to basal values IL-6 levels showed a significant decrease. Serum hs-CRP levels; mobilization with G-CSF on 4.th day, immediately after apheresis process and 24 hours after apheresis process, were found significantly high compared to basal values. 1 week after apheresis indicating a decrease and took a value near to basal condition.

In healthy donor serum ferritin levels; mobilization with G-CSF on 4.th day, immediately after apheresis, 24 hours after apheresis and 1 week after apheresis were found significantly high.

In our study compared to basal levels we found serum further oxidation protein products (AOPP) levels significantly low on 4.th day mobilization with G-CSF (before apheresis process). At the end of apheresis rising of AOPP levels 24 hours after apheresis and at the 1.st week of apheresis we have detected that continue to be remained significantly high. we found that serum albumin levels mobilization with G-CSF on 4. th day, end of apheresis and 24 hours after apheresis significantly lower than basal values. 1 week after apheresis we found that rising take a value near the basal condition.

Serum malondialdehyde (MDA) levels, mobilization with G-CSF on 4.th day nevertheless it was low compared to basal values, this decline was not significant. Apheresis end, 24 hours after apheresis and 1 week after apheresis serum MDA levels had continued to decline significantly.

Serum total antioxidant capacity (TAC) levels mobilization with G-CSF on 4. th day, immediately after apheresis process, 24 hours after apheresis process and 1 week after apheresis process compared to basal it was found significantly high.

This study show that mobilization with G-CSF and apheresis process cause oxidative stress and inflammation in healthy peripheric stem cell donor but not lead to degradation of tissue. Furthermore this process effected iron metabolism. Continuation of studies on this subject, mobilization with G-CSF and potential damage of apheresis process in healthy donor even at 6 months and 1 year periods searching we think that more reliable conclusions could be reached.

9. KAYNAKLAR

1. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir, 2006; 87
2. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. Science 2000; 287: 1442-1446.
3. Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. Cells Tissues Organs. 2002; 171(1): 64-76.
4. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell 2000; 100: 157-168.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998 Nov 6; 282 (5391):1145-1147.
6. Ross J, Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. Curr Opin Hematol. 2006; 13(4): 237-242.
7. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. Trends Biochem Sci. 2006; 31(10): 589-595.
8. Chen ZX, Chang M, Peng YL, Zhao L, Zhan YR, Wang LJ, Wang R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes: Regul Pept. 2007; 142(1-2):16-23.

9. Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. Clin Lab. 2007; 53(1-2): 81-84.
10. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001; 7(2): 211-228.
11. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. Tissue Eng. 2007; 13(8): 1799- 1808.
12. Yamada Y, Yokoyama SI, Wang XD, Fukuda N, Takakura N. Cardiac stem cells in Brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow non-hematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. Stem Cells. 2007; 25(5): 1326 -1333.
13. Dreger P. ve ark. Source of Haemopoietic Stem Cells. In: Apperley J.F. Gluckman E. Gratwohl A. Craddock C. (Eds). Blood and Marrow Transplantation. Paris: 2000. s.69-88.
14. Unal A, Sarı İ. Kök Hücre Kaynağı ve Seçimi. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı, Ceşme, Roche Sanayi A.Ş.; 2004. 37-41.
15. Sources of Stem Cell Transplantation. www.marrow.org (17/02/2005).
16. Sargın D. Kök Hücre ve Kök Hücre Tedavisi. Hematoloji VII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kurs Kitabı. İstanbul: 2003. s.49-61.
17. Beksac M. Donor Selection and Sources of Hematopoietic Cell Transplantation. Turkish Journal of Hematology, 1996; 14(1): 7-14.

18. Hebert B, Potti A, Alonto MA, Mehdi S. Incidence and relationship of non-hepatocellular malignancies in patients with hemochromatosis. *Blood* 2001;98:5b.
19. Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Britton RS, Zyou XY, Fleming RE, et al. Cell surface expression of HFE protein in epithelial cells, macrophages, and monocytes. *Hematologica* 2000;85:340-5.
20. Akoglu T. Kemik iligi Transplantasyonu. In: _liçin G, Biberoglu S, Süleymanlar G, Ünal S, etitörler. _ç Hastalıkları 2. Baskı. Ankara: Günes Kitapevi, 2003;1959-68.
21. Hoffman R. Hematopoietic Stem cell transplantation. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, editors. *Hematology Basic Principles and Practice* 3rd edition, New York: Churchill Livingstone; 2005;1551-69.
22. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L. *Harrison principles of internal medicine* 15th edition, volume 1&2. New York: McGraw-Hill;2001.
23. Djulbegovic B, Seidenfeld J, Bonnell C, Kumar A. Nonmyeloablative Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Hematologic Malignancies: A Systematic Review. *Cancer Control* 2003;10(1):17-41.
24. Petersdorf EW, Deeg HJ, Diagnostic use molecular probes before and after marrow transplantation. *Clin Lab Med* 1992; 12: 113- 128.
25. Burt RK, Traynor AE. Hemotopoetic stemcell transplantation: a new therapy for autoimmun disease. *Stem Cells* 1999; 17: 366- 372.

26. Bensinger WI, Price TH, Dale DC et al. The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. *Blood* 1993, 81:1883-1888.
27. Lane TA, Law P, Maruyama M, et al. Mobilization of peripheral blood stem cells in normal donors by G-CSF and GM-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *ASCO* 1995, 14:74 (abstr:2).
28. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1995, 85:1655-1658.
29. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V et al. G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br J Haematol* 1994, 87:609-613.
30. Schmitz N, Dreger P, Suttorp M et al. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (Granulocyte colony- stimulating factor). *Blood* 1995, 85:1666-1672.
31. Asano, S. 1991. Human granulocyte colony-stimulating factor. Its basic aspects and clinical applications. *American Journal of Pediatric Haematology- Oncology*, 13 , 400-413.
32. Demetri, G.D. and Griffin, J.D., 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78 , 2791-2808.

33. Groopman J.E., Molina J.M. and Scadden D.T., 1989. Haematopoietic growth factors: biology and clinical applications. *New England Journal of Medicine*, 321 , 1449-1459
34. Metcalf, D., 1996. The molecular control of granulocytes and macrophages. Education program 26th Congress of the International Society of Haematology. Singapore.
35. Adachi S, Kubota M., Lin Y.W., Okuda, A., Matsubara K., Wakazono, Y. and Hirota, H., 1994. In vivo administration of granulocyte-colony stimulating factor promotes neutrophil survival in vitro. *European Journal of Haematology*, 53 ,129-134.
36. Russell S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. Prepublished online December 7, 2004; doi:10.1182/blood-2004-06-2480 2005 105: 2631-2639
37. Bruno Nervi, Dan C. Link, and John F. DiPersio. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:690–705 (2006)
38. Ramakrishna, L.R., 2005. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfusion and Apheresis Science*, 32 , 63-72.
39. Volk EE, Dorn RE, Smith ML. An examination of ethical issues raised in the pretreatment of normal volunteer granulocyte donors with granulocyte colony-stimulating factor. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:508-513.

40. Stroncek DF, Clay ME, Petzoldt ML, Smith J, Jaszcz W, Oldham FB, et al. Treathment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. *Transfusion* 1996;36:601-610.
41. Murata M, Harada M, Kato S, Takahashi S, Ogawa H, Okamoto S, et all. Peripheral blood stem cell mobilization and apheresis: analysis of adverse events in 94 normal donors. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:1065-1071.
42. Korbling M. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy subjects. *Curr Opin Hematol* 1998;5:209-214.
43. Tecnical manual commitee. Tecnical manual. 14th ed. Bethesda, MD: american Association of Blood Banks, 2002.
44. Azevedo A, Tabak D. Life-threatening capillary leak syndrome after G-CSF mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:311-312.
45. Anderlini P, Przepiorka D, Seong D, O'brien S, Giralt, S., Ippoliti, C. and Korbling, D. 1996. Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte colony stimulating factor mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors , and analysis of charges forth procedure. *Transfusion*, 36 ,590-595
46. Aki Hirayama, Sohji Nagase, Atsushi Ueda, Takashi Ishizu, Yoshinori Taru, Keigyou yoh, Kouichi Hirayama, Masaki Kobayashi and Akio Koyama. Oxidative Stress During Leukocyte Absorption Apheresis. *Journal of Clinical Apheresis* 18:61–66 (2003).

47. Johnny Amer, Shoshana Frankenburg, and Eitan Fibach. Apheresis oxidative Stress in Blood Cells. Therapeutic Apheresis and Dialysis 14(2):166-171(2009).
48. Smith A. Embryo stem cell biology (online).2005 (cited 2010 June 10). Available from: URL: <http://www.bioc.cam.ac.uk/uto/smitha.html>
49. Jeneyi S. Stem cell patents knocked down in round one (online).2005 (cited 2007 April 3) Available from: URL:<http://www.patentbaristas.com/archives/2007/04/03/warf-stem-cell-patents-knocked-down-in-round-one/>
50. Kan hücrelerinin özel üretim merkezi: kök hücre (online) 2009. available from:URL:<http://www.evrimteorisi.info/gercekler/kan-hucrelerinin-ozel-uretim-merkezi-kok-hucre>
51. Sies H., Oxidative stress: from basic research to clinical application, Am. J. Med., 91:31-38, 1991.
- 52.Yegin ZA, Paşaoğlu H, Aki SZ, Özkurt ZN, Demirtaş C, Yağci M, Acar K, Sucak GT. Pro-oxidative/antioxidative imbalance: a key indicator of adverse outcome in hematopoietic stem cell transplantation. Int J Lab Hematol. 2011 Aug;33(4):414-23.
53. Mutluay R, Konca C, Erten Y, Paşaoğlu H, Değer SM, Ağirgün C, Derici U, Arinsoy T, Sindel S. Predictive markers of asymptomatic atherosclerosis in end-stage renal disease patients. Ren Fail. 2010 May;32(4):448-54.
54. Suyani E, Derici UB, Sahin T, Oflluoglu E, **Pasaoglu H**, Erdem O, Barit G, Reis KA, Erten Y, Arinsoy T, Sindel S. Effects of everolimus on

cytokines, oxidative stress, and renal histology in ischemia-reperfusion injury of the kidney. *Ren Fail.* 2009;31(8):698-703

55. Ozenirler S., Tuncer C., Ogun CO., Altan N., Kandilci U., Activity of superoxide dismutase in erythrocyte of nonalcoholic chronic liver diseases, *General Pharmacology* 25(7):1349-1351, 1994.

56. Paşaoğlu H, Muhtaroglu S, Güneş M, Utaş C. The role of the oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 1996 Dec;29(6):567-72.

57. Yılmaz S., Bahcecioğlu IH. , Karbon tetraklorür ile Siroz Olusturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Enzim ve Piruvat Kinaz Aktiviteleri, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 24: 25–28, 2000.

58. Ustundağ B., Bahcecioğlu DH., Sahin K., Gulcu F., Duzgun S., Ozercan DH., Gursu MF., *F.U. Sağlık Bil. Dergisi*, 19(4), 263-271, 2005.

56. Nishiyama Y., Ikeda, H., Haramaki N., Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure, *Am. Heart J.*, 135:115, 1998.

60. Yao T., Esposti SD., Huang L., Amon R., Spangenberg A., and Zern MA., Inhibition of carbon tetrachloride induced liver injury by liposomes containing Vitamin E, *Am. J. Physiol.*, 30: 476-484, 1994.

61. Halliwell B., Gutteridge JMC., Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, An overview, *Methods Enzymol*, 186:1-85, 1990.

62. Fang Y.Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants and nutrition, *Nutrition*, 18:872-879, 2002.

63. Kaneda H., Taguchi J., Ogasawara K., Aizawa T., Ohno M., Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease, *Atherosclerosis*, 162:221-225, 2002.
64. Halliwell B., Gutteridge J.M., *Free Radical in Biology and Medicine*, Third ed., Oxford University Press, Oxford, 160-165, 2000.
65. Akkus I., *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 13-19, 1995.
66. Beckman K.B., Ames B.N., The free radical theory of aging matures, *Physiol. Rev.*, 78:547-581, 1998.
67. McCormick M., Denning G.M., Reszka G.M., Bilski P., Buettner G.R., Rasmussen G.T., Rainsack M.A., Britigan B.E, Biological effects of menadione photochemistry: effects of menadione on biological systems may not involve classical oxidant production., *Biochem. J.*, 350:797-804, 2000.
68. Basaga H.S., *Biochemical Aspects of Free Radicals*, *Biochem. Cell. Biol.*, 68, 989-998, 1990.
69. Sodergren E., *Lipid peroxidation in vivo*, Uppsala University, Uppsala, 2000. 55. Gilbert D.L., Fifty years of radical ideas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 899:1, 2000.
70. Gilbert D.L., Fifty years of radical ideas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 899:1, 2000.

71. Freidovich I., Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen?, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 893:13, 1999.
72. Pieper G.M., Siebeneich W., More-Hilton M., Roza A.M., Reversal by LArginin of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic rat, *Diabetologia*, 40:910-915, 1997.
73. Agarwal R., Chase S.D., Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malonaldehyde in biological samples, *J. Chromatogr. B.*, 775:121-126, 2002.
74. Chen S., Schopfer P., Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel function of peroxidase, *Eur. J. Biochem.*, 260:726-735, 1999.
75. Cheeseman K.H., Slater T.F., An introduction to free radical biochemistry, *Brit. Med. Bulletin*, 149:481-493, 1993.
76. Evans P., Halliwell B., Micronutrients: Oxidant/antioxidant status, *Br. J. Nutr.*, 85:67, 2001.
77. Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J., Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, *Amino Acids*, 25:259-274, 2003.
78. Gutteridge J.M., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, 41:1819-1828, 1995.
79. Cheeseman K.H., Slater T.F., An introduction to free radical biochemistry, *Brit. Med. Bulletin*, 149:481-493, 1993.

80. Mayne P D., Clinical Chemistry in Diagnosis and Teratment, Oxford University Press, New York, 1992.
81. Berlett B.S., Stadtman E.R., Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, J. Biol. Chem., 272:213-216, 1997.
82. Haddad J.J., Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways, Biochemical and Biophysical Research Communications, 316:969-977, 2004.
83. Boyunağa H., Celik C., Serbest radikaller ve hucre sel denge, Bilim Teknik Dergisi, 347:98-100, 1996.
84. Powell S.R., The antioxidant properties of zinc, J. Nutr., 130:1447-1454, 2000.
85. Ulusu NN., Sahilli M., Avci A., Canbolat O., Ozansoy G., Ari N., Bali M., Stefek M., Stolc S., Gajdosik A., Karasu C., Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E, Neurochem. Res, Jun, 28 (6): 815-823, 2003.
86. Uchida K., 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, Progr. Lip. Res., 569:1-26, 2003.
87. Reznick A.Z., Packer L., Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay, Methods Enzymol., 233:357-363, 1994.
88. Shacter E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, Drug Met. Rev., 32:307-326, 2000.

89. Hawkins C.L., Davies M.J., Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1504:196-219, 2001.
90. Evans P., Lyras L., Halliwell B., Measurement of protein carbonyls in human brain tissue, *Methods Enzymol.*, 300:145-156, 1999.
91. Halliwell B., How to characterize a biological antioxidant, *Free radic. Res. Commun*, 1:1-32, 1990.
92. Jerry P., Liu L., Zeng M., Stamler J.S., An apoptotic model for nitrosative stress, *Biochemistry*, 39:1040-1047, 2000.
93. Halliwell B., Antioxidant characterization: Methodology and mechanism, *Biochemical Pharmacology*, 49:1341-1348, 1995.
94. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*. 91: 179–94, 2003.
95. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. 2004. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J. Androl.*, 6: 59-65.
96. Splettstoesser W.D., Werner S.P., Oxidative stress in phagocytes 'The Enemy Within', *Microscopy Research And Technique*, 57:441-455, 2002.
97. Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Körbling M. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996;88:2819-2825

98. Pamphilon D, Nacheva E, Navarrete C, et al. The use of granulocyte colony-stimulating factor in volunteer unrelated hemopoietic stem cell donors. *Transfusion* 2008; 48:1495-1501
99. Tighe CC, McKoy AM, Evens AM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety consideration from the Research on Adverse Drug Events and Reports Project. *Bone Marrow Transpl* 2007; 40:185-192.
100. Dinarello CA. The acute phase response. *Cecil Textbook of Medicine*. 1992; 286:1571-1573.
101. Johnson JL, Moore EE, Tamura DY, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC. Interleukin-6 augments neutrophil cytotoxic potential via selective enhancement of elastase release. *J Surg Res* 1998; 76: 91-94.
102. Park CS, Chung SW, Ki SY, Lim GI, Uh ST, Kim YH, Choi DI, Pa JS, Lee DW, Kitaichi M. Increased levels of interleukin-6 are associated with lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluids of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1162-1168.
103. Van den Berghe W, Vermeulen L, Wilde GD, Bossher KD, Boone E, Haegeman G. Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem pharmacol* 2000; 60: 1185-1195
104. Andreoli Bennett. Akut faz reaktanları, *Cecil essentials of medicine*. 1995:564.

105. Hutchinson WL, Koe GW, Frochlich M, et al. Immunoradiometric assay of circulating C-reactive protein: Age-related values in the adult general population. *Clin Chem* 2000;46:34-38.
106. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein, in health and disease. *J Clin Invest* 1993;91:1351-1357.
107. Kushner I, Rzewnicki DL. The acute phase response In: Mackowiak PA (Ed). *Fever basic mechanism and management* 2nd(Eds). Philadelphia: Lipincott-Raven, 1997:165-176.
108. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, et al. Absence of diurnal variation of CRP concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 2001;47:426-430.
109. Mac Gregor AJ, Galimore JR, et al. Genetic effect on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid-A protein: A comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem* 2004;50:130-134.
110. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann NY Acad Sci*.1982;389:406-418.
111. Legouffe E, Rodríguez C, Picot MC , Richard B, Klein B, Rossi JF, Commes T. C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998;31: 351-357
112. DE WysWD, Begg C, Lavin PT et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am J Med* 1980;69: 491-497

113. Nervi B, Link D, DiPersio F. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *Journal of Biochemistry* 2006; 99:690-705
114. Taichman R. Blood and bone : two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*-2004-06-2480
115. Kök Hücre Aferezi. S. Kalayoglu-Besisik. I. He maferez Atolye Çalışması Kurs Kitabı, İstanbul, 2002.
116. Haas M de, Kerst JM, van der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijen JH, Roos D, van Oers RH, von dem Borne AE. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood*- 1994; 84: 3885-3894
117. GD Demetri and JD Griffin. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*- 1991; 78: 2791-2808
118. Weiss M, Moldawer LL, Schneider EM. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* 1999; 93: 425-439.
119. Lysak D, Hrabetova M, Vrzalova J, Koza V, Narvatilova J, Svoboda T, Jungova A, Topolcan O. Changes of cytokine levels during granulocyte colony-stimulating factor stem cell mobilization in healthy donors: association with mobilization efficiency and potential predictive significance. *Transfusion* Volume 51, February 2011

120. Carstanjen D, Regenfus M, Müller C, Salama A. Interleukin-6 is a effector molecule of short-term G-CSF treatment inducing bone metabolism and an acute-phase response. *Experimental Hematology* 29 (2001) 812-821
121. Özgürtaş T,¹ Aydın İ, Atay A, Yavuz İ, Nevruz O, Erbil M.K. Yüksek Serum Ferritin Düzeylerinin Etiyolojik Spektrumu. *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2008; 33 (4) ; 223–225.
122. Uluğ M, Uluğ N, Selek Ş. Levels of Acute Phase Reactants in Patients with Acute Brucellosis. Presented in the XIVth Turkish Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (25-29 March 2009, Antalya).
123. Descamps B, Witko-Sarsat V. Importance of oksidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59 (Suppl.78):S108-S113
124. Michealis R, Kristal B, Snitkovsky T, Sela S. Oxidative modifikations impair albumin quantification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401 (2010) 137-142.
125. Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 49: 621-629, 1993
126. Greene EL, Paller MS: Oxygen Free Radicals in Acute Renal Failure. *Miner Electrolyte Metab* 17: 124-132, 1991
127. Rice-Evans, C., Miller, N.J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods. Enzymol.*, 234: 279-293.

128. Yoshioka T, Kawoda K, Shimoda T (1979): Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet. Gynecol*, 135, 372-376.
129. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kid Int* 1996;49:1304-5.
130. Daniel C. Regulation of normal and malignant hematopoietic stem cells by the bone marrow microenvironment (stem cell niche). Available from: URL: (online) <http://hematology.wustl.edu/faculty/link/linkBio.html>

10. EKLER



T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KURUMSAL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU
GAZİ UNIVERSITY MEDICAL FACULTY INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL ADI	"Sağlıklı Gönüllü Vericilerde G-CSF Uygulanması ve Kök Hücre Aferezi İşleminin İnflamatuvar Markırlar, Oksidatif Stres ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi"				
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI, / ADI	Prof.Dr.Hatice Paşaoğlu				
	Belge Adı	Tarihi / değişiklik No.su	Dili Türkçe			
KARAR BİLGİLERİ	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ					
	Karar No:165	Tarih: 29 Eylül 2010				
Üniversitemiz Tıp Fakültesinde yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı araştırma projesine ait dosya etik açıdan incelenmiş, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler yönünden bütçe dışında uygun olduğuna karar verilmiştir. Komisyonun kararı, projenin bütçesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Komisyonumuza bildirilmesi gerekmektedir						
KURUMSAL ARAŞTIRMA DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU (2010 Versiyonu), BİYOTETİK SÖZLEŞMESİ, KLİNİK ARAŞTIRMALAR HAKKINDA YÖNETMELİKTE DEĞİŞİKLİK YAPILMASINA DAİR YÖNETMELİK(11 Mart 2010 tarih ve 27518 sayılı)					
ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr.Aynur OĞUZ BAŞKAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları- Çocuk Onkoloji	G.Ü.T.F Çocuk Sağ.ve Hast.A.D.	K		xx	E
Prof.Dr.Carian ULUOĞLU BAŞKAN YRD.	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D.	K	x	E	xx
Prof. Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D.	E	x	E	xx
Prof.Dr.Çağatay ÇİFTER ÜYE	Genel Cerrahi	G.Ü.T.F Genel Cerrahi A.D.	E	x	E	xx
Prof.Dr.Aysel ARICIOĞLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	K	x	E	xx
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D.	E	x	E	xx
Prof.Dr.Öznur L. BOYUNAGA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D.	K	x	E	xx
Prof.Dr.Gonca AKBULUT ÜYE	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	x	E	xx
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları - Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hast.A.D.-Nefroloji B.D.	E	x	E	xx
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik	G.Ü.T.F Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	x	E	xx
Doç.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D.	K	x	E	xx
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	x	E	xx
Hukuk Müşaviri Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşaviri	G.Ü.Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	x	E	xx

* Araştırma İle İlişki

** Toplantıda Bulunma

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışma sürecinin bitimine kadar gerekli yardım, tavsiye ve yönlendirmeler yapan, hiçbir zaman sabır, özveri, destek ve hoşgörülerini benden esirgemeyen, sevgi ve saygı duyduğum değerli hocam, tez danışmanım Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU' na,

Tez konumun belirlenmesinde her türlü destek ve yardımlarını gördüğüm, sabır ve hoşgörülerini benden esirgemeyen, karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım, sevgi ve saygı duyduğum değerli hocam, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kök Hücre Nakil Ünitesi Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülsan TÜRKÖZ SUCAK' a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca teorik derslerimde değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan tüm Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Yardım ve desteklerini esirgemeyen, Sayın Dç. Dr. Şahika Zeynep AKI'ya,

Laboratuvar çalışması ve sonuçların hesaplanmasında bana yardımcı olan, değerli zamanını ayıran, yüksek lisansa başladığım günden bugüne her türlü destek, bilgi ve yardımlarını gördüğüm, Sayın Uzman Dr. Elif SUYANI'na,

Laboratuvar çalışması ve sonuçların hesaplanmasında bana yardımcı olan, değerli zamanlarını ayıran, Öğ. Gör. Özge Tuğçe

PAŞAOĞLU ve Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya ABD asistanlarından Dr. Ayşe BAHAR TUNCEL ve Dr. Çınar SEVERCAN'a

İhtiyaç duyduğum her anımda desteklerini hissettiğim, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, tezimde çok büyük katkıları olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kök Hücre Nakil Ünitesindeki çalışma arkadaşlarım, Sayın Uzm.Biyolog Özlem KARACAOĞLU YURDAGÜL, Sayın Talat BABAYİĞİT, ve Sayın Nuh AYDIN'a,

Yüksek lisansa başladığım günden bugüne, desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen yüksek lisans dönem arkadaşlarım Uzman Biyolog Erdem KAHRAMAN ve Uzman Biyolog Adem EKTİ' ye,

Tezin, İngilizce özeti konusunda bana yardımcı olan değerli arkadaşım Sayın Dr. Hasan KARAGEÇİLİ'ye,

Tez dönemim boyunca her zaman desteğini gördüğüm sabrına ve bilgisine hayran olduğum Sayın Aytaç Onur ALİBAZOĞLU'na

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman sevgi ve hoşgörülerini gördüğüm canım annem Sultan İLHAN ve sevgili kardeşlerime,

Eğitim hayatım boyunca bu günlere gelmemde en az benim kadar emeği olan, yaşadığı süre boyunca her zaman desteğini gördüğüm, karşıma çıkan zorluklarda akıl danıştığım canım babacığım Sayın Yusuf İLHAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Çiğdem

Soyadı: İLHAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Doğubayazıt, 01.01.1981

Eğitimi:

2010- ~ : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD Yüksek Lisans

2000-2004: Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dili : İngilizce