

KÖK HÜCRE NAKLİNDE TANI VE TAKİPTE LABORATUVAR TESTLERİ

Dr.Seval AKPINAR

Hemogram

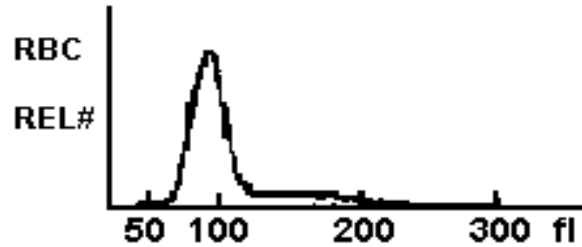
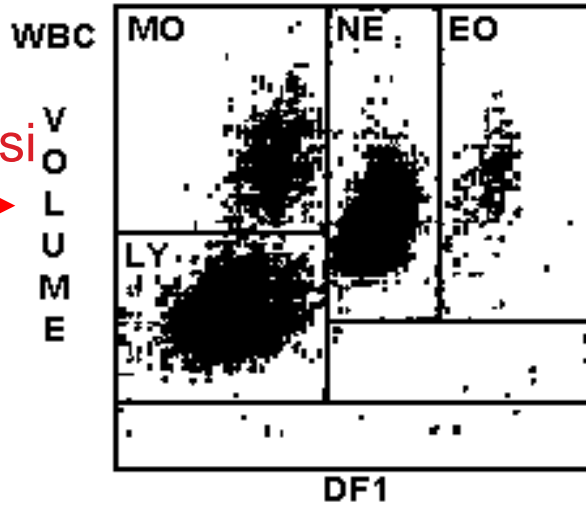
Complete Blood Count (CBC)

Tam Kan Sayımı

- Kandaki hücrelerin sayısını ve oranlarını saptayan bir testtir.
- Lökosit, eritrosit ve trombositler hakkında bilgi verir.
- Sonuçlar raporlanırken bazı kısaltmalar ve açık terimler kullanılır

Normal hemogram raporu

Saçılım grafisi



Histogram



WBC	6.8	
	%	#
NE	52.6	3.6
LY	36.7	2.5
MO	7.8	0.5
EO	2.5	0.2
BA	0.4	0.0

RBC	5.29
HGB	16.2
HCT	47.0
MCV	88.8
MCH	30.7
MCHC	34.5
RDW	12.5



Sayısal değerler

PLT	179
MPV	8.4

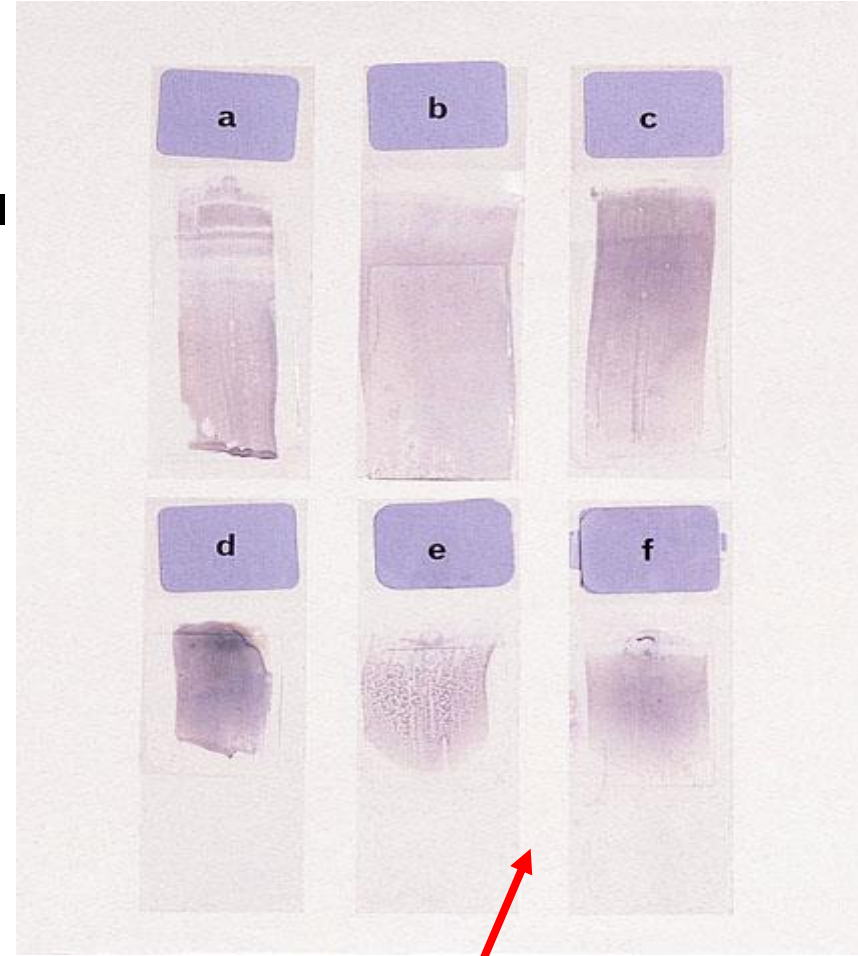
Tam Kan Sayımı İçin Hata Kaynakları

- ▶ Aç karnına alınmasına gerek yok.
- ▶ Uzun süreli turnike uygulanması (hemokonsantrasyon),
- ▶ Kapiller veya venöz kan,
- ▶ Antikoagülan kaynaklı hatalar, yanlış tüp
- ▶ Yetersiz veya fazla antikoagülan,
- ▶ Yetersiz karıştırma,
- ▶ Laboratuvara geç ulaştırma veya geç çalışma,
- ▶ Diüurnal değişim, postür

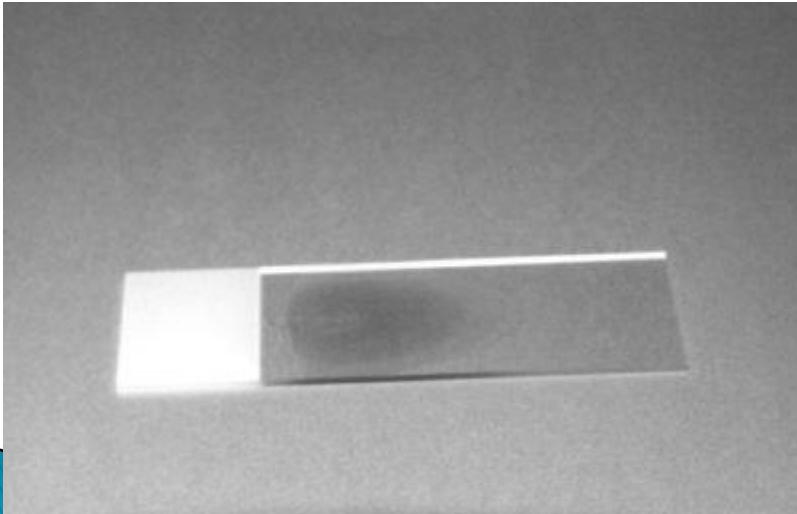
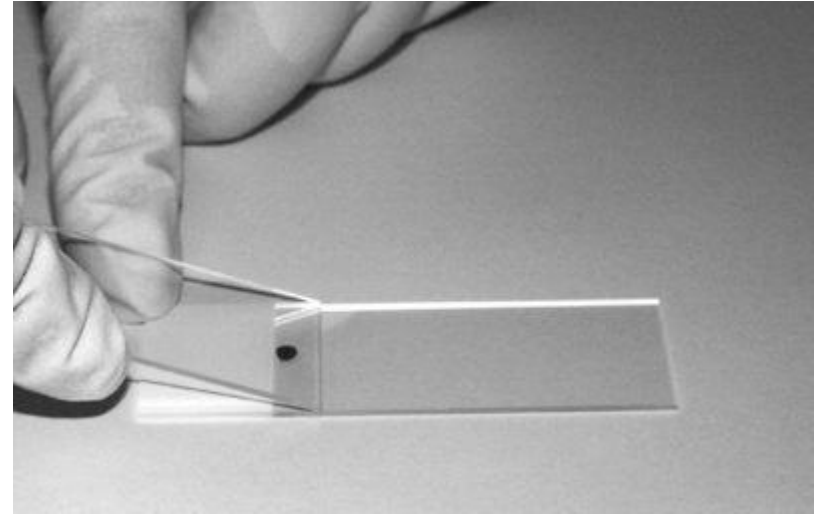
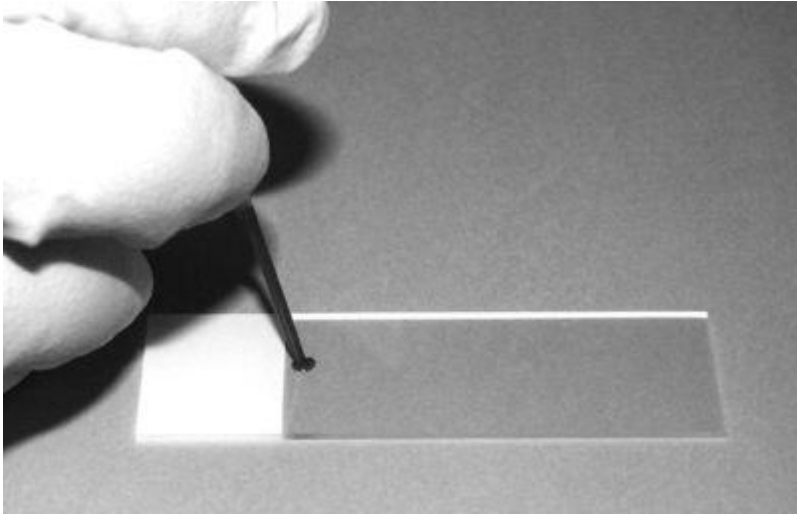


PERİFERİK KAN YAYMASI

- ▶ Temiz bir lam üzerine bir damla kanın yayılması
- ▶ Hücre çekirdeğini ve stoplazmasını ayrı ayrı boyalar ile boyanması
- ▶ Giemsa, MayGrünwald-Giemsa, Wright
- ▶ Her 3 kan hücresi ayrı ayrı değerlendirilir



Periferik yaymanın hazırlanması



Kullanılan boyalar

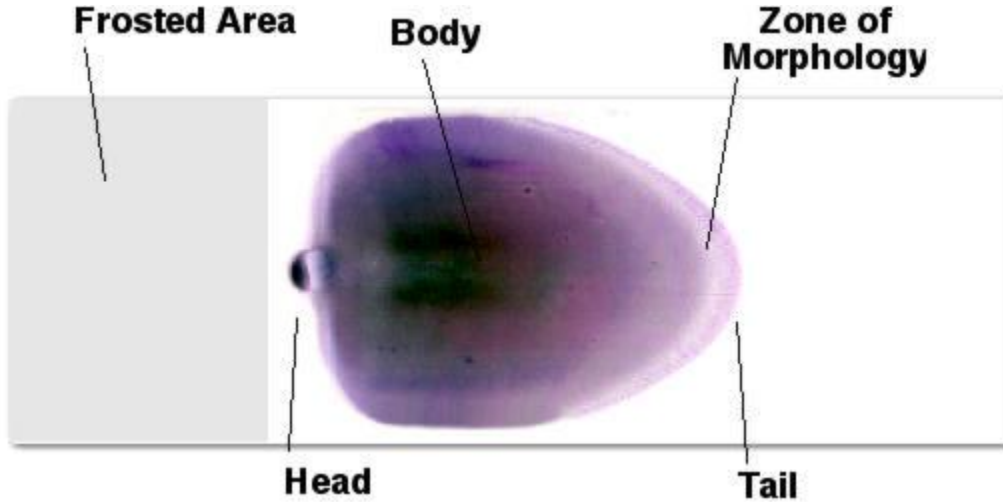
Wright boyası

Giemsa boyası

May Grunwald (3 dk.)

+Giemsa(8dk.)

Periferik yaymanın değ erlendirilmesi



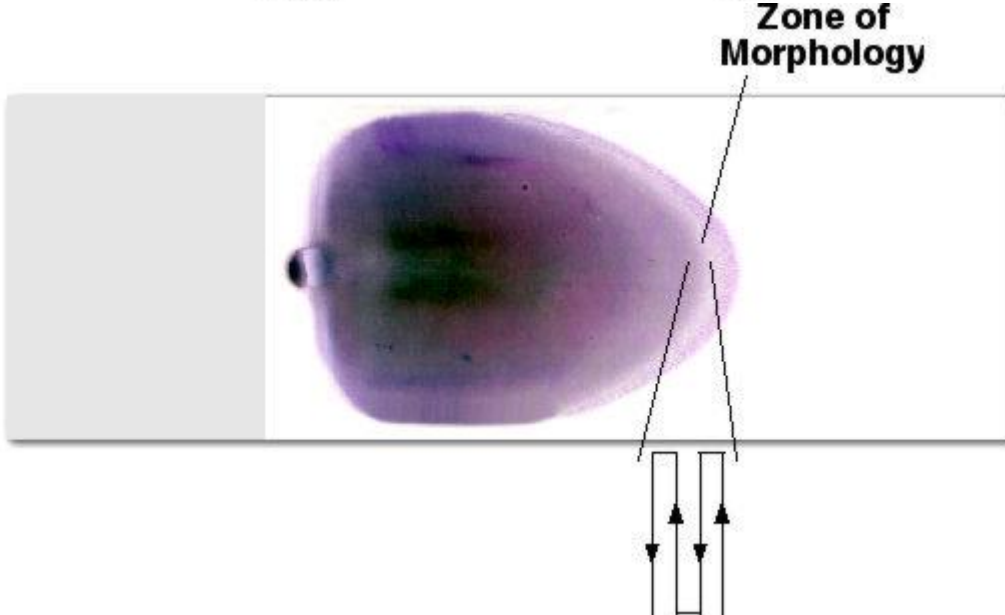
Horizontal hareket

Eritrositler

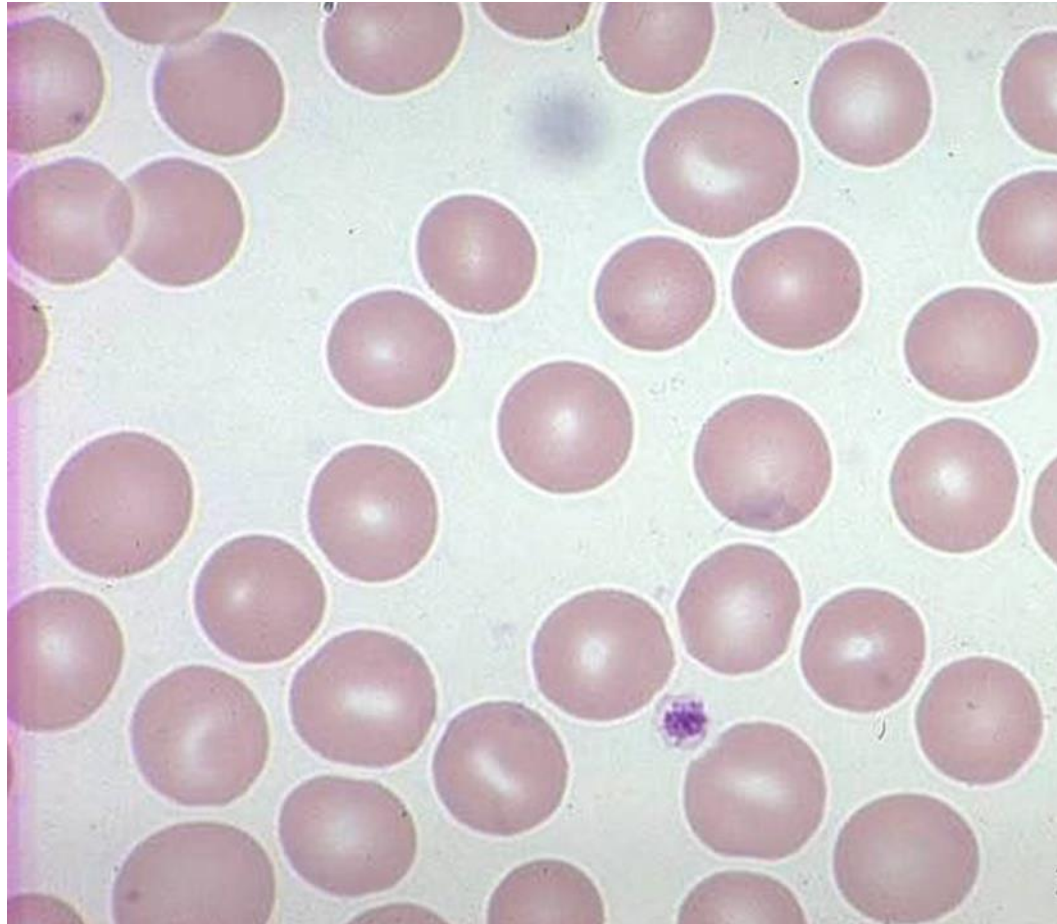
L kositler

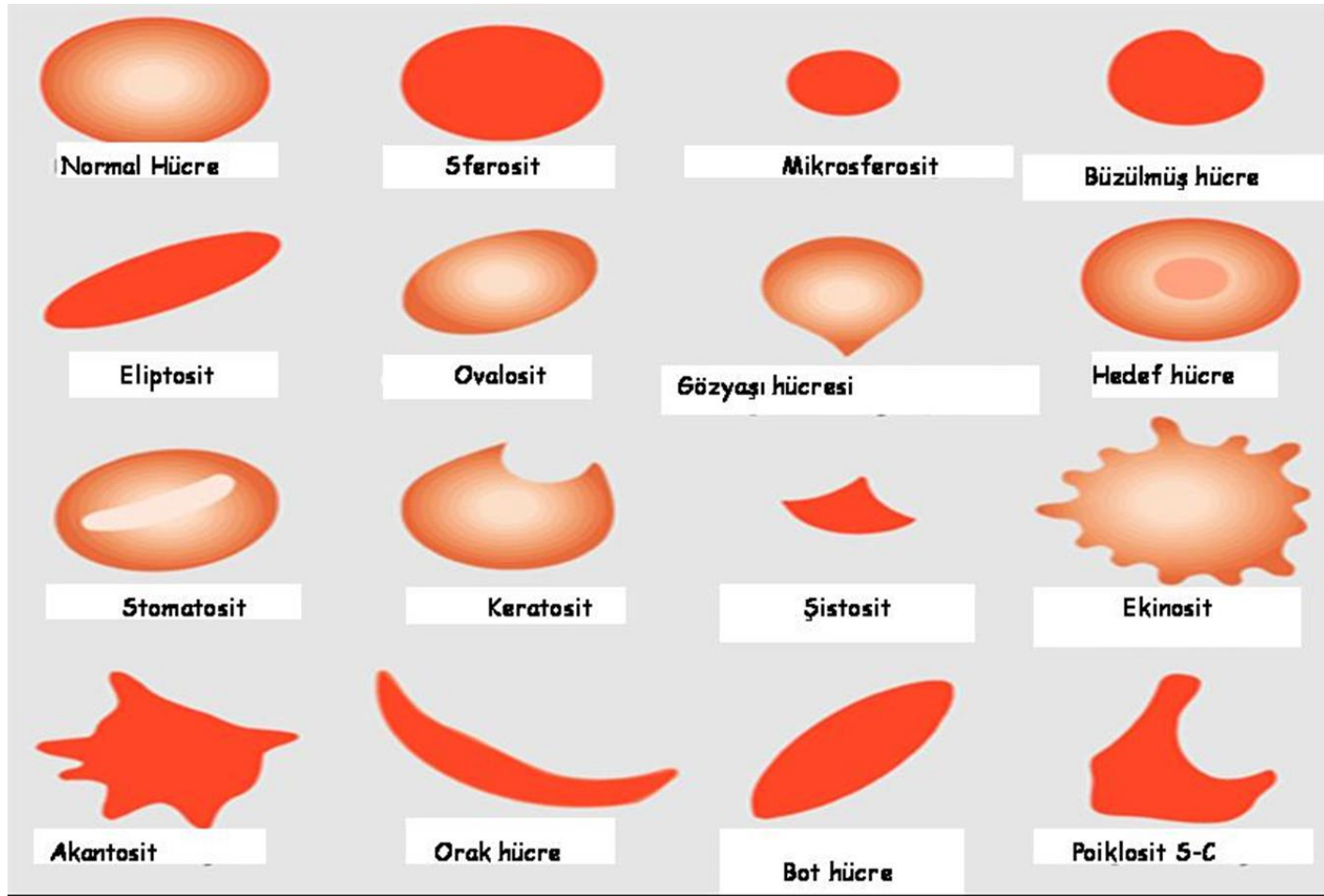
Trombositler

En az 100 l kosit sayıncaya
kadar devam etmeli

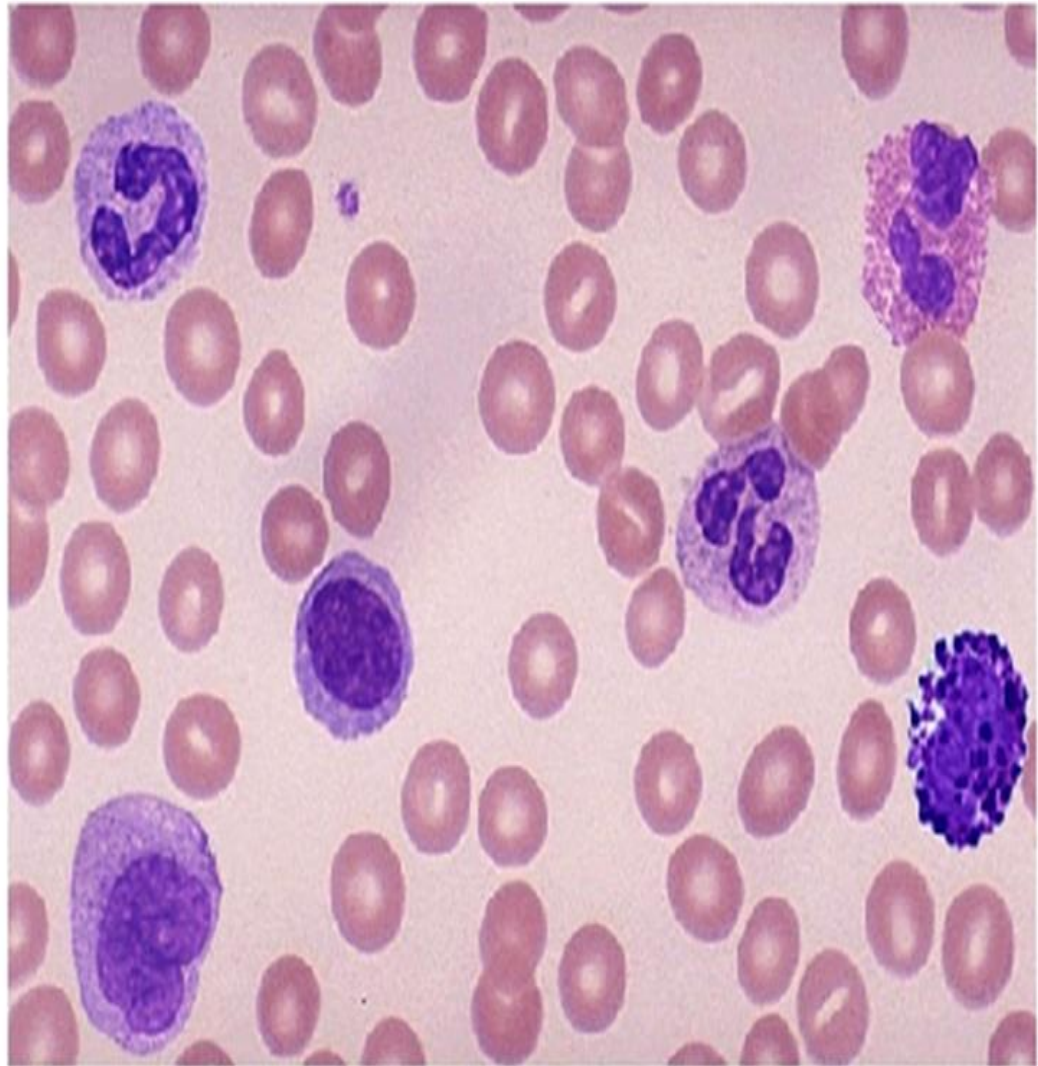


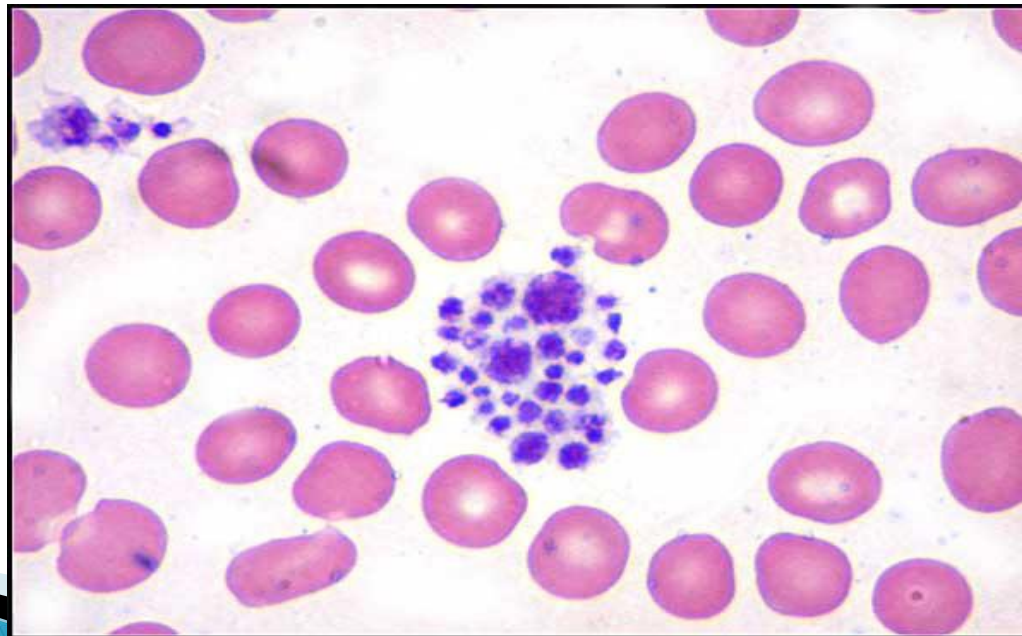
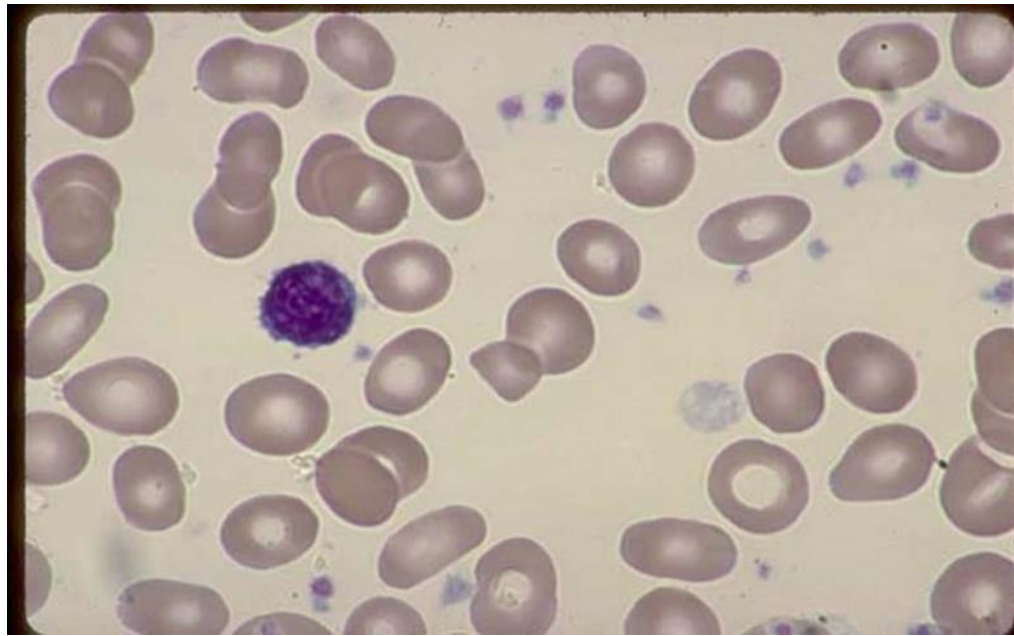
- ▶ Hastanın yaşı-cinsi bilinmeli
- ▶ Lenfositoz erişkinlerde patolojik, çocuklarda normal
- ▶ Otomatik kan sayımlarında verilen lökosit oranları
- ▶ Periferik yayma ile doğrulanmalı



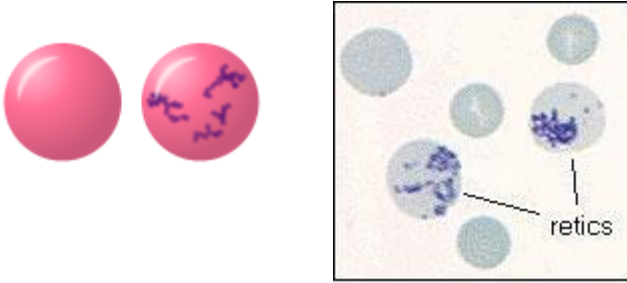


- Neutrophil
- Eosinophil
- Basophil
- Lymphocyte
- Monocyte





Retikülosit



Retikülositler olgunlaşmalarını henüz tamamlamamış eritrositlerdir

Çekirdekleri yoktur. Ancak sitoplazmaları ribozom kökenli RNA artıkları içermeyi sürdürür

Normalde çevre kanında dolaşan eritrositlerin kabaca % 1'i (% 0.5-2.5) retikülosit evresindedir

Bu hücrelerin “retikülosit” olarak adlandırılma nedeni, yeni *metilen mavisi* ya da *parlak krezil mavisi* gibi boyalarla, yayma tespit edilmeden boyandıklarında (*supravital boyama*) içlerinde ince iplikçik ve granüllerden oluşan *ağsı (retiküler)* bir örgünün görülmesidir

Wright-Giemsa ile boyanmış yaymalarda, normal eritrositlerden biraz daha büyük olan retikülositler, eritrositler gibi tam pembe değil, biraz daha mavimsi boyanırlar (*polikromazi*).



RETİKÜLOSİT SAYISI

ARTMAMIŞ

ARTMIŞ

**MCV
NORMAL**

**MCV
DÜŞÜK**

**MCV
YÜKSEK**

**AKUT KAN
KAYBI**

HEMOLİZ

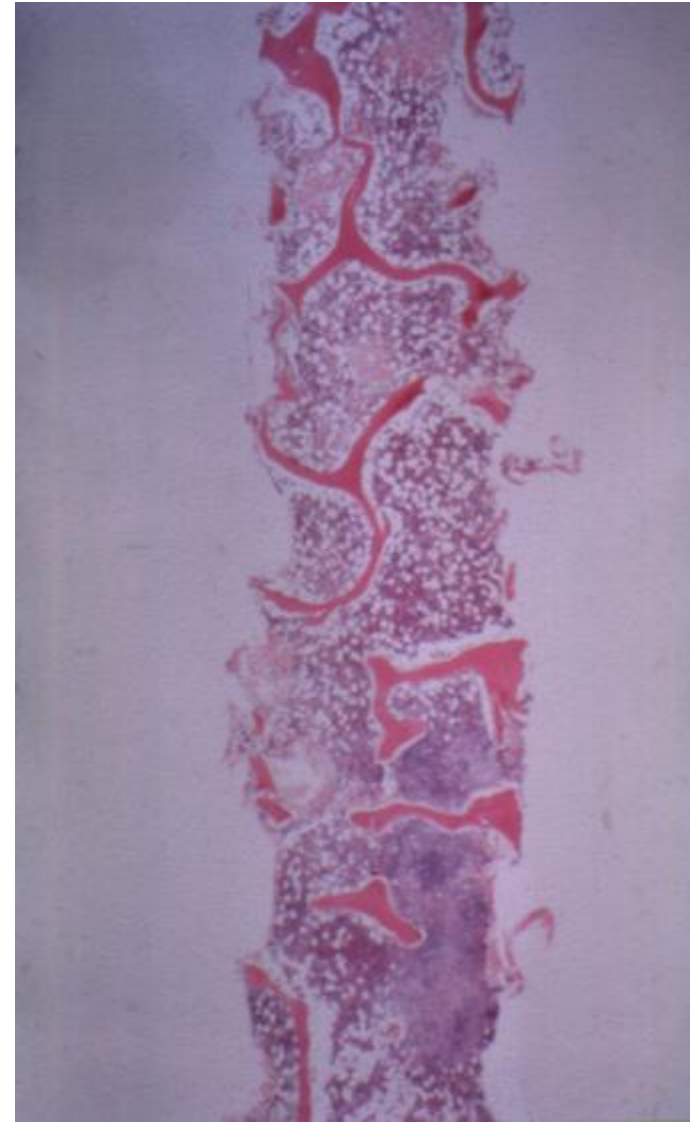
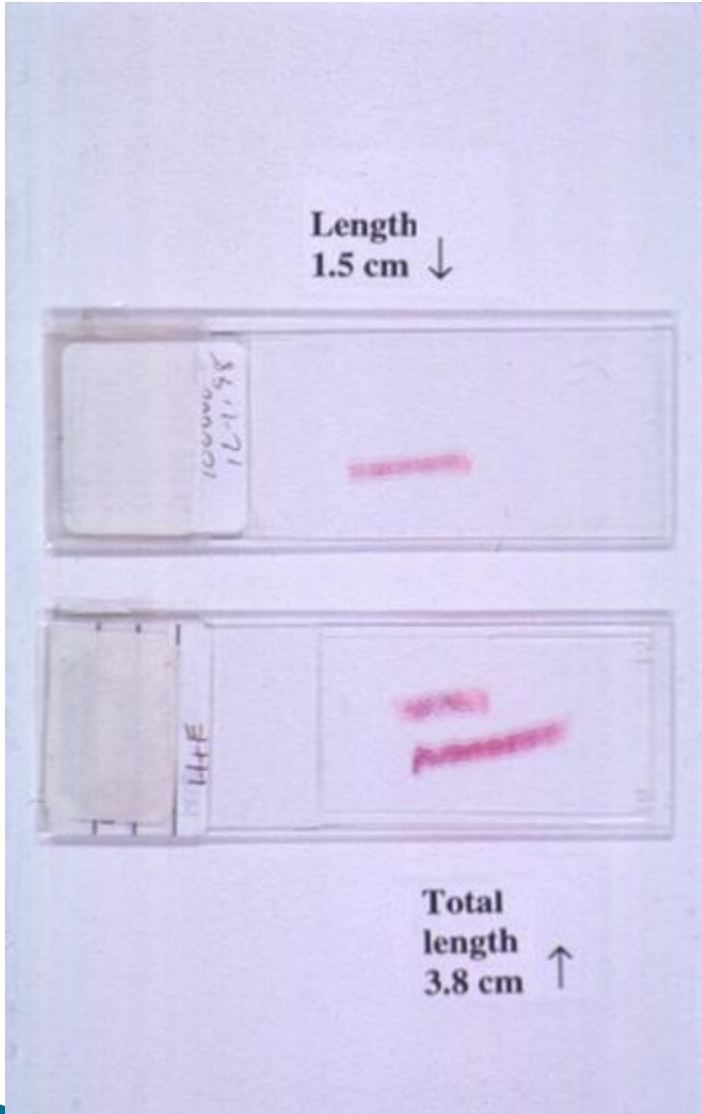
KEMİK İLİĞİ ASPIRASYON VE BİYOPSİSİ



Puncture site
over iliac crest

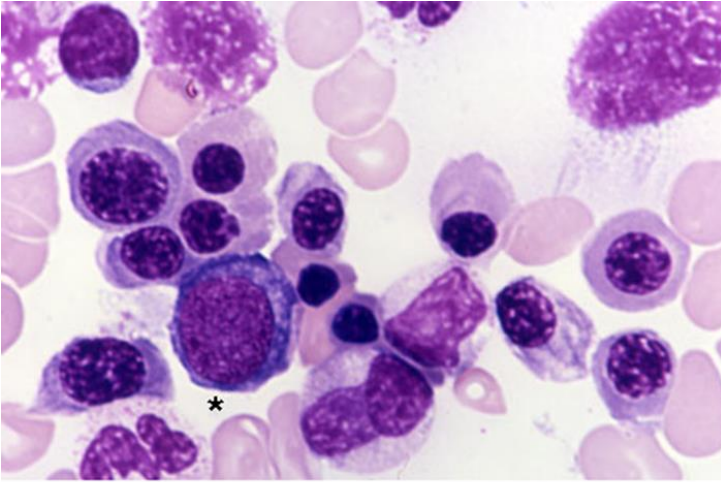


- ▶ **Kemik iliği aspirasyonu** : Erişkinlerde corpus sterni veya Spina İliaca Posterior Superior
- ▶ **Kemik iliği biyopsisi**
- ▶ Hücre miktarı/yağ hücresi miktarı
- ▶ Eritropoietik aktivite ve matürasyon
- ▶ Granülopoietik aktivite ve matürasyon
- ▶ Miyeloid–eritroid oranı 3–5 / 1
- ▶ İlikte yabancı hücre, inflamasyon, nekroz varlığı
- ▶ İliğin demir içeriği
- ▶ Megakaryositler
- ▶ Lenfositler
- ▶ Plazma hücreleri
- ▶ Monositler

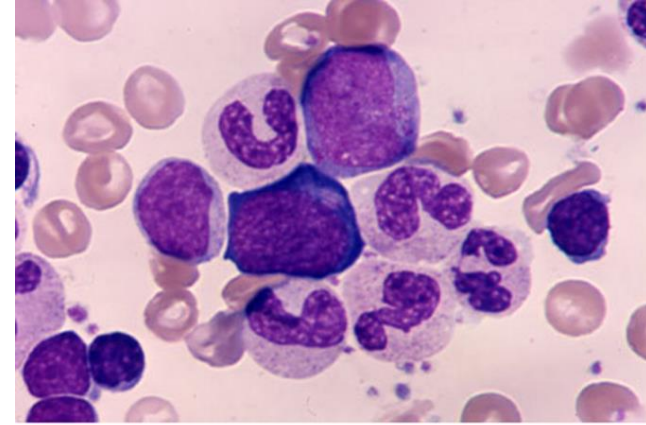


Kemik İliği Biyopsisi

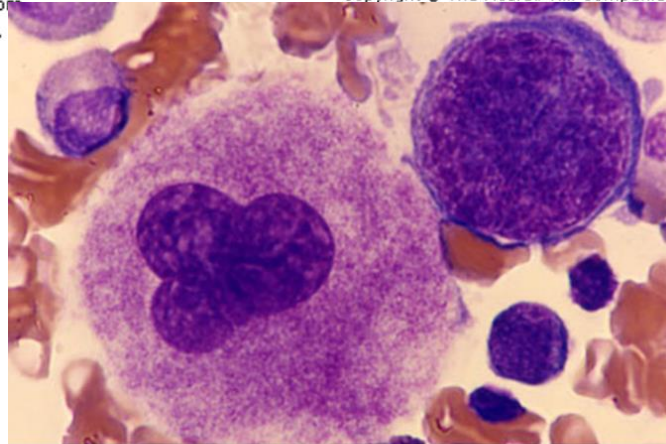
Kemik iliği aspirasyonu tıpkı periferik yayma gibi boyanır ve lökosit formülü sayar gibi çekirdekli hücreler sayılır. Ortalama 200–500 hücre sayılır, yapılan bu hücre ayırımına miyelogram denir



Source: Lichtman MA, Shafer MS, Felgar RE, Wang N:
Lichtman's Atlas of Hematology: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.



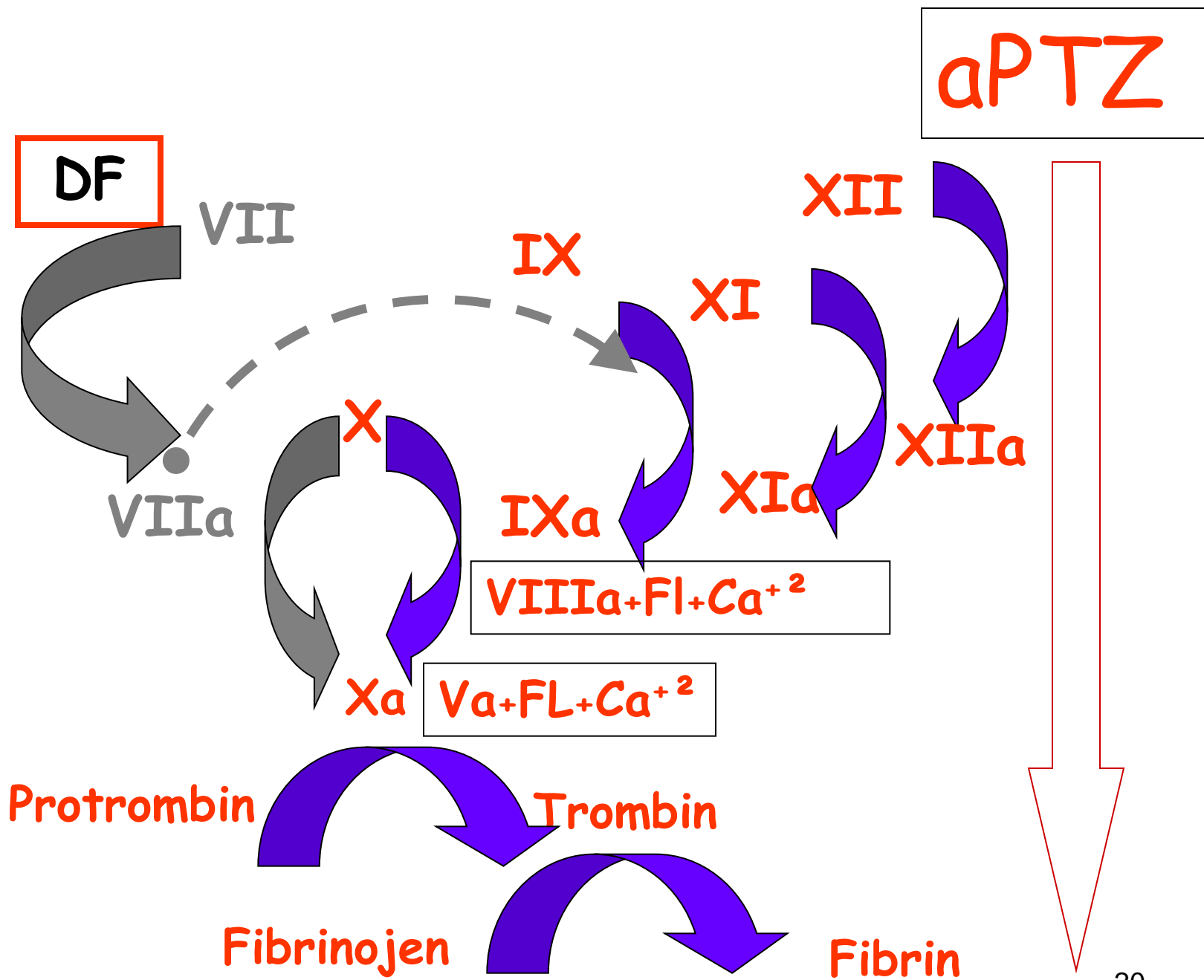
Source: Lichtman MA, Shafer MS, Felgar RE, Wang N:
Lichtman's Atlas of Hematology: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.



Source: Lichtman MA, Shafer MS, Felgar RE, Wang N:
Lichtman's Atlas of Hematology: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

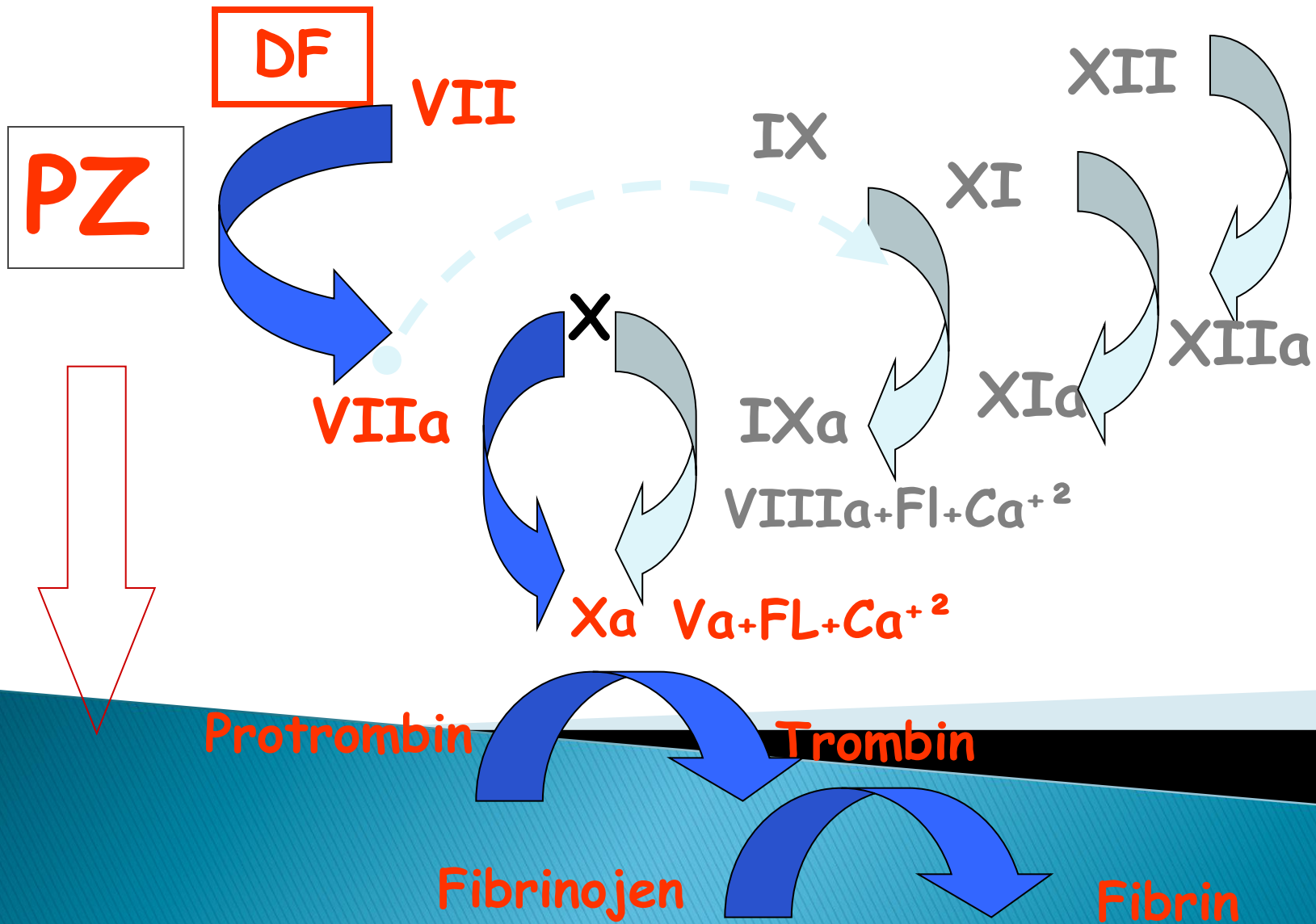
PIHTILAŞMA TESTLERİ

- ▶ Protrombin Zamanı, Aktivitesi, İNR (9–12,5 sn)
- ▶ Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (23–35sn)
- ▶ Pıhtılaşma faktörlerinin eksikliğini gösterebilmek için tasarlanmış
- ▶ Cerrahi öncesi kanama riskini göstermek için tasarlanmamış
- ▶ Öykü alınması ve cerrahi işlemin kanama riskini değerlendirmek daha önemli



aPTT yi uzatan nedenler

- ▶ Test tüpüne kanın az alınması, tam karıştırılmaması, laboratuvara geç gönderilmesi
- ▶ Kateterden alınması
- ▶ Heparin, uzun süreli warfarin kullanımı
- ▶ Karaciğer hastalıkları
- ▶ FVIII, FIX eksikliği
- ▶ FXI, FXII, HMWK, prekallikrein eksikliği
- ▶ Ortak yoldaki faktörlerin eksiklikleri
- ▶ Polistemi
- ▶ Lupus antikoagülanı
- ▶ İnhibitör gelişimi



PT yi uzatan nedenler

- ▶ Oral antikoagülan kullanımı
- ▶ Karaciğer hastalıkları
- ▶ Faktör VII eksikliği
- ▶ Ortak yoldaki faktörlerin
 - (FX, FV, FII, fibrinojen) eksiklikleri
- ▶ Nadir:
 - Lupus antikoagülanı,
 - paraproteinemiler

PT ve aPTT yi uzatan nedenler

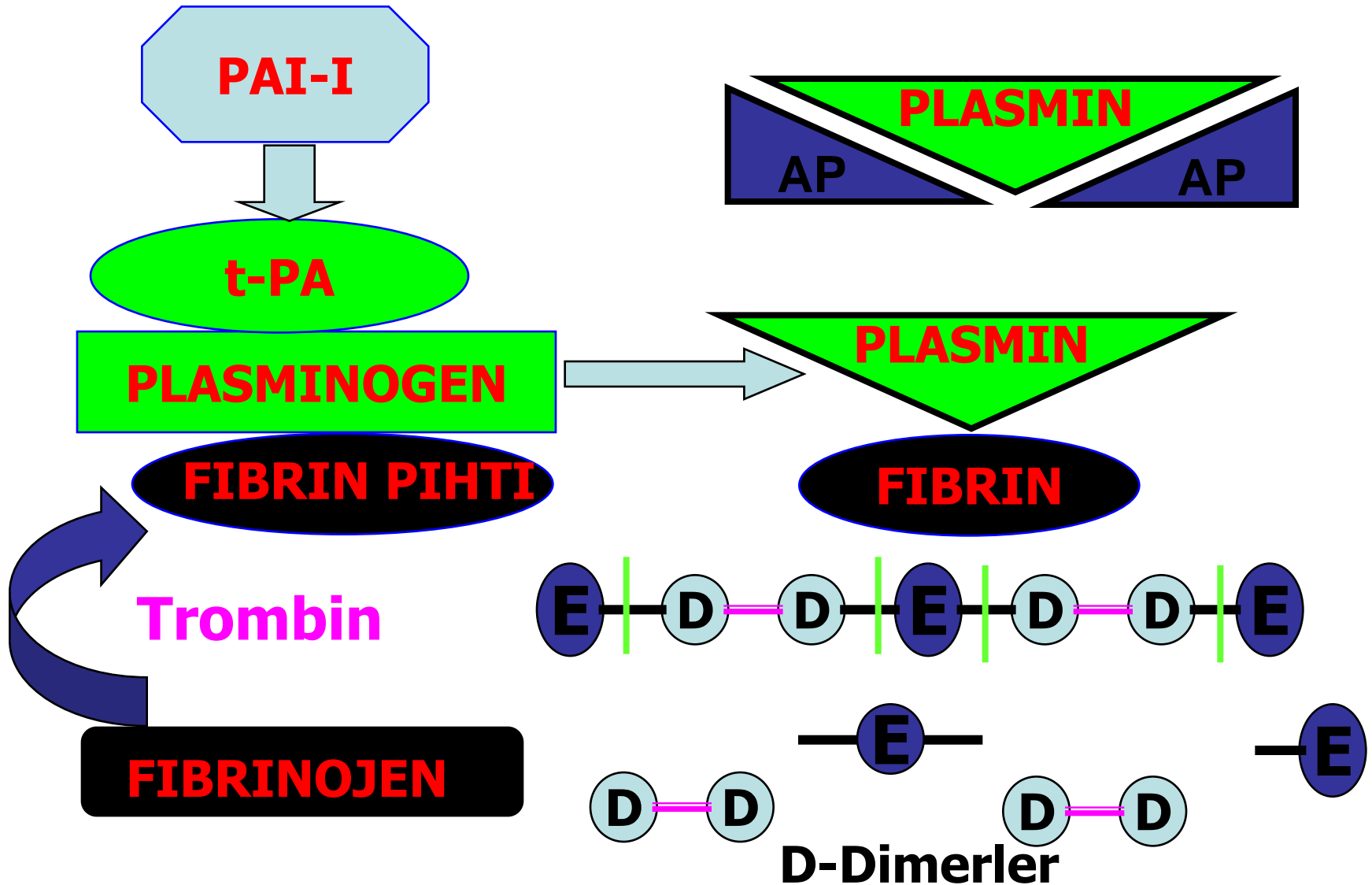
- ▶ Ortak yoldaki faktörlerin eksiklikleri
- ▶ Warfarin kullanımı
- ▶ Karaciğer hastalıkları
- ▶ Yaygın damar içi pıhtılaşması (DIC)

FİBRİNOJEN

Fibrinojen düzeyi: 200-400 mg 150' nin altında replasman gerekebilir.

- ▶ Karaciğer hastalığı–Asit
- ▶ DIK (sekonder fibrinolizis)
- ▶ Primer fibrinolizis
- ▶ Siroz, şok, metastatik prostat CA, GUS travma
- ▶ İlaçlar
- ▶ L-asparaginaz, alkol, tiklopidin, vb.
- ▶ Kanser
- ▶ Heparin
- ▶ Disfibrinojemi

Fibrinolitik Sistem



D-Dimer yüksekliği

- ▶ DIK (sekonder fibrinolizis)
- ▶ Arteriyel ve venöz tromboz
- ▶ Primer fibrinolizis
- ▶ Pulmoner emboli
- ▶ Post-operatif
- ▶ Travma
- ▶ Kanser
- ▶ Gebelik (son dönemi) postpartum
- ▶ Orak hücreli anemi krizi
- ▶ Hematom
- ▶ Trombolitikler (T-PA tedavisi)

FERRİTİN

- ▶ Demirin depo formunun solubl şeklidir.
- ▶ Serum ferritin düzeyinin 12 ng/ml'den düşük olması demir depolarının boş olduğunu gösterir.
- ▶ Ferritin'in demir eksikliğinde düzeyi azalır, kronik hastalık anemisinde ise artar.
- ▶ Serum ferritin düzeyi 2 haftadan fazla demir tedavisi alınca ya da kan transfüzyonu sonrası bakılırsa yalancı olarak normal ya da yüksek çıkabilir

FERRİTİN-2

- ▶ Serum ferritin düzeyine demir tedavisine başlamadan ya da demir tedavisi kesildikten en az 1 hafta sonra bakılmalıdır.
- ▶ Ferritin bir akut faz reaktanıdır ve inflamasyon, infeksiyon, uzun süreli açlık, KBY, hematolojik malignansi varlığında düzeyi artar ve mevcut olan demir eksikliğini maskeler.
- ▶ Bu tip durumda serum ferritin <100 ng/ml ise demir eksikliğini gösterir.

C- REAKTİF PROTEİN (CRP)

Kalsiyum iyonlarının varlığında S.pneumoniae'nin C-polisakkaridi ile presipitasyon veren bir akut faz serum proteindir.

- ▶ CRP sağlıklı bireylerin serumunda çok az miktarda bulunur (<1mg/dl)
- ▶ Gün içerisinde değişiklik göstermez.

CRP

- ▶ Akut enfeksiyonlar, romatolojik hastalıklar, maligniteler ve Mİ gibi doku hasarı olan durumlarda artar.
- ▶ İnflamasyondan 4-6 saat içerisinde artmaya başlar.
- ▶ 24-48 saatte max ulaşır.
- ▶ Doku hasarı devam ettiği süre boyunca yüksek kalır.
- ▶ Yarı ömrü 4-7 saattir.
- ▶ 3-7 gün içinde normale döner.

PROKALSİTONİN (PCT)

Prokalsitonin, kalsitonin hormonunun bir prohormonudur.

- ▶ PCT proteolitik reaksiyonlar ile kalsitonine dönüşür.
- ▶ Endotoksin ve sitokinlerin etkisi altında bu son proteolitik basamak inhibe olur.
- ▶ Normalde ise tüm PCT parçalanır. Kan dolaşımına katılmaz.
- ▶ Enfeksiyon esnasında dolaşımda kalsitonin düzeyinde yükselme görülmezken, PCT dolaşıma salınır.

PCT

- ▶ Sağlıklı bireylerde PCT düzeyi 0.05 ng/ml'nin altındadır.
- ▶ Kalsitoninin yarı ömrü 10 dk , prokalsitoninin 20–24 saattir.
- ▶ Viral enfeksiyonlar ve sistemik immünolojik hastalıklarda hafif bir artış olabilir ancak belirgin etkisi yoktur.
- ▶ CRP'nin aksine nekroz, inflamasyon ve viral enfeksiyonlarda önemli bir artış görülmez.
- ▶ Bakteriyel enfeksiyonlara özgün olduğu kabul edilir.

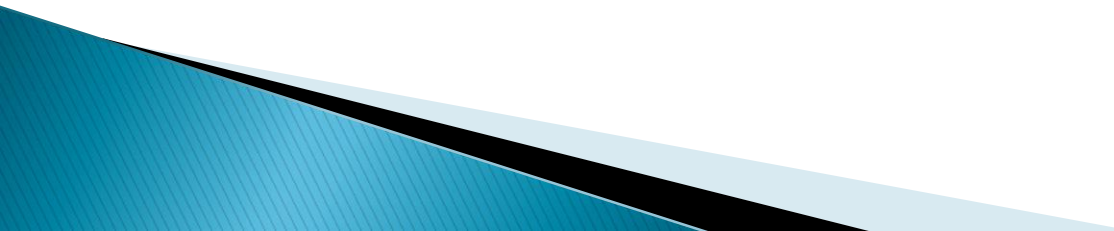
B-(1-3)-D GLUKAN TESTİ

- ▶ Yüksek riskli hematolojik hastalarda invazif fungal infeksiyonların tanısı için plazmadaki beta-glukan testine bakılması önerilir.(AL veya allo Kİ HSCT için indüksiyon/konsolidasyon tedavisi sonrası uzamı nötropenisi olan hastalar)
- ▶ Beta glukan GM'den daha önce pozitifleşir.

B-(1-3)-D GLUKAN TESTİ-2

- Hemodiyaliz
- Hiperlipidemi
- Hiperbilüribinemi
- İmmünoglobülin ve albümin gibi kan ürünlerinin kullanımı
- Bakteriyemi ve örneklerin gazlı bezle temas etmesi teste dair yorumlarda karışıklık yaratabilir

GALAKTOMANNAN

- ▶ Aspergillus için spesifiktir.
 - ▶ Akut enfeksiyon sırasında kan dolaşımına saçılır
- IFI için potansiyel erken tanı yöntemi (Cut-off 0.5Haftada 2 kez)
- ▶ Serumda ve diğer vücut sıvılarında yapılabilir
- BAL, BOS, İDRAR
- ▶ Nötropenik hastalarda aspergillozise yönelik takip amaçlı kullanılmaktadır.
- 

GM Yalancı pozitiflik nedenleri

- ▶ GM çeşitli besinlerde bulunabilir tahıllar, pirinç, makarna, konserve ve katkı maddeleri • Mısır gevreği • Ekmek • Makarna • Pirinç • Kek • Hindi • Sosis • Cips • Krem karamel
- ▶ Barsaklardan translokasyon
- ▶ Penicillium ve Paecilomyces türleri ile çapraz rxn
- ▶ Bazı antibiyotikler (Piperasilintazobaktam • Ampisilin-sulbaktam • Amoksisilin-klavulanat kombinasyonlarının eş zamanlı kullanımı)
- ▶ Bifidobacterium türleri (süt ve süt ürünleri)

GM yalancı negatiflik nedenleri

- ▶ Sınırlı anjioinvazyon,
- ▶ Yüksek antikor titresi,
- ▶ Düşük fungal yük
- ▶ Mantarın düşük galaktomannan açığa çıkarması
- ▶ Mantarın büyüme fazı
- ▶ Mikro çevre
- ▶ Konakçı immun durumu,
- ▶ Anti-aspergillus antikor varlığı

Polimerize zincir reaksiyonu PCR

- ▶ Belirli bir DNA segmentinin invitro ortamda çoğaltılmasıdır
- ▶ Hematolojik tanı ve tedavi kararında, izlemde önemlidir
- ▶ HLA doku grubunun saptanması
 - Clas-I: A, B, C
 - Clas-II: DR, DP, DQ lokusları
- ▶ Kimerizm tayini
- ▶ CMV antijenemi
- ▶ Bcr- abl

CMV

- ▶ Sero-epidemiyolojik çalışmalar gelişmiş ülkelerde erişkinlerin %50-70'inin, gelişmekte olan ülkelerde ise %100'ünün CMV'ye karşı antikor oluştuğunu göstermektedir.
- ▶ Latent enfekte şahıslar yaşam boyu virüsü ekstrete etmekte ve immunsupresyon olmadıkça başka bir sorun oluşmamaktadır.
- ▶ Kök hücre nakli yapılan hastalarda reaktivasyon şeklinde hastalığa neden olabilmektedir.

- ▶ CMV enfeksiyonu:
- ▶ Herhangi bir semptom olmaksızın virüsün veya viral antijenlerin veya viral nükleik asitlerin kan, vücut sıvıları veya dokulardan izole edilmesi durumudur
- ▶ **CMV hastalığı: CMV enfeksiyonu + SEMPTOM**

- ▶ En iyi takip PCR ile CMV-DNA düzeyi izlemi
- ▶ CMV-DNA'nın pozitif saptanması reaktivasyon göstergesi
- ▶ Reaktivasyon saptanması ile premedit tedavi başlama önerisi CMV-DNA kopya düzeyine göre karar verilmelidir
- Kaç kopya üzeri? **Standart yok**
 - ❖ CMV-DNA düzeyi dalgalanmalı seyir gösterir, ardışık izlemde **düzeş artışının** saptanması anlamlı
 - ❖ **Transplant merkezi deneyimine göre yapılmalı**

BK VİRÜS

- ▶ Hemorajik Sistit ;
- ▶ engrafman sonrası genellikle 3-6 hafta sonra ortaya çıkar
- ▶ Tanı :
- ▶ İdrarda ve kanda viral yük tayini

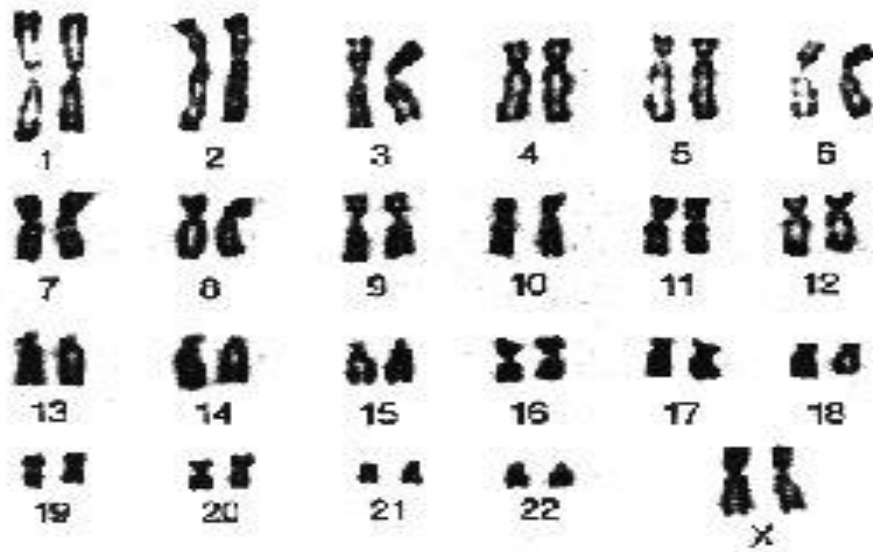
AKIM SİTOMETRİ(FLOWSİTOMETRİ)

- ▶ Bir solüsyon içindeki hücrelerin yüzeylerindeki veya sitoplazmasındaki veya nükleusundaki antijenlerin immünfloresan yöntemi ile tespiti
- ▶ Hücrelerin büyüklükleri
- ▶ Hücrelerin granülariteleri
- ▶ Hücrelerin üzerinde bakılması istenen antijen ekspresyonları, genellikle 1'den fazla antijenin aynı anda bakılabildiği yöntemdir

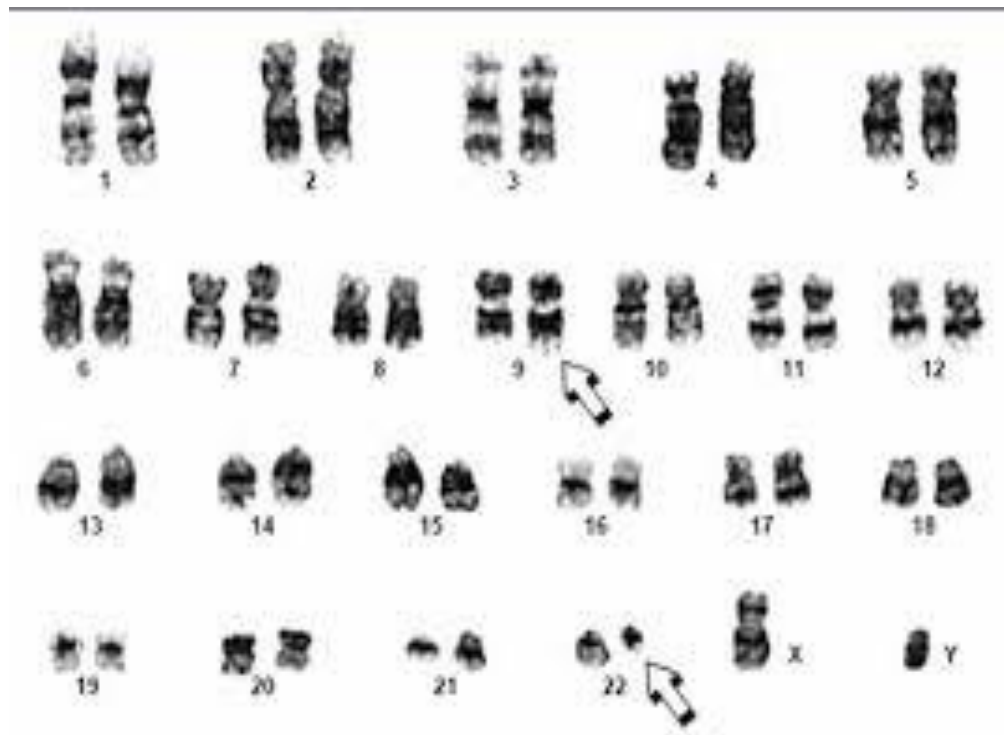
- ▶ Hücrenin birçok fiziksel özelliğini aynı anda ölçen teknoloji
- ▶ Hücre yüzeyindeki antijenik yapıları (CD'leri) floresanlı monoklonal antikorlarla saptayarak hücrenin tipini belirleme yöntemi,
- ▶ Hücrelerin DNA içeriği
- ▶ Hücre siklusu konusunda bilgi veren yöntem

KROMOZOM ANALİZİ

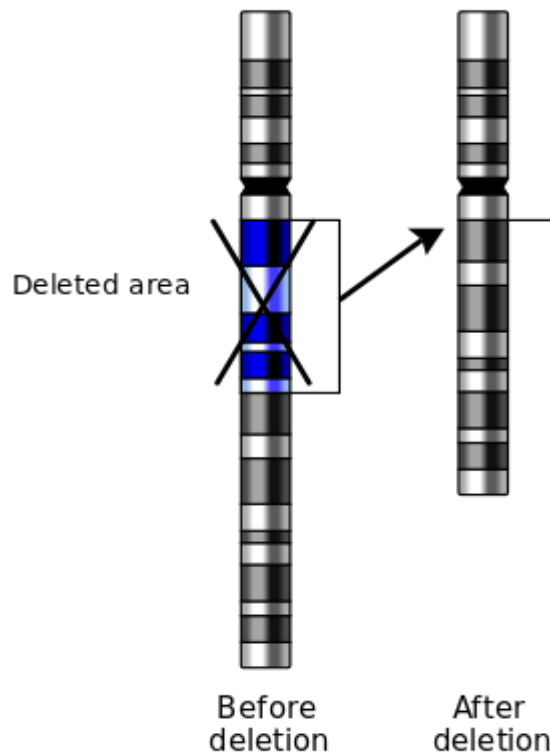
- ▶ KARYOTİP= Hücrede kromozom aranması
- ▶ Normal kadın karyotipi= 44 XX



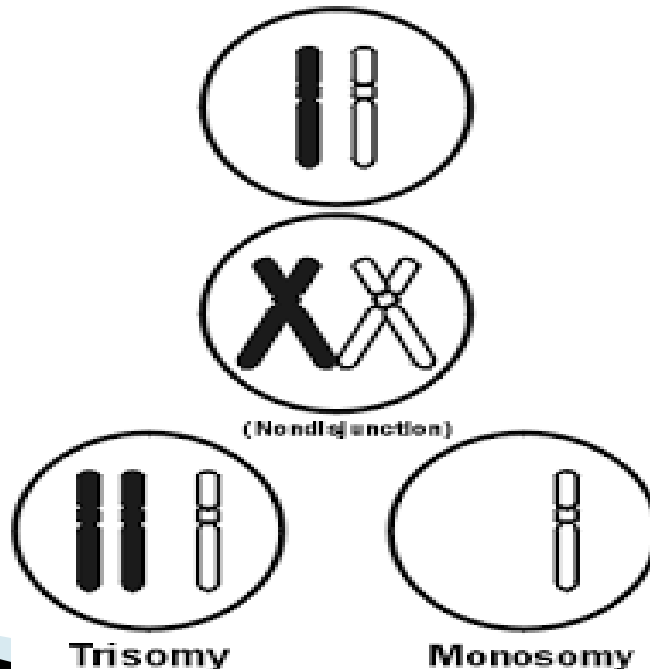
- ▶ Normal erkek karyotipi= 44 XY



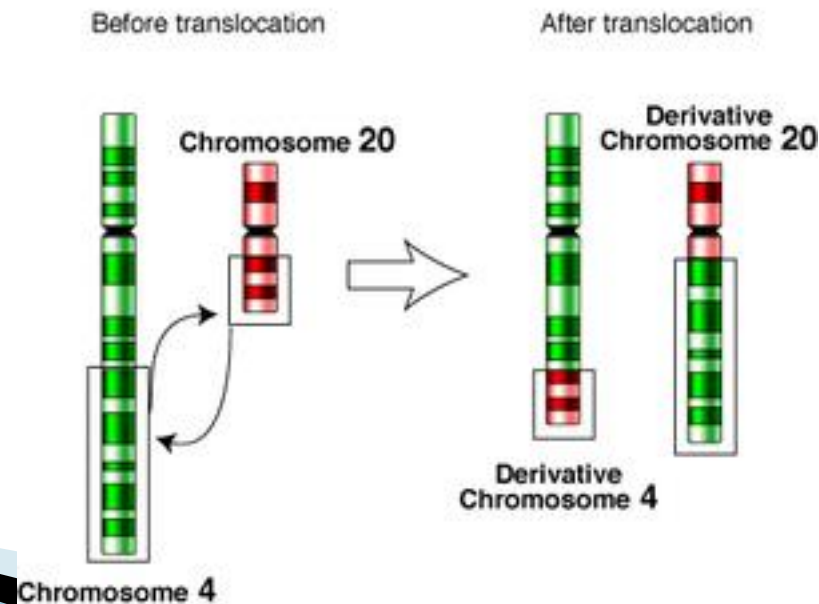
- ▶ **Delesyon** = Kromozomun bir segmentinin kayıp olması (iki kırılma arasında kalan ve kopanan parçanın kayıp olması)
- ▶ p= kısa kol
- ▶ q= uzun kol



- ▶ **Trizomi**; tam bir kromozom kazanımını gösterir + ile gösterilir.
- ▶ **Monozomi**; tam bir kromozom kaybını gösterir - ile gösterilir.

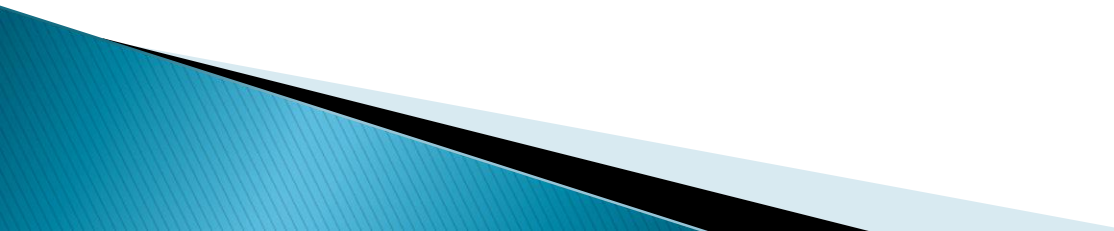


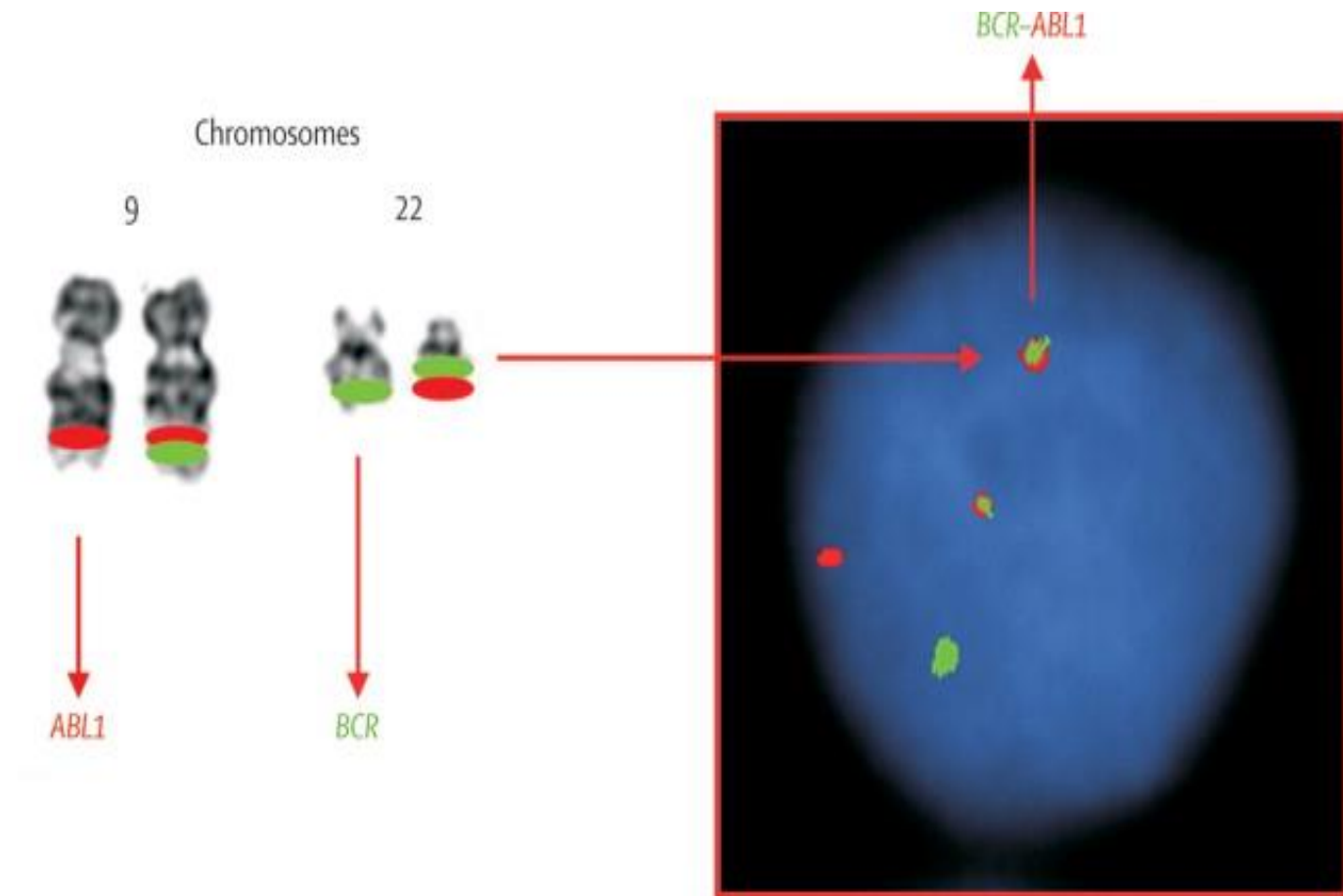
- **Translokasyon**, bir kromozomun kaybolan parçasının ya da kopan bir parçasının başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalilerindendir.



FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

Kromozomlar çeşitli floresan boyalarla işaretlenip analiz için hazırlanır

- ▶ Klinik sitogenetik
 - ▶ Prenatal tanı
 - ▶ Kanser sitogenetigi
 - ▶ Gen haritalanması
 - ▶ Tümör biyolojisi
 - ▶ Gen ekspresyonları
- 



HUMAN LEUKOCYTE ANTİGEN

HLA

- ▶ Bir kişinin doku tipini gösterir.
 - ▶ Uygun donör seçimi hematopoietik kök hücre nakli başarısı için kritik öneme sahiptir.
- Donör kaynakları:
- ▶ Tek yumurta ikizi (singeneik, HLA identik)
 - ▶ Kardeş, akraba veya akraba dışı (HLA uyumlu, haplo uyumlu veya uyumsuz allogeneik)
 - ▶ Kordon kanı (HLA uyumlu, haplo uyumlu veya uyumsuz allogeneik)
 - ▶ Hastanın kendisi (otolog, HLA identik) olabilir

- ▶ Donör ve alıcının HLA class I (HLA-A,B ve C) ve class II (HLA-DRB1 ve DQB1) haplotiplerinin karşılaştırılması başarılı bir allogeneik hematopoietik kök hücre transplantasyonu için anahtar faktördür.
- ▶ Akraba dışı donörlerin giderek daha fazla kullanılmasıyla HLA tipleme teknikleri ve HLA terminolojisi gelişmiş, ilave HLA allelleri keşfedilmiş ve HLA tipleme yöntemleri iyileşmiştir

- ▶ 6. kromozom kısa kolunda MHC sistemi de denilen HLA bölgesi, Class I ve II antijenleri ile immün tanımı sağlayan proteinlerin sentezlendiği gen bölgesidir.

- ▶ **Class I antijenler;**

- HLA A, B ve C (HLA-E, F, G,..)
- CD8+ T lenfositlere antijen sunumu

- ▶ **Class II antijenler;**

- HLA DR, DQ ve DP (HLA-DM, DO,..)
- CD4+ T lenfositlere

HLA tipleme yöntemleri

- ▶ **Serolojik tipleme :**

- Serolojik antikor temelli yöntem kullanarak HLA proteinlerini tespit etmeye dayanır.
- Aile içi tipleme yapmak için kullanılabilir
- Donör ve alıcı akraba değilse sadece serolojik HLA, yeterli olmaz.

- ▶ **Moleküler tipleme:**

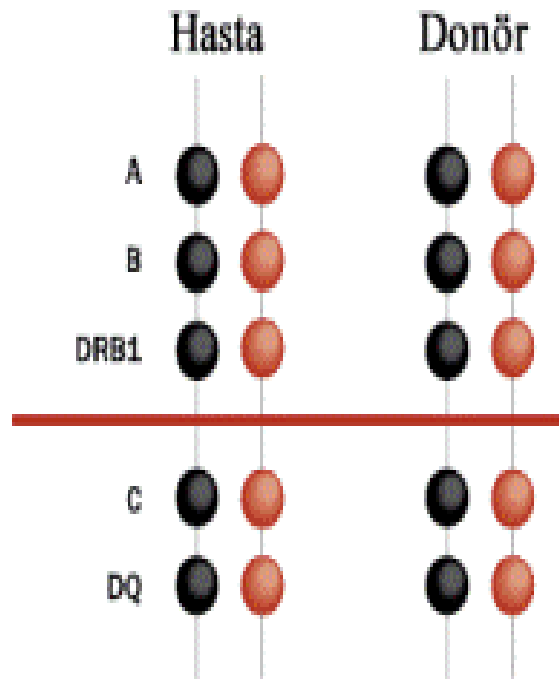
- HLA genlerini, onların DNA dizileriyle tanımlar.
- Akraba dışı donör HLA karşılaştırmasında zorunludur.
- Düşük veya yüksek çözünürlüklü olabilir

HLA UYUMUNA GÖRE TERİMLER;

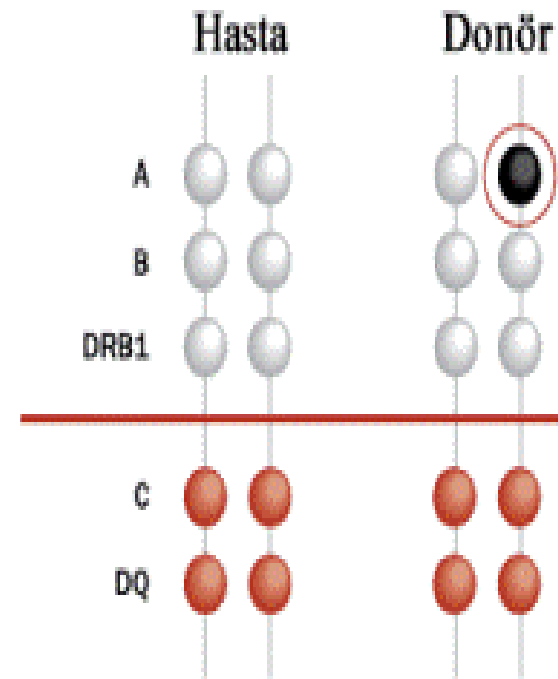
- ▶ HLA UYUMUNA GÖRE;
- ▶ MRD: matched related donor ;
- ▶ tam eşleşmiş donor :10/10 uyumlu kardeş-akraba
- ▶ MUD: matched unrelated donor;
- ▶ tam eşleşmiş donor :10/10 uyumlu akraba dışı
- ▶ MMRD: mismatched related donor;
- ▶ tek uyumsuz donor :9/10 uyumlu kardeş-akraba
- ▶ MMUD: mismatched unrelated donor
- ▶ tek uyumsuz donor :9/10 uyumlu akraba dışı
- ▶ HAPLOİDENTİK: 2 veya daha fazla uyumsuz nakil:
- ▶ 5/10-6/10-7/10-8/10 uyumlu kardeş-akraba

HLA uyum örnekleri

A. 6'da 6 uyum / 10'da 10 uyum



B. 6'da 5 uyum / 10'da 9 uyum



KİMERİZM

Genetik olarak farklı olan iki hücre serisinin aynı organizmada bulunmasına denir.

Kan transfüzyonları, kök hücre nakilleri, solid organ nakilleri, invitro fertilizasyon gibi tedavi seçeneklerinde edinsel kimerizm ortaya çıkabilir.

- ▶ Hemotopoietik KHN'de kimerizm, Allo-KHN den sonra donör kaynaklı lenfohematopoietik hücrelerin alıcıda bulunması şeklinde tanımlanır.

- ▶ Allo–KHN den sonra görülen kimerizm donör ve/veya alıcıdan köken alan hücrelerin varlığına göre değişik şekillerde gelişebilir;
- ▶ **Tam Kimerizm (TK) “Complete Chimerism/Full Chimerism** Genel olarak alıcının hematopoietik dokularında donör kaynaklı hücrelerin >%95 bulunması %5–95 arasında bulunması ise
- ▶ **Karma Kimerizm(KK) ”Mixed chimerism”** %5–95 arasında bulunması olarak ifade edilir.
- ▶ Kimerizm dinamik bir olaydır.
- ▶ **Otolog geri dönüşüm** Artan KK bazen sadece alıcı tipi hücrelerin oluşması ile sonlanabilir .

TEŞEKKÜR EDERİM