

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA YÜKSEK DOZ METİL PREDNİZOLON VE  
GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖRÜN  
HEMATOPOETİK ANA-KÖK HÜCRE MOBİLİZASYONU  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pamir ŞENER

TRABZON – 1998

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA YÜKSEK DOZ METİL PREDNİZOLİN VE  
GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖRÜN  
HEMATOPOETİK ANA-KÖK HÜCRE MOBİLİZASYONU  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Pamir ŞENER

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Erol ERDURAN

TRABZON – 1997

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

1.ÖNSÖZ	III
2.GİRİŞ	1
3.GENEL BİLGİLER	3
4.MATERYAL ve METOD	23
5.BULGULAR	26
6.TARTIŞMA	31
7.SONUÇLAR ve ÖNERİLER	39
8.TÜRKÇE ÖZET	40
9.İNGİLİZCE ÖZET	41
10.KAYNAKLAR	42

## ÖNSÖZ

Malign hastalıkların tedavisinde ortaya konulan yeniliklerden birisi de periferik kana mobilize edilmiş hematopoetik kök-ana hücre ( $CD_{34}^+$  hücre) transplantasyonudur. Son yıllarda bu konu ile ilgili büyük aşamalar kaydedilmiştir. Bu tezde sözü edilen çalışmalara değişik bir açıdan katkıda bulunma amaçlanmıştır.

Çalışmaya başlangıcından bu yana değerli fikirleri ile katkıda bulunan Doç.Dr.Erol ERDURAN'a, deneklerin kan analizlerini flow cytometry ile çalışan Dr.Yavuz TEKELİOĞLU'na,  $CD_{34}$  kit temininde yardımcı olan Bizim Medikal Firmasına ve tavşanların alımında destek olan Pfizer İlaç Firmasına teşekkür ederim.

## GİRİŞ

Hematolojik ve nonhematolojik malign hastalıklarda uygulanan yüksek doz kemoradyoterapi, hastalarda kümülatif kök ve projenitör hücre zararına yol açarak uzun süreli hematopoetik yetmezliğe ve uzamış pansitopeniye neden olur (1-5). Bu tedavi rejimleri ile hematopoetik iyileşme sağlanmakla birlikte, çoğu kez hastalarda gelişen enfeksiyon ve kanama komplikasyonları yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (3,5). Kemoradyoterapi sonrası hematopoezin desteklenmesi için granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi hematopoetik büyüme faktörleri sıklıkla kullanılır (3,6-9).

Kemik iliği transplantasyonu malign hastalıklarda bir tedavi şekli olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (3,4,10). Allojenik ve otolog olmak üzere iki şekilde uygulanan kemik iliği transplantasyonu sonrası hematopoezin iyileşme hızı sınırlıdır (3,11-14) ve kemik iliği malign hücrelerle infiltre olan hastalarda otolog transplantasyon sonrası relaps oranı allojenik transplantasyonlardan daha yüksektir (1,15). Bu nedenlerle kemik iliği transplantasyonuna bir alternatif üretmek amacı ile yeni hücre kaynakları araştırılmış ve yakın zamanlarda hematopoetik hücre kaynağı olarak periferik kana mobilize olmuş  $CD_{34}^+$  hücreler kullanılmaya başlanmıştır (4,14,16-20). Genel anestezi uygulanmaksızın poliklinik şartlarında, noninvaziv bir şekilde elde edilen bu hücrelerin hematopoezi iyileştirme hızı daha fazladır (11,18,21-23). Kemik iliği transplatasyonuna oranla daha ucuz ve kolay bir uygulama olan periferik kan kök ve projenitör hücre transplantasyonunda tek bir lökoferez işlemi ile transplantasyona yetecek miktarda  $CD_{34}^+$  hücre toplanabilmektedir (2,23).

Periferik kana hematopoetik hücre mobilize etmek için kemoterapi, daha sıklıkla G-CSF olmak üzere hematopoetik büyüme faktörleri veya her ikisi birlikte kullanılmaktadır (19,24-27). Özellikle otolog transplantasyonlarda kemoterapi ve hematopoetik büyüme faktör kombinasyonlarının en iyi sonuçları verdiği bildirilmiştir (2,16,17,23,28). Son yıllarda akut lösemili hastalarda yüksek doz kortikosteroidlerin (metil prednizolon) periferik kana  $CD_{34}^+$  progenitör hücre mobilizasyonunu arttırdığı gösterilmiş (29), ancak sağlam kişilerde ve hayvan deneylerinde yüksek doz metil prednizolonun (YDMP) periferik kan  $CD_{34}^+$  progenitör hücre mobilizasyonu üzerine etkileri araştırılmamıştır.

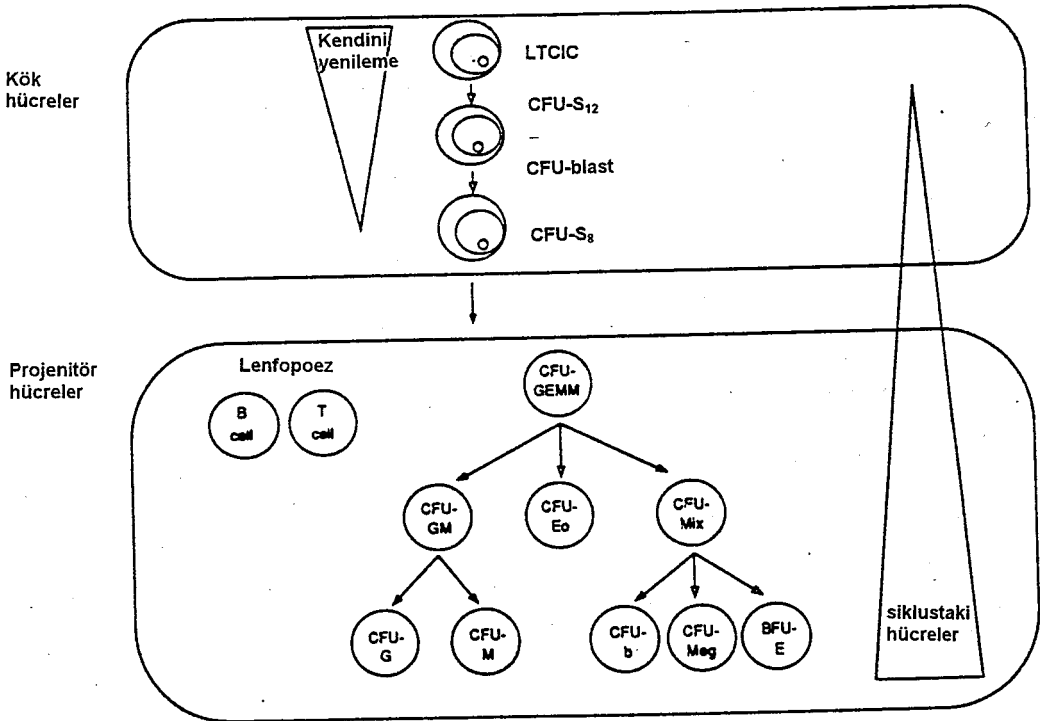
Otolog kemik iliği transplantasyonunda hematopoetik hücreleri mobilize etmek için kullanılan kemoterapötik ajanlar ciddi myelosupresyona neden olurlar (23), hematopoetik büyüme faktörlerinin ise maliyeti çok yüksektir (30). Bu çalışmada yan etkileri ve maliyeti kullanılan kemoterapötik ajanlar ve büyüme faktörlerinden daha az olması nedeni ile alternatif bir ajan olan YDMP'un periferik kana  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonu üzerine etkisi araştırıldı ve bu etki G-CSF ile karşılaştırıldı.

## GENEL BİLGİLER

CD<sub>34</sub> molekülü; kemik iliği, umbilikal kord ve periferik kandaki hematopoetik kök ve projenitör hücreler ile vasküler endotel, yüksek endotelyal venüller ve fibroblastlar gibi nonhematopoetik hücreler üzerinde eksprese olan bir membran glukoproteinidir (31-35).

Bu molekül biyokimyasal olarak musin benzeri sialoglukoprotein yapısındadır. Molekül büyük miktarda O<sup>-</sup> ve 9 adet N<sup>+</sup> ile bağlı glikozilasyon yeri içerir (2,34) ve ekspresyonu hücrelerin matürasyonu sırasında azalır (33,35).

Kemik iliği ve periferik kanda bulunan hematopoetik hücreler 3 kompartmanda oluşur (36,37) (Şekil 1).



Şekil 1: Hematopoetik Hücreler

### 1. Kök Hücre Kompartmanı:

Morfolojik olarak küçük lenfositlere benzeyen ve tüm kemik iliği hücrelerini oluşturma yeteneği olan çok yönlü gelişme kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu kompartmanda bulunan hücreler:

- LTCIC : Long term culture initiating cell (uzun süreli kültür başlatıcı hücre).
- CFU-S : Colony forming unit spleen (dalak koloni oluşturu hücre).
- CFU-Blast : Colony forming unit blast (blast koloni oluşturu hücre).
- HPP-CFC : High proliferative potential colony forming cell (yüksek proliferatif potansiyelli koloni oluşturu hücre).

### 2. Projenitör (ana) Hücre Kompartmanı:

Yönlendirilmiş ve sınırlı proliferatif potansiyele sahip, myeloid, eritroid ve megakaryositik seriden oluşmuş hücrelerdir. Bu kompartmanda bulunan hücreler:

- CFU-GEMM : Colony forming unit granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte (granülosit, eritroid, makrofaj, megakaryosit koloni oluşturu hücre).
- CFU-GM : Colony forming unit granulocyte, macrophage (granülosit-makrofaj koloni oluşturu hücre).
- CFU-G : Colony forming unit granulocyte (granülosit koloni oluşturu hücre)
- CFU-M : Colony forming unit macrophage (makrofaj koloni oluşturu hücre)
- CFU-Mix : Colony forming unit mix (miks koloni oluşturu hücre)
- CFU-b : Colony forming unit basophil (bazofil koloni oluşturu hücre)
- CFU-Eo : Colony forming unit eosinophil (eozinofil koloni oluşturu hücre)
- CFU-Meg : Colony forming unit megakaryocyte (megakaryosit koloni oluşturu hücre)
- BFU-E ve CFU-E : Burst forming unit erythroid ve Colony forming unit erythroid (eritroid koloni oluşturu hücre)



### 3. Postmitotik Hücre Kompartmanı:

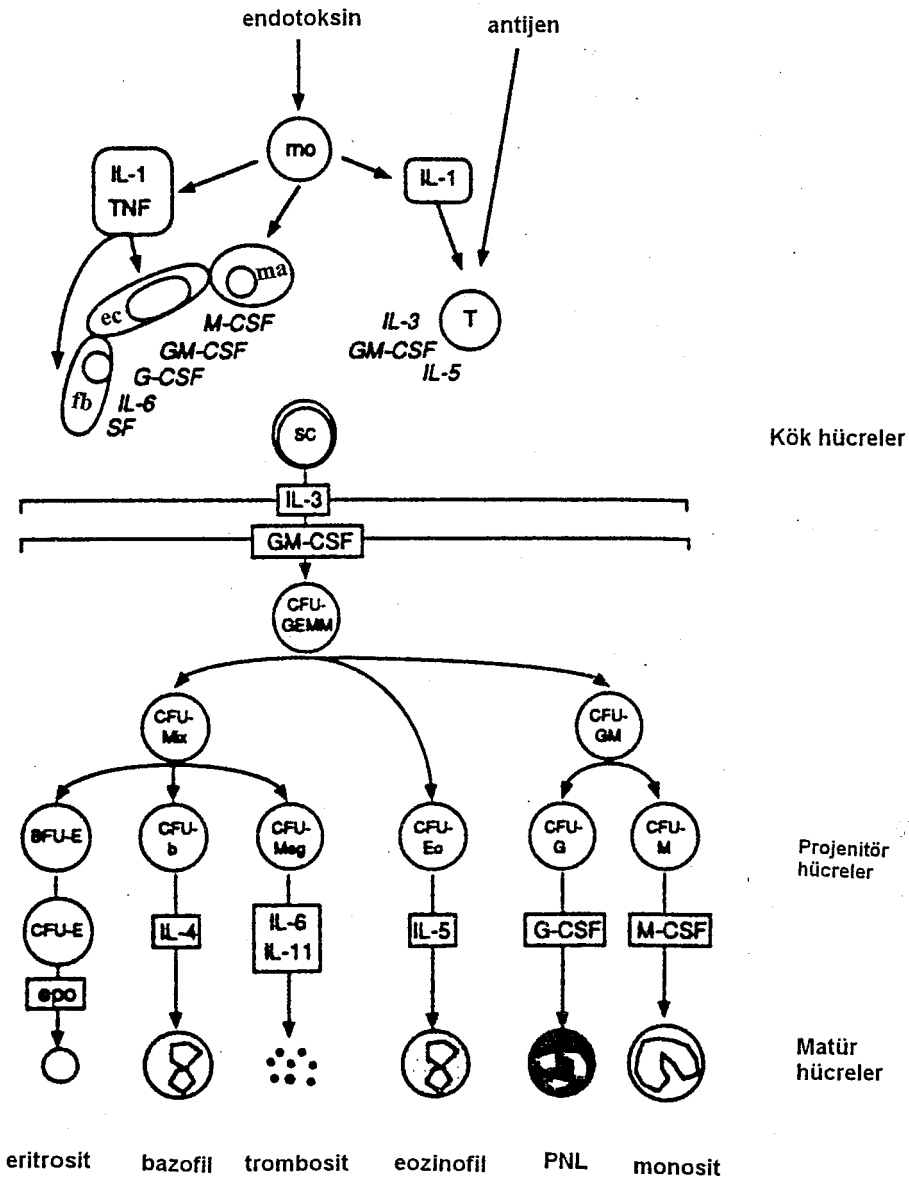
Olgunlaşmış ve proliferasyon göstermeyen myeloblast, promonosit, proeritroblast ve megakaryosit gibi hücreler bu kompartmanda bulunur.

Tüm hematopoetik kök ve progenitör hücreler üzerinde CD<sub>34</sub> antijeni eksprese olsa da timusta CD<sub>34</sub><sup>-</sup> myeloid progenitörler bulunmuştur. Ayrıca kültür ortamlarında interleokün-3 (IL-3) ile muamele edilen CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücrelerin bu antijeni kaybettiği gösterilmiştir. Bunlar oldukça az sayıdadırlar ve koloni oluşturmayı başaramazlar. Bu durum CD<sub>34</sub> antijeninin, uygun koşullarda kök ve progenitör hücre yüzeyinde modüle olabileceğini göstermektedir (38).

Bütün bu farklı hücrelerin intrauterin gelişimsel hematopoezi mezoblastik, hepatik ve myeloid olmak üzere 3 anatomik evreden oluşur (36). Son yıllara kadar mezoblastik hematopoezin başlıca Yolk Kesesi (dotter kesesi) olmak üzere ekstraembriyonik yapılarda meydana geldiği ve gebeliğin 3. haftasında başladığı düşünülüyordu (36). Çünkü insanlardaki erken kan hücre ontogenitesi çoğunlukla hayvan modellerindeki gözlemlere dayanıyordu (39). Oysa Yolk Kesesi'nin kan oluşturma aktivitesi evrim süreci içinde dramatik olarak azalmıştır (ekstraembriyonik geçici hematopoetik doku). Bu yapı tüm primitif ve embriyonik kan hücrelerinin sadece bir kısmının üretiminden sorumludur (39). Bilinenin aksine insanlar da dahil yüksek omurgalılarda intraembriyonik kök hücrelerinin spesifik orijini, preumblikal bölgede embriyonik ventral aortun endoteline yapışık bir kaç yüz tane yuvarlak hücreden oluşan farklı bir popülasyondur. Bu popülasyon gebeliğin 4. ile 5. haftasında tespit edilebilmiştir. Buradaki hücreler primitif hücrelerin yüzey antijenlerini eksprese ederler ve en fazla yerel CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre proliferasyonuna sahiptirler. O halde hematopoez şimdiye kadar bilinenlerin aksine embriyoda başlamaktadır (39).

Gebeliğin yaklaşık 6. haftasında mezoblastik hematopoez geriler, 10-12. haftalarda tamamen durur ve bu sırada hematopoezin küçük bir bölümü kemik iliğine kayar (36,39). Hepatik hematopoez 6. haftada devreye girer ve bu evrede karaciğer başta olmak üzere dalak, timus ve lenf nodları kan yapım yerleridir. Karaciğer gebeliğin son trimesterine kadar birincil hematopoetik organ olarak kalır. Gebeliğin son 3 ayında ise hematopoezin ana organı kemik iliğidir (36,39).

Gestasyonel ya da postnatal yaş ve anatomik lokalizasyon ne olursa olsun bütün hematopoetik yapıların üretimi, kendini yenileme ve bütün kan hücre tiplerine klonal maturasyon yeteneğine sahip pluripotent kök hücreler ile başlar. Bunlardan gelişen projenitör hücreler hematopoetik büyüme faktörlerinin etkisi altında daha matur hücrelere farklılaşırlar (36) (Şekil 2). Tek bir pluripotent kök hücre bir çok projenitör hücre oluşturma kapasitesine sahiptir (37).



Şekil 2: Hematopoetik Büyüme Faktörlerinin Hematopozdeki Rollerini

Daha önce de belirtildiği gibi pluripotent kök hücreler kendini yenileme kapasitesine sahiptir. Projenitör hücreler ise kendilerini yenileyemezler ve sınırlı proliferatif (çoğalma) potansiyelleri vardır. Bu hücreler diferansiasyon (farklılaşma) ile ölürler. Projenitör hücrelerin sayıları kök hücre havuzunda üretilecek hücre miktarına bağlıdır (37).

Kök hücrelerin proliferatif potansiyelleri ve diferansiasyon yetenekleri stromal hücrelerin bizzat kendilerinden veya stromal hücreler tarafından sentezlenen faktörlerden etkilenir. Lenfosit, fibroblast veya endotelyal hücre kaynaklı IL-3, interlökin 6 (IL-6) gibi sitokinler kök hücrelerin projenitör hücrelere dönüşümünü hızlandırır (37). Düzenleyici moleküller olarak da bilinen bu büyüme faktörlerinin çoğu, projenitör hücrelerin yakın çevresinde bulunan hematopoetik aksesuar hücreler tarafından üretilir. Aksesuar hücreler stromada yer alan yardımcı hücrelerdir ve fonksiyonları hakkında fazla bilgi yoktur. Erken ve geç etkili olmak üzere 2 tip humoral düzenleyici faktör vardır. İmmatür hücreler interlökin-1 (IL-1), IL-3, IL-6 ve GM-CSF gibi erken etkili faktörlerden etkilenir. Diferansiasyon olayı devam ettikçe eritropoetin (Epo), G-CSF ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) gibi geç etkili faktörlere duyarlılık artar (9,37). Bu durum hematopoetik gelişimde büyüme faktörlerinin hiyerarşik bir sırayla etki gösterdiği hipotezine destek olmuştur (9).

Bütün bunların yanısıra hematopoetik diferansiasyon uygun bir mikro çevre gerektirir. İnsanlarda bu ortam kemik iliği ile sınırlı iken kemirgenlerde hem kemik iliği, hem de dalak bu mikro çevreyi oluşturur. Hücreler ile mikro çevre arasındaki etkileşimler oldukça spesifik moleküler mekanizmaları gerektirir ve bu mekanizmalar üzerine etkili genetik faktörler giderek önem kazanmaktadır (37). Kemirgenlerde dalak kompartmanına ait hücreler CFU-S'dir. Bunlar CFU-S<sub>12</sub> (12. gün koloni oluşturan hücreler), CFU-S<sub>8</sub> (8. gün koloni oluşturan hücreler) olarak adlandırılır. Pre-CFU-S ise bu kompartmanın en ilkel hücrelerindedir ve hematopoezin uzun süreli rekonstitusyonundan (yeniden yapılanma) sorumludur. CFU-S<sub>12</sub> ve CFU-S<sub>8</sub> gibi daha matür hücreler kısa süreli rekonstitüsyonda rol oynarlar (37). En son bulunan HPP-CFC'nin ise kök hücrelerine denk olduğu düşünülmektedir (37,40).

Sonuç olarak, hematopoez sürekli bir olaydır ve klonal bir yapıya sahiptir. Bu da tek bir pluripotent kök hücrenin tüm hematopoetik sistemi yeniden oluşturma kapasitesine dayanır (37).

Bölünme süreci esnasında hücreler  $G_1$ , S,  $G_2$ , M gibi çeşitli fazlara girerler.  $G_1$  ilk fazdır ve DNA sentezi için hücre mekanizmasının hazırlanması periodudur. S fazında DNA sentezlenir.  $G_2$ , 2. aralıktır; bu fazda hücreler bölünmeye hazırlanır (premitotik faz). M gerçek bölünme periodudur (mitoz fazı). Oluşan yeni hücreler tekrar  $G_1$  fazına girerler. Kök hücrelerinden bazılarının  $G_0$  adı verilen dinlenme fazında veya uzamış  $G_1$  fazında bulduklarına ve proliferatif olmadıklarına inanılır. Aktif olarak hücre siklusunda olmayan bu hücreler bazı kemoterapik ajanlar ve büyüme faktörleri tarafından indüklenerek hızlı bir şekilde hücre siklusuna tetiklenir. Böylece kök hücrelerinin proliferasyonları arttırılmış olur (41). Bu stimülatör ajanların yanısıra proliferasyonu azaltan ve aksesuar hücrelerden salgılanan inhibitör moleküller de bildirilmiştir. Laktoferrin, H-ferritin (42), makrofaj inflamatuvar protein (MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 $\alpha$ ), interlökin 8 (IL-8), trombosit faktör-4 (PF-4), monosit kemotaktik ve aktive edici faktör (MCAF=MCP-1), interferon uyarıcı protein (IP-10) bu gruba dahildir (43,44). Bu moleküller kök ve progenitör hücrelerin doza ve zamana bağımlı olarak reversibl bir şekilde absöüt sayılarını ve hücre siklusundaki devir sayılarını azaltırlar (43,44).

$CD_{34}^+$  kök ve progenitör hücreler mobilize olmamış periferik kanda damar cidarına yapışık olarak oldukça küçük konsantrasyonlarda bulunurlar ve vasküler endotel, yüksek endotelyal venüller ve bazı fibroblastlar tarafından yapılırlar (34). Bununla birlikte bazı büyüme faktörleri ve kemoterapötik ilaçlar gibi mobilize edici ajanlarla  $CD_{34}^+$  kök ve progenitör hücreler kemik iliğinden periferik kana çıkarılabilirler (2).

Yolk Kesesi, embriyonik aort endoteli, fetal karaciğer, umbilikal kord kanı, kemik iliği ve kemirgen dalağında varlığı gösterilen kök ve progenitör hücreler arasında olduğu gibi (31,34,37,39), mobilize faz ile durgun fazdaki kök ve progenitör hücreler arasında da fenotipik profil ve klonojenik potansiyel açısından önemli farklılıklar vardır (31,34,45,46). Embriyonal kök hücreleri en fazla çoğalma kapasitesine sahiptir. Sonra da sırayla çoğalma kapasitesine sahip hücreler fetal karaciğer, umbilikal kord

kanı, mobilize periferik kan ve kemik iliğinde bulunur (37). Bu farklılıklar onların elde edildiği çevreye bağlıdır (31).

CD<sub>34</sub> molekülü kök ve progenitör hücrelerin adhezyonunda da görev alır (34). Bu hücreler diferansiyasyon antijenleri ve hücre kültür yöntemi ile tespit edilirler. Şu an en fazla tercih edilen metod, diferansiyasyon antijenleri kullanılarak uygulanan akım hücremetrik (flow cytometry= FCM) analiz metodudur (21,47,48). Yakın zamana kadar kullanılan hücre kültür metodu ise kemik iliği yeniden çoğalma yeteneğini indirekt olarak gösterir ve standardizasyonu kötüdür. 14 gün kadar bir zaman kaybına neden olmasından dolayı retrospektif değeri vardır (21,47).

#### **Akım Hücremetrik Analiz:**

Akım hücremetrik analiz; tek tek hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin bir alıcı cihaz tarafından bir sıvı içerisine tek sıra halinde alınarak bu hücrelerin veya partiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu sistemde hücreler ince bir sıvı akımı içinde tek sıra halinde geçmektedir. Geçiş esnasında hücrelerin üzerine isabet ettirilen lazer ışını ile hücre yüzeyindeki farklı işaretlerin verdiği renkli dalga boyları ve farklı renklerdeki floresan boyalarla toplanırlar. Her bir hücreden gelen ışın dağılımları ve uyarımları elektronik olarak ilgili hücrelerin tanımlanmasında kullanılır (49).

Hücre yüzey antijenleri hücrenin hangi farklılaşma aşamasında olduğunu gösterir. FCM'de immunofenotipleme hücre yüzey antijenlerinin floresan boyalarına tutunmuş monoklonal antikorlar ile bağlanması yoluyla yapılır. Belirli bir hücre dizisini tanıyan monoklonal antikor kümesine farklılaşma kümesi (cluster of differentiation) denir ve kısaca CD ile gösterilir. Bu yöntem ile saniyede 500'den fazla hücre analiz edilebilir (50).

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücrelerini tespit eden CD<sub>34</sub> antikorları şunlardır (48):

- 1-Q.BEND-10 monoklonal antikorlar
- 2-12,8 monoklonal antikorlar
- 3-8G12 monoklonal antikorlar.
- 4-My10 monoklonal antikorlar.
- 5-Phycoerythrin monoklonal antikorlar

8G12 antikoru en iyi neticeyi veren CD<sub>34</sub> antikoru'dur. Bağlayıcı özellikleri kaybolmaksızın florokromlarla direkt olarak işaretlenebilir ve direkt immun floresan yöntemiyle görülebilirler (21).

Diferansiasyon antijenlerinin ekspresyonu bireyler arasında farklılık arz eder (48). CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücrelerin alt grupları da yine diferansiasyon antijenlerinin ekspresyonu ile ayırt edilir (48).

CD<sub>34</sub> hücrelerinin alt grupları ve eksprese ettikleri antijenler şunlardır.

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>2</sub><sup>+</sup>, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>3</sub><sup>+</sup>, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>7</sub><sup>+</sup> = T lenfoid projenitörler (22)

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>10</sub><sup>+</sup>, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>19</sub><sup>+</sup>, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> = B lenfoid projenitörler (38,45)

CD<sub>20</sub><sup>+</sup>

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>13</sub><sup>+</sup>, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>15</sub><sup>+</sup>, CD<sub>34</sub> CD<sub>33</sub><sup>+</sup> = Myeloid projenitörler (22,31).

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>61</sub><sup>+</sup> = Megakaryositik projenitör (45)

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>14</sub><sup>+</sup> = Monositik projenitör (22,38)

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>71</sub><sup>+</sup> = Transferrin reseptörleri (Eritroid projenitör hücreler üzerinde bulunur) (38,45,48)

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup> = Gelişmenin erken safhasını gösteren antijen (2,51)

CD<sub>34</sub><sup>+</sup> C-kit<sup>+</sup> = C-kit, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre membranını

çevreleyen kök hücre faktörüne (SCF=C-kit ligand) bağlanır ve varlığı aktif hücre siklusunu gösterir (52-56). C-kit SCF etkileşimleri hematopoetik gelişimin kontrolünde önemlidir.

CD<sub>38</sub>, HLA-DR antijen ekspresyonu ve Rodamin-123 retansiyonu aktivasyon markırları olarak ifade edilir. T lenfoid, B lenfoid, myeloid, monositik, megakaryositik, eritroid antijenlerinin ve aktivasyon markırlarının negatifliği ile Thy-1 ve C-kit antijenlerinin pozitifliği primitif hücre tipini gösterirken, bütün antijenlerin ve aktivasyon markırlarının pozitifliği matür hücre tipinin bir ifadesidir. Matür hücrelerde C-kit ve Thy-1 antijen pozitifliği görülmez. Mesela CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>33</sub><sup>-</sup> pluripotent kök hücreyi gösterirken CD<sub>34</sub><sup>+</sup> CD<sub>33</sub><sup>+</sup> myeloid projenitörü ifade eder (38,45).

Kemik iliğinde, mobilize olmamış kana oranla çok daha fazla  $CD_{34}^+$  hücre bulunur (1). Bu hücrelerin sayısı kemik iliğinde %1-5 arasındadır ve dolaşımdaki hücrelerden yaklaşık 10 kat daha fazladır (33,38,57). Primitif kök hücrelerinin çoğu kemik iliği kompartmanında bulunur (46). B lenfoid projenitörler, kemik iliğinde mobilize kana göre daha fazladır. Ancak buradaki koloniler oldukça küçüktür ve düşük klonojenik kapasiteye sahiptir. Bu durum proliferatif kapasitenin yetersiz olduğunu gösterir (22,31). T lenfoid ve monositik projenitörler ise bütün kompartmanlara düşük konsantrasyonlarda ve eşit olarak dağılmıştır (22,38,45).  $CD_{15}$ ,  $CD_{71}$ , C-kit antijen ekspresyonu ve rodamin-123 retansiyonu kemik iliğinde tüm kompartmanlardan daha fazladır (45). Oysa  $CD_{33}$  ve  $CD_{13}$  antijen ekspresyonu kemik iliğinde diğer kompartmanlardan daha az oranda bulunur (22,38).

Hem primitif, hem de projenitör hücreler mobilize olmamış periferik kanda kemik iliğine oranla daha azdır ve bu hücrelerin kendilerini yenileneme kapasiteleri daha yetersizdir (46). Mobilize olmamış periferik kandaki  $CD_{34}^+$  hücrelerin çoğu HLA-DR<sup>+</sup>'dir ve bu kompartmanda kemik iliğinden daha fazla  $CD_{45}$  ile  $CD_{33}$  antijen ekspresyonu mevcuttur (38).  $CD_{71}$  antijen ekspresyonu mobilize olmamış periferik kanda oldukça düşük konsantrasyonlarda iken B-lenfoid projenitörler hemen hemen kemik iliği ile aynı miktarlarda bulunur (38). Bu kompartmandaki  $CD_{34}^+$  hücre sayısı %0.05-0.5 arasındadır (2,22).

Fetal hematopoetik hücrelerin klinik şartlarda elde edilmesi kolaydır. Hızla artan bu hücreler, alıcıyı erişkinlerdeki hücrelere oranla daha hızlı ve etkili biçimde restore ederler. Bu hücrelerin en sık kullanıldığı kaynak umbilikal kord kanıdır (37,39). Herhangi bir ajan ile mobilize olmuş periferik kan ve umbilikal kord kanı ortak özellikler taşırlar ve kemik iliği hücrelerinden oldukça farklıdırlar (31,38). Myeloid projenitörler periferik ve umbilikal kord kanında kemik iliğine oranla çok daha fazladırlar (22,31,48). Bu iki kompartmandaki koloniler dikkati çekecek kadar büyüktür ve yüksek klonojeniteye sahiptir (24,31).  $CD_{34}^+$  HLA-DR<sup>-</sup> hücreler umbilikal kord kanında yüksek miktarlarda bulunurlar. Bu durum umbilikal kord kanının primitif hücreler açısından zengin olduğunu gösterir (31).

C-kit ve CD<sub>71</sub> antijen ekspresyonu ve rodamin-123 retansiyonu, mobilize periferik kanda kemik iliğine göre daha düşüktür. Stimülatör ajanlar ile mobilizasyon sonucu periferik kanda pirimitif kök hücreler kemik iliği düzeylerine yaklaşırlar (45). Burada dikkati çeken bir nokta, C-kit ekspresyonunun mobilizasyon ile daha fazla düşmesidir. C-kit ekspresyonunun kök hücre faktörü tarafından bloke edildiği düşünülmektedir (45).

Farklı glikozilasyon ile ilişkili epitoplara varlığı veya yokluğu, CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücrelerin pozitif seleksiyonu (saf CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre ürünlerinin elde edilmesi), immünofenotiplendirilmesi ve hematopoezdeki rolleri açısından önemlidir (34). CD<sub>34</sub><sup>+</sup> molekül epitoplara klas I, klas II ve klas III olarak sınıflandırılırlar. Klas III epitoplara normal hematopoetik projenitör hücreler ve matür lösemik hücreler üzerinde klas I ve klas II epitoplaraından daha geniş bir yayılım gösterirken, bu epitoplara her üçü de pirimitif hücreler üzerinde eşit olarak eksprese olurlar (2,34).

Hücre matürasyonu arttıkça CD<sub>34</sub> antijen ekspresyon oranı düşer (35). Diferansiyasyon sırasında CD<sub>34</sub> molekülünde klas I ve klas II epitop ekspresyonunun selektif olarak azalmasına bir takım enzimatik olaylar neden olur. CD<sub>34</sub> antikoraının epitop analizi bunların nörominidaza (sialik asitleri CD<sub>34</sub> glukoproteininin karbonhidrat kısmından ayırır) ve glukoproteaza (sadece CD<sub>34</sub> gibi musin benzeri glikoproteinleri protealize uğratar) olan duyarlılıkları ile sınıflandırılır. Clas I epitoplara her 2 enzime de hassastır. Klas II epitoplara sadece glukoproteaza hassastır. Klas III epitoplara ise hiç birine hassas değildir. Matürasyon sırasında klas I ve klas II'nin enzimatik azalması, klas III epitoplaraını saptanabilir hale getirir. Bu nedenle hematopoetik kök-projenitör hücre transplantasyonunda CD<sub>34</sub> klas III antikoraı kullanarak elde edilen epitoplara sahip hücreler tercih edilmelidir (2,34).

Hematolojik ve nonhematolojik malign hastalıklarda mobilize periferik kan kök-projenitör hücreleri (PBSPC) son yıllarda artan bir hızla kemik iliği trasplantasyonuna alternatif olarak, ayrıca yüksek doz kemoterapi ve radyoterapi sonrası hematopoetik iyileşmeyi hızlandırmak amacı ile kullanılmaktadır (5,16-20,28).



PBSPC transplantasyonu allojenik (11,18,58,59) ve otolog (3,21,28,60) olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. Allojenik periferik kan greftlerinin kemik iliği greftlerinden daha fazla sayıda T hücresi içermesi nedeni ile graft versus host hastalığı (GVHD) riskini arttırdığı düşünülmektedir (11,18,58,59). Ancak periferik kandaki bu sayıca fazla T hücreleri kemik iliğindekiyelerden kalitatif olarak farklıdır. Mobilizasyon sonrası periferik kanda T hücrelerinin  $CD_{34}^+ CD_4^- CD_8^-$  alt gruplarının fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir. Bu çift negatif antijen ekspresyonu taşıyan hücrelerin GVHD'da regülator rol oynadığı ve bu hücrelerin GVHD'nın inhibisyonundan sorumlu doğal supresörler olduğu bildirilmiştir (11,18). T lenfosit sayısının fazlalığı nedeniyle allojenik PBSPC transplantasyonunda GVHD riski fazla gibi görünse de hemen hemen kemik iliği transplantasyonu ile eşit düzeyde bulunmuştur (18,59).

Allojenik PBSPC transplantasyonunda GVHD riskini azaltmak için T hücre depleksyonu (T hücrelerinin negatif seleksiyonu) (13,61) veya  $CD_{34}^+$  hücre seleksiyonu gibi yeni yöntemler artık gündeme girmiştir (4,13,14,61). T hücre depleksyonunun büyük miktarda projenitör hücre kaybına neden olabilmesi, klinisyenleri daha sıklıkla  $CD_{34}^+$  hücrelerinin pozitif seleksiyonunu tercih etmeye yöneltmiştir (4,14,61).

Otolog PBSPC transplantasyonunda ise en önemli komplikasyon tümör hücre kontaminasyonu ve buna bağlı tümör relapsıdır (19,23,62,63). Özellikle hematopoetik büyüme faktörlerinin kullanımında periferik kana  $CD_{34}^+$  hücrelerinin yanısıra tümör hücrelerinin de mobilize olduğu teorik olarak iddia edilmiştir (19,23). Büyüme faktörlerinin in-vitro lösemik hücre proliferasyonunu uyardığını gösteren çalışmalar bu görüşü desteklemektedir (9). Bununla birlikte kontamine PBSPC ürünlerinin yüksek tümör relaps oranına yol açtığı hipotezi şimdiye kadar klinik uygulamalarda ispatlanamamıştır (19,64). Hatta bu görüşün aksine periferik kanda tümör hücre kontaminasyonu her zaman kemik iliğindekiyelerden daha düşük seviyelerde bulunmuştur (65). Çünkü  $CD_{34}^+$  hücrelerinin sitokinlere sensitivitesinin tümör hücreleri ile karşılaştırıldığında çok daha fazla olduğu görülmüştür (63).

Ancak yine de kemik iliği invazyonu olan kanserli hastalarda periferik kanda relapsa neden olabilecek miktarda tümör hücresinin bulunduğu görüşü klinisyenleri tedirgin etmektedir (2,23,63,65). Malign hücrelerin periferik kanda sirküle ettiği ve kullanılan rejimlerin bu hücreleri periferik kana mobilize ettiği düşüncesi yeni ayıklayıcı sistemlerin uygulamaya girmesine neden olmuştur (19,23,63,66,67). Amgen hücre seleksiyon sistemi (immunomagnetik hücre selektörü) ile saf  $CD_{34}^+$  hücre ürünlerinin elde edilmesi bu uygulamalara bir örnektir (27,64). Böylece periferik kanda tümör hücre kontaminasyonu minimuma indirgenir ve relaps oranı azaltılmış olur. Aynı zamanda elde edilmiş saf ürünler sayesinde hematopoetik iyileşme hızı artar (27,64).

Kemoterapötik ilaçlar ve komplemanlar da  $CD_{34}^+$  hücre pürifikasyonunda kullanılabilir (2,66). Ancak kemoterapötik ilaçların malign hücrelere olduğu kadar greftdeki  $CD_{34}^+$  hücrelere de toksik olması ve komplemanlar ile yeterince saf ürünler elde edilememesi ilgiyi selektif  $CD_{34}$  antikoları kullanılarak gerçekleştirilen immunomagnetik seleksiyon sistemi üzerinde yoğunlaştırmıştır (66).

Allojenik transplantasyonlardaki GVHD ve otolog transplantasyonlardaki tümör relaps riskine rağmen son yapılan çalışmalar PBSPC transplantasyonunun kemik iliği transplantasyonuna oranla çeşitli avantajlara sahip olduğunu göstermiştir. İlk olarak PBSPC genel anestezi kullanılmadan, poliklinik şartlarında lökoferez yöntemi ile toplanabilir (11,18,21,23,68). Noninvaziv bir girişim olması nedeni ile donör kemik iliği aspirasyonu risklerinden korunulmuş olur (11,15,22,23). Ek olarak trasplantasyon için yeterli miktarda PBSPC, kemik iliğinin tümör hücreleri ile infiltrasyonu sonucu fonksiyon görememesi veya kemoradyoterapiyi izleyerek fibrozis, hipoplazi gibi kemik iliği yetersizliği durumlarında da elde edilebilir (2,5,21,23). Bununla birlikte en önemlisi, PBSPC transplantasyonu daha hızlı hematopoetik iyileşmeye neden olmaktadır (Daha hızlı nötrofil, trombosit iyileşmesi gibi) (16,21,22,45,68-71). Böylece febril nütropeni, enfeksiyon epizodları ve antibiotik kullanımı azalır (15,23). Destek tedaviye ve kan ürünlerine daha az sıklıkla ihtiyaç duyulur, hastanede kalma süresi kısalır, tedavi maliyeti düşer (16,18,22,23).

İnfüze edilen  $CD_{34}^+$  hücre miktarı, hematopoetik iyileşmede en önemli parametredir. Düşük dozda hücre transplantasyonu erken hematopoetik iyileşme sağlayabilir, ancak uzun süreli iyileşmeyi ters yönde etkiler (19,46). Ek olarak infüze edilen hücreler içerisinde hem uzun süreli rekonstitusyonu sağlayacak primitif hücreler, hem de kısa süreli rekonstitusyonu sağlayacak daha matür hücreler yeterli miktarda bulunmalıdır (46). Erişkinlerde olduğu gibi çocuklarda da PBSPC toplanması etkili ve güvenli bir uygulamadır, fakat çocuk yaş grubundaki çalışmalar oldukça azdır (19).

Hematopoetik kök ve projenitör hücrelerin mobilizasyonu dinamik ve reversibl bir olaydır (21,46). Primitif ve daha matür hücrelerin mobilizasyonunun farklı mekanizmalar ile gerçekleştiği düşünülmektedir (45). Hücrelerin sirkülasyona mobilizasyonunda olasılıkla ilik stroması ve kök-projenitör hücreler arasındaki adhezyon molekül etkileşimleri rol oynamaktadır. Bu interaktif mekanizmalar üzerindeki etki, kullanılan ajanın tipine bağlı olduğu kadar o ajanın dozuna da bağlıdır (17). Klasik adhezyon molekülleri kemik iliği  $CD_{34}^+$  hücreleri ve stroma arasındaki yapışmayı sağlamaktadır (46). Disulfide bağlı heterodimer olarak görülen bir kök hücre lektini parsiyel olarak pürifiye edilmiştir (46). Bunun yanısıra E-selektin (72), ICAM-1 (intrasellüler adhezyon molekülü-1) benzeri hücre adhezyon melekülü (73) ve L-selektin (74), hematopoetik dokulardaki endotelial hücreler ve kök hücrelerinin üzerinde gösterilmiştir. Hücreleri mobilize eden (kemik iliği endoteline sevkeden) mekanizmalar ile onları ilik stroma hücrelerine bağlayan mekanizmaların aynı olup olmadığı ise henüz bilinmemektedir (46). Hem endotel hücreleri, hem de hematopoetik hücreler üzerindeki spesifik adhezyon moleküllerinin çoğalmasını veya azalmasını sağlayan sitokinlerin farklı olduğu düşünülmektedir. Bu sitokinler hücrelerin bağlanmasına veya salınmasına yardım ederler (46).

Ek olarak transplantasyonlarda hematopoetik kök-projenitör hücrelerin sirkülasyon yolu ile nonhematopoetik dokulara ulaşmasında, şeker molekülleri ile ilişkili bazı reseptörlerin rol oynadığı bildirilmiştir (asialoglukoprotein reseptörleri, mannoz veya galaktoza bağlanan adheziv lektin reseptörleri gibi) (37). Transplante edilen hücreler alıcıda sürekli çoğalır. Ancak bu hücrelerin hepsinin kendini yenileme kapasitesine sahip

olup olmadığı ve hematopoeze peşpeşe katılıp katılmadığı henüz bilinmemektedir (37).

Mobilizasyon mekanizmalarının bütünüyle anlaşılması elde edilen ürünün kalite ve miktarını arttıracak, kullanılan ajan için en uygun dozun ve optimum ürünün sağlanmasında en uygun zamanın belirlenmesine yardımcı olacaktır (17). Hücrelerin uygun zamanda toplanması ise gerekli lökoforez sayısını, dolayısıyla maliyeti azaltacaktır (15). Bu şekilde olabilecek yan etkiler de minimuma indirgenecektir (17).

PBSPC mobilizasyonu için çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bunlar kemoteropötik ajanlar (25,45), büyüme faktörleri (3,5,6,10,61) ya da her ikisinin kombinasyonu şeklindedir (2,20,45,75). Elde edilen  $CD_{34}^+$  hücre miktarı ise kullanılan yöntem, bu yöntemin uygulama zamanına, kullanılmışsa kemoterapötik ajanların dozuna, büyüme faktörlerinin ilave edilmesine, altta yatan hastalığın kemik iliği tutulumuna ve önceki kemoterapinin etkilerine bağlıdır (15,17). Bunların aksine yaş, cinsiyet ve hastalığın tanısı  $CD_{34}^+$  hücre miktarını etkilemez (15,19).

## **Kök ve Projenitör Hücre Mobilizasyonu Üzerine**

### **Kemoterapötik Ajanların Etkileri:**

Yukarıda da belirtildiği gibi PBSPC mobilizasyonunda kullanılan yöntemlerden birisi kemoterapötik ajanlar ile mobilizasyondur. Bu tip uygulamalarda önce kemoterapiye bağlı aplazi görülür, sonra rebound rejenerasyon fazı gerçekleşir. Bu ikinci period esnasında hücreler proliferere ve mobilize olurlar (23,51,68). Mobilizasyon rejimlerine kemoterapinin ilavesi ve dozunun arttırılması sitoredüktif etkiyi de artırır ve minimum tümör kitlesi sağlanabilir. Ancak yüksek dozlarda kemoterapötik ajanlar myelosupresyona, daha fazla febril epizod ve enfeksiyona neden olurlar (5,17). Kemik iliğinde pirimitif kök hücre ve projenitör hücrelerin belirgin kaybına ek olarak kök hücre fonksiyonlarında bozukluk ve irreversibl hücre depleasyonu (baskılanması) meydana gelebilir (23,46). Hücrelerin klonojenik potansiyelinde ve kemik iliği yenilenme kabiliyetinde azalma görülür (1). Bütün bu olumsuz etkilerinden dolayı kemoterapötik ajanların yüksek dozlarından kaçınılmalıdır. Uygun sayıda kök ve projenitör hücre, az veya sıfır toksisitede kemoterapi dozlarıyla elde edilebilir (23).

Mobilizasyon mümkün olduğunca erken dönemlerde, teşhisten hemen sonra uygulanmalıdır (15,28). En uygun zaman, tümör hücre kontaminasyonunun en düşük ve  $CD_{34}^+$  hücrelerinin en büyük miktarının elde edildiği zamandır (28). Kemoterapi sonrası maksimum kök-projenitör hücre oluşumu beyaz kürenin en düşük noktadan hızla yükselmeye başladığı anda görülür (23).

Kemoterapiyi takiben iyileşme fazında toplanan periferik kan lökositleri GM-CSF den zengindir ve durgun fazdaki lökositlere göre daha hızlı hematopoetik iyileşme sağlarlar. Mobilize kan kök ve projenitör hücreleri de aynı şekilde kemoterapi sonrası daha hızlı nötrofil ve trombosit iyileşmesine neden olurlar.  $CD_{34}^+$  hücre alt grup farklılıkları normal kemik iliği ve periferik kan arasında mevcuttur, ancak iyileşme fazında bu farklılıklar azalır (38).

Mobilizasyon için siklofosfamid (CYC) (25,76,77), Etoposid (2,5,75), İfosfamid (5,75), Paclitaksiel (25), Karboplatin (2,24), Mitoksantron (24), Tiotepa (2), Busulfan (25), Sitozin arabinosid (46), Taksol (2), Melfalan (2), 5-Florourasil (27), Epirubisin (27) gibi kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır.

Bu ajanların hematopoetik hücreler üzerinde farklı etkileri vardır. Sitozin arabinosid primer olarak aktif şekilde siklusta bulunan hücreleri etkiler. Projenitörlerin bir kısmını öldürür, ancak pirimitif kök hücrelere zarar vermez. Siklofosfamid projenitörlerin bir kısmını zarara uğratar, fakat pirimitif kök hücreler üzerinde minimal toksik etkiye sahiptir. Busulfan ise primer olarak pirimitif kök hücreleri etkiler ve onları yok eder. Busulfanın kemik iliğinin mikro çevresi ve pirimitif kök hücre kompartmanı üzerindeki etkileri sürekli. Yetersiz PBSPC mobilizasyonuna neden olur ve artık kullanılmamaktadır (46). Siklofosfamid ve etoposid en efektif mobilizasyonu sağlayıp aynı zamanda minimal toksisite gösteren ajanlardır (2).

Siklofosfamid DNA sentez inhibisyonunu, hücrelerin S fazına girişini önleyerek yapan, alkilleyici bir kemoterapötik ajandır (78). Önceden de belirtildiği gibi özellikle primitif hücrelere fazla zararı yoktur (46). Mobilizasyon etkisini normal kemik iliği endotelial hücre bariyerini parçalayarak gerçekleştirir (46). Kemoterapötik ajanların hepsi rebound iyileşme fazını gerçekleştirmez. Oysa CYC ile hem periferik kanda CFU-GM, CFU-Mix gibi  $CD_{34}^+$  projenitörlerin ve pirimitif kök hücrelerin

düzeyinde yükselme görülür, hem de bu hücrelerin hematopoetik rekonstitusyon kapasiteleri artar (77). Siklofosfamid verildikten 4 gün sonra geçici myelosupresyona neden olur, bunu izleyerek 6. ve 7. günlerde kanda beyaz küre ve kök projenitör hücreler artar. 8. günde hücreler tekrar bazal seviyeye dönerler (46).

Siklofosfamid ile mobilizasyonda doz 1-7 gr/m<sup>2</sup> aralığında tutulur ve intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır (2,28,57,79). Olabilecek yan etkiler ateş, nötropeni, trombositopeni (3-4. günlerde düşmeye başlar ve en düşük seviyeye 7-12. günlerde ulaşır), kemik iliği depresyonu, bulantı, kusma, diare, ürik asid nefropatisi, interstisyel pulmoner fibrozis, hepatit, uygunsuz ADH sekresyonu, azospermi ve hemorajik sistittir. Ancak toksisite minimaldir ve tolere edilebilecek düzeydedir. Siklofosfamid bu özellikleriyle PBSPC mobilizasyonunda tercih edilebilecek efektif bir ajandır (76,77).

Sadece kemoterapötik rejimlerle periferik kanda yeterli düzeyde hücre toplanamayabilir (18,23). Üstelik toksik etkiler bir çoğunda mevcuttur (5,17,23,46). Özellikle son yıllarda allojenik PBSPC transplantasyonunun kemik iliği transplantasyonuna bir alternatif olarak uygulamaya girmesiyle birlikte hematopoetik büyüme faktörleri ön plana çıkmıştır (11,18,58,59).

### **Kök ve Projenitör Hücre Mobilizasyonu Üzerine Hematopoetik Büyüme Faktörlerinin Etkileri:**

Hematopoetik büyüme faktörleri hematopoetik kök ve projenitör hücrelerin proliferasyonunu, diferansiasyonunu ve matür kan hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyen glukoprotein yapısındaki hormonlardır. Bu hormonlar kemik iliğinde projenitör hücrelerden türeyen kolonilerin oluşumunu uyardıkları için orijinal olarak koloni stimule edici faktörler olarak da adlandırılırlar (9,37). Büyüme faktörleri, hücrelerle pluripotent kök hücreden matür sirkülatuar hücrelere diferansiasyon zincirinde değişik düzeylerde ilişki içerisindedirler (9).

Eritroid hücrenin büyümesini etkileyen Epo ilk tanımlanan insan hematopoetik büyüme faktörüdür. Daha sonra GM-CSF, G-CSF, M-CSF ve interlökinler bulunmuştur (9,37).

Her bir büyüme faktörü tek bir gen tarafından kodlanır. Eritropoetin geni 7. kromozonda, GM-CSF, IL-3, M-CSF genleri 5. kromozonun uzun kolunda bulunur. G-CSF geni ise 17. kromozomdadır (9).

T-lenfositler, monositler veya makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlar hematopoetik büyüme faktörlerinin major hücre kaynaklarıdır. Eritropoetinin büyük bir kısmı böbrekte peritübüler hücrelerde, %10-15 ise karaciğerde yapılır. Bu faktörler lokal olarak yapılırlar ve kemik iliğinin ekstrasellüler matriksinde parçalara ayrılırlar (9).

Büyüme faktörlerinin salınımında geçerli model şöyledir (Şekil II). Sentezleyici hücrelerin aktivasyonu sonrası bu mediatörler üretilir. Antijen, lektin veya IL-1'in aktivasyonu ile T Lenfositler GM-CSF, IL-3, IL-5 sentezler. Monositler endotoksinle uyarılma sonrası G-CSF, GM-CSF ve SCF salgılar. Gamma- interferon, IL-3 ve GM-CSF gibi aktive olmuş T lenfosit ürünleri ile uyarıldıktan veya TNF- $\alpha$ 'ya maruz kaldıktan sonra mononükleer fagositlerden M-CSF yapımı artar. M-CSF ayrıca fibroblastlar ve endotelial hücreler tarafından da sentezlenir (9,37). Aktive olmuş monositler tarafından salınan iki sitokin olan TNF- $\alpha$  ve IL-1 fibroblast ve endotelial hücreleri G-CSF ve GM-CSF yapımı için uyarır (9,37).

Hematopoetik büyüme faktörleri biyolojik etkilerini, hedef hücre yüzeyinde bulunan az sayıdaki yüksek afiniteli reseptörlere spesifik olarak bağlanarak gösterirler. Reseptörler nonhematopoetik hücrelerde olduğu kadar hematopoetik hücrelerde de gösterilmiştir (9).

Hematopoetik büyüme faktörlerinin akut myeloblastik lösemideki blastların proliferasyonunu da uyardığı in-vitro olarak gösterilmiştir. Akut myeloblastik lösemili hastalardaki lösemik hücreler yapısal olarak GM-CSF, G-CSF ve M-CSF genleri taşır. Bununla birlikte çok az sayıda lösemi hücresi in-vitro büyümesini sürdürebilmek için yeterli konsantrasyonda bu büyüme faktörlerini üretir ve onlara karşılık verir. Bunun tam aksine in-vitro bu faktörlerle stimülasyondan sonra lösemi hücrelerinin büyümesinin durduğu ve terminal diferansiasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir (9).

Hematopoetik büyüme faktörlerinin hematopoetik sistem dışında da rolleri vardır. Bunların normal kemik iliği fibroblastları, endotelial hücreler ve solid tümör hücrelerinin büyümesini ve fonksiyonunu in-vitro uyardığı gösterilmiştir. Mesela GM-CSF ve G-CSF endotelial hücrelerinin

göçünü ve proliferasyonunu arttırır. Bu hücrelerin üzerinde her iki faktör için yüksek afiniteli bağlanma noktaları vardır (9,37).

Hematopoetik büyüme faktörleri klinikte özellikle kemoterapinin myelotoksik etkisini hafifletmekte etkilidirler. Mortalite ve morbiditeyi azaltır ve optimal dozun uygulanmasına fırsat tanır (9,46). Ayrıca kemik iliği, PBSPC ve umbilikal kord kanı transplantasyonundan sonra hematopoezin iyileştirilmesinde kullanılırlar. Son yıllarda ise hematopoetik büyüme faktörleri PBSPC morbilizasyonunda uygulama alanına girmiştir (3,6,9,46). Büyüme faktörleri bazı durumlarda lösemik hücrelerin proliferasyonunu uyarırlar ve bu lösemik hücrelerin S fazına geçişlerini hızlandırarak kemoterapötik ajanlara karşı olan duyarlılıklarını arttırırlar. Ayrıca bazı kök hücrelerini daha az ilaç sensitif olan yavaş veya nonsiklik faza sokabilirler (9).

Rekombinant human granülosit koloni stimüle edici faktör (Rh G-GSF) E.Coli tarafından yapılan ve kromotografik basamaklı serilerde saflaştırılan 18,6 kilodalton molekül ağırlığında glikozillenmemiş, 174 aminoasitlik tek zincirli bir polipeptiddir (28). Onkohematolojide en çok kullanılan ve üzerinde en fazla çalışılan sitokinlerden birisidir (59). Tolere edilebilir yan etkileriyle rutin olarak kullanılan en uygun büyüme faktörüdür (18,37).

Klinikte hematolojik cevap özellikle matür nötrofil sayısında belirgin artış şeklindedir (37,80). Dolayısıyla kemoterapi sonrası hem nötropenin derinliği ve süresi, hem de febril episodların görülme sıklığı azalır. Bunun sonucunda uzun süreli antibiyotik tedavisine ihtiyaç duyulmaz ve hastanede kalış süresi kısalmır (37). Periferik kan hücrelerindeki artış, kemik iliği selülaritesindeki ve myeloid/eritroid hücre oranındaki artış ile birlikte izlenmektedir (9).

G-CSF'ün yüksek dozlarında diğer hücre serilerinde de artış gözlenir (3,9,37). Kandaki diğer projenitör türlerinin artış mekanizması belli değildir. G-CSF'ün oldukça immatür hücreler olan CFU-blast'ları etkilediği gösterilmiş, megakaryositik ve eritroid projenitörlerin bu hücrelerden oluştuğu düşünülmüştür (37). Ayrıca G-CSF ile tedavi edilen bazı hastalarda hızlı trombosit iyileşmesi gözlenmesine rağmen kanda CFU-Meg tespit edilememiştir. Ancak non-proliferatif endomitotik megakaryositik



prekürsörler bu hastalarda saptanmıştır. Bu prekürsörlerin G-CSF verilmesi sonrası endojen olarak sentezlenmiş IL-6 ve LIF (lösemi inhibe edici faktör) gibi sitokinlerle uyarıldığı ileri sürülmüştür (75).

G-CSF ile mobilize edilen kanda  $CD_{34}^+$  hücrelere ek olarak fazla sayıda myeloid projenitör hücre de bulunur. Buna ek olarak pirimitif kök hücreleri de artmış ve kemik iliğindeki düzeylerine yaklaşmıştır (31,37,45). Ayrıca mobilize olan hücrelerin klonojenik kapasiteleri oldukça fazladır ve oluşan koloniler kemik iliğindeki diğerden çok daha büyüktür, neredeyse gözle görülebilecek büyüklüğe erişmiştir (22,24,31).

G-CSF ile mobilize kanda matür nötrofiller, projenitörler ve kök hücrelerin artışına ek olarak lenfosit alt gruplarının da etkilendiği görülür. Absolüt T lenfosit sayısı, absolüt monosit sayısı, doğal öldürücü hücreler,  $T_4$  ve  $T_8$  hücre sayıları da artar. Bunu endojen sitokinleri etkileyip lenfosit yüzeyindeki adhezyon moleküllerinin üretimini değiştirmekle gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (59). G-CSF ile mobilizasyonda periferik kanda  $CD_{34}^+$  hücreler 5. ile 6.günlerde pik yaparlar (3,18,22,69). Özellikle projenitörlerde yaklaşık 100 kat artış saptanmıştır (37,69).

G-CSF hem kanser hastalarında, hem de allojenik transplantasyon için sağlıklı kişilerde PBSPC mobilizasyonunda kullanılır (3). Klinik uygulamalarda 5-16  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$  dozlarında verilir. Mobilize ettiği  $CD_{34}^+$  hücre sayısı açısından bireyler arasında da önemli farklılıklar vardır. Daha yüksek dozlarda artış olmaz, ancak toksik etkilerde minimal artışlar gözlenebilir (13,19,22). En sık görülen yan etkisi kemik ağrısı ve myaljidir. Nadir olarak hipotansiyon, splenomegali, egzema ve vaskülit gibi istenmeyen etkiler bildirilmiştir (18,19,59). Ancak sağlıklı kişilerde G-CSF verilmesinden 6-12 gün sonra trombosit sayısının geçici olarak azaldığı görülür. Lökoferez uygulamaları da ek olarak trombosit kaybına neden olur. Genelde yüksek dozlarda görülen bu geçici trombositopeninin mekanizması pek anlaşılamamıştır. Genişleyen granülopoezin trombopoezi suprese ettiği düşünülmektedir (18,19). G-CSF ile ayrıca ilk 30 dakika içerisinde geçici lökopeni, lökosit alkalin fosfatada ve laktik dehidrogenazda artış görülebilir (9). Hem sağlıklı kişilerde, hem de neoplastik vakalarda uzun süreli yan etki tanımlanmamıştır. Uzun süreli kemik iliği analizlerinde ne morfolojik ne de sitogenetik anomali

gözlenmemiştir (18). Mobilizasyon etkinliği G-CSF'ün dozuna bağlıdır. Sağlıklı donör PBSPC'si ile hematolojik ve nonhematolojik malignensili hastalardan elde edilen otolog PBSPC arasında CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre sayısı açısından büyük farklılıklar yoktur. Ek olarak fazla sayıda hücre toplanabildiği için bir tek lökoferez uygulaması yeterli olabilir (18,19).

Diğer bir sık kullanılan büyüme faktörü olan GM-CSF'ün mobilizasyon etkinliği G-CSF'e yakın olsa da toksisitesi daha fazladır (18). Ateş, myalji, artralji, anoreksi, transaminazlarda yükselme, enjeksiyon yerinde lokalize döküntü yapar. Bunlar tolere edilebilen yan etkilerdir. Daha yüksek dozlarda kapiller sızma sendromu, plevral, perikardiyal efüzyonlar, asit, büyük damar trombozu görülebilir (9). İlk doz reaksiyonu olarak ise hipotansiyon, hipoksi bildirilmiştir. GM-CSF'ün kısa süreli intravenöz infüzyonu özellikle yüksek dozlarda ilk doz reaksiyonu, karaciğer toksisitesi ve ateşe neden olur. Bu nedenle subkutan enjeksiyon, sürekli intravenöz infüzyon veya 6 saatlik intravenöz infüzyon tercih edilmelidir (62).

## **Kök ve Projenitör Hücre Mobilizasyonu Üzerine**

### **Kortikosteroidlerin Etkileri:**

Kortikosteroidler adrenal bezin korteksinde, zona fasikülata tabakasında sentez edilen steroid halkasından oluşmuş bileşiklerdir. Sentezleri ve salınımları ACTH tarafından kontrol edilir. Karbonhidrat, protein, yağ metabolizmasına etkileri, antiinflamatuvar ve immunosupresif etkileri yanında hematopoetik, santral sinir sistemi, böbrekler, kardio vasküler sistem, kemikler ve kalsiyum metabolizması ile çizgili kaslar üzerine de etkileri vardır (81).

Hematopoetik hücreler üzerinde oldukça kompleks bir etkiye sahip olan kortikosteroidlerin kök ve projenitör hücre mobilizasyonu üzerindeki etkileri henüz yeterince anlaşılammıştır. Hematopoetik büyüme faktörleri mobilizasyonda oldukça etkin ajanlardır, ancak hem elde edilimi zordur, hem de maliyeti yüksektir. Bu durum PBSPC mobilizasyonlarına ek bir destek olarak glukokortikoidlere karşı ilgiyi arttırmıştır. Yüksek doz metil prednizolon (YDMP) özellikle çocuklarda relatif olarak ucuz ve kolay uygulanabilir bir tedavi şeklidir. Aplastik anemili hastalarda hemoglobin,

beyaz küre, trombosit değerlerini yükseltir, kemik iliği selülaritesini normal seviyesine getirir ve hematopoezde tam bir restorasyon sağlayabilir (30). Tedaviyle CFU-GM'lerin normal değerlere çıktığı bildirilmiştir. Hematopoezi hem immunosupresif etkiyle hem de koloni stimülatör aktiviteyi uyararak iyileştirdiği düşünülmektedir (30,82). Deksametazonun koloni stimülatör aktivite üzerinde uyarıcı etkilerinin olması (83) ve hidrokortizon ile sağlıklı kişilerde CFU-GM'lerin proliferasyonunun artması bu düşünceyi desteklemektedir (42). Hidrokortizonun bu etkilerini potansiyel koloni inhibitörleri olan interferon, ferritin, laktoferrin, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  gibi moleküllerin bir veya daha fazlasının üretimini inhibe etmek yolu ile gerçekleştirdiği belirtilmiştir (42).

YDMP'nun akut lenfoblastik lösemili hastalarda lökositlerin kemik iliğinde yapımını hızlandırdığı (84) ve akut lösemili hastalarda direkt toksik etkinin yanısıra myeloblastların ve lenfoblastların matür granülositlere diferansiasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (84-91). Metil prednizolonun endojen GM-CSF düzeyini arttırarak hematopoezi restore ettiği ve diferansiasyonu gerçekleştirdiği düşünülmektedir (91). Prednizolon ve deksametazon da güçlü differansiye edici ajanlardır (85). Yine YDMP'nun akut lösemili çocuk hastalarda kemik iliğinde CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre proliferasyonunu endojen büyüme faktör üretimini uyararak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (33). Ayrıca normal hematopoezi inhibe eden lösemi ile ilişkili inhibitörler üzerine supresif etkisi de vardır (33). ALL ve AML'li hastalarda metil prednizolonun periferik kan CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücreleri arttırdığı geçtiğimiz yıllarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (29).

## MATERYAL ve METOD

Kemik iliğinden periferik kana kök ve projenitör hücre mobilizasyonu üzerine YDMP, G-CSF ve her ikisinin birlikte kullanımının etkinliğini araştırmak amacı ile yapılan bu çalışmanın deney aşaması KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada 37 adet Yeni Zelanda cinsi beyaz tavşan kullanıldı. Tavşanlar Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara Tavukçuluk Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Tavşanları beslemek için Samsun Yem Sanayii'nde üretilen yem kullanıldı. Denekler 2850-3300 gr ağırlındaydı (ortalama 3050 gr).

İnsanlarda periferik kanda  $CD_{34}^+$  hücre oranı %0.05-0.5 arasındadır ve flow cytometry ile %0.1'in altındaki değerler ölçülememektedir (2). Çalışmada önce herhangi bir mobilize edici ajan verilmeden rastgele seçilmiş bir kaç tavşanda periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre oranları ölçüldü ve FCM ile saptanabilecek değerler elde edilemedi. Bu nedenle kemik iliği kök ve projenitör hücreleri üzerinde bir kemoterapötik ajan ile uyarım sağlandı. Bunun için bütün tavşanlara siklofosfamid  $1\text{gr}/\text{m}^2$  intravenöz (iv) 30 dakika süre içerisinde infüzyon şeklinde tek doz olarak verildi. Siklofosfamid verilişinden 5 gün sonra periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre oranı FCM ile ölçüldü. Elde edilen edilen bu  $CD_{34}^+$  hücre değerleri başlangıç değerleri olarak alınıp denekler dört gruba ayrıldı ve siklofosfomid verildikten 5 gün sonra gruplara diğer mobilize edici ajanlar verilmeye başlandı. Deneklerin gruplara göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Deneklerin gruplara göre dağılımı:

Grup 1 (G <sub>1</sub> )	:	7 tavşana serum fizyolojik (SF) 1 cc/kg/gün iv puşe (Kontrol grubu) şeklinde 1 dakika süre içerisinde 7 gün verildi.
Grup 2 (G <sub>2</sub> )	:	10 tavşana MP 30 mg/kg/gün tek doz sabah 9:00'dan önce iv puşe şeklinde 10 dakika süre içerisinde 7 gün verildi.
Grup 3 (G <sub>3</sub> )	:	10 tavşana G-CSF 5 µg/kg/gün tek doz iv infüzyon şeklinde 30 dakika süre içerisinde 7 gün verildi.
Grup 4 (G <sub>4</sub> )	:	10 tavşana MP 30 mg/kg/gün tek doz sabah 9:00'dan önce iv puşe şeklinde 10 dakika süre içerisinde ve G-CSF 5 µg/kg/gün tek doz iv infüzyon şeklinde 30 dakika süre içerisinde ardışık olarak 7 gün verildi.

Tüm gruplarda 8. Gün FCM ile CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre oranları ölçüldü.

Bu çalışmadaki FCM analizleri KTÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve **Coulter Epics Elite FCS Flowcytometry** cihazı kullanıldı. Her bir CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hücre oranı ölçümü için deneklerden 2 cc venöz kan alındı ve EDTA içeren tüplere konuldu. 5 cc kapasiteli diğer bir plastik tüpün içerisine CD<sub>34</sub> monoklonal antikorundan (Phycoerythrin, Kat. No: Immunotech 1145-08.1, U.S.A.) 20 µl konularak üzerine 100 µl venöz kan eklendi ve mikserde karıştırıldı. Bu şekilde 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen materyal **Coulter Multi-Q-Prep** cihazından geçirildi. İşlem sırasında bu cihazda numüne sırayla otomatik olarak immunoprep A (formik asid; stabilizer), immunoprep B (sodyum karbonat, sodyum klorid, sodyum sülfat; stabilizer) ve İmmunoprep C (paraformaldehid; tampon) ile muamele edildi. Tekrar 20 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübasyonu sağlandı. İşlem sonunda nünuneler analiz için hazır hale geldi ve FCM cihazına verildi. Her bir test için gerekli 100 µl venöz kan en az 5000 /mm<sup>3</sup> lökosit içermekteydi.

**İstatistiksel Deęerlendirme:**

Verilerin istatistiksel analizinde, gruplar parametrik varsayımları yerine getiremediğinden dört grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Waryans analizi kullanıldı. Farklı iki grubun karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testinden ve aynı gruplar içerisindeki karşılaştırmalarda ise Wilcoxon Rank Sam testinden yararlanıldı (92). Grupların aritmetik ortalamalarının minimum ve maksimum değerleri arasında farklılık olması nedeniyle verilerin sonuçları aritmetik ortalama (Arit. ort) $\pm$ standart hata (SH) olarak hesaplandı.

## BULGULAR

Deneklere CYC, SF, YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra periferik kanda tespit edilen  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri aşağıda sunulmuştur.

### Periferik Kan $CD_{34}^+$ Hücre Yüzdeleri:

Başlangıç değerlerini elde etmek için CYC verildikten 5 gün sonra elde edilen periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri açısından dört grup arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ( $P=0,939038$ ) (Tablo 2).

**Tablo 2:** Grupların CYC verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri

<i>CD<sub>34</sub><sup>+</sup> Hücre Yüzdeleri (%)</i>			
	Arit.Ort.±SH	Minimum	Maksimum
G <sub>1</sub>	2.01±0.76	0.1	4.5
G <sub>2</sub>	1.82±0.38	0.3	4.1
G <sub>3</sub>	1.79±0.62	0.3	6.8
G <sub>4</sub>	1.86±0.65	0.2	7

Gruplara SF, YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra elde edilen periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri açısından dört grup arasında anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ( $P=0.002599$ ) (Tablo 3). Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için grupların ortalama  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri kendi aralarında karşılaştırıldı.

**Tablo 3:** Gruplara SF, YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri.

<i>CD<sub>34</sub><sup>+</sup> Hücre Yüzdeleri (%)</i>			
	Arit.Ort.±SH	Minimum	Maksimum
G <sub>1</sub>	1.21±0.48	0.1	3.1
G <sub>2</sub>	4.17±0.53	2.2	7.1
G <sub>3</sub>	8.37±2.40	1.5	28.6
G <sub>4</sub>	3.67±0.72	0.3	7.2

$$G_1-G_2 \rightarrow P=0.005357$$

$$G_2-G_3 \rightarrow P=0.0694$$

$$G_1-G_3 \rightarrow P=0.003376$$

$$G_2-G_4 \rightarrow P=0.54489$$

$$G_1-G_4 \rightarrow P=0.03148$$

$$G_3-G_4 \rightarrow P=0.0450735$$

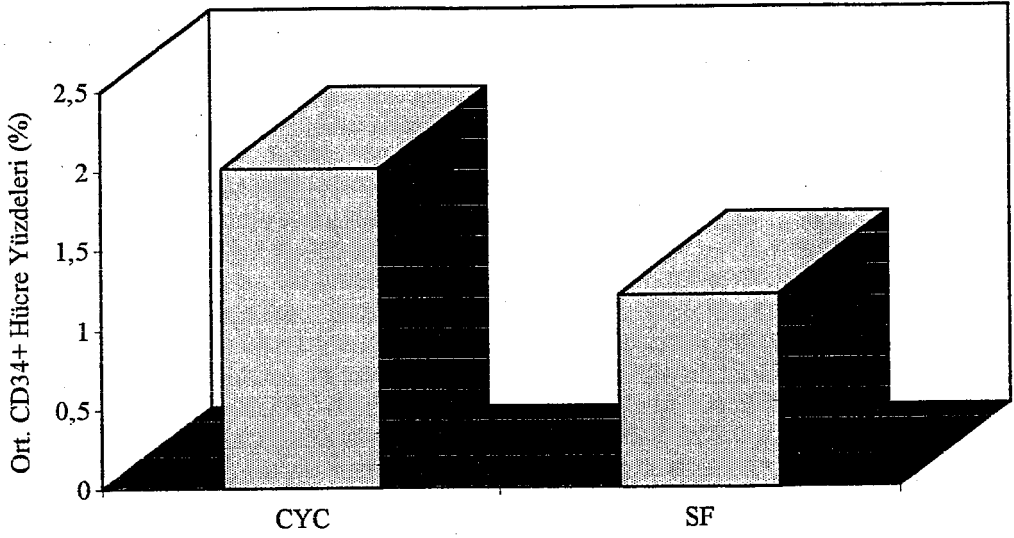
SF verilen kontrol grubu (G<sub>1</sub>) ile YDMP (G<sub>2</sub>), G-CSF (G<sub>3</sub>) ve YDMP ile G-CSF (G<sub>4</sub>) ardışık verilen gruplar karşılaştırıldığında  $CD_{34}^+$  hücre yüzdesinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir (P<0.05).

Daha sonra G<sub>1</sub> haricinde diğer üç grup kendi aralarında ayrı ayrı karşılaştırıldı. G<sub>2</sub> ile G<sub>3</sub> ve G<sub>2</sub> ile G<sub>4</sub> arasında  $CD_{34}^+$  hücre artışı açısından anlamlı bir fark bulunmadı (P>0.05). G<sub>2</sub> ile G<sub>3</sub> arasında  $CD_{34}^+$  hücre artışı açısından istatistiksel olarak fark bulunmamakla birlikte, G<sub>3</sub>'de G<sub>2</sub>'ye oranla daha fazla bir  $CD_{34}^+$  hücre artışı mevcuttu. Ancak G<sub>3</sub> ile G<sub>4</sub> karşılaştırıldığında G<sub>3</sub>'deki  $CD_{34}^+$  hücre artışının G<sub>4</sub>'deki artışa oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlemlendi (P<0.05).

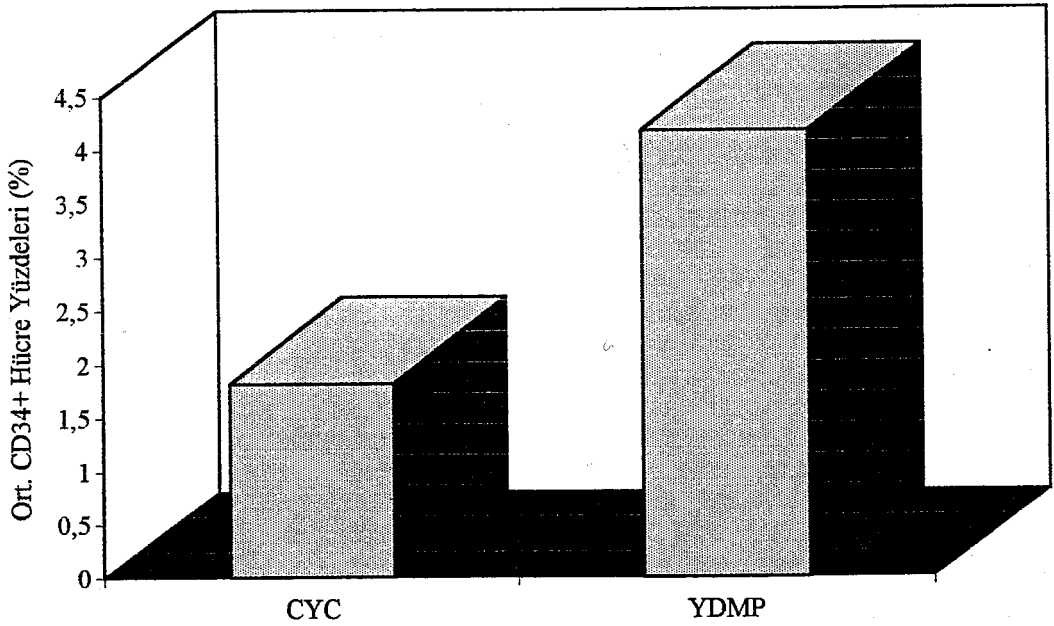
Bütün deneklere CYC verildikten 5 gün sonra elde edilen  $CD_{34}^+$  hücre değerleri ile bundan sonra SF, YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten 7 gün sonra elde edilen  $CD_{34}^+$  hücre değerleri Şekil 3,4,5 ve 6'da görülmektedir.



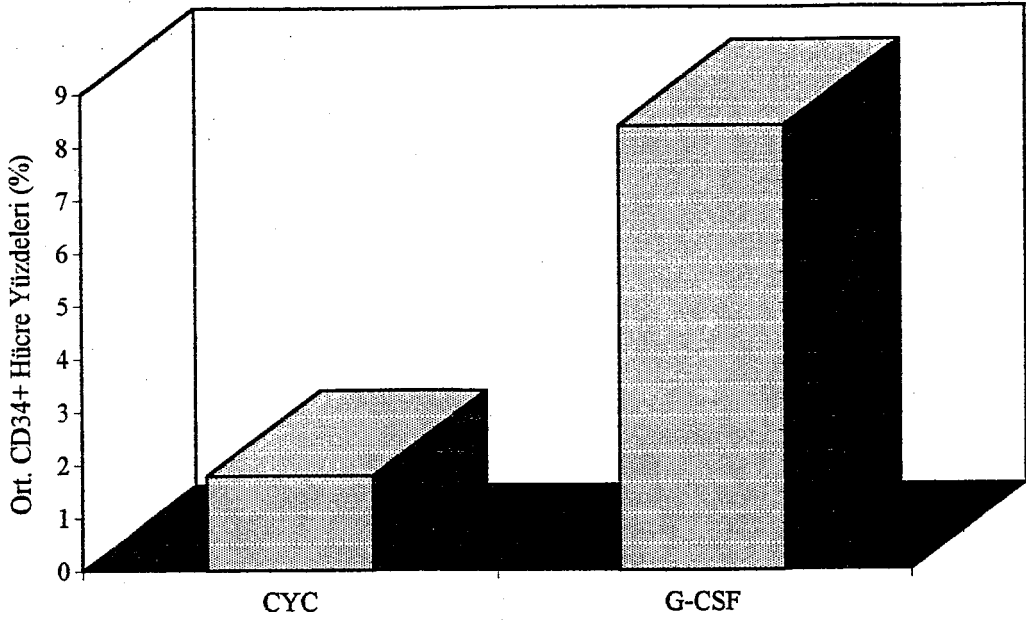
Şekil 3: Deneklere CYC ve SF verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri



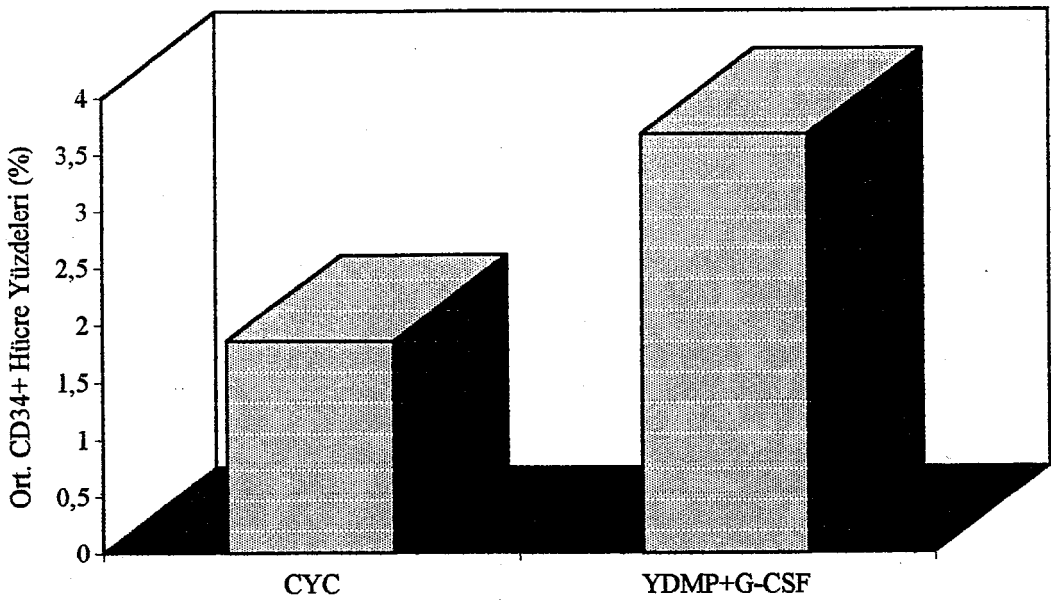
Şekil 4: Deneklere CYC ve YDMP verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri



Şekil 5: Deneklere CYC ve G-CSF verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri



Şekil 6: Deneklere CYC ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri



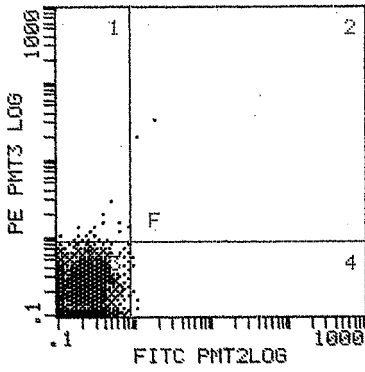
Tüm gruplar CYC verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri ile SF, YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri açısından ayrı ayrı karşılaştırıldı.  $G_1$ 'de iki değer arasında anlamlı bir farklılık bulunamazken ( $P>0.05$ ).  $G_2$ ,  $G_3$  ve  $G_4$ 'te  $CD_{34}^+$  hücre yüzdelerinin anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ( $P<0.005$ ).

Deneklere CYC ve SF, YDMP, G-CSF, YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdelerindeki değişiklikler Tablo 4'te gösterilmektedir.

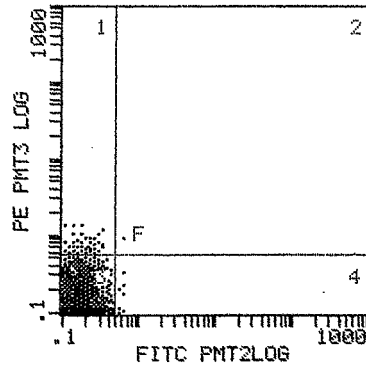
**Tablo 4:** Gruplara CYC ve SF, YDMP, G-CSF, YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri.

<i>CD<sub>34</sub><sup>+</sup> Hücre Yüzdeleri (%)</i>							
$G_1$		$G_2$		$G_3$		$G_4$	
<u>Arit.Ort±SH</u>		<u>Arit.Ort±SH</u>		<u>Arit.Ort±SH</u>		<u>Arit.Ort±SH</u>	
CYC	SF	CYC	YDMP	CYC	G-CSF	CYC	YDMP+ G-CSF
2.01±0.76	1.21±0.48	1.82±0.38	4.17±0.53	1.79±0.62	8.37±2.40	1.86±0.65	3.67±0.72
P=0.13057		P=0.004427		P=0.004426		P=0.004832	

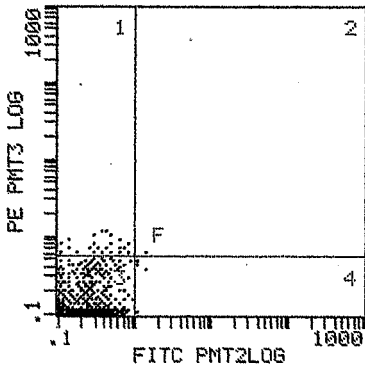
Farklı gruplardaki deneklerde  $CD_{34}^+$  hücre oranlarının FCM histogramları aşağıda gösterilmiştir.



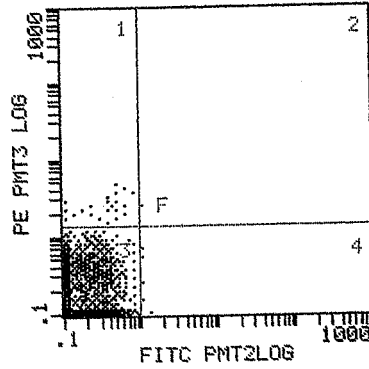
Şekil 7:  $G_1$ 'deki deneklerden birisinin SF sonrası histogram örneği ( $CD_{34}^+$  %1.5)



Şekil 8:  $G_2$ 'deki deneklerden birisinin YDMP sonrası histogram örneği ( $CD_{34}^+$  %6.4)



Şekil 9:  $G_3$ 'deki deneklerden birisinin G-CSF sonrası histogram örneği ( $CD_{34}^+$  %9.1)



Şekil 10:  $G_4$ 'deki deneklerden birisinin YDMP+G-CSF sonrası histogram örneği ( $CD_{34}^+$  %3.3)

Çalışmada hematopoetik kök ve ana hücreleri tespit etmek için  $CD_{34}$  Multipotent Kök Hücre [Phycoerythrin (PE)] Monoklonal Antikorları kullanıldı.

## TARTIŞMA

PBSPC transplantasyonu, son yıllarda artan bir hızla solid tümörler ve hematolojik malign hastalıkların tedavisinde kemik iliği transplantasyonuna bir alternatif olarak kullanılmaktadır (16-20). PBSPC mobilize etmek için en etkili yöntemin kemoterapi ve hematopoetik büyüme faktör kombinasyonu olduğu bildirilmiştir (2,16,17,23,28). Burada ideal olan düşük doz kemoterapi ile bu kombinasyonun sağlanmasıdır (23). Kemoterapötik ajanın ve hematopoetik büyüme faktörünün PBSPC mobilizasyon kinetiğinin işleminde ve hematopoezin iyileşmesinde sinerjik olarak hareket ettiği gösterilmiştir (17). Bu mobilizasyon metodunda kemoterapötik ajan ile malign hücreler minimuma indirgenirken (17), aynı zamanda büyüme faktörü ile oldukça hızlı bir immun fonksiyon, trombosit ve nötrofil iyileşmesi elde edilmektedir (16,17,46). CYC ve G-CSF bu kombinasyonda en sık tercih edilen ajanlardır (26,46). Kemik iliğine olan toksik etkileri ve periferik kana yetersiz sayıda hücre mobilize etmeleri nedeniyle PBSPC mobilizasyonunda tek başına kemoterapötik ajanların kullanımı tercih edilmemektedir (46,68). Bu çalışmada CYC, YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF kombine kullanılarak farklı oranlarda PBSPC mobilizasyonu sağlandı.

Son bir kaç yıldır uygulamaya giren allojenik PBSPC transplantasyonunda hematopoetik büyüme faktörleri kullanılmaktadır (18,22,59). Ancak bu faktörlerin hem elde edilmesi zordur, hem de maliyeti oldukça yüksektir (30). Bu durum araştırmacıları yeni mobilize edici ajanlar bulmaya yöneltmiştir. Kortikosteroidler bunlara bir örnektir. Hematopoetik hücreler üzerinde oldukça kompleks bir etkiye sahip olan kortikosteroidlerin kök ve projenitör hücre mobilizasyonu üzerindeki

etkileri henüz yeterince anlaşılmamıştır. Yüksek doz metil prednizolon tedavisi yakın zamanda lösemili hastalarda denenmiş ve kemik iliği  $CD_{34}^+$  hücre proliferasyon ve mobilizasyonunu, dolayısıyla periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre sayısını arttırdığı görülmüştür (29,33). Bu etkisini endojen hematopoetik büyüme faktörü salınımını uyararak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (33). Tuncer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada YDMP tedavisi ile GM-CSF salınımının ve buna bağlı olarak koloni sitümüle edici aktivitenin arttığı (91), bir başka çalışmada ise aynı tedavi metoduyla serumda hem G-CSF, hem de GM-CSF düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (93). Ancak YDMP şimdiye kadar allojenik PBSPC transplantasyonunda periferik  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunu sağlamak için hiç kullanılmamıştır.

Bizim yaptığımız bu araştırmada YDMP ilk defa sağlıklı deneklerde hematopoetik kök ve projenitör hücre mobilizasyonunda kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda periferik kanda  $CD_{34}^+$  hücrelerin G-CSF ile mobilize edildiğinde 5 ile 6. günlerde (18), MP ile mobilize edildiğinde ise 7. günde pik yaptıkları tespit edilmiş olduğundan deneklere ilaçlar 7 gün süre ile verilmiş ve 8. gün bütün tavşanlarda FCM ile  $CD_{34}^+$  hücre oranları ölçülmüştür. Çalışmanın sonucunda bir hematopoetik büyüme faktörü olan G-CSF'ün kullanılan diğer ajanlara oranla periferik kana daha fazla  $CD_{34}^+$  hücre mobilize ettiği görülmüştür. İlginç olarak YDMP ile G-CSF'ün ardışık kullanıldığı  $G_4$  grubundaki periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre artışının G-CSF'ün tek başına kullanıldığı  $G_3$  grubundaki  $CD_{34}^+$  hücre artışından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Bu durum daha önce yapılan çalışmalardaki YDMP'un endojen G-CSF ve GM-CSF salınımı uyararak periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre sayısını arttırdığı yönündeki görüşlere ters düşmektedir (29). Bizim sonuçlarımız, YDMP ile eksojen verilen G-CSF'in hematopoetik kök-projenitör hücre proliferasyon ve mobilizasyonunda sinerjik olarak hareket etmediği izlenimini vermektedir.

Her ne kadar bu çalışmada G-CSF ve YDMP birbirlerine sinerjik etki göstermemelerine rağmen tek başına YDMP tedavisi  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunu efektif olarak sağlamış ve G-CSF hematopoetik hücre mobilizasyonunda YDMP'na oranla daha etkili görünse de, bu artış

istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). YDMP ile tedavide klinik olarak yan etkilerin tolere edilebilir düzeyde olduğu ve hipertansiyon, akne, buffalo hörgücü, hiperglisemi, depresyon gibi etkilerin nadiren görüldüğü bildirilmiştir (30,89). YDMP'un hematopoetik büyüme faktörüne oranla daha ucuz ve kolay elde edilebilir bir ajan olması PBSPC transplantasyonuna ek bir destek sağlayacak gibi görünmektedir. Bizim araştırmamızda tek doz YDMP'un maliyeti, tek doz G-CSF'ün maliyetine oranla daha ucuz bulunmuştur.

Siklofosfamid en güvenilir ve etkili mobilize edici kemoterapoetik ajan olarak bilirse de yaptığımız bu çalışmada  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunda tek başına kullanıldığında yeterince efektif bulunamamıştır. CYC için hematopoetik hücre mobilize edici doz literatürde  $1-7 \text{ gr/m}^2$  olarak bildirilmesine rağmen, çalışmada deneklerin hematopoetik sistemini bu kemoterapötik ajanın toksik etkilerinden korumak amacıyla en düşük doz olan  $1 \text{ gr/m}^2$  tercih edilmiştir. CYC verildikten sonra periferik kanda tespit edilen  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri YDMP, G-CSF ve YDMP ile G-CSF ardışık verildikten sonra ayrı ayrı periferik kanda tespit edilen  $CD_{34}^+$  hücre yüzdelerinden anlamlı derecede düşüktü ( $P<0.005$ ). Bu sonuçlar PBSPC elde etmek için tek başına CYC'nin yetersiz olduğunu veya uygulanan  $1 \text{ gr/m}^2$ 'lik düşük dozun efektif bir mobilize edici doz olmadığını ve CYC verildikten sonra hematopoetik büyüme faktörlerinin de verilmesi gerektiğini bir kez daha ortaya koymuştur. Sonuç olarak bu araştırmada istatistiksel olarak anlamlı olmasa da periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre artışında en büyük etkiye bir hematopoetik büyüme faktörü olan G-CSF'ün sahip olduğu gözlenmiştir.

Son yapılan çalışmalarda G-CSF verilmesi ile periferik kanda  $CD_{34}^+$  hücre sayısının artışının sadece kemik iliğindeki hücrelerin proliferasyon ve mobilizasyonuna bağlı olmadığı, G-CSF'nin periferik kanda yerleşik şekilde bulunan  $CD_{34}^+$  hücreleri apoptozisten koruyarak bu hücrelerin yaşam sürelerini uzattığı bildirilmiştir (94). Kemik iliğinde bulunan  $CD_{34}^+$  hücreler, kemik iliği stroması ile temas etmesi ve lokal mikro çevre tarafından üretilen büyüme faktörlerinin etkisi ile apoptozisten korunur. G-CSF verilmesi ile kemik iliğindeki bu ortama benzer şekilde periferik kanda bir mikro çevre oluşur ve  $CD_{34}^+$  hücrelerinin apoptozis oranı azalır.

Apopitozisteki bu azalış sadece  $CD_{34}^+$  hücelere sınırlıdır, diğler hüceler gruplarında bu etki görülmemiştir. Ancak yine de malign hücelerde apopitozisin süpresyonunun malign transformasyonla sonlanacağı riski açısından dikkatli olunmalıdır (94).

Son yıllarda mobilizasyon rejimlerine bir yenilik olarak hematopoetik büyüme faktörlerinin kombinasyonu üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda SCF (kök hüceler faktörü) ile G-CSF, IL-3 ile G-CSF ve GM-CSF ile G-CSF'ün ardışık kullanımından bahsedilmektedir (6). Özellikle SCF ile G-CSF kombinasyonu sıklıkla tercih edilmekte ve  $CD_{34}^+$  hüceler mobilizasyonunda her iki faktörün tek başına kullanımından daha etkili olduğu ve daha hızlı bir hematopoetik iyileşme sağladığı belirtilmektedir (6,12). IL-3-GM-CSF füzyon proteini (PIXY-321), genetik manuplasyonlar sonucunda elde edilmiş bir büyüme faktör kombinasyon örneğidir (2).

Bu verilerin ışığında PBSPC transplantasyonunun hızla kemik iliği transplantasyonunun yerini aldığı görülmektedir (18,19). Özellikle  $CD_{34}^+$  hücelerin pozitif seleksiyonu tam kan lökoferez ürünlerine oranla daha hızlı bir hematopoetik iyileşme sağlar ve malign hüceler ile T hüceler sayısını önemli ölçüde azaltır (14,67). Ek olarak bu konsantre ürünlerin küçük volümleri, onların dondurularak saklanması büyük kolaylık sağlar (67). Dondurulup infüzyon öncesi yeniden çözünen hücelerin kendini yenileme ve proliferasyon kapasitesinin tam ve sürekli olduğu gözlenmiştir (11,67).  $CD_{34}^+$  hücelerin seleksiyonu yöntemi ile lizis olmuş hücelerin, debrisin ve krioprotektanların azalmış volumüne bağlı olarak muhtemel yan etkilerden korunmuş olur. Bu tip uygulamalarda transplantasyon sonrası büyüme faktör ilavesine ihtiyaç duyulmayabilir (67).

Lökoferez uygulamalarının maliyeti kemik iliği aspirasyon yöntemine oranla daha yüksek olsa da uygulanan bu gelişmiş yöntemler ile her bir transplantasyonda sadece tek bir lökoferez girişimiyle yeterli miktarda ürün toplanabilir ve bu maliyeti kısmen düşürür (2). Ayrıca daha hızlı hematolojik iyileşme sayesinde hastanede kalma süresi kısalmır, antibiyotik kullanımı, destek tedavi ihtiyacı azalmır. Bu durum PBSPC transplantasyonunu daha ucuz bir uygulama haline getirir (2,22,23).



Bütün bu gelişmiş uygulamalara rağmen, önceden uygulanmış aşırı kemoterapi nedeniyle bazı hastalardan yeterli miktarda PBSPC mobilize edilememektedir (20,28). Kemik iliği rezervleri oldukça yetersiz olan bu hastalardan  $CD_{34}^+$  hücrelerinin küçük bir miktarı alınarak, bunların proliferasyonunu ve kendini yenileme kapasitesini arttırabilen sitokinlerle ex-vivo inkübe edilmesi sonunda infüzyon için yeterli sayı ve kapasitede ürün elde edilebilir (2,14,20,95). Bu şekilde ürünler tümör hücreleri ve T lenfositlerden arındırılmış olur (4,14). Ex-vivo kültürlerde  $CD_{34}^+$  hücreler 1-2 hafta sonra en az 50 katı kadar çoğaltılabilir ve böylece bir kaç hücreden tüm hematopoetik sistemi yenileyecek miktarda ürün sağlanabilir (4). Kemirgenler ile yapılan çalışmalarda 30 LTCIC'nin uzun süreli rekonstitusyon için yeterli olduğu gösterilmiştir. İnsanlar için bu sayının maksimum 30.000 olduğu belirtilmiştir (14).

Araştırmacılar son yıllarda intrauterin hematopoetik kök projenitör hücrelerin transplantasyonun uygulanabileceğini gösterdiler. Burada yine pozitif seçilmiş  $CD_{34}^+$  hücreleri kullanılmakta ve fetusun boyutlarının küçüklüğü nedeniyle çok düşük volümler yeterli olmaktadır (4).

Günümüzde  $CD_{34}^+$  hücreler artık gen terapisinde denenmektedir (4,96). Pozitif seleksiyon yöntemiyle elde edilmiş bu hücrelere multipl ilaç rezinstans geninin retroviral transferinin kemoterapötik ilaçların myelotoksik etkilerinden kemik iliğini koruyabileceği ifade edilmiştir (97). Erken çalışmalarda hematopoetik hücrelere rekombinant retroviral vektör ile transfer edilmiş neomisin fosfotransferaz geni kullanılmış ve hematopoezin gelişimsel kapasitesi bu şekilde aydınlatılmaya çalışılmıştır (98). Gen tedavisinde ilk çalışmalar bir takım hematolojik olmayan konjenital hastalıklar üzerindedir. Artık bu tedavi yöntemi malignensili ve immun yetmezlikli hastalar üzerinde denenmektedir (98). Son bir kaç yıldır araştırmacılar gen transferi için  $CD_{34}^+$  hücre popülasyonunu kullanmaktadırlar ve bu hücrelerin gen tedavisi için ideal hedefler olduğu belirtilmiştir (23,98).

Bütün bu ilerlemeler sonucunda bir kaç yıl içerisinde sadece kemik iliği transplantasyonu değil, PBSPC transplantasyonu için kullanılan lökoferez uygulamaları da tarihe karışacak gibi görünmektedir (2). Hastalardan, hematopoetik iyileşmeyi desteklemek için daha sonra kullanılmak üzere sadece bir kaç hücre alınıp ex-vivo çoğaltılabilecek (2,4,14) ve aynı zamanda

bu hürelere gen transferi uygulanabilecektir (4,96-98). Onkohematolojide bu konu üzerine çalışmalar hızla ilerlemektedir ve görüldüğü gibi PBSPC transplantasyonu oldukça ilgi çekici bir uygulama şeklidir. Elde edilen  $CD_{34}^{+}$  hücrelerin transplantasyonu kemik iliği transplantasyonuna bir alternatif olabileceği gibi, aynı zamanda aplastik anemi, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, myelodisplastik sendrom ve immun yetmezlikler gibi bir takım hastalıklarda da hematopoezi desteklemek amacı ile kullanılabilir.

YDMP ile G-CSF'in  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilizasyonunda sinerjik olarak etki göstermemesi, hücreler ile kemik iliği mikro çevresi arasındaki etkileşimlerden veya MP'nun hematopoetik hücreler üzerindeki G-CSF reseptörlerini bloke etmesinden kaynaklanabilir. Bu hipotezlerin ispatlanabilmesi ve YDMP'un allojenik veya otolog PBSPC transplantasyonunda  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilize etmek üzere kullanılabilmesi için daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara gerek vardır.

Sonuçlarımız,  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilizasyonunda etkili bir yöntem olarak YDMP tedavisinin kullanabileceğini göstermektedir. YDMP tedavisi ile  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilizasyonunun yanısıra aynı zamanda blastik hücrelerin matür granüositlere diferansiasyonu gerçekleşmektedir. Bu etkileri nedeniyle YDMP, kemik iliği malign hücrelerle infiltre hastalara verildiğinde periferik kana  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilizasyonunun aksine tümör hücre mobilizasyonunun engellenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca G-CSF'e göre daha ucuz bir ajan olması YDMP tedavisinin  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilizasyonunda ucuz ve etkili bir yöntem olduğu izlenimini vermektedir. YDMP'un tek başına kullanıldığında efektif bir şekilde  $CD_{34}^{+}$  hücre mobilizasyonu sağlamasına rağmen eksojen verilen G-CSF ile birlikte sinerjik olarak hareket etmemesi, mobilize edici etkisini sadece endojen G-CSF veya GM-CSF salınımı uyararak gerçekleştirdiği yönündeki hipotezlerle uyumsuzdur.

## SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada malign hastalıkların tedavisinde yeni bir uygulama şekli olan periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre transplantasyonunda mobilize edici ajanlar olarak CYC, G-CSF, YDMP ve YDMP ile G-CSF'un ardışık kullanımını sonrası etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

1. CYC ile periferik kana yeterli düzeyde  $CD_{34}^+$  hücre mobilize edilemedi.
2. G-CSF ile diğer mobilize edici ajanlara oranla daha fazla  $CD_{34}^+$  hücre periferik kana mobilize edildi.
3. YDMP,  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunda etkili bir ajan olarak değerlendirildi. Ancak mobilize ettiği hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da G-CSF'e oranla daha düşük bulundu.
4. YDMP ile G-CSF'un ardışık kullanımını sonrası mobilize olan  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri tek başına G-CSF kullanımına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu.
5. Bilindiği kadarıyla YDMP, ilk defa bu çalışmada sağlam deneklerde periferik kana  $CD_{34}^+$  hücre mobilize etmek üzere kullanıldı ve bu tür uygulamalarda ekonomik açıdan ek bir destek sağlayabileceği izlemine verdi.
6. İleride sadece bir kaç adet  $CD_{34}^+$  hücrenin ex-vivo çoğaltılabilmesiyle PBSPC transplantasyonu gerçekleştirilebilecek ve bu hücrelere gen transferi uygulanabilecektir. Bu ümit verici gelişmeler doğrultusunda yeni mobilize edici ajanların bulunması ve YDMP'un etkilerinin değerlendirilmesi için daha ileri çalışmalara gerek olduğu kanısındayız.

## ÖZET

Periferik kan  $CD_{34}^+$  hücre transplantasyonu son yıllarda artan bir hızla hematolojik ve nonhematolojik malign hastalıkların tedavisinde kemik iliği transplantasyonuna bir alternatif olarak kullanılmaktadır.  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunda hematopoetik büyüme faktörleri, kemoterapötik ajanlar veya her ikisi kombine olarak uygulanmaktadır. Hematopoetik büyüme faktörlerinin yüksek maliyeti ve kemoterapötik ajanların myelotoksik etkileri nedeniyle yeni mobilize edici ajanlar araştırılmış ve yakın zamanlarda yüksek doz metil prednizolon tedavisinin (YDMP)  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

Çalışma 37 tavşanda yapıldı. Başlangıç değerlerini elde etmek üzere siklofosfamid (CYC)  $1 \text{ gr/m}^2$  tek doz olarak verildi ve beş gün sonra  $CD_{34}^+$  hücre yüzdeleri ölçüldü. Daha sonra denekler dört gruba ayrıldı. Birinci Gruba (kontrol grup,  $n=7$ )  $1 \text{ cc/kg/gün}$  dozda serum fizyolojik, ikinci gruba ( $n=10$ )  $30 \text{ mg/kg/gün}$  dozda YDMP, üçüncü gruba ( $n=10$ )  $5 \text{ µg/kg/gün}$  dozda granülosit koloni sitümüle edici faktör (G-CSF), dördüncü gruba ise ( $n=10$ )  $30 \text{ mg/kg/gün}$  dozda YDMP ve  $5 \text{ µg/kg/gün}$  dozda G-CSF ardışık olarak 7 gün süre ile verilerek  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonu üzerindeki etkileri araştırıldı. Uygulama sonunda CYC ile efektif bir mobilizasyon sağlanamazken YDMP ve G-CSF ile periferik kana yeterli düzeyde hücrenin mobilize olduğu görüldü. G-CSF ile YDMP'na oranla daha fazla hücre mobilize edilse de bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ). YDMP ile G-CSF'un ardışık kullanıldığı gruptaki  $CD_{34}^+$  hücre artışının G-CSF'e oranla anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Sonuç olarak 7 gün uygulanan YDMP tedavisinin  $CD_{34}^+$  hücre mobilizasyonunda etkili bir yöntem olduğu düşünüldü.

## SUMMARY

### The Effects of HDMP and G-CSf Therapies on the Peripheral Hematopoietic Stem-Progenitor Cell Mobilization in Rabbits

In the recent years, peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell transplantation is increasingly used as an alternative therapy to bone marrow transplantation in the treatment of hematologic and nonhematologic malignancies. The CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell mobilization procedure includes the administration of hematopoietic growth factors, chemotherapeutic agents or both. Because the high cost of hematopoietic growth factors and the myelotoxic effects of chemotherapeutic agents, new mobilizing agents are under investigation. Recently, it was indicated that high dose methyl prednisolone (HDMP) caused the increase of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell mobilization.

Thirtyseven rabbits were included to this study. Cyclophosphamide (CYC) of 1 g/m<sup>2</sup> in a single dose was given to all rabbits to obtain the initial values. Percentages of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells were measured after five days. Thirtyseven rabbits were divided into four groups. In the first group, 7 rabbits were chosen as controls and serum physiologic (1 ml/kg/day) was given intravenously for seven days. 30 mg/kg/day HDMP and 5 µg/kg/day granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) were given for seven days to the second (n=10) and third (n=10) groups, respectively. The fourth group (n=10) was received 30 mg/kg/day HDMP plus 5 µg/kg/day G-CSF for seven days. While no effective mobilization was provided with CYC, HDMP and G-CSF produced sufficient cell mobilization to peripheral blood. According to HDMP, G-CSF mobilized more CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells but this was not statistically significant (p>0.05). In the fourth group CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell mobilization was significantly lower than that of G-CSF group (p<0.05). In conclusion, HDMP therapy may be considered as an effective method in CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell mobilization.

## KAYNAKLAR

1. Voso MT, Murea S, Goldschmidt H, Hohaus S, Haas R: High-dose therapy with peripheral blood of the haemopoietic progenitor cell compartment. *British Journal of Haematology*, 94:759-766, 1996.
2. Smith AM: Peripheral blood progenitor cell transplantation: Clinical, practical and economic consideration. *Journal of Hematotherapy*, 3:331-348, 1994.
3. Sheridan WP: Transplantation of mobilized peripheral blood stem cells: Role of filgrastim. *Journal of Hematotherapy*, 3:349-353, 1994.
4. Berenson RJ: Transplantation of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hematopoietic precursors: Clinical rationale. *Transplantation Proceedings*, Vol 24, No 6, pp3032-3034, 1992.
5. Brugger W, Bross K, Frisch J, Dern P, Weber B, Mertelsmann R: Mobilization of peripheral blood progenitor cells by sequential administration of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following polychemotherapy. *Blood*, Vol 79, No 5 1193-1200, 1992.
6. Morstyn G, Glaspy J, Shpall EJ, Briddel R, Menchaca D, Lill M, Jones RB, et al: Clinical applications of filgrastim and stem cell factor in vivo and in vitro. *Journal of Hematotherapy*, 3:353-355, 1994.
7. Gianni AM, Bregni M, Stern AC, Siena S, Tarella C, Bonadonna G: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*, 2:580-584, 1989.
8. Socinski MA, Elisa A, Schnipper L, Cannistra SA, Antman KH, Griffin JD: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet*, 1:1194-1198, 1988.
9. Groopman JE, Molina JM, Scadden DT: Hematopoietic growth factors: Biology and clinical applications. *New England Journal of Medicine*, 321:1449-1459, 1989.

10. Bolwell BJ, Goormastic M, Yanssens T, Dannly R, Baucoco P, Fishleder A: Comparison of G-CSF with GM-CSF for mobilizing peripheral blood progenitor cells and for enhancing marrow recovery after autologous bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplantation*, 14:913-918,1994.
11. Körbling M, Przepiorcka D, Huh YO, Engel H, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, et al: Allogenic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: Potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood*, 85:1659-1665,1995.
12. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, et al: Effect of peripheral blood progenitor cells mobilised by filgrastim on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet*, 339:640-644,1992.
13. Weaver CH, Buckner CD, Longin K, Appelbaum FR, Rowley S, Lilleby K, Miser J, et al: Syngeneic transplatation with peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of G-CSF. *Blood*, 82:1981-1984,1993.
14. Henschler R, Brugger W, Luft T, Frey T, Kanz L, Mertelsmann R: Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD<sub>34</sub><sup>+</sup> selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood*, 84:2898-2903,1994.
15. Knudsen LM, Gaarsdal E, Jensen L, Nielsen KJ, Nikolaisen K, Johnsen HE: Improved priming for mobilization of and optimal timing for harvest of peripheral blood stem cells. *Journal of Hematotherapy*, 5:399-406,1996.
16. Elliott C, Samson DM, Armitage S, Lyttelton MP, McGuigan D, Hargreaves R, Giles C, et al: When to harvest peripheral blood stem cell after mobilization therapy: Prediction of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell yield by preceding day CD<sub>34</sub><sup>+</sup> concentration in peripheral blood. *Journal of Clinical Oncology*, 14:970-973,1996.
17. Lie AK, Rawling TP, Bayly JL, To LB: Progenitor cell yield in sequential blood stem cell mobilization in the same patients: insights into chemotherapy dose escalation and combination of haemopoietic growth factor and chemotherapy. *British Journal of Haematology*, 95:39-44,1996.
18. Dreger P, Glass B, Uharek L, Schmitz N: Allogenic peripheral blood progenitor cells: Current status and future directions. *Journal of Hematotherapy*, 5:331-337,1996.

19. Diaz MA, Villa M, Alegre A, Lamana ML, Granda A, Madero L: Collection and transplantation of peripheral blood progenitor cells mobilized by G-CSF alone in children with malignancies. *British Journal of Haematology*, 94:148-154,1996.
20. Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R: Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus G-CSF. *Experimental Hematology*, 21:508-514,1993.
21. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, et al: Flowcytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blod*, 77:400-409,1991.
22. Tjonnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, Egeland T: Characterization of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> peripheral blood cells from healthy adults mobilized by G-CSF. *Blood*, 84:2795-2801,1994.
23. Fielding AK, Watts MJ, Goldstone AH: Peripheral blood progenitor cells versus bone marrow. *Journal of Hematotherapy*, 3:299-304,1994.
24. Teofili L, Iovino MS, Sica S, Pierelli L, Menichella G, Rumi C, et al: Characterization of peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> progenitor cells mobilized with chemotherapy and G-CSF. *Experimental Hematology*,22:990-995,1994.
25. Eifenbein GI, Janssen WE, Partyka JS, Fields KK: Cyclophosphamide, paclitaxel and G-CSF as chemo-growth factor mobilization of stem cells into peripheral blood (abstract 339) in Perry MC eds: Program/Proceedings of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), PRISM Productions, Inc., Westerville, vol 16,1997.
26. Crump M, Yee K, Imrie K, Couban S, Stewart AK, Saragosa R, Keating A: Platelet recovery after high-dose chemotherapy is superior with peripheral blood stem cells mobilized by cyclophosphamide+G-CSF compared to G-CSF alone (abstract 341) in Perry MC eds: Program/Proceedings of the ASCO, PRISM Productions, Inc., Westerville, Vol 16,1997.
27. Richel D, Johnsen H, Canon J, Schaafsma M, Schenkeveld C, Hansen S, McNiece I, et al: CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells selected with the Amgen cell selection system safely and rapidly and engraft following high-dose chemotherapy for breast cancer (abstract 354) in Perry MC eds: Program/Proceedings of the ASCO, PRISM Productions, Inc., Westerville, Vol 16,1997.



28. Fukuda M, Kojima S, Matsumoto K, Matsuyama T: Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and G-CSF in childhood neuroblastoma and non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, 80:327-331,1992.
29. Çetin M, Hiçsönmez G, Tuncer AM, Kansu E, Canpınar H: The effect of short-course high-dose corticosteroid therapy on peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> progenitor cells in children with acute leukemia. *Experimental Hematology*, 24(10):1191-1194,1996.
30. Özsoylu Ş, Coşkun T, Minassazi Ş: High dose intravenous glucocorticoid in the treatment of childhood acquired aplastic anaemia. *Scand Journal of Haematology*, 33:309-316,1984.
31. Steen R, Tjonnfjord GE, Egeland T: Comparison of the phenotype and clonogenicity of normal CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells from umbilical cord blood, G-CSF mobilized peripheral blood and adult human bone marrow. *Journal of Hematotherapy*. 3:253-262,1994
32. Turkina AG, Baryshnikov AY, Sedyakhina NP, Folomeshkina SV, Sokolova MA, Choroshco ND, Stavrovskaya AA: Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukemia patients: expression, activity and correlations with CD<sub>34</sub> antigen. *British Journal of Haematology*, 92:88-96,1996.
33. Tuncer AM, Hiçsönmez G, Gümrük F, Albayrak D, Duru F, Güzel E, Şaylı T: The effect of high-dose methylprednisolone on CD<sub>34</sub><sup>+</sup> bone marrow cells in children with acute myeloblastic leukemia. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 37:345-349,1995.
34. Steen R, Gaudernack G, Brinch L, Egeland T: Differences in the distribution of CD<sub>34</sub> epitopes on normal haemopoietic progenitor cells and leukaemic blast cells. *British Journal of Haematology*, 94:597-605,1996.
35. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS: Characterization of murine CD<sub>34</sub><sup>+</sup>, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 84:691-701,1994.
36. Christensen RD, Ohls RK: Development of the hematopoietic system. In: *Textbook of Pediatrics*, Nelson WE (Eds). WB Saunders Co, 1996, p:1375-1378.
37. Nathan DG, Sieff CA: The anatomy and physiology of hematopoiesis. In: *Hematology of Infancy and Childhood*, Nathan DG, Oski FA (Eds). WB Saunders Co, 1993, pp:156-215.

38. Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Smith DH, Stewart CC, To LB: Identification and comparison of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flowcytometry. *Blood*, 77:2591-2596,1991.
39. Peault B: Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *Journal of Hematotherapy*, 5:369-378,1996.
40. Muench MO, Cupp J, Polakoff J, Roncarolo MG: Expression of CD<sub>33</sub>, CD<sub>38</sub> and HLA-DR on CD<sub>34</sub><sup>+</sup> human fetal liver progenitors with a high proliferative potential. *Blood*, 83:3170-3181,1994.
41. Williams DE, Lu L, Broxmeyer HE: Characterization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Immunology Research*, 6:294-304,1987.
42. Pasquale D, Chikkappa G, Wang G, Santella D: Hydrocortisone promotes survival and proliferation of granulocyte-macrophage progenitors via monocytes/macrophages. *Experimental Hematology*, 17:1110-1115, 1989.
43. Broxmeyer HE, Cooper S, Maione T, Gordon M, Daly T: Myeloprotective effects of the chemokines interleukin-8 and platelet factor-4 in a mouse model of cytosine arabinoside chemotherapy. *Experimental Hematology*. 23:900-904,1995.
44. Maze R, Sherry B, Kwon BS, Cerami A: Myelosuppressive effects in vivo of purified recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Journal of Immunology*, 149:1004-1009,1992.
45. To LB, Haylock DN, Dowse T, Simmons PJ, Trimboli S, Ashman LK: A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase and bone marrow CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells. *Blood*, 84:2930-2939,1994.
46. Neben S, Marcus K, Mauch P: Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamid and/or G-CSF. *Blood*, 81:1960-1967,1993.
47. Serke S, Sauberlich S, Huhn D: Multiparameter flow-cytometrical quantitation of circulating CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells: correlation to the quantitation of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony-assay. *British journal of Haematology*,77:453-459,1991.

48. Kreissig C, Kirsch A, Serke S: Characterization and measurement of CD<sub>34</sub> expressing hematopoietic cells. *Journal of Hematotherapy*, 3:263-289,1994.
49. Safalı M, Gedikođlu G, Celasun B, Finci R: Flow cytometry/akım sitometrisinin patolojideki yeri. *Ankara Patoloji Bülteni*, 9(1):92-106,1992.
50. Riley RS, Mahin EJ, Ross W: Clinical applications of flow cytometry. Igaku-Shoin, New York-Tokyo, 1994.
51. Haas R, Möhle R, Murea S, Goldschmidt H, Pförsich M, Witt B, Hunstein W: Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by cytotoxic chemotherapy and G-CSF. *Journal of Hematotherapy*, 3:323-330,1994.
52. Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM: Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD<sub>34</sub><sup>+</sup> and CD<sub>34</sub><sup>+</sup> lin-cells, and generation of colony-forming cell progeny from CD<sub>34</sub><sup>+</sup> lin-cells. *Blood*, 77:2316-2321,1991.
53. Miyazawa K, Toyama K, Gotoh A, Hendrie PC, Mantel C, Broxmeyer HE: Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product. *Blood*, 83:137-145, 1994.
54. Smith FO, Broudy VC, Zsebo KM, Lampkin BC, Buckley CV, Opie T, Wodds WG, et al: Cell surface expression of c-kit receptors by childhood acute myeloid leukemia blasts is not of prognostic value. *Blood*, 84:847-852,1994.
55. Piao X, Curtis JE, Minkin S, Minden MD, Bernstein A: Expression of the kit and kit A receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood*, 83:476-481,1994.
56. Pinto A, Gloghini A, Gattei V, Aldinucci D, Zagonel V, Carbone A: Expression of the c-kit receptor in human lymphomas is restricted to Hodgkin's disease and CD<sub>30</sub><sup>+</sup> anaplastic large cell lymphomas. *Blood*, 83:785-792,1994.
57. Bregni M, Siena S, Brando B, Rovagnani F, Bonadonna G: Circulation of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous GM-CSF. *Blood*, 74:1905-1914,1989.
58. 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 (Letter).

59. Sica S, Rutella S, Mario AD, Rumi C, Etuk B, Menichella G, Leone G, et al: G-CSF in healthy donors: mobilization of peripheral hemopoietic progenitors and effect on peripheral blood leukocytes. *Journal of Hematotherapy*, 5:391-397,1996.
60. Bishop MR, Anderson JR, Jackson JD, Bierman PJ, Reed EC, Vose JM, Armitage JO, et al: High-dose therapy and peripheral blood progenitor cell transplantation: Effects of GM-CSF on the autograft. *Blood*, 83:610-616,1994.
61. Suzue T, Kawano Y, Takaue Y, Kuroda Y: Cell processing protocol for allogenic peripheral blood stem cells mobilized by G-CSF. *Experimental Hematology*, 22:888-892,1994.
62. Lieschke GJ, Cebon J, Morstyn G: Characterization of the clinical effects after the first dose of bacterially synthesized GM-CSF. *Blood*, 74:2634-2643,1989.
63. Gazitt Y, Tian E, Barlogie B, Reading CL, Vesole DH, Jagannath S, Schnell J, et al: Differential mobilization of myeloma cells and normal hematopoietic stem cells in multipl myeloma after treatment with cyclophosamide and GM-CSF. *Blood*, 87:805-811,1996.
64. Vredenburgh J, Tyer C, Broadwater G, Berry D, Desombre K, Silva O: The incidence and significance of tumor cell contamination of the hematopoietic support from patients with solid tumor treated with high-dose chemotherapy (abstract 338) in Perry MC eds: Program/Proceeding of the ASCO, PRISM Peoductions, Inc., Westerville, Vol 16,1997.
65. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L: Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood*, 83:636-640,1994.
66. Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K, Duffy B, et al: Highly purified CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells reconstitute hematopoiesis. *Journal of Clinical Oncology*, 14:2224-2233,1996.
67. Hassan HT, Kruger W, Zander AR, Stockschlader M, Hoffknecht H: G-CSF administration following peripheral blood selected CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells autologous transplantation accelerates haematological recevory after myeloablative therapy. *British Journal of Haematology*, 92:1026-1029,1996.
68. Kanold J, Rapatel CH, Berger M, Chassagne J, Lutz P, Plantaz D, Vannier JP, et al: Use of G-CSF alone to mobilize peripheral blood stem cells for collection from children. *British Journal of Haematology*, 88:633-635,1994.

69. De Luca E, Sheridan WP, Watson D, Szer J, Begley CG: Prior chemotherapy does not prevent effective mobilization by G-CSF of peripheral blood progenitor cells. *British Journal of Cancer*, 66:893-899,1992.
70. McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ: Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science*, 171;293-294,1971.
71. Gorin NC: Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. *Clinics in Haematology*, 15:pp19-48, 1986.
72. Schweitzer KM, Drager AM, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijssmeijer AP, Langenhuijsen MM: Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *American Journal of Pathology*, 148:165-172,1996.
73. Rao SG, Chitnis VS, Deora A, Tanavde V, Desai SS: An ICAM-1 like cell adhesion molecule is responsible for CD<sub>34</sub><sup>+</sup> haemopoietic stem cells adhesion to bone marrow stroma. *Cell Biology Int*, 20(4):255-259,1996.
74. Mohle R, Murea S, Kirsch M, Haas R: Differential expression of L-selectin, VLA-4 and LFA-1 on CD<sub>34</sub><sup>+</sup> progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF enhanced recovery. *Experimental Hematology*, 23:1535-1542,1995.
75. Brugger W, Birken R, Bertz H, Hecht T, Pressler K, Frisch J, Schulz G, et al: Peripheral blood progenitor cells mobilized by chemotherapy plus G-CSF accelerate both neutrophil and platelet recovery after high-dose VP16, ifosfamide and cisplatin. *British Journal of Haematology*, 84:402-407,1993.
76. Gianni AM, Siena S, Bregni M: Letter to the editor: *Experimental Hematology*, 19:147-148,1991.
77. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, et al: Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Experimental Hematology*, 18:442-447,1990.
78. Hornung RL, Longo DL: Hematopoietic stem cell depletion by restorative growth factor regimens during repeated high-dose cyclophosphamide therapy. *Blood*, 80:77-83, 1992.
79. Klingebiel T, Handgretinger R, Herter M, Dopfer LR, Kudlich B, Haus U, Farber L, et al: Feasibility and tolerability of GM-CSF for peripheral blood stem cell mobilization and recovery in children. *Bone Marrow Transplantation*, Vol.15, (Suppl 2), Leu 1250, S78 (Abs. 333), 1995.

80. Molineux G, Pojda Z, Dexter TM: A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with G-CSF. *Blood*, 75:563-569,1990.
81. Kayaalp SO: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Beşinci Baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara, 1993, S2497-2523.
82. Motoji T, Teramura M, Takahashi M, Oshimi K, Okada M, Kusakabe K, Mizoguchi H, et al: Successful treatment of refractory anemia with high-dose methylprednisolone. *American Journal of Hematology*, 33:8-12,1990.
83. Nissen C, Moser Y, Speck B: Dexamethasone enhances colony stimulating activities. *British Journal of Haematology*, 53:301-310,1983.
84. Hiçsönmez G, Onat N, Albayrak D, Yetgin S, Özsoylu Ş: Acceleration of leukocyte recovery by administration of short-course high-dose methylprednisolone in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology*, 8:193-197,1991.
85. Hiçsönmez G, Tuncer AM, Çetin M, Gümrük F, Kara A, Yalçın S: Morphologic evidence of in vivo differentiation in acute myeloblastic leukemia. *Acta Haematology*, 90:214-215,1993 (Letter).
86. Hiçsönmez G, Özsoylu Ş, Tuncer AM, Ertürk G, Özbek N, Karadeniz N: Direct morphological evidence of high-dose methylprednisolone-induced maturation of leukemic cells in children with acute nonlymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*. 19:232-233,1991 (Letter).
87. Hiçsönmez G, Güler E, Tan E, Tuncer AM, Tan E, Tekelioğlu M: The potential role of high-dose methylprednisolone on the maturation of leukemic cell in children with acute promyelocytic leukemia. *Experimental Hematology*, 21:599-601,1993 (Letter).
88. Hiçsönmez G, Özsoylu Ş: High-dose methylprednisolone for acute nonlymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*, 17:1051-1056,1989 (Letter).
89. Hiçsönmez G, Özsoylu Ş, Tuncer AM: Differentiation of myeloid leukemic cell induced high-dose methylprednisolone in patients with AML and its therapeutic potential. *Leukemia Research*, 15:pp.537-541,1991.

90. Sugawara T, Sato A, Shishido T, Okuda M, Kameoka J, Meguro K, Endo K: Complete remission in acute myeloid leukemia after treatment with G-CSF and high-dose intravenous methylprednisolone. *British Journal of Haematology*, 77:561-564,1991.
91. Tuncer AM, Gümrük F, Oğuz H, Hiçsönmez G, Ertürk G, Albayrak D: The effect of high-dose methylprednisolone treatment on GM-CSF level in children with acute leukemia. *Leukemia Research*, 16:615-619,1992.
92. Greenberg R: *Medical Epidemiology*. Appleton and Lange. 1 st. Edition, Connecticut, pp:99-142,1993.
93. Tuncer AM, Hiçsönmez G, Gümrük F, Saylı T, Güler E, Çetin M, Okur H: Serum TNF-alpha, gamma-INF, G-CSF, GM-CSF levels in neutropenic children with acute leukemia treated high-dose methylprednisolone. *Leukemia Research*, 20:265-269,1996.
94. Philpott NJ, Preu RL, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Gibson FM: G-CSF-mobilized CD<sub>34</sub><sup>+</sup> peripheral blood stem cells are significantly less apoptotic than unstimulated peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells. *British Journal of Haematology*, 97:146-152,1997.
95. Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ: Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells into the myeloid lineage. *Blood*, 80:1405-1412,1992.
96. Lübbert M, Brugger W, Mertelsmann R, Kanz L: Developmental regulation of myeloid gene expression and demethylation during ex vivo culture of peripheral blood progenitor cells. *Blood*, 87:447-455,1996.
97. Hanania E: MDR gene therapy. *Oncology Review*, 9(1):5,1994.
98. Germeraad WTV, Asami N, Fujimoto S, Mazda O, Katsura Y: Efficient retrovirus-mediated gene transduction into murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 84:780-788,1994.