

T.C
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

**GRANÜLOSİT KOLONİ UYARAN FAKTÖR İLE KÖK
HÜCRE MOBİLİZASYONU YAPILAN SAĞLIKLI
VÉRİCİLERDE SOLUBL ADEZYON MOLEKÜLLERİ**

HEMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Önder ARSLAN

ANKARA, 1997

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
BULGULAR.....	28
TARTIŞMA.....	38
ÖZET.....	43
KAYNAKLAR.....	45

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında değerli bilimsel katkılarını esirgemeyen başta tez hocam Sayın Prof Dr. Haluk Koç ve Prof. Dr. Hamdi Akan'a, ve bu alanda yetişmemde emekleri olan Hematoloji Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Meral Beksaç'a, Prof. Dr. Osman İlhan'a, Prof Dr. Nahide Konuk ve Prof. Dr. Akın Uysal'a, laboratuvar çalışmalarında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Uz. Dr. Klara Dalva'ya, istatistiki değerlendirmeleri yapan Sayın Hakan Varol'a teşekkür ederim.

Dr. Önder ARSLAN

GİRİŞ ve AMAÇ

Kemik iliği transplantasyonu hematolojik malignitelerde önemli bir tedavi yaklaşımıdır. Son yıllarda kemik iliği yerine periferden toplanan kök hücreler, yüksek doz kemoterapi sonrası kemik iliği toparlanmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Öncelikle otolog transplantasyonlarda kullanılmaya başlanan bu tedavi alternatifi son yıllarda allogeneik transplantasyonlarda da artan oranlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Allogeneik vericilerde periferden toplanacak kök hücre miktarlarını arttırabilmek ve aferez sayılarını azaltabilmek amacıyla hematopoetik koloni uyaran faktörler kullanılmaktadır. Bunlardan klinikte ilk kullanılmış olanlarından biri granülosit koloni uyaran faktördür (G-CSF).

Adezyon molekülleri hematopoetik hücreler başta olmak üzere birçok hücrenin yüzeyinde bulunan ve hücreler arası iletişimde ve etkileşimde önemli rol oynayan moleküllerdir. Bu moleküller aynı zamanda bu ilişkileri ile kök hücrelerinin kemik iliğinden perifere dökülmelerini programlamaktadırlar. Bu nedenlerle, adezyon moleküllerinin allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu (APKHT) öncesinde, G-CSF desteğindeki mobilizasyon işlemlerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. G-CSF ile uyarılan kök hücrelerinin veya hematopoetik stromanın yüzey adezyon molekül ekspresyonunda değişiklikler olmaktadır. Hematopoetik büyüme hormonları ile veya başka uyaranlarla aktive olan lökositler, endotel hücreleri veya stroma hücrelerinin yüzeylerinde bulunan adezyon moleküllerinin ekspresyonlarında artış olur. Daha sonra bu moleküller seruma dökülürler. Yüzey adezyon moleküllerinde, çeşitli uyaranlar ile olabilecek değişiklikler bunların solubl formlarının serum düzeylerinin takibi ile mümkün olabilmektedir.

Bu çalışmada amaç G-CSF ile kemik iliği uyarılan sağlıklı hematopoetik kök hücre vericilerinin serum solubl adezyon molekül seviyelerindeki değişiklikleri takip etmek, bu moleküllerin birbirleri ve engrafman kinetiği ile olan ilişkilerini gözlemlemektir. Bunlara ek olarak adezyon molekülü seviyelerindeki değişikliklerle hastalardaki granülosit ve trombosit toparlanma süreleri arasında ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesi de çalışmanın hedefleri arasındadır. Bu düşüncelerden hareketle 15 sağlıklı allogeneik periferik kök hücre vericisine 5 gün süre ile 10µ/kg/günde tek

doz cilt altına G-CSF verildi ve G-CSF öncesi, G-CSF alırken 3. günde ve G-CSF'nin kesilmesinden 24 saat sonra serum sölubl adezyon moleküllerinden hücreler arası adezyon molekülü (ICAM-1), E-Selektin, L-Selektin ve CD44 seviyeleri ölçüldü ve sayılan dört solubl adezyon molekülünün serum seviyeleri yukarıda belirtilen konular açısından değeriendirildi.

GENEL BİLGİLER

ALLOGENEİK PERİFERİK KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU

Otolog periferik kök hücre transplantasyonu (OPKHT), hematopoetik büyüme faktörlerinin kullanılmaya başlanmasından sonra otolog kemik iliği transplantasyonunun yerini almıştır. Kolay hasat yapılabilmesi, hematopoetik yapılanmanın hızlı olması, hastaların erken taburcu olabilmesi ve maliyetin düşük olması en önemli avantajlarıdır (1,2). Granülosit koloni stimule edici faktör (granulocyte colony stimulating factor; G-CSF) ile mobilize edilmiş periferik kök hücrelerinin myeloablatif tedavi sonrası uzun süreli hematopoezi sağlayabileceği ilk kez hayvanlarda gösterilmiştir (3,4). Bu veriler sayesinde allogeneik periferik kök hücrelerinin, kemik iliğindeki kök hücrelerinin yerine kullanılabileceği düşüncesi gelişmiştir. Sonuçta G-CSF ile uyarılmış donörler kullanılarak allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu (APKHT) uygulanmıştır. İlk kullanım yeri donörün genel anestezi almasının sakıncalı olduğu veya kemik iliği hasatının (harvest) yeterli yapılamadığı olgulardır (5). Kemik iliği transplantasyonu sonrası gelişen greft yetmezliğinde de kullanılmıştır (6).

İlk APKHT uygulaması 1989'da Kessinger ve ark. tarafından 18 yaşında 3. remisyonda ALL'li hastada yapılmıştır (7). Donörü 21 yaşında HLA-identik erkek kardeşidir. Hazırlama rejimi olarak tüm beden ışınlaması (TBI) ve yüksek doz sitozin arabinozid kullanılmıştır. On seans aferez sonrası toplanan ve T-hücre ayıklaması yapılarak dondurulan ürünler son aferez seansı ile hastaya verilmiştir. +11.günde granulosit, +27. günde üç seride de engrafman tespit edilmiş olmakla birlikte hasta +32. günde enfeksiyon ile kaybedilmiştir (7).

Donöre G-CSF kullanılarak yapılan ilk APKHT ise Dreger ve ark. tarafından 1991 de gerçekleştirilmiştir (6). İki kez greft yetmezliği gelişen akut nonlenfoblastik lösemi (ANLL)'li 47 yaşındaki kadın hastada donörün 3. genel anesteziyi kabul etmemesi üzerine G-CSF desteğinde yapılan aferez ile başarılı engrafman sağlanmıştır ve hasta halen sağlıklıdır.

G-CSF kullanılarak doğrudan yapılan ilk APKHT uygulaması ise 1993'de Russell ve ark. tarafından uygulanmıştır (5). Akut lenfoblastik lösemi (ALL) 2. remisyonda 45 yaşındaki erkek hastanın donörünün 114kg olması ve aşırı sigara anemnezinin bulunması nedeniyle genel anestezinin riskleri göz önüne alınarak bu tedavi yaklaşımı tercih edilmiştir.

Weaver ve ark. ise 1993'de aynı uygulamayı ilk kez singeneik transplantasyonda kullanmışlardır (8). Daha sonra bu konuda çeşitli çalışmalar birbirini izlemiştir (9 -14).

Büyüme faktörleri ile perifere itilen kök hücreler, primitif kök hücreleri ile yönlendirilmiş (committed) hematopoetik prekürsör hücrelerinin oluşturduğu bir mikst popülasyonun oluşmasına neden olurlar ve bu oluşum kemik iliğinden farklı değildir (CD34+/CD33-, CD34+/HLA-DR-, CD34+/Thy1+). Ancak elde edilen CD34+ hücre popülasyonu kemik iliğine göre birkaç kat daha fazladır. Ayrıca elde edilen CD34+ hücre oranı ile kullanılan G-CSF dozları arasında belirgin bir korelasyon tespit edilmiştir (15,16). Anderlini ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada G-CSF sonrası (2x6µg/kg/gün) 4. ve 5. günde periferik kanın ve aferez ürünlerinin karşılaştırılmalı çalışmasında 5. günde yapılan hasatların daha efektif olduğu ve hedef CD34+ hücre sayısına tek aferez ile ulaşıldığı gözlenmiştir (17). İki grup arasında aferez ürünleri arasında lenfoid hücre elemanları ve NK hücreleri açısından fark bulunmamıştır.

Hasat için kullanılması gereken optimal G-CSF dozunu belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Suzue ve ark. 5µg/kg/gün G-CSF ile 2.5µg/kg/gün'e göre daha iyi CD34+ hücre toplamışlardır. Dreger ve ark. ise 10µg/kg/gün G-CSF'yi 5µg/kg/gün'e göre daha efektif bulmuşlardır (18). 10µg/kg/gün ile daha yüksek dozların direkt karşılaştırmasının yapıldığı bir çalışma yoktur. 16µg/kg/gün'ün üzerinde kullanan çalışma yoktur. En efektif G-CSF dozu 10µg/kg/gün olarak bulunmuş ve 4. dozdan 24 saat sonra yapılacak aferez ile en etkin kök hücre toplaması yapılabileceği belirtilmiştir. G-CSF'nin daha uzun süreli kullanımının CD34+ hücrelerde artış sağlamadığı gibi azalmaya neden olduğu da gösterilmiştir.

G-CSF kullanımı sonrası en sık karşılaşılan yan etkiler miyalji, kemik ağrıları ve baş ağrısıdır. Yan etkiler hastaların %50'sinde gözlenir ve parasetamol ile kısmen önlenabilirler. Bunların yanısıra bazı hastalarda LDH, alkali fosfataz yüksekliği ve hipokalemi görülebilir. G-CSF sonrası ardışık aferez yapılan donörlerde, büyüme faktörü verilmeden aferez yapılanlara göre trombosit sayılarında düşüş gözlenmiştir. G-CSF'nin sağlıklı donörlere kısa süreli kullanımının uzun vadede getirebileceği problemler henüz bilinmemektedir. Henüz en uzun süreli takipte olan donör 5 yıldır ve şimdiye kadar major bir komplikasyon bildirilmemiştir. Yapılan

bir çalışmada bu donörlerin kemik iliği morfolojik kontrollerinin normal olarak değerlendirildiği rapor edilmiştir.

Periferik kandan toplanan ürünün T hücre içeriği kemik iliğine göre 1-2 log daha fazladır (19). Dreger ve ark ise periferik kandan toplanan kök hücrelerinin kemik iliğine göre 7 kat fazla T hücre ve 20 kat fazla NK hücre içeriğinin olduğunu göstermişlerdir (18). Korbiling ve ark ise bir başka çalışmalarında kemik iliğine oranla periferik kök hücre ürünlerinin T hücre oranının 1.0-1.4 log fazla olduğunu göstermiştir (13). Kullanılan G-CSF dozlarının arttırılması veya aferez gününde yapılacak değişiklikler elde edilen ürünlerdeki lenfoid hücre oranlarını ve NK hücrelerinin sayılarını etkilememiştir (16,17).

Periferden toplanan ürünlerdeki T hücre içeriğinin fazla olması nedeniyle T hücre ayıklama çalışmaları gündeme gelmiştir. Campath-1 + otolog kompleman, immunomagnetik CD34+ hücre seleksiyonu, biotin-avidin ile CD34+ hücre seleksiyonu, soybean aglütinasyonu ve E-roset tekniği bu amaçla kullanılan metodlardır. Yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada immunomagnetik CD34+ hücre seleksiyonu en efektif bulunmuştur (4 log T hücre azalması). Bu uygulamalar sırasında %40-50'lere varan oranlarda CD34+ hücre kayıpları da bildirilmiştir.

Lökafez sonucu toplanan periferik kök hücrelerinin immunoterapötik potansiyelleri vardır. Periferik kanda bulunan kök hücrelerinin LAK hücreleri oluşturabilme kapasiteleri olduğu gösterilmiştir.

Engrafman için toplanması gerekli minimum CD34+ hücre sayısı bilinmemektedir. Önerilen $5.0 \times 10^6/\text{kg}$ 'dır. Graft versus host hastalığı (GVHH) profilaksisinin içeriği de önemlidir. HLA uygunsuz transplantlarda daha fazla hücre sayısına gereksinim vardır. Otolog PKHT çalışmalarında alt sınır $2.0 \times 10^6/\text{L}$ olarak belirtilmiş ve gerekli sayının $5.0 \times 10^6/\text{L}$ 'den büyük olması istenmiştir. Buna karşılık Seattle çalışmasında 53 donörden 4'ünde 0.6, 1.49, 1.55 ve $1.74 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ hücre verilen hastalarda başarılı engrafman olmuştur. Seattle grubunun önerdiği CD34+ hücre sayısı $15 \times 10^6/\text{kg}$ 'dır.

Uygulanan lökafez devamlı akım sağlayan cihazlarla 12-15L kan işleyecek şekilde yapılmalıdır. İşlemin önemli yan etkileri olmaması nedeniyle, donör hospitalize edilmeden de uygulanabilir.

Aferez sonrası toplanan hücreler dondurularak saklanabilir. Bazı çalışmalarda ise dondurma işlemi yapılmadan doğrudan günlük olarak hastalara verilmiştir. Korbiling ve Russell'ın çalışmalarında toplanan hücrelerin dondurularak saklanabileceği gösterilmiştir. CFU-GM ve CD34 hücre sayılarında ve engraftman günlerinde belirgin değişiklik gözlenmemiştir. Bu sayede hasta hazırlanmasında esnek olunabilmektedir. Bunlara karşın dondurulmadan verilen taze hücreler ile dondurma işlemi sırasında hücrelerde olabilecek kayıplar önlenmekte ve maliyet daha düşük olmaktadır.

Allogeneik ve otolog periferik kök hücre transplantasyonu sonrası erken engraftman gelişmesini sadece CD34+ hücre içeriklerinin sayıca fazlalıkları veya fonksiyonlarında olabilecek değişikliklerle açıklamak mümkün değildir. Bir diğer açıklama şekli ise büyüme faktörleri ile uyarılmış bu kök hücreleri ile birlikte bulunan aksesuar hücrelerin yapabileceği katkıdır. APKHT uygulanan ilk olgular genellikle kötü riskli ve ileri evre hastalardır. Bu hastalarda kemik iliği transplantasyonuna göre APKHT sonrası engraftman sürelerinde belirgin hızlanma saptanmıştır. Engraftmana etki eden parametreler, verilen CD34+ hücre sayısı, GVHH profilaksisinde kullanılan ajanlar ve posttransplant dönemde kullanılan büyüme faktörleridir. Ellidokuz hastayı içeren EBMT çalışmasında nötrofil ve trombosit engraftmanı, sırasıyla; 15 ve 16. günlerde olmuştur. Trombositlerin $50 \times 10^9/L$ olması için geçen süre ise 18 gün olarak verilmiştir. Korbiling CsA+prednisolone GVHH profilaksisi ile hastalarda engraftman zamanlarını 9 ve 12 gün olarak tespit etmişlerdir (13).

Hematolojik engraftmanın erken olması yanı sıra immün yapılanmanında bu hastalarda çabuk olduğu ve CD3+ hücrelerin toparlanma zamanlarının kısaldığı gösterilmiştir. Elde edilen bu erken hematolojik yapılanma aynı zamanda uzun sürelidir. Şimdiye kadar geç dönemde graft yetmezliği gösteren hasta yayımlanmamıştır.

Umulanın aksine bu hastalarda GVHH insidansında belirgin bir artış gözlenmemiştir. EMBT serisinde 59 hastada grade >2 GVHH insidansı %24 olarak verilmiştir. Seattle grubunun sonuçları da aynı paraleldedir (%16) (19).

APKHT'nin avantajları ise; genel anestezinin getirebileceği risklerden donörün korunması, donörün transfüzyon gereksiniminin olmaması, erken engraftman ve erken mobilizasyon ile erken immun yapılanmadır.

Bütün avantajları yanında APKHT uygulamasının bir takım dezavantajları vardır. Bunlar, donöre G-CSF kullanımının riskleri ve aferezin getirebileceği risklerdir (Seattle çalışmasında 53 donörden 12'sinde kateter yerleştirilmesi gerekmiştir). Hastalarda kronik GVHH insidansında belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu transplant şeklinin uzun vadede hastalıksız yaşam ve yaşam süreleri üzerine olan etkileri bilinmemektedir.

AKİT'e APKHT ilave edilmesi hematolojik yapılarınmayı hızlandırmak amacıyla düşünülmüş bir yaklaşımdır. Beş hastada engraftmanı hızlandırmak ve transplantasyona bağlı komplikasyonları azaltmak amacıyla AKİT + 1-4 gün içinde G-CSF ile mobilize edilmiş APKHT uygulanmış ve GVHH insidansında artış olmadan engraftmanın hızlandığını gösterilmiştir.

HLA uygun APKHT uygulamaları yanında HLA uygunsuz APKHT uygulamaları da az sayıda olmakla birlikte bildirilmiştir. Russell ve ark. HLA uygunsuz 4 hastada APKHT uygulamışlardır. Hastalardan biri 27. Günde, granulosit engraftmanı olmasına rağmen, trombosit transfüzyonuna bağımlı iken VOD ile kaybedilmiştir. Diğer 2 hastada, hızlı engraftman olmakla birlikte evre 2 GVHH gözlenmiş ve daha sonra kronik GVHH gelişmiştir. Bu hastalar halen yaşamaktadır. İki antijen uygunsuzluğu bulunan hasta ise +30. günde engraftman yetmezliği ile kaybedilmiştir. Bacigalupo ve ark. ise 1 class II antijen uygunsuzluğu olan hastada başarılı engraftman sağlamışlardır (Evre 2 GVHH).

APKHT'nun klinikte diğer kullanım alanları; kemik iliği transplantasyonu sonrası nükslerde immunoterapi amaçlı, graft yetmezliği ve graft rejeksiyonu tedavisidir.

Tüm bu verilerin sonucunda Cenevre'de yapılan EMBT toplantısında APKHT uygulanmasındaki öneriler aşağıda özetlenmiştir;

1. Donöre 10µg/kg/gün G-CSF uygulamak ve aferezi 4. dozdan sonra yapmak,

2. Lökaferizi devamlı akım sağlayan aferez cihazları ile 15L işlem görecektir şekilde uygulamak,
3. En az $2-3 \times 10^6$ /kg CD34+ hücre toplamak, yeterli hücre toplanamadığında G-CSF dozu yenilenerek bir sonraki gün aferezi yenilemek,
4. Eğer mümkünse aferez ürününün dondurulmadan verilmesini sağlamak,
5. Eğer mümkünse alıcılarda standart GVHH profilaksisi ve hazırlama rejimleri kullanmak,
6. Elde edilen verilerin uluslararası birliklere bildirilmesini sağlamak.



ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Adezyon molekülleri konusundaki son 10 yıl içindeki gelişmeler immunoloji, kanser metastazı, inflamasyon, embriyogenez ve tromboz gibi değişik alanlarda bilgi birikimimizin genişlemesine yol açmıştır (20).

Erken hematopoetik kök hücreleri stromal hücrelere ve ekstrasellüler matrikse bağlanırlar ve bu sayede olgunlaşırlar ve adeziv davranışlarında belirgin değişiklikler olur (21-24). Bu değişikliklerden ve adeziv karakteristiklerinden sorumlu olan çeşitli reseptörler tariflenmiştir. Bu reseptörlerin uyarılması hücre içerisinde çeşitli mekanizmaları harekete geçirmektedir. Bu içerisinde çeşitli substratların fosforilizasyonu, programlanmış hücre ölümünden veya hücre büyümesinden sorumlu olan genlerin ekspresyonundaki ve hücre membran yapısındaki değişiklikler en önemlileridir (25). Bu konuda tariflenmiş en önemli yapılar integrinler, immünglobulin süper ailesi, selektinler ve diğerleridir (26).

İntegrinler: Hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerine özelleşmiş, non-kovalan bağlı alfa ve beta zincirlerinden oluşan glikoproteinlerdir. Her alfa alt ünitesi sadece bir beta alt ünitesi ile birleşebildiğinden sınıflandırılmaları beta integrinler üzerinden yapılmaktadır (27). Yirmibir değişik integrin kombinasyonu tarif edilmiştir (26). Beta 1 integrinlere (CD29) örnek olarak VLA 1-6 (Very Late Antigen); beta 2 (CD18) integrinlere örnek olarak lökosit integrinleri (LFA-1); beta 3 integrinlere (CD61) örnek olarak sitoadezinler (Glikoprotein IIb/IIIa) ve diğerleri sayılabilir (27).

İmmünglobulin Süper Ailesi (IgSA); İki antiparalel beta1-zincirinden oluşan yaklaşık 100 amino asite sahip dimerlerden oluşan immünglobulin benzeri yapılardır (27). Bu yüzey antijenlerinin başlıca 2 görevi vardır; antijen tanınması (C1-tip), kompleman bağlanması veya hücre adhezyonu (C2-tip) (26). C-2 grubunda CD2, CD58 (LFA-3) ve CD56 (NCAM) bulunmaktadır. Endotelial hücreler tarafından eksprese edilen ve lökosit adezyonunda rol oynayan IgSA üyeleri ise: hücreler arası adezyon molekülü-1(ICAM-1; Intercellular Adhesion Molecule-1, CD54), ICAM-2 (CD102), damarsal hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1; Vascular Cell Adhesion Molecule, CD106), trombosit-endotelial hücre adhezyon molekülü-1 (PECAM-1; Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1,

CD31) ve mukozal adressin (MadCAM-1)'dir (26). ICAM-1 ekspresyonunun dokuların inflamasyon gösteren bölgelerinde arttığı ve bu durumdan interferon gama (IFN- γ), interlökin-1 beta (IL1- β) ve tümör nekrozis faktör alfa'nın (TNF- α) bölgesel yapımından sorumlu olduğu düşünülmektedir (28,29).

İlk olarak 1991 yılında solubl ICAM-1 molekülünün varlığı immunoblotting yöntemi ile gösterilmiştir. Daha sonra ELİSA yöntemi ile aynı bulgular doğrulanmıştır. Yapılan birçok çalışmada serum sICAM düzeyleri 102-450ng/ml arasında bulunmuştur. İnflamasyon, infeksiyonlar ve kanserler bu düzeyleri arttırmaktadır. sICAM düzeylerinin çeşitli hastalıklardaki verileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Serum solubl adezyon moleküllerinin çeşitli hastalıklardaki düzeyleri (parantez içindekiler p değerleridir)

	sICAM-1	sVCAM-1	sE-Selektin
Normal	56.5	54.7	10.8
Diabetes mellitus	94.5 (0.0002)	69.6 (0.0393)	23.4 (0.0001)
CAPD	141.2 (0.0001)	134.2 (0.0001)	19.7 (0.0091)
Hemodiyaliz	88.7 (0.0002)	124.5 (0.0001)	20.1 (0.0048)
Hipertansiyon	69.5 (0.5304)	73.9 (0.1363)	15.2 (0.0829)

Selektinler: Memelilerin C-tip lektin yapısına benzeyen, bir bölümü epidermal büyüme faktörü dizgisini takip eden ve kısa bir sitoplazmik kuyruk bulunduran yapılardır (27). Bu grupta tanımlanan 3 yapı L-Selektin, P-Selektin ve E-Selektin'dir. Bu glikoproteinlerin özelliği, homofilik veya heterofilik protein-protein bağlanması dışında sialize edilmiş Lewis X (Sle^x) adı verilen karbohidrat türevlerini de tanıyabilmesi ve bağlanabilmesidir (30). Diğer 2 gruba göre farkları hızlı bir şekilde aktive olabilmeleri ve fizyolojik akım şartlarında da etkin olarak çalışabilmeleridir. İnflamasyonun erken dönemlerinde lökositlerin ekstravazasyonundan ve damar endotelinde "yuvarlanma (rolling)" işleminden sorumludurlar (27). Özellikle L-selektin hematopoetik kök hücrelerinden başka immatür timositlerde, erken B-hücre prekürsörlerinde, matür T ve B lenfositlerinde ve matür granülositlerde ve monositlerde ekspresyon gösterirler (31). Olgunlaşma aşamalarının ara

kademelerinde görülmezler. Megakaryositlerde ve eritroid seri erken hücrelerinde de bulunmazlar.

Selektinlerin solubl formları tariflenmiştir (32). Solubl L-Selektin plazmada 2 form halinde bulunmaktadır. Bunlardan biri 62kDa diğeri ise yaklaşık 75-100 kDa ağırlığındadır. sL-Selektin membranda bulunan reseptör formundan 3-5kDa daha hafiftir. Lenfositlerin forbol esterleri, kemoatraktanlar, IL-8, GM-CSF ile aktive olmaları sonucunda dakikalar içerisinde hücre yüzeyinden plazmaya dökülürler. Lenfositlerin mitojenlerle uyarılmalarından sonra plazmaya dökülmeleri ise daha yavaş olmaktadır. Plazmaya dökülen sL-Selektinler biyolojik olarak aktiftirler (33). Bu nedenle plazmada belli bir konsantrasyona ulaştıkları zaman L-Selektinin aracı olduğu adezyon olaylarını inhibe ederler. Fizyolojik konsantrasyonlarında bile lenfositlerin endotele olan adezyonlarında %15-20 inhibisyona neden olurlar. Nötrofillerde de benzer bulgular tespit edilmiştir. Fizyolojik serum konsantrasyonu 63 hastayı içeren bir çalışmada $1.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Çeşitli hastalıklarda sL-Selektin seviyelerinde çeşitli oranlarda artışlar tespit edilmiştir. Örnek vermek gerekirse; HIV enfeksiyonları, sepsis, Kawasaki hastalığı gibi.

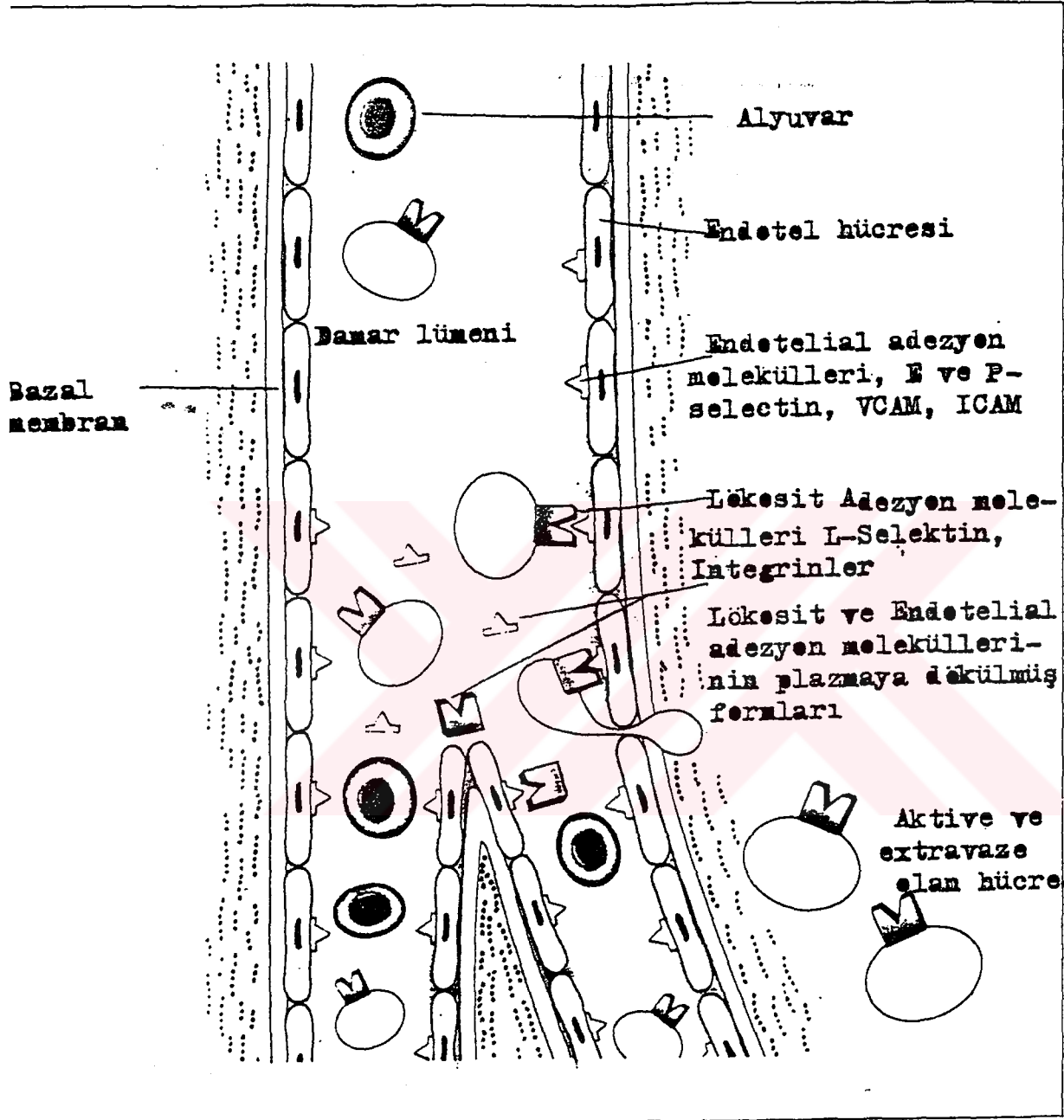
E-Selektin diğer geniş dağılım gösteren adezyon moleküllerinden farklı olarak sadece endotel hücrelerinin yüzeylerinde ekspresyon gösterir. İn vitro aktivasyon sonrası endotel hücrelerinin yüzeyinden E-Selektinin plazmaya döküldüğü gösterilmiştir. sE-Selektin düzeylerindeki artış endotel aktivasyonunun bir kanıtıdır. Diğer endotel kaynaklı trombomodulin, endotelin ve vWF'den farklı olarak endotel harabiyetinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. sE-Selektinde biyolojik olarak aktif kabul edilmektedir. sL-Selektinde olduğu gibi sE-Selektinin plazma düzeyleri çeşitli hastalıklarda artış göstermektedir. (Tablo 1). Şekil 1'de ise adezyon moleküllerinin solubl formlarının oluşmaları şematik olarak gösterilmiştir.

CD44: Organizmada çok geniş olarak dağılım gösteren, yüksek derecede pleomorfizm gösteren transmembran glikoproteindir. Onsekiz varyant formu mevcuttur. Lenfositlerin yüksek endotelial venüllere (HEV) tutunmasını kolaylaştıran hyaluronik asit reseptörüdür. Varyant formları kondroitin sülfata tutunarak, fibronektin, laminin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine de bağlanabilir. Homotipik adezyonda rol oynamaktadır. Bazı karsinoma ve tümörlerde yüksek ekspresyonu saptanmıştır. Metastazda rol oynadığı gösterilmiştir (34).

CD44 yapı olarak kartilaj bağlantı proteinlerine benzer. Ekstra sellüler matrikse bağlanmada, hücre göçünde, lenfopoezde ve lenfosit yerleşmesinde (homing) rol oynadığı bilinmektedir (35). CD44'ün sayısız isoformları bulunmaktadır ve isoformlardan özellikle CD44-6v'nin bir çok solid tümörde prognostik rolü olduğu ve aynı zamanda residüel tümör ve takip kriteri olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (36). Lenfoid dokularda en fazla 85-95 kDa ağırlığındaki standart (veya hematopoetik) formu ile 180-299 kDa ağırlığındaki diğer isoformu bulunmaktadır. İnsan serum ve plazmasında endojen proteolitik mekanizmalar sonucu salındığı düşünülen solubl formu bulunmaktadır (13).

Kan damarlarının endotelinde CD44 ve ICAM-1 eksprese edilmektedirler. Bu moleküllerin ekspresyonu; sitokinler, sitostatik ilaçlar ve büyüme faktörleri gibi endojen ve eksojen unsurlarca değişmekte ve dinamizm göstermektedirler. Bu dinamizm kök hücre nakli ve tümör metastazında büyük rol oynamaktadır (37-40).

Diğerleri: Bu grupta her 3 sınıfa da girmeyen "Cadherinler" adı verilen moleküllerle; glikoprotein yapısındaki "Homing" hücre adhezyon molekülü (H-CAM, CD44) yer almaktadır. Cadherinler kalsiyum bağımlı hücre adezyon molekülleridir. En iyi tanımlanmış olanı epitelyal cadherindir (E-cadherin). Epitellerin başlıca hücreler arası bağlantılarından olan "desmozomlar", cadherin ailesinin üyelerindendir (30). Cadherinlerin tümör hücrelerinin birbirleri ile yapışmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir (41).



Şekil 1: Adezyon moleküllerinin şematik gösterimi.

HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDE EKSPRESYON GÖSTEREN ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Hematopoietik kök hücreleri üzerinde çeşitli ailelere ait adezyon molekülleri eksprese olmaktadır. Bunlardan en önemlileri integrin ailesinden LFA-1, VLA-4, immunglobulin süper ailesinden ICAM-1, CD44 ve selektin ailesidir (42,43). CD34+ hücreler üzerinde eksprese olan bu adezyon molekülleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: CD34+ kök hücreleri üzerinde eksprese olan adezyon molekülleri

Integrinler	Selektinler
CD49d (VLA-4 α)	L-Selektin (Lecam-1)
CD49e (VLA-5 α)	Musinler
CD29 (β 1 integrin zinciri)	CD58 (LFA-3)
CD18 (β 2 integrin zinciri)	
CD11a (LFA-1)	
İmmunglobulinler	Proteoglikanlar
CD54 (ICAM-1)	CD44 (HCAM)
ICAM-3	

α 4 β 1 (VLA-4), α 5 β 1 (VLA-5), α 1 β 2 (LFA-1) integrinlerinin hematopoezden sorumlu olup hematopoetik kök hücrelerde eksprese oldukları gösterilmiştir. Primatlara anti- α 4 antikorlarının verilmesi CFU-GM ve BFU-E kolonilerinin periferik kanda 200 kat artmasına neden olmuştur. Bu moleküller aynı zamanda primitif hücrelerin olgunlaşmasından da sorumludurlar. Örneğin LFA-1 CD34+ progenitor hücrelerde ekspresyon gösterir. Uzun süreli hücre kültürlerine anti-LFA-1 konulması myeloid ve eritroid koloni oluşturan hücrelerin sayılarının azalmasına neden olmuştur.

VLA-4 ve VLA-5 üzerinde en çok çalışılmış olan ve progenitör hücreler üzerinde eksprese edilen integrinlerdir. Ancak çeşitli güçlükler dolayısı ile kök hücrelerde eksprese olan bu adezyon molekülleri üzerinde çalışmalar kolay yapılamamaktadır. Bunlardan ilki bu hücrelerin kemik iliğinde

oldukça az sayıda olmalarıdır. İkincisi genellikle bu çalışmalarda stromal hücreler yerine mezanşimal hücreler kullanılmakta ve sonuçta yorumlar yeterli olmayabilmektedir.

İnsanlarda akım sitometresi kullanılarak yapılan çalışmalarda hem kemik iliği kaynaklı ve hem de periferik mobilize edilmiş CD34+ hücrelerin %50'sinden fazlasında $\alpha 4$, $\alpha 5$ ve $\beta 1$ integrinlerin eksprese oldukları gösterilmiştir (44-48).

Integrinler dışında birçok adezyon molekülleri de hematopoetik kök hücrelerinin yüzeyinde eksprese olurlar. Bunlardan bir tanesi de CD54'dür. CD54 IgSA üyesidir. LFA-1 (CD11a/CD18) ve Mac-1 /CD11b-CD18) için ligand görevi görür. VLA-4 terminal eritroid matürasyonda önemli rol oynamaktadır (49).

L-selektin CD34+ hücrelerin bir kısmında eksprese olmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerinin ve lökositlerin endotele tutunmasında önemli görevi olan bir adezyon molekülüdür. Bu durumun hücre fonksiyonu üzerine olan etkisi bilinmemektedir (50). Ancak kök hücreler üzerinde eksprese olmaları nedeniyle transplantasyon sonrası hematolojik toparlanmayı gösteren bir parametre olarak kullanılabilir (48). Bu bulgular ışığında CD34 molekülünün L-selektinin reseptörü olduğu ileri sürülmüştür. Selektin ailesi 3 proteinden oluşmaktadır. L-selektin ekspresyonu sadece kan hücreleri ile sınırlı iken, E-selektin (ELAM-1) bir endotelial proteindir. P-selektin ise aktive trombositler ve endotel hücrelerinde bulunur. E-selektin ve P-selektinin stromal hücreler üzerinde eksprese olabileceğine ait kanıtlar varsa da, bu proteinler hematopoietik kök hücreler üzerinde gösterilmemiştir. Buna karşılık L-selektin ise özellikle (CD34+/lin -) hücreler üzerinde eksprese olmaktadır (31). Hücre yüzeyindeki L-selektin ekspresyonu ile hücrelerin klonojenik potansiyelleri arasında korelasyon olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (51). İn vitro ortama sürekli olarak anti-L-selektin ilave edilmesi ile klonojenik potansiyellerinin engellendiği gösterilmiştir.

Bu invitro veriler yanında özellikle klinikte kök hücre transplantasyonu sırasında verilen L-selektin+/CD34+ hücre sayıları ile granülosit ve trombosit toparlanma süreleri arasında belirgin bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. L-selektin için saptanan bu verilere karşılık diğer adezyon moleküllerinden PECAM-1, CD44, VLA-4, VLA-5 ve LFA-1 için bu tür bir

ilişki gösterilememiştir (48). Bu veriler L-selektin pozitif hücrelerin yüksek proliferatif kapasite gösterdiğinin kanıtıdır.

Kök hücrelerde dahil olmak üzere tüm hematopoetik hücrelerde CD44 ekspresyonu bulunmaktadır. CD44'e karşı geliştirilen monoklonal antikörlerin ise farelerde myelopoezi ve lenfopoezi baskıladığı gösterilmiştir. (35, 52, 53). Pluripotent kök hücrenin CD44 pozitif olduğu bilinmektedir ve lenfoid olgunlaşma sırasında CD44 ekspresyonunda farklılıklar gözlenmektedir. Olgunlaşma göstermeyen formlarda CD44 pozitifliği çok yüksek iken, olgunlaşmanın erken basamaklarından itibaren pozitiflik kaybolmakta fakat ilerde olgunlaşma artmaya başladıkça pozitiflik tekrar ortaya çıkmaktadır (54).

Tüm bu adezyon moleküllerine ilave olarak çeşitli hayvan çalışmalarında CD34'ünde hematopoetik hücre adezyonunda düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir (55).

Tüm bu adezyon moleküllerinin hematopoietik kök hücrelerdeki ekspresyonlarının ve adeziv fonksiyonlarının gösterilmesine rağmen hücreler üzerindeki düzenleyici fonksiyonları bugün için açık olarak bilinmemektedir.

SİTOKİNLERİN ADEZYON MOLEKÜLLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ ve BU ETKİLERİ İLE KÖK HÜCRELERİNİN PERİFERİK KANA DÖKÜLMELERİ

Yaygın aktiviteleri yanında sitokinlerin hematopoietik hücrelerin adeziv fonksiyonlarında etkili oldukları son yıllarda kemoterapi sonrası kullanıldıklarında birçok progenitör hücreyi kemik iliğinden periferik kana mobilize etmeleri sonucunda anlaşılmıştır. Bu mobilizasyon işlemi sırasında kök hücreler önce ilişki içinde oldukları stromal hücrelerden ayrılmakta ve sonrasında kan damarları ile temasa geçip ekstrasvazasyonu gerçekleştirmeye çalışmaktadırlar. Sitokinlerin veya klinikte kullanılan hematopoetik büyüme faktörlerinin etkisi ile kök hücrelerinin adezyon kinetiğinin yeniden yapılanmasının iki yan etkisi vardır. Bunlardan ilki bu kök hücreleri ile birlikte kemik iliği mikroçevresinde bulunabilen malign hücrelerinde tutundukları yerlerden ayrılarak periferik kana dökülmeleridir. İkincisi ise

bu kök hücrelerinin repopülasyon kapasitelerinde meydana getirebileceği olumsuz etkilerdir.

Sitokinler içerisinde G-CSF, GM-CSF, IL-3, steel faktör (stem cell faktör), PIXY 321 (GM-CSF+IL-3), IL-7, IL-8 klonojenik kök hücrelerinin periferik mobilize olmasına neden olurlar. Bu hücrelerin fenotipik karakterleri CD34+, HLA-DR-, CD38-, Thy-1+, -lin-, -rhodamin dull, c-kit+ olarak tariflenmektedir (56,57).

Kemoterapötik ilaçların yaptığından farklı olarak sitokinler çeşitli adezyon moleküllerini kemik iliğinde stromal mikroçevrede, ekstrasellüler kompartmandaki fonksiyonel durumlarında veya ekspresyonlarında değişiklikler meydana getirerek kök hücrelerinin periferik kana dökülmelerini sağlarlar. Sitotoksik ilaçlar ise kemik iliği mikrovasküler yapısında yapısal değişiklikler meydana getirmekte, sinüslerden dışarıya doğru negatif basınç oluşturmakta ve proliferatif kapasitesi yüksek hücrelerin ölümüne neden olarak kök hücrelerinin sayılarının artmasına katkıda bulunmaktadır. Sitokinlerin kök hücreleri periferik mobilize edebilmeleri için öncelikle kök hücre ile stromal mikroçevre arasındaki bağın koparılması gereklidir. Bunun sonrasında ise adezyon kaskadı kök hücrenin vasküler endotel ile ilişkiye girerek kök hücrenin ekstrasvazasyonunun gerçekleşmesini sağlamalıdır.

Mobilizasyon ile Steel faktör için, tirozin kinaz reseptör görevi yapan c-kit ligand ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. Bu da periferik kana kök hücre mobilizasyonunun çok sayıda sitokinlerin birlikte çalışması ile gerçekleşmiş olacağının bir göstergesidir. İntegrinlerin fonksiyonlarındaki kayıplarında bu konuda katkısı olduğu düşünülebilir. Periferik kana dökülen bu kök hücrelerinin sitokin uyarıları altında stabil hallerinden kurtulup çoğalmaya ve diferansiye olmaya başlayabileceği ve böylece toplanan hücrelerin engraftman sorunlarına (gecikmelerine) yol açabileceği ileri sürülmüştür. Ancak pratikte toplanan bu hücreler ile başarılı hematolojik toparlanma sağlanabilmektedir. Periferik çıkan bu kök hücrelerinin çoğunun Go-G1 fazında hücreler olup, çok az bir kısmının S fazında olduğu gösterilmiştir. Ancak yine de bu hücrelerin sitokinler ile uyarılarak koloni oluşturma potansiyellerini korudukları gösterilmiştir (58). Ayrıca G-CSF uygulaması CD34+ periferik hücrelerde apoptozisi engellemektedir.

Sitokinlerin hematopoetik kök hücrelerini veya hematopoetik öncülleri perifere mobilize etmelerinde çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlardan biri, sitokinlerin progenitör hücreleri proliferasyona iterek çoğaltmaları veya apoptozisi engileyerek sayılarının çoğalmasını sağlamalarıdır. Ancak yapılan çalışmalar progenitor hücrelerinin kemik iliğinden perifere yer değiştirdiklerini ve vücutta bulunan progenitör hücre miktarının artmadığını göstermiştir.

Bir hipoteze göre sitokinlerin progenitör hücreler üzerindeki VLA-4, VLA-5, LFA-1 ve LFA-3 integrinlerinin ekspresyonlarında azalma yaptıkları ve bunun sonucunda bu hücrelerin perifere döküldükleri belirtilmiştir. Bunun yanında c-kit ekspresyonunda da azalma olmaktadır (57). Sitokinlerden özellikle G-CSF'nin sadece bu moleküllerde ekspresyonu azaltarak progenitör hücreleri mobilize ettiği hipotezi yeterli değildir. Çünkü yapılan çalışmalarda anti-VLA-4 antikorları ile birlikte G-CSF kullanıldığında da donörlerde 4-10 kat periferde kök hücrelerinde artışlar tespit edilmiştir. Bu nedenle sitokinlerin tek bir mekanizmadan çok birçok adezyon molekülünü etkileyerek bu işlemi yaptıkları düşünülmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 1996 - Mart 1997 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi, İbni Sina Hastanesi, Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde hematolojik maligniteleri nedeniyle allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu planlanan 15 hastanın sağlıklı donörleri çalışma grubunu oluşturmaktadır. Donörler transplantasyon uygulanacak hastaların HLA-tam uyumlu kardeşleriydi. Donörlerin yaşı medyan 30 (22 - 45)'dur. Bunlardan 8'i kadın, 7'si erkekti. Donörlerin ve hastaların özellikleri tablo 3'de gösterilmiştir. Transplantasyon öncesi, fizik muayene, tam kan, rutin biyokimya, PA akciğer grafisi, EKG, viral serolojik tetkikler ve kemik iliği aspirasyon incelemesi yapılarak sağlıklı oldukları gösterilen bu donörler çalışmaya alınmışlardır. Transplantasyon uygulanan hastaların tanıları ise sırasıyla; akut nonlenfoblastik lösemi (6 hasta), kronik myelositer lösemi kronik faz (6 hasta), akut lenfoblastik lösemi (2 hasta), multiple myelomadır (1 hasta).

Hazırlama rejimi: Üçüncü nüks sırasında transplantasyon yapılan bir ALL'li hasta hariç, hastaların hepsinde busulfan 16mg/kg + siklofosfamid 120mg/kg hazırlama rejimi kullanıldı (Tablo 3).

GVHH profilaksisi: Hastalara GVHH profilaksisi amacıyla siklosporin-A + kısa dönem metotraksat (MTX) protokolü kullanıldı. Siklosporin -1 günden başlamak üzere 1mg/kg x günde 2 kez, i.v. 6 saat infüzyon şeklinde kullanıldı. Hasta oral almaya başladığında 5mg/kg/gün günde 2 doza bölünerek 180. güne kadar verildi. MTX ise +1.gün 15mg/kg i.v., +3, +6, +11. günler 10mg/kg i.v. dozunda kullanıldı.

G-CSF uygulaması: Donörlere hastaların hazırlama rejimlerinin -4. gününden başlamak üzere 5 gün süreyle sabahları 10µ/kg/gün dozunda cilt altına rekombinant G-CSF (Neupogen, Roche) uygulandı. G-CSF aferez başlangıç gününde lökaferez işleminden 2 saat önce yapıldı. İlk lökaferez sonucunda yeterli CD34+ hücre elde edilemeyen donörlere ertesi sabah aynı şekilde G-CSF verildi.

Tablo 3: Donörlerin ve hastaların özellikleri

Donör seks/yaş	Hasta seks/yaş	Tanı	Hastalık Statüsü	GVHH proflaksisi	Hazırlama rejimi
E/28	E/36	ANLL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
K/44	K/40	ANLL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
E/28	K/32	KML	1. KF	CsA+MTX	Bu+CY2
E/36	K/40	KML	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
E/30	E/34	KML	1. KF	CsA+MTX	Bu+CY2
K/27	K/17	MM	Plato faz	CsA+MTX	Bu+CY2
K/24	K/26	ALL	3. relaps	CsA	CVB
E/22	K/24	ANLL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
K/45	E/43	ANLL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
E/28	E/33	KML	1. KF	CsA+MTX	Bu+CY2
K/42	E/36	KML	1. KF	CsA+MTX	Bu+CY2
K/37	E/34	ANLL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
K/30	K/27	ALL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
E/32	E/25	ANLL	TR1	CsA+MTX	Bu+CY2
K/25	E/34	KML	1. KF	CsA+MTX	Bu+CY2

KF: kronik faz

CBV: siklofosfamid+BCNU+etoposid

TR1: 1. tam remisyon

CsA+MTX: Siklosporin + metotreksat

Bu+CY2: Busulfan + Siklofosfamid

Lökaferez: Beşinci gün G-CSF uygulamasından 2 saat sonra donörlere periferik kök hücrelerin toplanması amacıyla lökaferez işlemi uygulandı. Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, Hemaferesis Ünitesinde devamlı akım sağlayan Cobe Spectra, (COBE BCT, Inc, Lakewood, CO.) veya Fenwall CS 3000 (Baxter Healthcare Systems, Deerfield, IL) aferez cihazları ile periferik kök hücre toplama işlemleri yapıldı. Bu işlem için donörlerden hiçbirinde santral kateter gerekli olmadı ve işlem periferik venöz damarlar kullanılarak gerçekleştirildi. Her seansta donörlerin total kan hacimlerinin yaklaşık 2 - 2.5 katı kanları işleminden geçirildi. Toplanan ürünlerden lökosit sayımı, mononükleer hücre sayımı, CD34+ hücre sayımı yapıldı.

CD34+ hücre tayini: Lökaferez ürününden lökosit sayımı yapıldı. Elde edilen sonuca göre gerekli ise ürün sulandırılarak lökosit sayısının 30.000/ μ L olması sağlandı. Dilüsyon solüsyonu olarak kalsiyum ve magnezyum içermeyen %1 BSA kullanıldı. Üç ayrı tüpe 100 μ L ürün dağıtılıp üzerine 1. tübe CD45 FITC/CD14 PE, 2. tübe IgG1 FITC/IgG1 PE (izotipik kontrol), 3. tübe CD45 FITC / CD34 PE (Anti-HPCA-2, Clone 8G12) 20 μ L monoklonal antikor (Becton Dickinson) ilave edildi. Tüpler 20dk karanlıkta oda ısısında enkübe edilip üzerlerine 2ml lizis solüsyonu ilave edilerek 10dk daha bekletildi. Lizise uğramış eritrositleri uzaklaştırmak için tüpler 5dk 250xg'de santrifüj edilip süpernatant atıldı. Kalan pelet 2 kez FACSFlow (PBS) ile yıkanıp 5dk 250xg'de santrifüj edildi. Üzerine 0.5ml %1 paraformaldehit eklendikten sonra 24 saat içerisinde akım sitometresinde (FACSort, Becton Dickinson) 60.000 hücre/tüp sayıldı.

Sonuçların değerlendirilmesi: İlk tüpteki CD45'e karşı CD14, FSC'ye karşı SSC (Side Scatter) dot plotları çizilip, görülen dağılımlardan yararlanılarak mononükleer hücreleri içine alacak şekilde bir 'gate' tanımlandı. Diğer analizler bu gate içinde yapıldı. İzotipik kontrol tüpünden nonspesifik bir bağlanma olup olmadığı kontrol edildi ve eğer yok ise değerlendirmeye devam edildi. Üçüncü tüpte;

a) CD45+ ve CD34+ hücrelerin mononükleer hücreler içerisindeki yüzdesi hesaplandı (CD45/CD14 tübü yardımıyla analiz ettiğimiz gate içerisindeki kontamine hücrelerde tespit edilip, gerekli düzeltmeler yapıldı).

b) CD34- SSC dağılımına bakılarak da CD34+ hücre yüzdesi saptandı.

Bu şekilde üründeki mononükleer hücre içerisinde bulunan CD34+ hücre oranı tespit edilmiş oldu. Toplanan mononükleer hücre sayısı yardımı ile CD34+ hücre sayısı hesaplandı.

Adezyon moleküllerinin tayini: Donörlerden G-CSF verilmeden önce, G-CSF uygulamasının 3. gününde ve son G-CSF dozundan 24 saat sonra periferik kan örnekleri alındı ve 1 saat içerisinde 2500xg’de santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar porsiyonlara ayrılarak çalışma gününe kadar -20°C’de saklandı. Herbirinden 3 kez olmak üzere 15 donörden alınan toplam 45 serum örneği adezyon moleküllerinin çalışılacağı güne kadar (ortalama 6 ay) saklandı. Çalışma gününde her test ile ilgili serumlar çözülerek oda ısısına gelmeleri sağlandı. Deneye başlamadan önce tablo 4’de belirtildiği şekilde serumlar yöntem sulandırıcı kullanılarak dilue edildi.

Tablo 4: Serumların dilüsyon oranları

Deney	İlk Dilüsyon Oranı	Plaktaki son Dilüsyon
sICAM-1	1/1	x 10
sE-SELEKTİN	1/1	x 5
sL-SELEKTİN	1/100	x 200
sCD44	1/60	x 300

Kullanılan Reaktifler:

- 1) Spesifik monoklonal antikor ile kaplanmış mikrokuyucuklu plaklar
- 2) HRP (horse-reddish-peroxidaz) konjuge edilmiş spesifik monoklonal antikor (konsantre)
- 3) Standart (sCD44 sICAM-1 sL-Selectin sE-Selektin)
8 ng/ml 100 ng/ml 25 ng/ml 50 ng/ml
- 4) “Wash Buffer” Konsantresi (x 20) (% 1 Tweenzo içeren PBS)
- 5) “Yöntem Buffer” Konsantresi (x 20) (% 1 Tween 20 ve % 10 BSA içeren PBS)
- 6) Örnek Sulandırıcı (Tamponlanmış protein matrix)
- 7) Substrat Solüsyonu I (Tetramethyl Benzidine = TMB)
- 8) Substrat Solüsyonu II (% 0.02’lik tamponlanmış hidrojen peroksit)
- 9) Stop Sol. 4 normal sülfirik asit.

Reaktiflerin hazırlanması ;

1) Yıkama Tamponu: Konsantre “wash buffer”dan 50 ml alınarak deiyonize su ile hacim 1 litreye tamamlandı. Köpürtülmeden karıştırılıp pH’ın 7.4 olduğu kontrol edildi. Değil ise pH 7.4’e ayarlandı.

2) Yöntem Buffer; 0.5ml “yöntem buffer“ konsantresi 95ml deiyonize su ile dilüe edildi.

3) HRP Konjugat: Konsantre olarak bulunan HRP konjuge edilmiş antikor çalışılan deneye göre 1/100 veya 1/1000 kez dilüe edilerek kullanıldı.

TMB substrat solüsyonu: Metal içermeyen temiz bir pipet kullanarak eşit hacimlerde substrat I ve substrat II solüsyonunun karıştırılması ile hazırlandı ve hemen kullanıldı (en geç 5 dk içinde). Hazırlanması sırasında ışıkla temasından kaçınıldı.

Prensip: Testle kullanılan plakların yüzeyi anti sICAM-1’e spesifik bir monoklonal antikor ile kaplıdır.

Plaktaki kuyulara serum örnekleri veya standartlar dağıtıldığında bağlı bulunan antikor örneklerdeki sICAM-1’i absorbe eder. Ortama sICAM-1’e spesifik ve HRP ile konjuge edilmiş bir monoklonal antikor eklenir. Bu işaretli antikor daha önce plak yüzeyinde tutulmuş olan sICAM-1’e bağlanır. Bir enkübasyonu takiben yıkama yolu ile sICAM-1 bağlanmamış olan işaretli antikor ortamdaki uzaklaştırılır. Takiben tüm kuyulara HRP ile reaksiyonu girecek bir substrat eklenir (Tamponlanmış % 0.02’lik hidrojen peroksit içinde bulunan Tetrametil benzidin).

HRP ile substratın reaksiyonu sonucunda oluşan renkli ürünün miktarı örnekteki sICAM-1 düzeyleri ile orantılıdır. Reaksiyon, ortama asit eklenerek durdurulur ve plaktaki kuyuların absorbanları 450nm dalga boyunda okunur.

Kullanılan 5 sICAM-1 standardı yardımıyla bir grafik çizilerek örneklerin sICAM-1 konsantrasyonları tespit edilir.

Not: Tüm deneylerde prensip aynı olup, farklılık plağın kaplanmış olduğu spesifik monoklonal antikor ve ortama eklenen HRP konjuge edilmiş diğer bir spesifik monoklonal antikordan kaynaklanır.

Deney : (ICAM-1) (0-100 (x10) 129-298 ng/ml 230 ± 47.4 ng/ml)

Tüm reaktif ve serum örnekleri oda ısısına getirilip, köpürtülmeden karışmaları sağlandıktan sonra çalışma başlatılır. Anti sICAM-1 ile kaplı

mikrokuyucukların bulunduğu plak, yıkama solüsyonu ile yıkayıp kurumasına fırsat vermeden tüm kuyulara 200'er ml sICAM-1 standartı (100 ng/ml) dağıtıldıktan sonra sırası ile bir sonraki kuyuya 100ml aktarma yapıp beşinci kuyudan sonra 100ml dışarı atılarak standartın seri dilüsyonu (100 - 6.25 ng/ml) sağlanır. Diğer bir kuyuya da kan sayımında kullanılmak üzere 100ml örnek sulandırıcı koyulur. Örneklerin ölçüleceği kuyulara ise 90 ml örnek sulandırıcısını takiben 10ml serum örneği dağıtılarak örneğin 1/10 dilüsyonu sağlanmış olur.

Konsantre durumda bulunan HRP konjugate deney tamponu ile 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra her kuyuya 50ml dilue HRP konjugat dağıtılır. Plak kapatılarak oda ısısında, karanlıkta 15dk 100xrpm'e ayarlanmış bir karıştırıcıda enkübe edilir ve süre bitiminde tüm kuyulara 100 µl 4 N Sulfirik asit dağıtılarak enzimin inaktive edilmesiyle reaksiyonun durdurulması sağlanır. Asit eklenmesini takiben kuyuların 450 nm ve 620 nm (referans dalga boyu olarak)'deki absorbansları ölçülür. Ölçüm sırasında kör kuyusuna göre "O" ayarı yapılarak diğer kuyuların verdiği absorbans değerlendirilir.

Duplike olarak çalışılan standartların verdiği absorbans sICAM-1 değerlerine karşı grafiğe geçirilerek en uygun eğri çizilir ve bu eğriden yararlanılarak absorbanslı bilinen örneklerin sICAM-1 miktarları hesaplanır ve dilüsyon faktörü olan 10 ile çarpılarak gerçek sICAM-1 değerlerine ulaşılır.

Deneyin yapılması: Reaktifler ve serumlar oda ısısına getirilerek köpürtülmeden karışmaları sağlandı.

sE-Selektin'e spesifik monoklonal bir antikorla kaplı olan mikrokuyucukların bulunduğu plak 2 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra kurumasına fırsat vermeden standartların çalışılacağı kuyulardan ilki hariç diğerlerine 100'er µl örnek sulandırıcı dağıtıldı. İlk kuyuya 200 µl sE-Selektin standartı (50 ng/ml) eklenip, buradan başlayarak seri olarak ve bir kuyudan diğerine 100µl standart solüsyonu aktararak 1.6 ng/ml standarta kadar dilüsyon sağlandı (6. Standart) " 0 " ayarında kullanılacak kör kuyusuna örnek yerine 100µl örnek sulandırıcı koyulmasını takiben kalan kuyulara 80 µl örnek sulandırıcı ve 20 µl serum örneği pipetlendi. Konsantre halde bulunan HRP ile konjuge edilmiş antikor yöntem sulandırıcı ile 100 kez sulandırıldıktan sonra tüm kuyulara 50 µl dilue

edilmiş HRP konjugat dağıtıldı ve plak kapatılarak 2 saat oda ısısında enkübe edildi. Süre bitiminde kuyucukların içi boşaltılarak, üç kez yıkama tamponu ile yıkandı ve kısa süre önce hazırlanmış (deterjanlı PBS Ph 7) olan TMB substrat solüsyonundan tüm kuyulara 100µl dağıtıldı. Plak 15dk oda ısısında karanlıkta enkübe edildikten sonra, ortama 100µl 4 N sülfirik asit ekleyerek reaksiyon durduruldu ve kör kuyusu ile “0” ayarı yapılmasını takiben tüm kuyuların 450 ve 620nm’de verdikleri absorbans ölçüldü (multiskan multisof type 349, menarini).

X eksenine standart sE-Selektin konsantrasyonları (1.6-50 ng/ml), Y eksenine de son absorbanslar işaretlenerek en uygun eğri çizildi ve absorbansları bilinen örneklerin sE-Selektin’e konsantrasyonları bu eğri yardımı ile hesaplandı. Bulunan değerler, 5 olan dilüsyon faktörü ile çarpılarak gerçek sonuca ulaşıldı.

Reaktif ve örnekler oda ısısına getirilip, köpürtülmeden karıştırıldı. Serumlar yöntem tamponu (assay buffer) kullanılarak 1/100 oranında dilue edildi (10 µl örnek + 990 µl yöntem buffer). sL-Selectine’e spesifik, murin orijinli bir monoklonal antikorla kaplanmış olan mikrokuyucukların bulunduğu plak 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Fazla sıvısı alındıktan sonra kurumasına fırsat vermeden standart ve örneklerin pipetlemesine geçildi. İlki hariç tüm standart kuyularına 100 µl yöntem sulandırıcı dağıtılıp ilk kuyuya 25 ng/ml standarttan 200 µl pipetlendikten sonra bir kuyudan diğerine 100 µl aktarmak yoluyla yapılan seri dilüsyonlar 0.4 ng/ml standart elde edilerek sürdürüldü. “0” ölçümünde kullanılacak kuyulara 100 µl yöntem tamponu pipetlendi. Örnek dağıtılacak kuyulara ise 50µl yöntem sulandırıcı ve 50µl serum dağıtılarak serumlar toplam 200 kez dilue edilmiş oldu. HRP ile konjuge edilmiş anti-sL-Selektin antikor 100 kez dilue edilerek tüm kuyulara 50 µl konjugat dağıtıldı. Plak kapatılarak oda ısısında 100 rpm’lik bir karıştırıcıda 2 saat enkübe edildi. Süre bitiminde plak içindeki sıvı boşaltılıp kuyular 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı.

Taze hazırlanmış TMB substrat solüsyonundan tüm kuyulara 100µl dağıtılıp plak 15dk, 100 rpm’lik bir karıştırıcıda, karanlıkta enkübe edildi. Reaksiyon kuyucuklara 100µl 4 N sülfirik asit eklenmesi ile durduruldu ve oluşan renk, 450nm ve 620 nm dalga boylarında yapılan absorbans ölçümleri ile değerlendirildi (referans dalga boyu) (multiskan, multi soft type 349,

menarini). Okuma sırasında kör kuyusuna göre cihaza “0” ayarı yapıldıktan sonra absorbands ölçümleri kaydedildi.

Kullanılan standartların sL-Selectin değerleri (ng/ml) x eksenine absorbands değerleri Y eksenine yerleştirildikten sonra en uygun grafik çizilerek test edilen serumların sL-Selectin miktarları grafik yardımı ile bulundu ve sonuçlar 200 ile çarpılarak gerçek sonuçlara ulaşıldı.

Sonuçlar örnek sulandırıcı ile 1/60 oranında (10 + 590 µl) dilue edildi. sCD44’e spesifik murine kaynaklı bir monoklonal antikora kaplanmış kuyucukların bulunduğu plak, 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Fazla sıvısı alınıp, kurummasına fırsat vermeden devam edildi.

Standart kuyularına 100 ml örnek sulandırıcı dağıtılmasını takiben ilk standart kuyusuna 100 ml sCD44 standardı (8 ng/ml) pipetlenip bir kuyudan diğerine 100 µl aktararak bir seri dilue standart hazırlandı. 0.12 ng/ml standardın bulunduğu son kuyudan 100µl solusyon dışarı atıldı.

“0” ölçümü yapılacak kör kuyusuna da 100 µl örnek sulandırıcı eklendi. Diğer kuyulara ise 80 ml örnek sulandırıcı sonrası 200ml 1/60 dilue serum örnekleri dağıtıldı. HRP ile konjuge edilmiş anti sCD44 antikoru 1000 kez dilue edilerek tüm kuyulara 50ml konjugat pipetlendi.

Plağın üstü kapatılarak oda ısısında, dakikada 100 devir yapan bir karıştırıcıda 3 saat enkübe edildi. Süre bitiminde kuyular boşaltılıp, plak 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Tüm kuyulara taze hazırlanmış Substrat solusyonundan 100’er µl dağıtıldı ve plak tekrar oda ısısında, dakikada 100 devir yapan bir karıştırıcıda, karanlıkta, 15 dk süreyle enkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüm kuyulara 10 µl 4 N sulfirik asit dağıtılarak reaksiyonun durması sağlandı. Kör kuyusu ile “0” ayarının yapılmasını takiben tüm kuyuların 450 nm ve 620 nm (referans) dalga boylarında verdiği absorbands kaydedildi. Bulunan değerler dilüsyon faktörü olan 300 ile çarpılarak gerçek değerlere ulaşıldı.

Engrafman zamanı: Hastalara posttransplant dönemde G-CSF kullanılmadı. Granülosit sayısının birbirini takip eden 3 gün $>0.5 \times 10^9/L$ olması granülosit engrafmanı olarak kabul edildi. Trombositlerin ise

transfüzyon desteksiz olarak $>20 \times 10^9/L$ düzeyine ulaşması trombosit engrafmanı olarak değerlendirildi.

İstatistiki analiz: Adezyon moleküllerinin G-CSF öncesi, G-CSF sırasında ve G-CSF sonrası ölçülen serum seviyelerindeki değişiklikler varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. Bu hesaplamalarda verilerin normal dağıldığı ve eşit varyanslı olduğu varsayımı uygulanarak karşılaştırma yapıldı. İkili karşılaştırmalarda ise iki örnek t-testi uygulandı. Standart sapmaların farklı olmasından dolayı pooled t test kullanılmadı. p değerinin 0.05'den küçük bulunması ise anlamlı olarak değerlendirdi.



BULGULAR

Lökaferrezis: Onbeş donöre toplam 33 seans lökaferrezis uygulanmıştır. Median lökaferrez sayısı 2 (1 - 3)'dir. Donörlerden 4'ünde 3 seans lökaferrezis gerekmiş olup, bir donörde ise tek seans aferezis yeterli olmuştur (Tablo 5).

Toplanan mononükleer hücre (MNH) sayısı: Toplanan MNH sayısı median 7.7 (2.5 29.3) $\times 10^8/\text{kg}$ 'dır (Tablo 5).

Toplanan CD34+ hücre sayısı: Onbeş donörden elde edilen CD34+ hücre sayısı median 15.2 (0.8 - 88.0) $\times 10^6/\text{kg}$ 'dır. Her donörden elde edilen toplam CD34+ hücre sayıları tablo 5'de görülmektedir.

Engrafman zamanı: ALL'li hastalardan birinde engrafman olmadı. Bu hasta tüm grup içerisinde CD34+ hücre sayısı açısından en düşük değere sahip olan hastaydı. Hasta +32. gününde infeksiyon ile kaybedildi. Hastalardan ikisi ise erken dönem komplikasyonlarla kaybedildi. Bunlardan bir kadın hasta serebrovasküler olay ile +15. günde kaybedilirken, diğer bir erkek hasta ise +10. günde hemorajik sistit, venooklüziv hastalık ve akciğer infeksiyonu ile engrafman öncesinde kaybedildi. Geri kalan 11 hastada ise granülosit engrafmanı median 11 (10 - 18) günde, trombosit engrafmanı ise 12 (9 - 33) günde gerçekleşti.

CD34+ hücre sayısı ile engrafman zamanı ilişkisi: Erken dönemde kaybedilen hastalar hariç tutulduğunda hastalara verilen CD34+ hücre sayıları ile granülosit engrafman süreleri arasında ilişki tespit edildi ($p=0.022$). Buna karşın aynı ilişki trombosit toparlanma dönemi için bulunamadı ($p=0.248$). Granülosit ve trombosit toparlanma süreleri arasında da bir ilişki saptanmadı ($p=0.655$).

Adezyon molekülleri: Donörlerin G-CSF öncesi, G-CSF uygulamasının 3. gününde ve G-CSF'den 24 saat sonra ölçülen sICAM, sE-Selektin, sL-Selektin ve sCD44 değerleri tablo 6 ve Şekil 2-5'de verilmiştir. Sonuçlar ng/ml olarak ifade edilmiştir. Tablo 6'da ayrıca herbir dönemdeki solubl adezyon molekülleri düzeyleri, ortalama düzeyleri, standart sapmaları ve %95 güvenilirlik sınırları gösterilmiştir.

sICAM düzeyleri: Hastaların serum sICAM düzeyleri G-CSF uygulanması ile birlikte artış göstermişse de istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.722$) (Tablo 6 ve 7)(Şekil 2). Aynı şekilde G-CSF öncesi ve G-CSF sırasındaki serum seviyeleri ile G-CSF sonrasındaki değerler ayrı ayrı karşılaştırıldıklarında da ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.810$, $p=0.520$, $p=0.470$).

sE-Selektin düzeyleri: G-CSF uygulaması ile birlikte sE-Selektin düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir ($p=0.0001$) (Tablo 6 ve 7) (Şekil 3). G-CSF verilmesi öncesi ile G-CSF uygulaması sırasındaki ve G-CSF sonrası serum sE-Selektin düzeylerinde belirgin artış kaydedilmiş iken ($p=0.004$, $p=0.0001$), G-CSF sırasında ve G-CSF sonrası değerler karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p=0.150$).

sL-Selektin düzeyleri: sE-Selektin düzeyleri için saptanan profilin benzeri sL-Selektin düzeyleri içinde bulunmuştur. G-CSF uygulaması ile birlikte serum sL-Selektin düzeylerinde artış tespit edilmiştir ($p=0.002$)(Tablo 6 ve 7) (Şekil 4). Buna karşın G-CSF öncesi ile karşılaştırıldığında G-CSF uygulaması sırasındaki ve G-CSF sonrası serum sL-Selektin düzeylerinde belirgin artış kaydedilmiş iken ($p=0.004$, $p=0.001$), G-CSF sırasında ve G-CSF sonrası değerler arasında anlamlı farklılık yoktur ($p=0.087$).

sCD44 düzeyleri: Serum sICAM düzeyleri için saptanan veriler sCD44 içinde benzer şekilde bulunmuştur. G-CSF uygulaması ile birlikte sCD44 seviyelerinde artış kaydedilmekle birlikte istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.321$)(Tablo 6 ve 7)(Şekil 5). Her dönemdeki sCD44 seviyeleri ayrı ayrı karşılaştırıldıklarında da anlamlı ilişki gözlenmemiştir ($p=0.20$, $p=0.16$ ve $p=0.89$).

Adezyon molekülü düzeyleri ve engrafman ilişkisi: Çalışılan tüm solubl adezyon molekülleri ile granülosit ve trombosit engrafman zamanı arasında ilişkiler değerlendirilmiş ve sadece sICAM düzeyleri ile granülosit engrafmanı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p=0.011$). Başka bir deyişle G-CSF sonrası sICAM düzeyi artıkcça granülosit toparlanma zamanı kısalmıştır. sICAM düzeyleri ile trombosit toparlanma zamanı arasında ise bir ilişki gözlenmemiştir ($p=0.648$).

CD34+ hücreler ile adezyon molekülleri arasındaki ilişki: Donörlerden toplanan CD34+ hücre sayıları ile G-CSF uygulamasının 3. günündeki

solubl adezyon moleküllü düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bu karşılaştırmada sL-Selektin düzeyleri ile CD34+ hücre sayıları arasında sınırda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.062$). Buna karşın diğer solubl adezyonları ile CD34+ hücre sayıları arasında korelasyon bulunamamıştır.

Adezyon molekülleri arasındaki ilişki: Donörlere G-CSF verilmesinin 3. günündeki serum solubl adezyon moleküllü düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldıklarında da; sICAM düzeyleri ile sE-Selektin ($p=0.025$) ve sL-Selektin ($p=0.005$) düzeyleri arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Yine sE-Selektin ile sL-Selektin değerleri arasında korelasyon bulunmuştur ($p=0.0001$). Bunlara karşın sCD44 düzeyleri ile diğer adezyon molekülleri arasında ilişki bulunamamıştır ($p=0.714$, $p=0.910$, $p=0.163$).

Tablo 5: Verilen hücre dozları, GVHH ve engraftman günleri.

Hasta no.	Lökaferez sayısı	MNH $\times 10^6/\text{kg}$	CD34+ $\times 10^6/\text{kg}$	GVHH Akut	GVHH Kronik	MNS (gün) $>0.5 \times 10^9/\text{L}$	MNS(gün) $>1.0 \times 10^9/\text{L}$	PLT (gün) $>20 \times 10^9/\text{L}$	PLT (gün) $>50 \times 10^9/\text{L}$	kısa dönem sonuçlar
1*	2	5.2	9.0	--	--	--	--	--	--	10
2	2	29.3	85.7	Yok	Yok	10	11	9	14	25.12.1995
3	3	8.1	88.0	2	+	10	15	33	54	2.1.1996
4**	2	17.5	82.5	--	--	--	--	--	--	15
5	3	14.0	16.0	Yok	Yok	11	13	16	20	8.2.1996
6	2	11.0	15.2	--	--	--	--	--	--	7
7 #	3	12.5	20.6	2	Yok	12	14	15	16	295
8	2	7.7	56.0	3	Yok	10	11	10	11	2.5.1996
9	3	4.0	52.0	Yok	+	10	11	11	13	2.5.1996
10	1	3.9	5.0	Yok	Yok	14	15	12	13	27.5.1996
11	2	5.0	5.4	2	Yok	14	15	12	14	10.6.1996
12***	2	5.4	8.6	4	--	13	16	13	15	40
13&	2	2.5	0.8	--	--	--	--	--	--	32
14&&	2	8.9	4.3	--	--	12	15	11	13	43
15	2	7.5	7.4	Yok	Yok	18	21	14	18	2.12.1996

* +10. günde venooklusif hastalık ile kaybedildi.

** +15. günde serebrovasküler olay ile kaybedildi.

*** Evre IV akut GVHH ile kaybedildi.

& Engraftman yetmezliği ile kaybedildi.

&& Organik beyin sendromu ve pulmoner infeksiyon ile kaybedildi.

Hastalık nüksü ile kaybedildi.

Tablo 6: G-CSF etkisi altında serum adezyon molekülleri düzeyindeki değişiklikler.

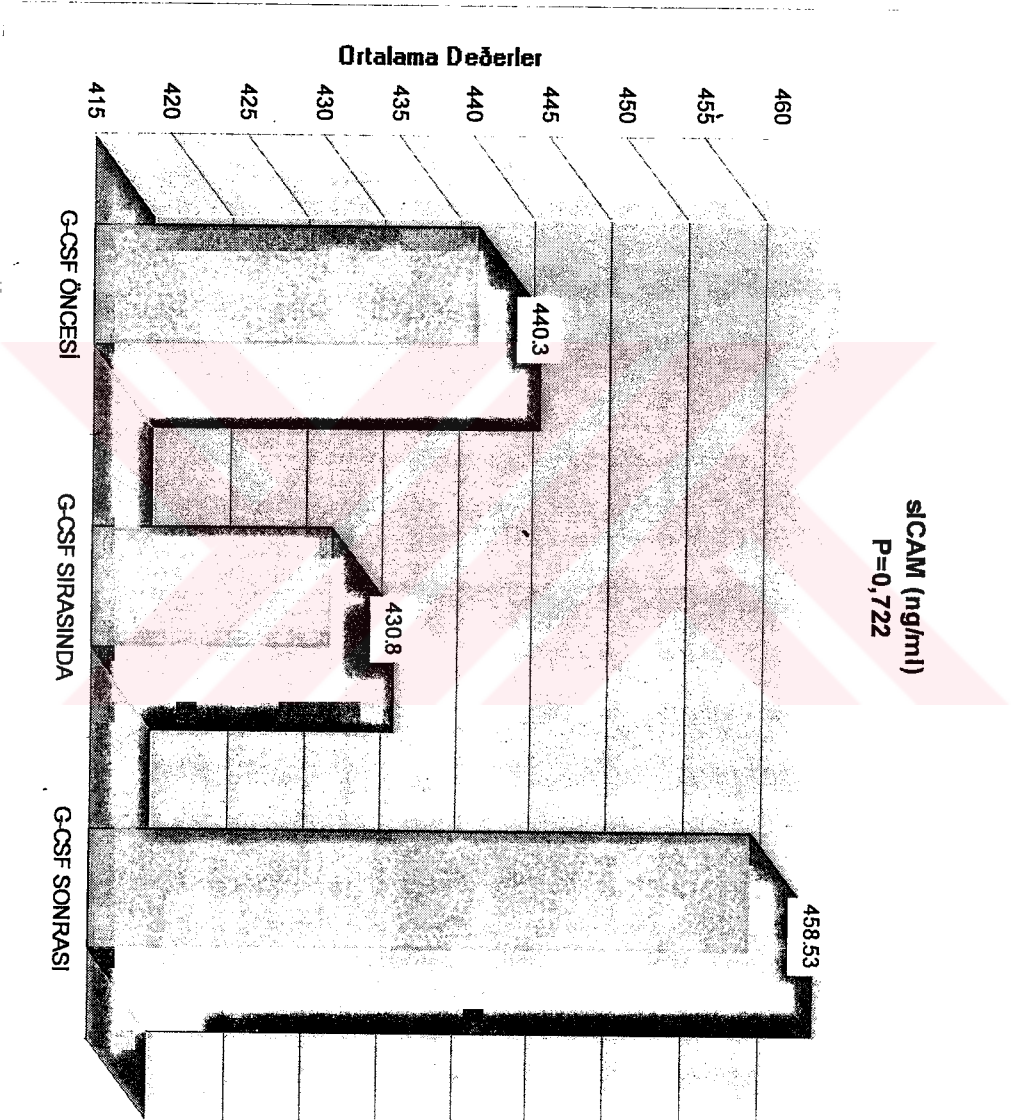
		sICAM (ng/ml)	sE-SELEKTİN (ng/ml)	sL-SELEKTİN (ng/ml)	CD44 (ng/ml)
G-CSF Öncesi	Ort.	440.30	61.52	652.80	42.94
	SS	79.40	28.70	217.20	60.78
	SH	20.50	7.41	56.10	15.70
	%95 CI	396.30-484.30	45.62-77.41	532.50-773.10	9.30-76.60
G-CSF Sırasında	Ort.	430.80	96.23	843.10	77.37
	SS	124.81	30.98	264.60	80.92
	SH	32.20	8.00	68.30	20.90
	%95 CI	361.70-499.90	79.07-113.39	696.50-989.70	32.50-122.20
G-CSF Sonrası	Ort.	458.53	110.60	1033.70	81.54
	SS	72.95	21.31	320.90	83.98
	SH	18.80	5.50	82.90	21.70
	%95 CI	418.10-498.90	98.76-122.37	856.00-1211.50	35.00-128.10

Tablo 7: G-CSF etkisi ile serum adezyon moleküllerindeki değişikliklerin istatistiki karşılaştırması

	$H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3$
sICAM	0.722
sE-SELEKTİN	0.0001
sL-SELEKTİN	0.002
sCD44	0.321

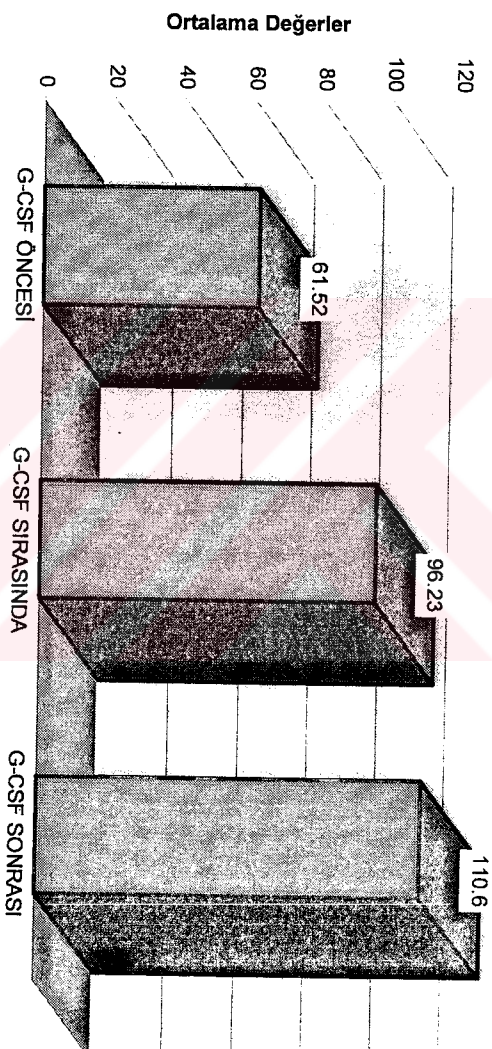
	$H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3$		
	$H_0: \mu_1=\mu_2$	$H_0: \mu_1=\mu_3$	$H_0: \mu_2=\mu_3$
sICAM	0.810	0.520	0.470
sE-SELEKTİN	0.004	0.000	0.150
sL-SELEKTİN	0.004	0.001	0.087
sCD44	0.200	0.160	0.890

μ_1 = G-CSF Öncesi ortalama
 μ_2 = G-CSF Sırasında ortalama
 μ_3 = G-CSF Sonrası ortalama

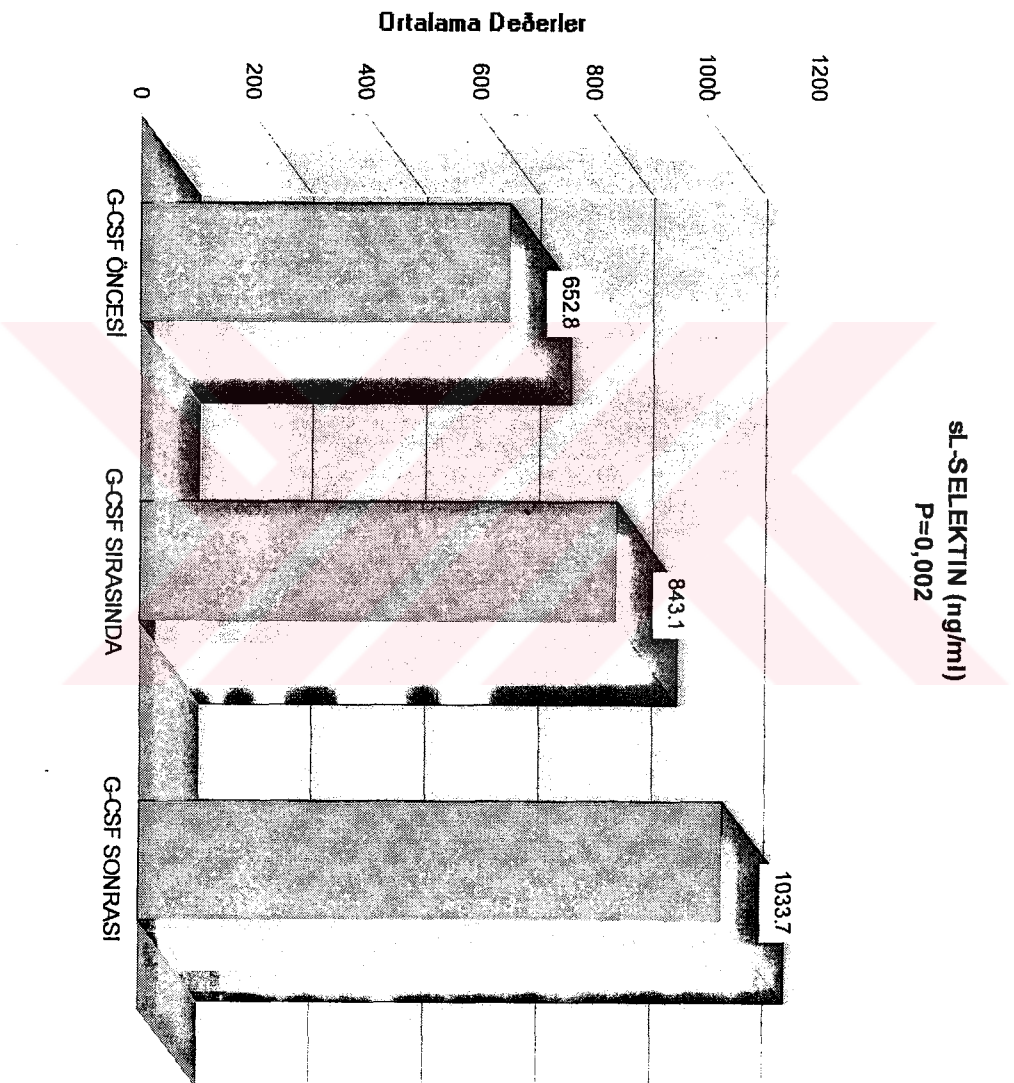


Şekil 2: G-CSF uygulaması ile sICAM düzeyindeki değişiklik

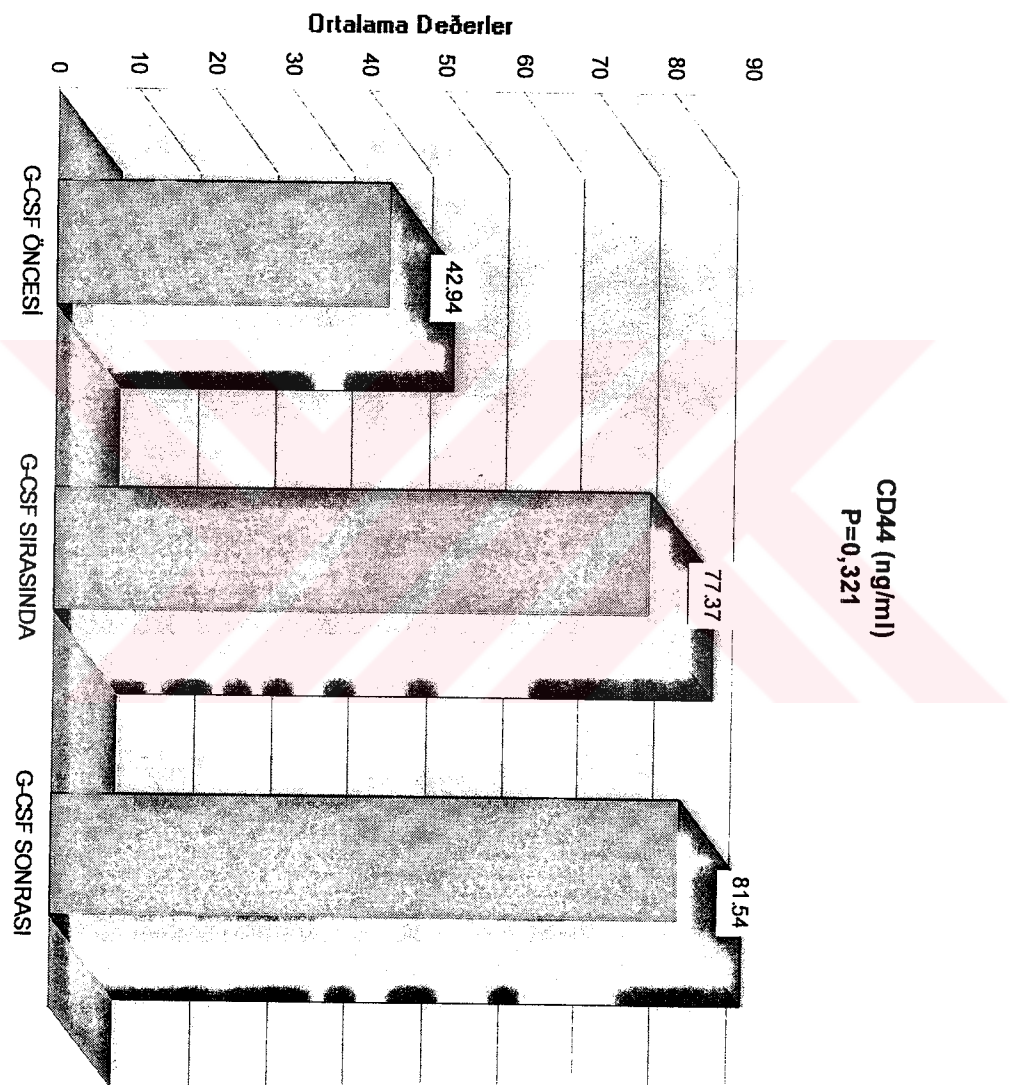
SE-SELEKTİN (ng/ml)
P=0,0001



Şekil 3: G-CSF uygulaması ile SE-SELEKTİN düzeyindeki değişiklik



Şekil 4: G-CSF uygulaması ile sl-SELEKTİN düzeyindeki değişiklik



Şekil 5: G-CSF uygulaması ile sCD44 düzeyindeki değişiklik

TARTIŞMA

Hematopoetik kök hücreleri üzerinde çeşitli adezyon moleküllerinin bulunduğu daha önce çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olup bu moleküllerden en önemlileri integrin ailesinden LFA-1, VLA-4, immunglobulin süper ailesinden ICAM-1, CD44 ve selektin ailesidir (42,43). Bu moleküller yardımı ile kök hücrelerinin kemik iliğindeki stromaya tutundukları gösterilmiştir. İn vitro ortamların yaratılmasındaki çeşitli zorluklar nedeniyle kök hücrelerinde eksprese olduğu bilinen bu adezyon molekülleri ile ilgili çalışmalar kolay yapılamamaktadır. Bu zorluklardan ilki bu hücrelerin kemik iliğinde oldukça az miktarda olmasıdır. İkincisi ise bu çalışmalarda stromal hücreler yerine mezanşimal hücreler kullanılması nedeniyle sonuçların yorumlanmasında karşılaşılan güçlüklerdir.

Hematopoetik büyüme faktörlerinden G-CSF'nin adezyon molekülleri üzerine olan etkilerini ortaya koyan in vitro çalışmaların zorlukları nedeniyle, gönüllü allogeneik periferik kök hücre vericilerinde G-CSF'nin adezyon moleküllerinden ICAM-1, L-Selektin ve CD44'ün solubl formları ile olan ilişkileri değerlendirildi. Her ne kadar daha önceki çalışmalarda E-Selektinin hematopoetik kök hücreleri üzerinde eksprese olmadığı gösterilmişse de kemik iliğinde stromal hücrelerde bulunduğu ait verilerin olduğu bilinen E-Selektin de G-CSF'ye olan yanıtı, diğer bir anlamda stromal hücrelerin G-CSF'ye olan yanıtını gösterebilmek amacıyla çalışma paneline dahil edildi.

Hematopoetik kök hücreler üzerinde bulunan adezyon molekülleri çift işaretleme yöntemi ile doğrudan gösterilebilmektedir. Biz çalışmamızda plazmada bulunan solubl formlarının düzeylerini izleyerek dolaylı olarak değerlendirdik. Bu moleküllerin solubl formlarının değerlendirilmesi kolay ve pratik bir yöntemdir. Bu amaçla G-CSF öncesi, G-CSF sırasında ve G-CSF sonrası; donörlerin sICAM, sE-Selektin, sL-Selektin ve sCD44 düzeyleri takip edilmiştir.

Yapılan değerlendirmede G-CSF sonrası donörlerde serum sICAM, sE-Selektin, sL-Selektin ve sCD44 seviyelerinde bazal düzeylerine göre artış tespit edilmiştir. Bu artış sICAM ve sCD44 düzeyleri için istatistiki olarak anlamlı bulunmazken (Tablo 6 ve 7) (Şekil 2 ve 5), sL-Selektin ve sE-

Selektin düzeyleri için ileri derecede anlamlı bulunmuştur (Tablo 6 ve 7) (Şekil 3 ve 4).

G-CSF uygulamasının 3. gününde değerlendirilen solubl adezyon molekülü düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldıklarında da sCD44 dışında aralarında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. sICAM düzeyleri ile sE-Selektin ($p=0.025$) ve sL-Selektin ($p=0.005$) düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Yine sE-Selektin ile sL-Selektin değerleri arasında korelasyon saptanmıştır ($p=0.0001$). Bu veriler adı geçen solubl adezyon moleküllerinin G-CSF uygulaması sırasında arttığının dolaylı bir göstergesidir.

Allogeneik kök hücre vericilerinde daha önce yapılan çalışmalarda G-CSF sonrası donörlerin periferik kanlarında hematopoetik kök hücre sayılarının arttığı gösterilmiştir. Mobilizasyon işlemi sırasında kök hücreler önce ilişki içinde oldukları stromal hücrelerden ayrılmakta ve sonrasında kan damarları ile temasa geçip ekstrasvazasyonu gerçekleştirmeye çalışmaktadırlar. Ancak bu sistemin nasıl çalıştığı bugün tam olarak bilinmemektedir. Bir hipoteze göre sitokinler progenitör hücreler üzerindeki bazı integrinlerin (VLA-4, VLA-5, LFA-1 ve LFA-3) ekspresyonlarında azalmaya neden olmakta ve sonuçta bu hücrelerin periferik dökülmektedir. Bunun yanında c-kit ekspresyonunda da azalma olmaktadır (59). Sitokinlerden özellikle G-CSF'nin sadece bu moleküllerde ekspresyonunu azaltarak progenitör hücreleri mobilize ettiği hipotezi yeterli değildir. Anti-VLA-4 antikoru ile birlikte G-CSF kullanılan donörlerin periferik kanlarında da 4-10 kat kök hücre artışı gözlenmiştir.

Bir diğer varsayıma göre, G-CSF ile uyarılan kök hücrelerinde ekspresyonları artan adezyon molekülleri plazmaya dökülmekte ve bu solubl formlar yüzeydeki molekülün aracı olduğu adezyon fonksiyonunu inhibe ederek kök hücrelerinin periferik çıkışına neden olabilmektedir. Bizim çalışmamızda da G-CSF etkisi altında tüm solubl adezyon moleküllerinin artış göstermesi ile birlikte periferik kök hücre sayılarının artmış olması bu hipotezi destekler niteliktedir. Yukarıda sayılan mekanizmalar nedeniyle sitokinlerin tek bir yoldan çok birçok adezyon molekülünü etkileyerek bu işlemi yaptıkları düşünülmektedir.

Sitokinler içerisinde G-CSF'den başka GM-CSF, IL-3, steel faktör, PIXY 321, IL-7, IL-8 klonojenik kök hücrelerinin perifere mobilize olmasına neden olurlar (56,57).

Kök hücre işaretleyicisi olarak kullanılan CD34+ hücre sayıları ile G-CSF dozu arasında da bir korelasyon olduğu gösterilmiş ve 10µg/kg/gün dozunda G-CSF kullanımı ile periferik kana yeterli CD34+ hücre popülasyonu mobilize edilebildiği belirtilmiştir. Mobilize edilen bu CD34+ hücrelerinin 1-2 seanslık lökaferez uygulamaları ile toplandıklarında allogeneik alıcılarda yeterli hematolojik toparlanma sağlayabildiği bilinmektedir. Ancak bugün için kesin olmayan hematolojik toparlanmayı sağlayacak olan minimum CD34+ hücre sayısıdır. Bu nedenle çeşitli merkezlerde toplanması hedeflenen CD34+ hücre sayıları $2-16 \times 10^6/\text{kg}$ arasında değişmektedir. Bizim çalışmamızda da onbeş donöre toplam 33 seans lökaferezis uygulanmış olup median lökaferez sayısı 2 (1 - 3)'dir. Onbeş donörden elde edilen CD34+ hücre sayısı ise median 15.2 (0.8 - 88.0) $\times 10^6/\text{kg}$ 'dır. Bu median CD34+ hücre sayısı literatürde her hasta için toplanması önerilen CD34+ hücre sayıları için önerilen tavan değerdir. ALL'li hastamız hariç, değerlendirilebilen diğer hastalarımızın hiçbirinde engrafman yetmezliği görülmemiştir. Engrafman yetmezliği ile kaybedilen ALL'li hastamız ise grup içerisinde en düşük CD34+ hücre içeriğini alan hastamızdır.

Alıcılara verilen CD34+ hücre sayıları ile engrafman dönemi arasında ilişki olduğu gerek otolog ve gerekse allogeneik transplantasyonlarda gösterilmiştir. Artan CD34+ hücre sayılarının engrafman dönemini kısalttığı belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda bu açıdan değerlendirilebilen 11 hastada granülosit engrafmanı median 11 (10 - 18) günde, trombosit engrafmanı ise 12 (9 - 33) günde gerçekleşmiştir. Bu hastalara infüze edilen CD34+ hücre sayıları ile granülosit engrafman sayıları arasında korelasyon tespit edilmiştir. ($p=0.022$). Buna karşın aynı ilişki trombosit toparlanma dönemi için bulunamamıştır ($p=0.248$).

G-CSF ile uyarılma sonrası periferdeki CD34+ hücrelerdeki artışın alıcılarda hematolojik toparlanma süresini kısaltması nedeniyle, donörlerdeki solubl adezyon molekülü düzeylerinin engrafman ile ilişkisi de bu çalışmada değerlendirilmiştir. Çalışılan tüm solubl adezyon molekülleri ile granülosit ve trombosit engrafman zamanları arasında ilişki araştırılmış ve sadece sICAM düzeyleri ile granülosit engrafmanı arasında anlamlı bir

ilişki tespit edilmiştir ($p=0.011$). Başka bir deyişle G-CSF sonrası sICAM düzeyi artıkça granülosit toparlanma zamanı kısalmıştır. sICAM düzeyleri ile trombosit toparlanma zamanı arasında ise bir ilişki gözlenmemiştir ($p=0.648$).

Daha önceki çalışmalarda kök hücre transplantasyonu sırasında verilen adezyon molekülleri düzeyleri ile hematolojik toparlanma açısından yapılan çalışmalarda sadece L-Selektin düzeyleri anlamlı bulunmuştur. L-selektin özellikle CD34+/lin- hücreler üzerinde eksprese olmaktadır (31). Hücre yüzeyindeki L-selektin ekspresyonu ile hücrelerin klonojenik potansiyelleri arasında korelasyon olduğu gösteren çok sayıda çalışma vardır (51). Dercksen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada CD34+ hücrelerde (CD44, integrinler ve L-Selektin bulunan adezyon molekülleri panelinden) sadece CD34+/L-Selektin+ hücrelerin trombosit engraftmanı ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır (48). Bu ilişki sadece CD34+ hücrelerle olan ilişkiden daha anlamlı düzeyde bulunmuştur. Granülosit toparlanma zamanı ile olan değerlendirmede ise tek başına CD34+ hücrelerle olandan daha sıkı korelasyon saptanmış olmakla beraber bu ilişki trombositlerde olduğu gibi anlamlı düzeye ulaşamamıştır. Aynı çalışmada hızlı trombosit toparlanması sağlayabilmek için gerekli olan CD34+/L-Selektin+ hücre miktarı $2.1 \times 10^6/\text{kg}$ olarak verilmiştir.

Literatürde L-selektin için saptanan bu verilere karşılık diğer adezyon moleküllerinden PECAM-1, CD44, VLA-4, VLA-5 ve LFA-1 için bu tür bir ilişki gösterilememiştir (46). Bu veriler, L-selektin pozitif hücrelerin yüksek proliferatif kapasiteleri olduğunu kanıtlamaktadır.

Bizim çalışmamızda da donörlerden toplanan CD34+ hücre sayıları ile G-CSF uygulamasının 3. günündeki solubl adezyon moleküllerinin düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada sL-Selektin düzeyleri ile CD34+ hücre sayıları arasında sınırda anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p=0.062$). Buna karşın diğer solubl adezyon molekülleri ile CD34+ hücre sayıları arasında korelasyon bulunamamıştır. Buna karşılık sICAM düzeyleri ile granülosit toparlanma zamanı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Literatürde bu ilişkiyi gösteren başka bir çalışma yoktur.

Sonuç olarak bu çalışmada G-CSF etkisi altında solubl adezyon moleküllerinde artış saptanmıştır. Artış saptanan bu solubl adezyon moleküllerinden sL-Selektin düzeyleri ile CD34+ hücre sayıları arasında korelasyon saptanmıştır. Hastalarda engraftmanı etkileyen faktörler

incelendiğinde CD34+ hücre miktarı ile granülosit toparlanması arasında ilişki tespit edilmiştir.

Biz bu çalışmada G-CSF'nin sağlıklı vericilerde kullanımı ile solubl adezyon moleküllerinin kandaki miktarında değişik derecelerde artışlar olduğunu ortaya koyduk. En önemli artış selektinlerde izlendi. Selektinlerin organizmada genel dağılımı göz önüne alınırsa; bu artışın tek bir hücre grubundan kaynaklanmadığı anlaşılabılır. Çok basamaklı bir işlem olan perifere kök hücre mobilizasyonunda selektinler olaya en çok katkıda bulunan grup olabilirler. L-Selektin ile CD34+ hücre miktarı arasında bulduğumuz ilişki bunun bir kanıtıdır. Başarılı bir engrafman için CD34+ hücre miktarının önemi bilinmektedir. Bu durumda hızlı bir engrafman için selektin aktivasyonu temel görünmektedir. Çalışmamızdaki bir diğer yeni ve önemli bulgu olan sICAM ile granülosit toparlanması arasındaki lineer ilişki adezyon moleküllerinin etkili olduğu bir diğer basamağı aydınlatıyor olabilir." Bu alandaki bilgilerimizin artmasıyla, belki de adezyon moleküllerinin ayrı ayrı (selektif) uyarılmaları ve yönlendirilmeleri engrafman olayına klinik olarak yeni yaklaşımlar sağlayabilecektir.

ÖZET

Bu çalışmada G-CSF ile kemik ilikleri uyarılan sağlıklı hematopoetik kök hücre vericilerinin serum solubl adezyon molekül seviyelerindeki değişiklikler gözlemlendi. Bu moleküllerin birbirleri ile olan ilişkileri ve adezyon molekülü seviyelerindeki değişikliklerle allogeneik transplantasyon uygulanan hastalardaki granülosit ve trombosit toparlanma süreleri arasında ilişkili olup olmadığı değerlendirildi.

Ocak 1996 - Mart 1997 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi, İbni Sina Hastanesi, Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı, Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde hematolojik maligniteleri nedeniyle allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu planlanan 15 hastanın sağlıklı donörleri çalışma grubunu oluşturdu. Bu sağlıklı allogeneik periferik kök hücre vericilerine 10µ/kg/günde tek doz s.c. x 5 gün G-CSF verildi ve G-CSF öncesi, G-CSF alırken 3. günde ve G-CSF'nin kesilmesinden 24 saat sonra sICAM-1, sE-Selektin, sL-Selektin ve sCD44 seviyeleri ölçüldü. Solubl adezyon moleküllerinin serum seviyelerinin ölçümü için ticari elisa kiti kullanıldı (Bender Med, Austria). Donörler transplantasyon uygulanacak hastaların HLA-identik kardeşleriydi. Donörlerin yaşı median 30 (22 - 45)'du. Bunlardan 8'i kadın, 7'si erkekti.

Onbeş donöre toplam 33 seans lökaferezis uygulandı. Median lökaferez sayısı 2 (1 - 3) idi. Bu donörlerden elde edilen CD34+ hücre sayısı median 15.2 (0.8 - 88.0) x 10e6/kg idi. Hastalarda granülosit engraftmanı median 11 (10 - 18) günde, trombosit engraftmanı ise 12 (9 - 33) günde gerçekleşti. Hastalara verilen CD34+ hücre sayıları ile granülosit engraftman sayıları arasında pozitif korelasyon tespit edildi (p=0.022). Buna karşın aynı ilişki trombosit toparlanma dönemi için bulunamadı (p=0.248).

Yapılan değerlendirmede G-CSF sonrası donörlerde serum sICAM, sE-Selektin, sL-Selektin ve sCD44 seviyelerinde bazal düzeylerine göre artış tespit edildi. Bu artış sICAM ve sCD44 düzeyleri için istatistiki olarak anlamlı bulunmazken (p=0.722 ve p=0.321), sE-Selektin ve sL-Selektin düzeyleri için ileri derecede anlamlı bulundu (p=0.0001 ve p=0.002). sICAM düzeyleri ile sE-Selektin (p=0.025) ve sL-Selektin (p=0.005) düzeyleri arasında da anlamlı ilişki tespit edildi. Yine sE-Selektin ile sL-Selektin değerleri arasında da korelasyon bulundu (p=0.0001).

Artış saptanan bu solubl adezyon moleküllerinden sL-Selektin düzeyleri ile CD34+ hücre sayıları arasında da korelasyon saptandı. Solubl adezyon molekülleri ile hastalardaki engrafman zamanları arasında yapılan değerlendirmede ise sICAM düzeyleri ile granülosit ve sL-Selektin düzeyleri ile trombosit engrafmanı arasında ilişki tespit edildi.



KAYNAKLAR

1. To LB, Roberts MM, Haylock DN, Dyson PG, Branford AL, Thorp D, Ho JQK, Dart GW, Horvath N, Davy MLJ, Olweny CLM, Abdi E, Juttner CA. Comparison of hematological recovery times and supportive therapy requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 9:277-284, 1992.
2. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 339(8794):640-644, 1992.
3. Molineux G, Pojda Z, Hamson I. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by colony-stimulating factor *Blood* 76; 2153-2158 1990.
4. Gratwohl A, Baldomero H, John L, Gimmi C, Pless M, Tichelli A, Nissen C, Filipowicz A, Speck B. Transplantation of G-CSF mobilized allogeneic peripheral blood stem cells in rabbits. *Bone Marrow Transplant* 16(1):63-8, 1995.
5. Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet* 341,1482, 1993.
6. Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Löffler H, Schmitz N, Schroyens W. Allogeneic granulocyte colony stimulating factor mobilised peripheral blood stem cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation. *Blood* 81: 1404-1409, 1993.
7. Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, Landmark JD, Dooley DC, Law P, Coccia PF, Warkentin PI, Weisenburger DD, Armitage JO. Allogeneic transplantation of blood derived, Tcell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 4: 643-646, 1989.

8. Weaver CH, Buckner CD, Longin K, Appelbaum FR, Rowley S, Lilleby K, Miser J, Storb R, Hansen JA, Bensinger W. Syngeneic transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 82(7):1981-1984, 1993.
9. Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Löffler, Hunter A, Russell NH. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by Filgrastim (G-CSF). *Blood* 85;1666-1672, 1995.
10. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, Storb R, Buckner CD. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 85(6):1655-1658, 1995.
11. Russell JA, Luider J, Weaver M, Brown C, Selinger S, Railton C, Karlsson L, Klassen J. Collection of progenitor cells for allogeneic transplantation from peripheral blood of normal donors. *Bone Marrow Transplantation* 15(1):111-115, 1995.
12. H. Koç, G. Gürman, Ö. Arslan, M. Özcan, H. Akan, O. İlhan, N. Konuk, M. Beksaç, A. Uysal. Is there an increased risk of graft versus host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 88;2362-2364, 1996.
13. Korbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts *Blood* 85(6):1659-1665, 1995.
14. Urbano-Ispizua A, Solana C, Brunet S, Hernandez F, Sanz G, Alegre A, Petit J, Besalduch J, Vivancos P, Diaz MA, Moraleda JM, Carreras E, Ojeda E, de la Rubia J, Benet I, Domingo-Albos A, Garcia-Conde J, Rozman C. Allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: analysis of short term engraftment and acute GVHD incidence in 33 cases. *Bone Marrow Transplant* 18; 35-40 1996.

15. Grigg PA, Roberts AW, Rounow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony -stimulating factor) for mobilisation and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86;4437-4443, 1995.
16. Höglund M, Smédmyr B, Simonsson B, Tötterman T, Bengtsson M. Dose dependent mobilisation of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers receiving glycosylated rHuG-CSF. *Bone Marrow Transplant* 18; 19-27. 1996.
17. Anderlini P, Przepiorka D, Huh Y, Lauppe J, Miller P, Sundberg J, Seong D, Champlin R, Korbling M. Duration of filgrastim mobilization and apheresis yield of CD34+ progenitor cells and lymphoid subsets in normal donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 93(4):940-942, 1996.
18. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, Jacobs S, Suttorp M, Löffler H, Müller-Ruchholtz W, Schmitz N. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br J Haematol* 87(3):609-13, 1994.
19. Bensinger WI, Clift RA, Anasetti C, Applebaum FA, Demirer T, Rowley S, Sandmaier BM, Torok-Storb B, Storb R, Buckner D. Transplantation of allogeneic peripheral stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Stem Cells* 14:90-95, 1996.
20. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:11-25, 1990.
21. Koenigsmann M, Griffin JD, DiCarlo J, Cannistra SA. Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood* 79(3):657-665, 1992.
22. Gordon MY, Hibbin JA, Dowding C, Gordon-Smith EC, Goldman JM.. Separation of human blast progenitors from granulocytic, erythroid, megakaryocytic, and mixed colony-forming cells by "panning" on cultured marrow-derived stromal layers. *Exp Hematol*. 13(9):937-40, 1985.

23. Verfaillie C, Blakolmer K, McGlave P. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med.* 17(2):509-2, 1990.
24. van der Sluijs JP, Baert MR, Ploemacher RE. Differential adherence of murine hematopoietic stem cell subsets to fibronectin. *Exp Hematol* 22(13):1236-1243, 1994.
25. Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, Juliano R. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta* 1242(1):77-98, 1995
26. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Blood* 84: 2068-2100, 1994.
27. Straetmans N. Cell adhesion molecules and their role in haemopoiesis and in haematological diseases. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 23:504-514, 1993.
28. Hogg N, Bates PA, Harvey J. Structure and function of intercellular adhesion molecule-1. Hogg N (ed): *Integrins and ICAM-1 in Immune Responses*. Chem Immunol. Basel Karger, 1991, vol 50, pp 98-115.
29. Dustin ML, Springer TA. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann Review in Immunol* 9:27-66, 1991.
30. Garrod DR. Cell to cell and cell to matrix adhesion. *Br Med J* 306:703-705, 1993.
31. Sackstein R. Physiologic migration of lymphocytes to lymph nodes following bone marrow transplantation: role in immune recovery. *Semin Oncol* 20(5 Suppl 6):34-9, 1993.
32. Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in diseases. *Immunology Today* 14:506-512, 1993. Spertini O, Freedman AS, Belvin MP, Penta AC, Griffin JD, Tedder TF. Regulation of leucocyte adhesion molecule 1 (TQ1-Leu-8). Expression and shedding by normal and malignant cells. *Leukemia*: 300-308, 1991.

33. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma and retains functional activity. *J Cell Biol* 119:229-238, 1991. Spertini O, Schleiffenbaum B, White-Owen C, Ruiz Jr P, Tedder TF. ELISA quantification of L-selectin shed from leucocytes in vivo. *J Immunological Methods* 156:115-123, 1992.
34. Kipps TJ. The cluster of differentiation (CD)-antigens. Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ (eds): *Williams Hematology Fifth Edition*, McGraw-Hill Inc., 1995, pp. 113-140.
35. Lesley J, Hyman R, Kincade P. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271-335, 1993.
36. Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340:1053-1058, 1992.
37. Torensma R, Raymakers RAP, de Witte T, Figdor CG. Adhesion molecules in haematopoiesis. Education Sessions of the Second EHA, 1996, pp. 127-138.
38. Johnson JP. The role of ICAM-1 in tumor development. *Chem Immun* 50:143-163, 1991.
39. Roos E. Adhesion molecules in lymphoma metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 10:33-48, 1991.
40. Pals ST, Horst EM. Adhesion molecules and the dissemination of non-Hodgkin's lymphomas. Education Sessions of the Second EHA, 1996, pp. 130-133.
41. Albelda SM. Biology of Disease: Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest* 68:4-17, 1993.
42. Gunji Y, Nakamura M, Hagiwara T, Hayakawa K, Matsushita H, Osawa H, Nagayoshi K, Nakauchi H, Yanagisawa M, Miura Y. Expression and function of adhesion molecules on human hematopoietic stem cells: CD34⁺ LFA-1⁻ cells are more primitive than CD34⁺ LFA-1⁺ cells. *Blood* 80(2):429-436, 1992.

43. Kobayashi M, Imamura M, Uede T, Sakurada K, Maeda S, Iwasaki H, Tsuda Y, Musashi M, Miyazaki T. Expression of adhesion molecules on human hematopoietic progenitor cells at different maturational stages. *Stem Cells* 12(3):316-321, 1994.
44. Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34 stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* 90(2):358-367, 1992.
45. Liesveld JL, Winslow JM, Frediani KE, Ryan DH, Abboud CN. Expression of integrins and examination of their adhesive function in normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood* 81(1):112-121, 1993.
46. Kerst JM, Sanders JB, Slaper-Cortenbach IC, Doorakkers MC, Hooibrink B, van Oers RH, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood* 81(2):344-351, 1993.
47. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson J, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 80(2):388-395, 1992.
48. Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirksen MK, Slaper-Cortenbach IC, Schaasberg WP, Pinedo HM, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 85(11):3313-3319, 1995.
49. Patel VP, Lodish HF. A fibronectin matrix is required for differentiation of murine erythroleukemia cells into reticulocytes. *J Cell Biol* 105(6 Pt 2):3105-18, 1987.
50. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hematopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA-4 integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9374-9378, 1993.

51. Kocnig L, Baron S, Berenson R, Heimfeld S, Deisseroth AB. L-selectin is associated with higher plating efficiencies of clonogenic progenitor cells and is present at higher levels in CD34+ cord blood cells and chronic myelogenous leukemia cells than in normal bone marrow or peripheral blood cells. *Blood* 84:569a, 1994.
52. Kansas GS, Muirhead MJ, Dailey MO. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD4 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood*. 76(12):2483-92, 1990.
53. Lewinsohn DM, Nagler A, Ginzton N, Greenberg P, Butcher EC. Hematopoietic progenitor cell expression of the H-CAM (CD44) homing-associated adhesion molecule. *Blood*. 75(3):589-95, 1990.
54. Horst E, Meijer CJLM, Radaskiewicz T, van Dongen JJM, Pietres R, Figdor CG, Hooftman A, Pals ST. Expression of human homing receptor (CD44) in lymphoid malignancies and related stages of lymphoid development. *Leukemia* 4:383-389, 1990.
55. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(26):12240-12244, 1995.
56. To LB, Haylock DN, Dowse T, Simmons PJ, Trimboli S, Ashman LK, Juttner CA. A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood* 84(9):2930-2939, 1994.
57. Tong J, Hoffman R, Siena S, Srour EF, Bregni M, Gianni AM. Characterization and quantitation of primitive hematopoietic progenitor cells present in peripheral blood autografts. *Exp Hematol* 22(10):1016-1024, 1994.
58. Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, Petrucci MT, Ricciardi MR, Catani L, Rondelli D, Fogli M, Leopardi G, Ariola C, Tura S. Cycling status of CD34 cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 89(4):1189-1196, 1997.

59. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med.* 173(3):599-607, 1991.

