

## 1.GİRİŞ

Kök hücre nakli çeşitli malign ve non-malign hematolojik hastalıkların tedavisinde kür sağlayan bir yöntem olarak kabul edilir (1-3). Kök hücre kaynağı olarak daha hızlı engrafman ve işleme bağlı risklerin daha az olması nedeniyle günümüzde periferik kana mobilize olan hücreler kullanılmaktadır (4-6). Kök hücreler periferik kana 3-4 günlük bir süre mobilize olmaktadır ve hastaların %10-20'sinde bu mobilizasyon olamamaktadır. Periferik kana kök hücrelerin ne zaman mobilize olduğunu saptamak halen sorun olarak sürmektedir.

Bugün için hematopoetik kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunu saptamada tercih edilen ve standart yöntem haline gelen akım sitometri ile CD34 analizidir. CD34 analizi engrafman potansiyelini değerlendirmede de değerli bir araçtır. (7,8). İnsan kök hücreleri genel olarak CD34 gibi yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile karakterizedir fakat hematopoetik kök hücrelerin tümü CD34 eksprese etmez (19,20). Ayrıca hematopoetik kök hücreleri sadece yüzey fenotipine dayanarak saflaştırmanın ilave bazı kısıtlılıkları vardır (9-12,19). Bu nedenle insan kök hücrelerini tamamen fenotipik hücre yüzey moleküllerine dayanmadan etkin olarak saptayan metodlara ihtiyaç vardır.

Yüzey fenotipi kullanımına eşdeğer bir saflaştırma stratejisi ilkel hücrelerin hematopoetik gelişim süresince oksidatif hasardan korunmasıyla ilgili intraselüler enzim aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Bu enzimlerden biri retinoid metabolizması ve hematopoetik kök hücrelerin siklofosamid gibi alkilleyici ajanlara direncinde rol oynayan sitozolik aldehid dehidrogenaz (ALDH)'dır. ALDH'nın hematopoetik progenitör hücrelerde pozitif, matür hücrelerde negatif olduğu açık olarak gösterilmiştir (13,14,22). Periferik kan ALDH<sup>+</sup> hücre miktarının kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunu göstermede kullanılabileceği ileri sürülmüştür. ALDH için aynı zamanda CD34<sup>-</sup> uzun süreli engrafmandan sorumlu daha ilkel hücreleri saptadığı ve kök hücre miktarını belirlemede kullanımının daha iyi olabileceği belirtilmiştir (15-18,23).

Çalışmamızda 1) ALDH<sup>+</sup> hücre miktarının kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunu saptamada kullanılabilirliğini, 2) ALDH<sup>+</sup> hücre miktarının kök hücre nakli yapılan hastalarda engrafmanla ilişkisini araştırdık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELER

#### 2.1.1. Tarihçe

Erişkinlerdeki tüm kan elemanlarının ortak bir ana hücreden kaynaklandığı görüşü ilk kez 1909'da Maximov(25) ve bu ana hücrenin hastalıklardaki rolü 1916'da Danchakoff (24) tarafından ortaya atılmıştır. Maximow (25); morfolojik görünümü lenfosit benzeyen, çoğalma ve farklılaşmasını sağlayan mikroekolojik nişler aracılığıyla kana geçme yeteneği olan hematopoetik bir kök hücre varlığını ileri sürmüştür.

Till ve McCulloch(26) irradiye edilmiş farelere singeneik türde kemik iliği verildiği zaman fare dalakları üzerinde oluşan kolonileri tanımlayarak kök hücre ve progenitör hücrelerin olgun kan hücre üretimi sağladıklarını deneysel olarak ispatlamışlardır. Kemik iliği hücrelerinin transplantasyon ve miyeloblastasyon yapılmış alıcılarda hematopoezi yeniden sağlama kapasitesi hematopoetik kök hücre (HKH)'lerin in vivo ölçümünü sağlamıştır.

Pluznik (27) ve Bradley (28) kemik iliği hücrelerini saymak ve tanımlamak için yöntemler geliştirmişlerdir. Son dönemde kullanılmaya başlanan yeni yöntemler; kök hücrelerin, ortak miyeloid ve lenfoid progenitörlerin, serilere özgü progenitörlerin saflaştırılmasını sağlamış, böylece hücre ve kan hücre gelişiminin moleküler biyolojisini anlamada büyük gelişmeler kaydedilmiştir (29-32).

#### 2.1.2. Tanım

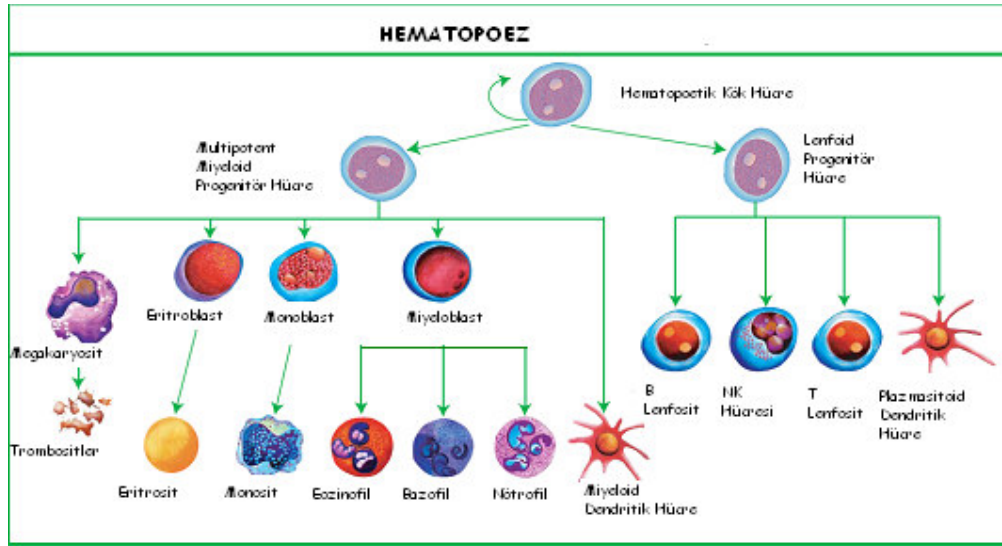
Kök hücreler; bölünerek kendini yenileyen, sayılarını devamlı sabit tutan ve kan, karaciğer, ve kas gibi özelleşmiş görev yapan organları oluşturabilen farklılaşma yeteneğindeki hücrelerdir. Totipotent, pluripotent ve unipotent kök hücreler olarak 3 grupta incelenirler:

**Totipotent Kök Hücreler:** Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğindeki kök hücrelerdir. Embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanırlar.

**Pluripotent Kök Hücreler:** Organizmadaki birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir.

**Unipotent Kök Hücreler:** Tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücrelerdir.

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



**Şekil 2.1.** Hematopoetik kök hücrelerden proliferasyon ve farklılaşma ile tüm tiplerde olgun kan hücresi üretimi.

İnsanlar dahil tüm memelilerdeki kök hücrelerin toplam sayısının  $2 \times 10^4$  olduğu tahmin edilmektedir (34). Bu hücrelerin sadece küçük bir kısmı sıklısa girer ve günlük  $4 \times 10^{11}$  olgun kan hücresi üretimini sağlar. Öldürücü dozda irradıye edilmiş hayvanlarda retroviral belirteçler kullanılarak yapılan çalışmalar HKH'lerin intravenöz transplantasyon sonrası kanda görülme zamanlarına göre kısa süreli ve uzun süreli yeniden çoğalan hücreler olarak ayrıldığını göstermiştir (35). Fakat çeşitli deneysel yaklaşımlar ile HKH'lerin çok daha heterojen bir grup olduğu saptanmıştır (36,37).

## 2.2. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE KAYNAKLARI

HKH'ler; kemik iliği, periferik kan, embriyo, göbek kordonu kanı ve kök hücrelerin in vitro çoğaltılmalarıyla elde edilebilir.

### 2.2.1.Kemik İliği

Hem allogeneik hem otolog kök hücre nakli için geleneksel olarak kullanılan HKH kaynağıdır. Kemik iliği toplama tekniği relatif olarak rutin hale gelmiştir. Genellikle posterior iliak krestten genel anestezi altında toplanır. Daha önce pelvise radyasyon alan hastalarda bu bölgeden yeterli kemik iliği elde edilemeyebilir ve alternatif HKH kaynakları gerekir. Kemik iliği damardan zengin bir organ olduğundan toplanan kemik iliği miktarına bağlı olarak önemli ölçüde kan kaybı oluşabilir.

### 2.2.2.Periferik Kan

HKH'ler periferik kanda düşük düzeyde bulunur. Hematopoetik büyüme faktörlerinin uygulanması ya da sitotoksik kemoterapi sonrası iyileşme döneminde dolaşan kök hücrelerde  $\geq 1000$  kat artış olduğunun gözlemlenmesi bu alanda önemli gelişme sağlamıştır.

Periferik kan kök hücreleri  $CD34^+/CD38^-$  Thy-1<sup>+</sup>dir ve miyeloid veya lenfoid serilere özgü belirteçleri eksprese etmezler (Lin<sup>-</sup>) (34). Ne fenotipik ne de immünolojik olarak kemik iliği kaynaklı kök hücrelere benzemezler. Hareketli periferik kan kök hücrelerinin S fazında daha az hücreleri vardır ve metabolik olarak daha az aktiftirler (40).

HKH kaynağı olarak periferik kan kullanılması durumunda; kemoterapi, çeşitli hematopoetik büyüme faktörleri ve bazı kemokin reseptör inhibitörlerini içeren çeşitli uyarılarla kana mobilize olan ve periferik kan progenitor hücreleri olarak adlandırılan hücreler aferez yoluyla kandan kolayca toplanır (41,42). Toplama işlemi her biri yaklaşık 4 saat süren günlük lökoferezlerle yapılır. Alınan kan lökositleri ayırmak amacıyla santrifüj edilir. Eritrosit ve trombositler ise işlem sırasında hastaya ya da donöre geri verilir. HKH'leri içeren lökosit kısmı toplanır ve otolog nakil planlanıyorsa transfüzyona kadar  $-196^{\circ}\text{C}$  sıvı azotta saklanır (43).

Kemik iliği greftleriyle kıyaslandığında periferik kan kök hücrelerinin çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır.

### **Periferik Kan Kök Hücre Transplantasyonunun Avantajları:**

- 1) Toplanması hastaneye yatmayı veya genel anesteziye maruz kalmayı gerektirmez.
- 2) Miyeloablatif tedaviden sonra daha kısa süreli sitopeni olur.
- 3) Malign hücre içerme olasılığı daha azdır (44).

### **Periferik Kan Kök Hücre Transplantasyonunun Dezavantajları:**

- 1) Damar yolu gereksinimi
- 2) Hematopoetik kök hücrenin mobilizasyonu için çeşitli faktörlere ihtiyaç duyulması
- 3) Sitokin tedavisinin yan etkileri
- 4) Hematopoietik kök hücre mobilizasyonunun her zaman başarılı olmaması
- 5) İmmün sistemdeki lökositlerin aktif hale gelebilmesi
- 6) Alıcıda kronik graft versus host hastalığı (GVHD) olasılığının artmasıdır (46).

### **2.2.3. Kordon Kanı**

HKH'ler doğum sonrası plasentadan direkt olarak sağlanan göbek kordonu kanından da elde edilebilir. Kordon kanı, kemik iliği ve periferik kana kıyasla kök hücrelerden zengindir. Ayrıca kordon kanı kök hücreleri relatif olarak immatür olduklarından immünojenik bariyerleri daha kolay geçebilirler. İnfüze edilen hücrelerin sayısı, doğası ve alıcının ölçüsüne göre değişmekle birlikte kordon kanı ürünü infüzyonu sonrası geç de olsa hematolojik engrafman ve immünojenik iyileşme gerçekleşir. Plasental kanın kaynağı ve altta yatan hastalığın doğasına göre değişen uzun süreli survi de sağlanmıştır.

Günümüzde kordon kanı, toplanabilen hücre sayısının azlığı nedeniyle sıklıkla çocuk ve genç erişkinlerle kullanılmaktadır. Ancak ikili ya da üçlü kordon kanı kullanımı ile daha ileri yaş hastalıklarda kullanımı artmıştır. Kordon kanı alıcısına verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı yaklaşık olarak allogeneik kemik iliği alıcısına verilen miktarın 1/10'udur. Bu durum kordon kanı hücrelerinin infüzyon öncesi ex vivo olarak arttırılmasını cazip bir düşünce haline getirmiştir. Kordon kanı kullanılması durumunda GVHD insidansı ve şiddeti kemik iliği kullanımına göre

daha azdır. HLA uyumlu ya da akraba dışı donör bulunamaması durumunda alternatif kaynak sağlar.

#### **2.2.4. Embriyonik Kök Hücreler**

İnsan embriyonik kök hücreleri (blastosistler); murin kemik iliği ya da yolk kesesi endotelial hücre serileri ve fetal sıgır serumu ile kültüre edildiğinde CD34<sup>+</sup> hematopoetik öncül hücrelere farklılaşabilir. Bu hematopoetik öncül hücreler yarı katı ortamda hematopoetik büyüme faktörleriyle kültüre edildiğinde tipik miyeloid, eritroid ve megakaryosit kolonileri oluştururlar. Oluşan bu embriyonik kök hücreler de transplantasyon için diğer bir HKH kaynağı oluşturur.

### **2.3. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ**

Bildirilen ilk kemik iliği nakli; 1939 yılında, altına bağlı aplazi gelişen bir hastaya kan grup antijenleri aynı olan erkek kardeşten alınan kemik iliğinin intravenöz olarak verilmesi şeklinde uygulanmıştır. Transplantasyon başarısızlıkla sonuçlanmış ve hasta 5 gün sonra kaybedilmiştir (46). 1950'li yılların başlarında laboratuvar deneyleri ile kemik iliği hücrelerinin intravenöz uygulanmasının hayvanları öldürücü dozda radyasyondan koruduğu gösterilmiştir (47). Bin dokuz yüz elliler sonu 1960'lar başında son dönem hematolojik malignitesi olan bazı hastalarda başarısız sonuçlar elde edilmesine rağmen en azından geçici engrafman sağlanabilmiştir (48). Kalıcı engrafman ilk kez 1965'te radyasyon ve kemoterapi alan akut lenfoblastik lösemili (ALL) bir hastaya 6 farklı donörden elde edilen intravenöz kemik iliği infüzyonu sonrası bildirilmiştir. Maalesef hasta 20 ay sonra rekürren lösemi nedeniyle kaybedilmiştir (49).

1960'larda HLA sisteminin keşfi ve doku uyumluğunu saptama metodlarının gelişimi kemik iliği naklinde yeni bir dönem başlatmıştır. İlk başarılı kemik iliği nakilleri 1968'de şiddetli kombine immün yetmezliği ve Wiskott-Aldrich sendromu olan çocuklara uygulanmıştır (50,51). Bin dokuz yüz yetmiş yedi ve 1980'de ilk başarılı akraba dışı nakiller bildirilmiştir (52,53).

Akut ve kronik lösemiler, non-Hodgkin lenfoma (NHL), Hodgkin lenfoma (HL), miyelodisplastik sendrom (MDS), multipl miyelom (MM) , miyeloproliferatif hastalıklar, testis tümörü ve nöroblastom gibi seçilmiş solid tümörler, aplastik anemi

ve amiloidoz hematopoetik kök hücre nakli ile başarılı biçimde tedavi edilen başlıca hastalıklardır.

### **2.3.1. Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli**

Kemik iliği ya da sitokinle mobilize periferik kanın kurtarma tedavisi olarak verilmesi hastaya daha yüksek doz radyasyon ve kemoterapi verilmesine olanak sağlar. Hastalığın etkili kontrolü başlıca yüksek doz kemoterapi ve/veya radyasyon etkisiyledir. İlaç direncini yenmek ve tümör hücrelerini öldürücü etkiyi iyileştirebilmek amacıyla ilaçlar tolere edilen maksimum dozda verilir. Otoimmün hastalıklarda immün sistemi düzenler. Otolog nakli takiben ortaya çıkabilecek başlıca problemler bulantı, kusma, alopesi, enfeksiyon, kanama, mukozit ve infertilitedir. Kemik iliği ile % 8-10 olan nakil ilişkili mortalite mobilize periferik kan progenitör hücrelerinin kullanımıyla çoğu merkezde % 1-3'e kadar düşmüştür.

### **2.3.2. Allogeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli**

Allogeneik hematopoetik kök hücre nakli seçimi altta yatan hastalığın tipi, prognozu, remisyon durumu, hastanın performans durumu ve uygun donör varlığına göre yapılır. HLA uyumlu akraba ya da akraba dışı donörler kullanılabilir. Allogeneik naklin yararlı etkileri hazırlama rejimi, daha da önemlisi graft versus tümör etkisine bağlıdır. Genetik/metabolik hastalıklarda düzelme sağlar. Miyeloablatif ya da non-miyeloablatif şekillerde uygulanır. Sonucu etkileyen faktörler; nakil anında hastalığın durumu, donör tipi, hasta yaşı ve varolan komorbid durumlarıdır. Mukozit, kanama, enfeksiyonlar, akut GVHD, venookluziv hastalık, pulmoner komplikasyonlar erken dönemde; relaps, kronik GVHD, infertilite, büyüme gelişme geriliği, sekonder maligniteler ise geç dönemde ortaya çıkabilecek komplikasyonlardır (54).

## **2.4. KÖK HÜCRE MOBİLİZASYONU**

Kemoterapi ya da sitokin tedavisini takiben hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin periferik kana çıkmasına mobilizasyon denir. Kök hücre mobilizasyonuna giden yol; HKH'lerin fare, köpek ve maymunların periferik kanında varlığını bildiren birkaç raporun yayınlanması ile 1960'larda başlamıştır. Takiben düşük düzeyde progenitörlerin kararlı durum homeostazı sırasında insan dolaşımında da bulunduğu bildirilmiştir (55).

Hematopoez sürecinde hematopoetik progenitör hücreler ve pluripotent kök hücrelerin büyük çoğunluğu kemik iliğinde yerleşmiş olmasına karşın, daha az sayıda ve sabit bir yoğunlukta devamlı olarak periferik kanda da bulunurlar (56). Normal koşullarda kemik iliğindeki hücrelerin sadece % 1-3'ü CD34 ekspres eder. Periferik dolaşımında ise bu hücreler sadece % 0.01 - 0.1 oranında bulunur. (57).

Mobilizasyon işlemi yaralanma ve inflamasyon sırasında oluşan stres sinyallerine yanıt olarak kemik iliği deposundan kök hücre ve progenitörlerin salınımının artması şeklindeki fizyolojik yanıtı taklit eder.

Günümüzde kök ve progenitör hücrelerin tercih edilen ve temel kaynağı mobilize hücrelerdir çünkü kemik iliği hücrelerine kıyasla engrafman daha hızlı olur ve işleme bağlı riskler daha azdır.

Kök hücre mobilizasyonu mezenkimal stromal ve hematopoetik hücreler arasındaki fizyolojik etkileşimin bozulmasını gerektirir. Mobilizasyon işlemi; nötrofil ve osteoklastların, kemoterapi ve granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF) gibi sitokinlerle tekrarlayan stimülasyonu sonucu oluşan aktivasyonu tarafından başlatılır. Membrana bağlı kök hücre faktörü (SCF) salınımı, progenitör hücre çoğalması, adezyon moleküllerinin aktivasyon ve/veya degradasyonu olur.

Mobilizasyon protokolleri başlangıçta sadece kemoterapiye dayalıyken sonraki yıllarda G-CSF keşfedilmiş ve bugün için standart mobilize edici ajan olarak mobilizasyon protokolleri içinde yer almaya başlamıştır.

#### **2.4.1. Kemoterapi ile Kök Hücre Mobilizasyonu**

Kemik iliği ve dolaşan kök hücre havuzu arasındaki dinamik denge kemoterapi uygulaması ile belirgin olarak bozulabilir (58). Kemoterapi sonrası sitopeni dönemini lökosit ve daha ön planda periferik kan progenitör hücrelerin rebound artışı izler. Bu dönemde periferik kan progenitör hücre yoğunluğu bazal değerlerin 20-25 katına ulaşabilir (59). Tek başına siklofosamid ( $3-7 \text{ gr/m}^2$ ) kök hücre üzerine önemli toksisitesi olmaması nedeniyle uygun bir mobilizasyon ajanı olarak kullanılmıştır (60-62). Mobilizasyon etkinliği için en önemli faktör en az birkaç gün 4. derece nötropeniye yol açan mielosupresyondur (62). Mobilizasyon amaçlı uygulanan kemoterapinin kök hücrelerin periferik kana geçişini sağlamak yanı sıra maligniteyi tedavi etmek ve tümörün kemoterapiye duyarlılığını test etmek gibi rolleri de vardır (59). Tek başına siklofosamidin anti-tümör etkisi sınırlı



olduğundan hastalığa özgü farklı kombinasyon kemoterapi rejimleri de mobilizasyon amaçlı kullanılmıştır. Tek başına kemoterapi ile kök hücre mobilizasyonu; diğer alternatiflere göre daha sınırlı mobilizasyon etkinliği, sitopeniye bağlı infeksiyon ve kanama riskleri ve düzelme dönemini belirlemede zorluk nedeniyle günümüzde nadiren kullanılır.

#### **2.4.2. Sitokinler ile Kök Hücre Mobilizasyonu**

Hematopoetik sitokinler periferik kanda dolaşan HKH yoğunluğunu geçici olarak arttıran etkin ajanlardır. Hematopoez üzerine değişik basamaklarda farklı etkilere sahip hematopoetik sitokinlerin (G-CSF, GM-CSF, SCF, flt-3 ligand, trombopoetin, IL-1, IL-3, IL-8 vb) kemik iliğinden periferik kana HKH mobilizasyonunda değişik derecelerde etkili oldukları gösterilmiştir (63). Bu sitokinlerden, G-CSF ve GM-CSF maligniteli hastalarda otolog transplantasyon ve sağlıklı donörlerde allogeneik transplantasyon alanında periferik kan HKH düzeyini arttırmada daha etkin ve daha emniyetli olmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmışlardır. G-CSF (5µg/kg/gün) mobilizasyon etkinliği açısından GM-CSF'den üstündür ve günümüzde var olan mobilize edici ajanların en güvenilir olanıdır (62). Daha yüksek dozlarda (10 µg/kg/gün) daha etkin mobilizasyon sağladığı gösterilmiştir. Günlük dozun ikiye bölünerek verilmesinin mobilizasyonu arttırabileceğini gösteren bulgular da vardır.

Günümüzde standart kullanılan doz 10 µg/kg/gün olup G-CSF'nin verildiği 4.günden itibaren periferik kana kök hücre mobilizasyonu olmakta ve 4, 5, 6, 7.gün kök hücreler periferik kandan toplanabilmektedir.

G-CSF uygulaması sırasında en sık görülen yan etkiler baş ağrısı ve kemik ağrısıdır (%80). Daha az sıklıkla halsizlik (%20), bulantı (%10), nörolojik (%6), grip benzeri (%5) ve kardiyovasküler (%2) semptomlar görülür (64,65). G-CSF kesilmesini gerektiren ciddi yan etkiler çok nadirdir. Akut ciddi yan etki olarak, splenik rüptür ve kapiller sızıntı sendromu bildirilmiştir (66,67).

Diğer sitokinler ise özellikle G-CSF ile birlikte mobilizasyon etkinliğini arttırıcı özellikleri açısından çeşitli araştırmalarda değerlendirilmektedir.

### 2.4.3. Kemoterapi ve Sitokinlerle Kök Hücre Mobilizasyonu

Otolog transplantasyonda hematopoetik sitokin veya sitokin kombinasyonlarının altta yatan hastalığa özgü kemoterapi protokolleriyle birlikte uygulanması, tek başına sitokin veya kemoterapiye göre mobilizasyon etkinliğini belirgin olarak artırır. Günümüzde en sık kullanılan mobilizasyon şeklidir (59,68).

İlk uygulamalarda etkin bir mobilize edici kemoterapi ajanı olarak siklofosamid ( $4-7 \text{ gr/m}^2$ ) kullanılmasına karşın, tek başına anti-tümör aktivitesi düşüktür. Bu nedenle günümüzde, altta yatan hastalığa etkili ve mobilizasyon etkinliği de yüksek kombine kemoterapi protokolleri sitokinler ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (62,63). Sitokin ile kemoterapi uygulamasında, kemoterapinin mobilizasyon etkinliği yanı sıra, tümör yükünü ve tümör hücre mobilizasyonunu azaltıcı, kemosenitiviteyi test edici önemli fonksiyonel özellikler de vardır.

Kemoterapiyi takiben  $5\mu\text{g/kg/gün}$  dozunda G-CSF başlanması ve beyaz küre sayısı düşüp sonra artarken beyaz küre sayısının  $>1000$  olması kök hücre mobilizasyonunun başladığı zamanı gösterir. Periferik kandaki  $\text{CD34}^+$  hücre miktarı bakılarak uygunsa kök hücre toplamaya başlanır. Periferik kandaki beyaz küre sayısının 1000'den 5000-6000'lere sıçramasının olduğu hastalar genellikle kök hücrenin iyi mobilize olduğu hastalardır.

Kemoterapi ile birlikte uygulanan G-CSF dozundaki artış, sitokinlerin tek başına uygulamasında olduğu gibi mobilizasyon etkinliğini artırır. G-CSF dozu yanı sıra uygulanan kemoterapi dozu da mobilizasyon etkinliğinde önemli olabilir.

Kemoterapi ve sitokin ile mobilizasyonun hastaneye yatış gerektirmesi, aplazi döneminde gelişen infeksiyöz komplikasyonlar, antibiyotik kullanımı ve transfüzyon gereksinimi gibi olumsuz yönleri de vardır (69). Ayrıca uygulama süresi sitokinlere göre anlamlı olarak daha uzundur ve afereze başlamak için kesin bir planlama yapılamaz (51).

### 2.4.4. Yeni Ajanlar ile Kök Hücre Mobilizasyonu

G-CSF'nin uzun etkili varyantları (pegfilgrastim) ve eritropoetin (darbepoetin) mobilize edici ajanlar olarak klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Yarı ömürlerinin uzun olması, hastaya rahatlık sağlama ve toplama zamanının daha esnek olabilmesi gibi yararları vardır.

AMD3100, CXCR4/SDF1a bağlanmasının geri dönüşümlü inhibitörüdür. CD34<sup>+</sup> hücreleri periferik kana mobilize eder. SDF-1 ve CXCR4 arasındaki etkileşim kök hücrelerin homing ve göçünde önemlidir. AMD3100, G-CSF ile uyarılmış CD34<sup>+</sup> hücre mobilizasyonunu ve aferezle toplanan CD34<sup>+</sup> hücre sayısını önemli ölçüde artırır. Tek doz AMD3100 (240 µg/kg) ya da 5 gün G-CSF rejimi sonrası aferezle toplanan CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kıyaslanabilir ölçülerdedir. Önemli toksisiteye rastlanmamıştır ve geç graft yetmezliği gözlenmemiştir. Otolog hematopoetik progenitör hücre mobilizasyonunda AMD3100 ile birlikte G-CSF kullanımı tek başına G-CSF'ye üstündür. Yeni CXCR4 agonisti moleküller (örneğin CTCE-0021) ile ilgili araştırmalar devam etmektedir (70).

#### **2.4.5. Kök Hücre Mobilizasyonunu Etkileyen Faktörler**

Hemapoetik progenitör hücrelerin toplanabilmesini etkileyen faktörler donör ya da işlemle ilişkili olabilir. Donörle ilişkili faktörler; yaş, daha önce alınan kemoterapiler, mobilizasyon rejimi ve mobilizasyon zamanındaki tomboosit sayısıdır. Daha önce yoğun tedavi alan, nitrozüre vb bazı ilaçları kullananlar ile HL, NHL ve prelösemik sendromlar türü hastalığı olanlarda mobilizasyon güç olur. Allogeneik donörler için ise mobilizasyonun güç olacağını gösteren böyle bir veri mevcut değildir (52). İşlemle ilişkili faktörler santral giriş yolu ve hücre ayıran aletlerdeki farklılıklardır. Ancak bugün için HKH toplamının optimum olmasının temeli, donör ya da hasta periferik kanında günlük CD34<sup>+</sup> hücre miktarını sayarak toplamaya başlama zamanına doğru karar verebilmektir (71-73).

Yeterli toplamının mevcut olan en iyi habercisi toplama sabahı kandaki mikrolitre (µl)'ye düşen CD34<sup>+</sup> hücre sayısıdır (74,75). Bazı yazarlar tek aferezde en az  $2-4 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> hücre/kg toplamak için µl'de belli miktarda (8-20/µl) CD34<sup>+</sup> hücre bulunduğunda toplamaya başlamayı tavsiye etmiştir (76).

Geçmişte her merkez afereze başlamak için kendine ait sayıyla karar verirdi (77). Fakat bugün aynı teknolojiyi kullanan merkezlerin aynı sayıya ulaşmasını sağlayan ticari testler geliştirilmiştir. Daha da önemlisi tek platform teknolojisi ile akım sitometride elde edilen CD34<sup>+</sup> hücre sayısını kullanarak afereze ne zaman başlanması ve kaç litre kan kullanılması gerektiğini tahmin etmede kullanılan bir formül mevcuttur (78).

## 2.5. ENGRAFMAN

Engrafman; hazırlık rejimini takip eden aplazi sonrası hücre serilerinin tekrar ortaya çıkarak tam kan tablosunun düzelmesi, verilen lenfohematopoetik hücrelerin konakçıda yerleşmesi olarak tanımlanır. Klinik çalışmalarda standardizasyon sağlanması amacıyla engrafman kriterleri konusunda genel bir görüş birliği oluşturulmuştur.

**Nötrofil Engrafmanı:** Ardışık 3 gün boyunca desteksiz mutlak nötrofil sayısının  $>0.5 \times 10^9/L$  olması veya  $1 \times 10^9/L$  olduğu ilk gün.

**Trombosit Engrafmanı:** Ardışık 3 gün boyunca desteksiz trombositlerin  $>20 \times 10^9/L$  olması veya  $>50 \times 10^9/L$  olduğu ilk gün.

**Lenfoid Engrafman:** İmmün yeniden yapılanma.

### 2.5.1. Engrafmana Etki Eden Faktörler

**Hazırlık rejimi:** Miyeloablatif olan rejimlerde olmayanlara ve indirgenmiş dozlara göre engrafman süresi belirgin olarak uzamaktadır.

**GVHD profilaksisi:** Özellikle uzun süreli metotreksat kullanımına bağlı nötrofil engrafman süresinin uzadığı bilinmektedir.

**Antimikrobiyal profilaksi:** Kinolon profilaksisi altında engrafman hızlanırken trimetoprim-sulfametoksazol altında uzama göstermektedir.

**Kemik iliği stromal yapısı:** Fibrozisli olgularda teorik olarak uzamış engrafman beklenirken yapılan çalışmalarda bu durum kanıtlanamamıştır.

**Kök hücre kaynağı:** Periferik kök hücre ile kemik iliğine göre belirgin olarak daha hızlı nötrofil (2-6 gün daha kısa) ve trombosit (5-8 gün daha kısa) engrafmanı izlenmektedir.

**Kök hücre içeriği:** CD34 miktarı arttıkça nötrofil ve trombosit engrafman süresi kısalmaktadır.

**Nakil sonrası büyüme faktörü kullanımı:** Nakil sonrası büyüme faktörü ile hematopoetik toparlanma hızlanmaktadır.

**Hipersplenizm:** KML ve miyelofibrozisi olan masif splenomegalili olgularda engrafman uzamakla birlikte rutin splenektomi önerilmemektedir (79).

## 2.6. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİN TANIMLANMASI

### 2.6.1. Hematopoetik Kök Hücrelerin İn Vivo Değerlendirilmesi

Miyeloablasyon yapılmış alıcılara transplantasyon sonrası tüm hematopoetik sistemi yeniden oluşturabilmesi HKH'lerin belirleyici özelliğidir. Fare ve çeşitli insan olmayan primat türlerine uygulanan transplantasyonlar insan hematopoezi için değerli deneysel modellerdir. İnsan HKH engrafmanı, immüdüşkün fare (örneğin NOD/SCID) ve fetal koyunlardaki ksenogeneik transplantasyon modelleriyle değerlendirilebilir.

### 2.6.2. Hematopoetik Kök Hücre ve Progenitörlerin İn Vitro

#### Değerlendirilmesi

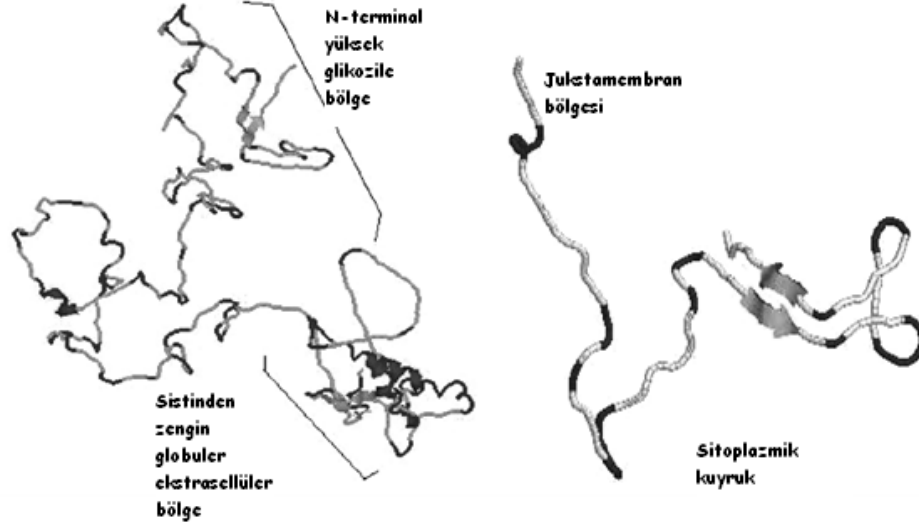
**Uzun Süreli Kültürler:** Hematopoetik kültür testleri; çoğalma ve farklılaşmanın değişik evrelerindeki hematopoetik hücreleri saptamak ve bu hücrelerin hematopoetik dokular ve saflaştırılmış topluluklardaki sıklığını ölçmek için kullanılır. Kullanılan yöntemden bağımsız olarak, uzun süreli kültürlerin başlatılmasından 1-3 hafta sonra gelişen hücrelerin relatif olarak olgun hücreleri temsil ettiği düşünülürken daha sonraki noktalarda oluşan hücrelerin (örneğin 5-8 hafta sonra) çok ilkel hücrelerden (uzun süreli kültür başlatan hücreler, LTC-IC) oluştuğu düşünülür.

**Koloni Testleri:** Koloni oluşturan hücre (CFC) testleri multipotent ve tek seriye özgü progenitörleri ölçmekte kullanılır. En sık uygulanan işlem uygun sitokin kombinasyonlarıyla desteklenen yarı katı besin ortamına tek hücre süspansiyonunun yerleştirilmesidir. Daha immatür olan progenitörler daha geniş koloniler oluşturur ve kolonideki hücrelerin matürasyonu daha uzun zaman alır. Çeşitli hematopoetik hücre türlerinin özellikle ex vivo manipülasyonlar sonrası bölünme ve farklılaşma yeteneğini değerlendiren fonksiyonel testtir. Ek olarak, çeşitli ilaç ya da bileşiklerin insan hematopoetik hücreleri üzerine toksik etkisinin değerlendirilmesini sağlar.

#### Fenotip ve İnsan Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu

**CD34:** CD34 antijeni; CD43, CD45RA, PSGL-1 ve CD164'ü içeren sialomüsin ailesinin bir üyesidir (20). CD34 proteininin moleküler ve biyokimyasal

analizi, bilinen herhangi bir proteinle sıra benzerliği bulunmayan yüksek oranda glikozile bir 115-120 kD monomerik yüzey proteini olduğunu düşündürür (80).



**Şekil 2.2.** İnsan CD34 molekülü- Gangenahalli ve ark. (120)'dan alınmıştır.

İlkel insan hematopoetik hücreleri üzerinde tanımlanan ilk farklılaşma belirteçidir. Aynı zamanda insan HKH ve progenitörlerinin elde edilmesinde en sık kullanılan belirteçtir. Normal insan kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin yaklaşık %1-4'ünde, kararlı durumdaki insan periferik kan çekirdekli hücrelerinin <math><0,1\%</math>inde eksprese edilir (81).

CD34 antijeni evreye özgüdür ve hematopoetik farklılaşmanın erken evrelerindeki hücreleri tanımlar. Bu nedenle bu popülasyon ilkel pogenitörler ve uzun süreli yeniden yapılanma sağlayan kök hücreler yanı sıra miyelid, eritroid, megakaryositik ve lenfositik serilere ait progenitörleri de içerir (82-86). CD34<sup>+</sup> hücrelerin sayımının kök hücrelerin mobilizasyon işlemi ve transplantasyon için kandan toplanmasında yararlı olduğu gösterilmiştir. Yüksek doz tedaviyi takiben 3 serideki erken ya da geç engrafman ve kan hücrelerindeki iyileşmenin önceden tahmin edilmesinde de bilgi sağlamaktadır (85,86).

Tüm serilerde klinik engrafman için gerekli en az CD34<sup>+</sup> hücre sayısı henüz bilinmemektedir çünkü bu kök ve progenitör hücre alt gruplarının bileşimine göre

değişebilir. Fakat kilogram vücut ağırlığı başına 5-10 milyondan fazla CD34<sup>+</sup> hücre içeren graftın hastaların büyük kısmında mutlak nötrofil sayısı ve trombositlerin erken düzelmesini sağladığı ve engrafman yetersizliği riskinin çok düşük olduğu bilinmektedir (82-87).

CD34<sup>+</sup> hücre sayımı klinik olarak yararlı olsa da nakil sonrası hematopoezi destekleyecek hücrelerin sıklık, canlılık ve hematopoetik potansiyelini her zaman tahmin ettirmez.

CD34 insan kök hücre belirteci olarak yaygın kullanılır ancak insan kordon kanı ve erişkin hematopoetik kaynaklarında, HKH ve lenfopoetik potansiyeli olan CD34<sup>-</sup> çok ilkel bir topluluğun varlığına ait deliller mevcuttur. Bu CD34<sup>-</sup> hücreler in vivo ve in vitro olarak CD34<sup>+</sup> HKH'ler de oluşturur. CD34<sup>-</sup> HKH fenotipi ilave olarak CD38 ve lineage spesifik hücre yüzey belirteçlerinin yokluğu ve CD133 pozitif ekspresyonu ile karakterizedir (5).

Miyeloablative tedavi sonrası hematopoezin yeniden sağlanması amacıyla periferik kan kök hücrelerinin daha sık kullanılması CD34<sup>+</sup> hücrelerin tahmini için standart bir metod ihtiyacını doğurmuştur. Akım sitometri, mobilize periferik kanda progenitörlerin sayımı ve aferezle elde edilen ürünün engrafman potansiyelini değerlendirmede değerli bir araçtır (88,89). CD34<sup>+</sup> hücreler için çeşitli sayım şekilleri önerilmiş ancak işlemler homojen olmadığından tartışmalı veriler elde edilmiştir (82,90).

Kompleks yapısı nedeniyle CD34 antijenine karşı geliştirilen klonal antikorlar farklı sensitivite göstermektedir. Nöraminidaz ve proteaz enzimlerine sensitifliklerine göre CD34 antijeninin 3 farklı epitopu vardır. Klas I epitoplar nöraminidaz enzimine kısmen veya tamamen sensitiftir. Klas II epitoplar sadece glikoproteaz enzimine sensitiftir. Klas III epitoplar ise her iki enzimden de etkilenmez.

Antikorum CD34 antijeninin hangi epitopuna karşı geliştirildiği ve hangi florokrom ile konjuge olduğu önemlidir. Ürün örneklerinde klas I antikorlarla yapılan CD34 hücre analizlerinde farklı neticeler elde edilirken, klas II ve III antikorlarla yapılan analizlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer yandan, fluoresein izotiosiyanat (FITC) ile konjuge CD34 epitoplarının düşük bağlanma gösterdiği saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında CD34<sup>+</sup> hücre analizinde CD34

molekölünün tüm glikolize varyantlarını ayırt eden klas II ve klas III antikorların ve pikoeritrin (PE) konjuge olanların kullanılması önerilir.

Farklı tip CD34<sup>+</sup> hücre analizlerinde CD45 antikorunun kullanım amacı; eritrosit, normoblast, trombosit ve debristen beyaz küreleri ayırmaktır. CD45 antikorları olarak CD45'in tüm glukofomlarını saptayabilen pan CD45 antikorları kullanılmalıdır.

### **CD34<sup>+</sup> Hücre Sayımında Standardizasyon Gerektiren Parametreler**

- 1) Örnek alımı, laboratuara gönderilmesi ve çalışılması
- 2) Kök hücre toplamaya başlanacak periferik kan CD34<sup>+</sup> hücre sayısı
- 3) Kullanılacak CD34 ve CD45 monoklonal antikor seçimi
- 4) Canlılık değerlendirilmesi
- 5) Hücrelerin ayrılması, lysing kullanımı ve sayılması
- 6) Absolü sayı belirleme
- 7) Ters pipetleme
- 8) İzotopik kontrol kullanma
- 9) Kapı alma stratejileri ve analiz

### **Laboratuvarlar Arası CD34 Analizinde Görülen Farklılıkların Kaynakları**

- 1) Seçilen monoklonal antikor
- 2) Canlılığın değerlendirilmesi
- 3) Beyaz küre sayımı ve dilüsyonda yapılan hatalar
- 4) Parlak ve zayıf pozitif CD34<sup>+</sup> hücreleri kapı almada farklılık
- 5) Hesaplama normoblastları elimine ederek düzeltmeme

### **CD34<sup>+</sup> Hücre Sayımında Kullanılan Akım Sitometri Protokolleri**

- 1) Milan-Mulhouse
- 2) SIHON
- 3) ProCOUNT
- 4) ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering)

İlk tanımlanan protokol Milan protokolü olup, daha sonra tam kan ve lyse-no-wash ile direkt immünfloresan-CD45 kullanılarak Mulhouse protokolü geliştirilmiştir. SIHON protokolünde ise lazer boya solüsyonu (nükleik asit boyası), anti CD14 ve



antiCD66e kullanılarak non-spesifik bağlanmanın elimine edilmesi ve daha uygun kapı alınması amaçlanmıştır. Daha sonra ISHAGE protokolü tanımlanmıştır.

ISHAGE protokolünde önemli olan ardışık kapı alma stratejisidir ve çok merkezli çalışmalarda en uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Anti-CD45-FITC ve anti-CD34-PE içeren 2 tüp gereklidir. İzotop kontrolü gerekmez çünkü kapı alma stratejisiyle non-spesifik bağlanma elimine edilir. İlk dot plot grafikte CD45'e karşı side scatter (SSC) vardır ve tüm hücreler bu dot plot grafikte görülür. Zayıf ve parlak CD45 pozitif olan hücreler birlikte R1 kapısı alınır. Bu kapı ile eritrositler, debris ve plateletler elimine edilmiş olur. Takiben R1 kapı hücrelerinde CD34'e karşı SSC dot plot grafiği çizilir ve CD34<sup>+</sup> hücre kapısını içine alan R2 kapısı alınır. Üçüncü dot plotta CD45'e karşılık SSC dot plotta R1 ve R2'deki kriterleri birlikte içeren hücreler izlenir. Buradan da düşük SSC ve düşük-orta CD45 floresans gösteren hücrelerde R3 kapısı alınır. Dördüncü dot plot ise R1+R2+R3 hücrelerini içeren FSC'ye karşı SSC olup seçilen hücrelerin lenfosit bölgesinde olduğu belirlenir ve R4 kapısı bu hücrelerde alınır. Beşinci dot plotta CD45'e karşı CD34 olup kapı alınmadan tüm hücreler izlenir ve CD34<sup>+</sup> hücrelerdeki düşük CD45 floresansının sınırı gözlenir. Son dot plotta ise forward scatter (FSC)'ye karşı side scatter (SSC) olup birinci dot plotta sadece lenfositlerin kapı alındığı R5'teki hücreler izlenir ve buraya R4 kapısının aynısı alınır ve böylece lenfositten daha küçük olan R4 kapısının dışına düşen parlak CD45 elimine edilir. CD34 çalışması 2 tüpte yapılır ve ortalama CD34<sup>+</sup> hücre sayısı kullanılır. İki tüpün değeri arasındaki fark %5'ten fazla ise test tekrarlanır. CD34<sup>+</sup> hücre sayısı, CD45<sup>+</sup> hücrelerdeki CD34<sup>+</sup> hücrelerin yüzdesinin ürün tam kan sayım analizörlerinde çalışılarak saptanan beyaz küre sayısı ile çarpılarak bulunur. Beyaz küre sayımında normoblastlar ekarte edilerek sayım değeri alınmalıdır.

ProCOUNT kitinde 3 floresan kanalı da kullanıldığından canlılık değerlendirme ya da CD34<sup>+</sup> hücrelerin alt gruplarını belirleme mümkün değildir(78).

**HKH'ler Üzerinde Lineage Belirteçlerinin Yokluğu:** HKH'leri içeren ilkel hematopoetik hücreler spesifik kan hücre tiplerinin terminal matürasyonu ile ilişkili çeşitli yüzey belirteçlerini eksprese etmezler. Bu nedenle çeşitli lineage belirteçlerinin eksprese edilmemesi çoğu hematopoetik hücre popülasyonundaki immatür hücreleri farklılaşmış hücrelerden ayırmada kullanılabilir. Lin<sup>-</sup> insan hücrelerini izole etmede sıklıkla kullanılan belirteçler glikoforin A, CD2, CD3, CD4,

CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 ve CD66b'dir. Lin<sup>-</sup> hücre seçimi seçilen belirteç kombinasyonuna göre HKH'lerde 20-500 kat zenginleşme sağlar.

Lin<sup>-</sup> ya da CD34<sup>+</sup> hücrelerden zengin bir popülasyonda progenitör aktivitesi olan hücrelerin sıklığı relatif olarak düşüktür (<%20) ve LTC-IC ve HKH sıklığı daha da düşüktür (sırasıyla <%1 ve <%0.1). HKH'ler, progenitörler ve daha olgun hücreler diğer belirteçleri farklı eksprese etme özelliklerine göre ayrılabilir. HKH'ler ve ilkel progenitör hücreler üzerinde olmayan ya da sadece zayıf eksprese edilen fakat bazı lineage committed progenitör hücre tiplerinde yüksek oranda eksprese edilen diğer belirteçler CD33, CD71, HLA-DR ve CD45RA'dır. Kök hücre izolasyonu için diğer stratejiler Thy-1, c-Kit ya da CD133 gibi spesifik belirteçlerle kombine Lin<sup>-</sup> ve/veya CD34<sup>+</sup> hücrelerin pozitif seleksiyonudur (94).

### **2.6.3. Kök Hücre Tanımlama ve İzolasyonunda Yeni Belirteç ve**

#### **Metodlar**

#### **Aldehid Dehidrogenaz (ALDH)**

İnsan kök hücreleri genel olarak CD34 gibi yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile karakterizedir fakat yeniden çoğalan insan hematopoetik hücrelerinin tümü CD34 eksprese etmez. Ayrıca hücre yüzey fenotipi hücre siklusu ilerledikçe ve ex vivo manipülasyonla değişebilir (96-98).

Hematopoetik hücreleri sadece yüzey fenotipine dayanarak saflaştırmanın bazı kısıtlılıkları vardır:

- 1) Hücre yüzey belirteçleri türler ve kök hücre kaynağına göre değişebilir.
- 2) İnsan kök hücre fenotipi hücre siklusu ilerlemesi, ex vivo kültür ve in vivo transplantasyonla değişebilir.
- 3) Transplante edilen kök hücrelerin fenotipi azalmış fonksiyonel aktiviteye rağmen sabit kalır.
- 4) İnsan kök hücrelerinin hematopoetik belirteçlere dayanarak saflaştırılması kısıtlı gelişim potansiyeli olan hücreleri seçebilir ve dönüşümlü kök hücre ya da progenitör fonksiyon gösterenleri dışlayabilir.

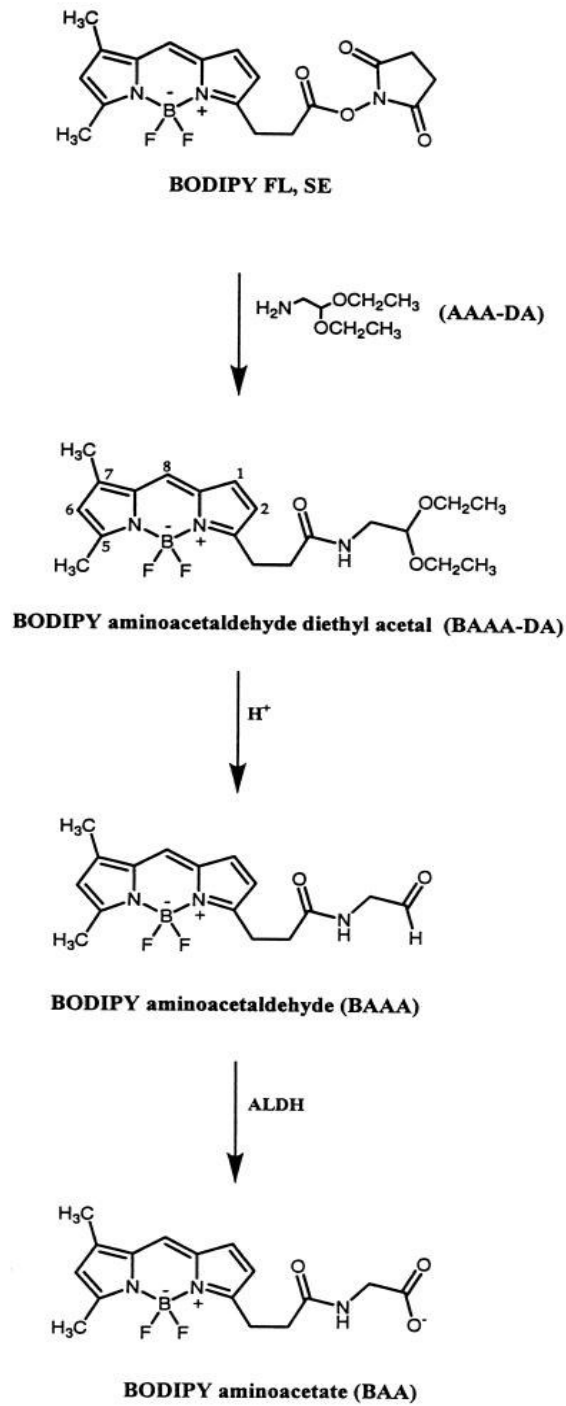
Bu nedenle insan kök hücrelerini tamamen fenotipik hücre yüzey moleküllerine dayanmadan etkin olarak izole eden metodlara ihtiyaç vardır. Umut

vaad eden yöntemlerden biri HKH'leri fenotipten ziyade korunmuş kök hücre fonksiyonuna göre izole etmektir.

Yüzey fenotipi kullanımına eşdeğer bir saflaştırma stratejisi ilkel hücrelerin hematopoetik gelişim süresince oksidatif hasardan korunmasıyla ilgili intraselüler enzim aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Bunlardan biri retinoid metabolizması ve HKH'lerin siklofosamid gibi alkilleyici ajanlara direncinde rol oynayan sitozolik ALDH'dır.

İnsan kordon kanından izole edilen, matür seri belirteçleri olmayan ve ALDH aktivitesi yüksek olan HKH'lerin ilkel hücre belirteçleri CD34 ve CD133'ü bol miktarda eksprese ettikleri gösterilmiştir. Klonojenik progenitör fonksiyon ve in vivo yeniden yapılandırma yeteneği ise sadece ALDH aktivitesi yüksek grupla sınırlı kalmış, ALDH aktivitesi düşük grupta saptanmamıştır (21). İnsan kordon kanında CD34<sup>+</sup> kök ve progenitör hücre kompartmanlarını ayırmada ALDH aktivitesini ilk kullanan Storm ve arkadaşlarıdır. Farklı fonksiyonları olan insan hematopoetik kök ve progenitör hücrelerinin prospektif izolasyonunda floresan bir substratın (Aldefluor) ALDH aracılı metabolizması ve daha sonra akım sitometri uygulanması yararlıdır denmektedir (22).

Aldefluor, kendisi ALDH'nın substratı olmayan bodipy-aminoasetaldehit dietil asetal (BAAA-DA) şeklindedir. BAAA-DA, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünür ve ALDH için floresan bir substrat olan bodipy-aminoasetaldehite (BAAA) dönüştürülmek için asite maruz bırakılır. BAAA yüksüzdür ve intakt canlı hücreleri plazma membranlarından serbestçe difüzyona uğrar. İntraselüler ALDH, BAAA'yı serbest difüzyona izin vermeyen negatif yükü nedeniyle hücre içinde biriken bodipy-aminoasetata (BAA) dönüştürür.



Şekil 2.3. BAAA-DA, BAAA ve BAA'nın yapısı –

<http://www.stemcell.com/technical/aldh.aspx>

(16/08/2008)'den alınmıştır (98 ).

Aldefluor kiti içinde bulunan buffer BAA'nın hücrelerden dışarı çıkmasını engelleyen bir transport inhibitörü içerir. Sonuç olarak, yüksek miktarda ALDH eksprese eden hücrelerde BAA ve böylece floresans birikir. Bu floresans standart akım sitometri ile ölçülebilmektedir.

BAAA'lı hücrelerin 10 kat daha fazla miktarda ALDH inhibitörü dietil amino benaldehit (DEAB) ile inkübasyonu ALDH<sup>br</sup> hücrelerin floresans yoğunluğunda önemli azalmayla sonuçlanır ve negatif kontrol olarak kullanılır.

Mobilize periferik kan hücrelerindeki ALDH sıklığı %3.1±4.8 olarak bildirilmiştir. Kordon kanında ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> hücre sıklığı ise yaklaşık %1 olarak bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda CD34 eksprese eden ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> hücrelerin sıklığı kordon kanı ve mobilize periferik kan hücreleri arasında küçük farkla %73-95 olarak bildirilmiştir. CD34 eksprese eden ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> insan kemik iliği hücrelerinin sıklığı ise daha azdır (%49-59). ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> kordon kanı ve kemik iliği hücrelerinin büyük çoğunluğu, ALDH'nın ilkel hematopoetik hücrelerde ekspresyonu ile uyumlu olarak, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-/lo</sup> fenotipindedir. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-/lo</sup> olan ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> hücrelerin mobilize periferik kandaki sıklığı sadece %0.75±1.2 olarak bildirilmiştir. ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> hücrelerin büyük kısmı ilkel hematopoetik hücrelerin diğer fenotipik özelliklerine de sahiptir (örneğin CD117 ve CD133). ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup>CD133<sup>+</sup> hücreler çok ilkel multipotent kök hücreleri temsil edebilecek küçük bir CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücre alt grubunu içerir.

ALDH<sup>br</sup> hücrelerin %63'ünde lineage antijenler azdır veya bulunmaz. Lin<sup>-</sup> ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> hücrelerin çoğu CD34<sup>+</sup>'tir. CD34<sup>-</sup>ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> hücreler lineage antijen ekspresyonu açısından heterojendir. ALDH<sup>br</sup>CD34<sup>-</sup> hücrelerin çoğu lineage antijenleri eksprese eder fakat ALDH<sup>dim</sup> veya ALDH<sup>-</sup> hücrelerden çok daha düşük düzeydedir ve lineage pozitif hücrelere farklılaşmakta olan committed öncülleri temsil edebilir. Kordon kanındaki ALDH<sup>br</sup>CD34<sup>-</sup> hücrelerin %0.04'ten daha azı ölçülemeyen lineage antijen ekspresyonuna sahiptir ve kemik iliğindeki benzer ALDH<sup>br</sup>CD34<sup>-</sup> grupların da CD38<sup>-/lo</sup> olduğu bildirilmiştir.

Genetik olarak immün yetmezliği olan NOD/SCID ve NOD/SCID/β2 mikroglobulin/knock out farelerde multilineage hücre engrafman yeteneği saptanan insan HKH'lerinin ALDH<sup>br</sup>SSC<sup>lo</sup> ve ALDH<sup>br</sup>Lin<sup>-</sup> alt gruplarda olduğu bulunmuştur.

İn vivo ve in vitro veriler ALDH aktivitesinin in vitro koloni oluşturma yeteneği olan committed progenitörler yanı sıra in vivo olarak farklı kinetik ve süreli olgun kan hücreleri oluşturabilen farklı insan HKH alt gruplarından zengin heterojen bir hücre topluluğunu tanımladığı gösterilmiştir.

Fallon ve ark (23) otolog mobilize periferik kan kök hücre graflarıyla verilen  $ALDH^{br}SSC^{lo}$  hücre sayısı ile nötrofil ve trombosit düzelmesine kadar geçen süre arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar  $ALDH^{br}$  hücre sayımının  $CD34^{+}$  hücre ölçümüne bir alternatif olabileceğini yani HKH'lerin fenotip yerine fonksiyonel özelliklere dayalı olarak tanımlanıp sayılabileceğini gösterir (99).

$CD133$  hematopoetik, endotelial ve nöral epiteliyal serilerin ilkel insan progenitör hücreleri üzerinde eksprese edilen bir yüzey molekülüdür. Daha önce tanımlanan insan kök hücre yüzey antijenleri ile homoloji göstermez. İnsan HKH'leri fenotipik olarak daha kısıtlı hücrelere farklılaştıkça hızla azalır. İrradyasyon ve transplantasyon sonrası hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin kemik iliği mikroçevresine göçünde rol oynayabilir.

$ALDH^{hi}CD133^{+}Lin^{-}$  grup başlıca  $CD34^{+}$  hücreler ve nadir  $CD34^{-}CD38^{-}CD133^{+}Lin^{-}$  hücreden oluşan, NOD/SCID farelerde yeniden çoğalma potansiyeline sahip olduğu gösterilen ilkel bir HKH hücre grubunu içerir.  $ALDH^{hi}CD133^{+}Lin^{-}$  hücreler hem kısa hem uzun dönemde yeniden çoğalan insan HKH'ler içerdiğini düşündürecek şekilde seri nakil sonrası alıcılarda engraftman göstermiştir (99).

Daha önce  $ALDH^{br}$  hücrelerle yapılan tüm çalışmalarda  $SSC^{lo}ALDH^{br}$  kordon kanı ve mobilize periferik kanın  $CD34^{+}$  ve  $CD34^{+}CD38^{-}$  hücrelerden zengin olduğu gösterilmiştir (94-96). Fakat  $CD34$  ve  $ALDH$  eksprese eden hücreler arasında çakışma mevcuttur.  $ALDH^{br}CD34^{+}$  hücreler en ilkel hematopoetik progenitörlerden zengindir. Kısa süreli miyeloid progenitörler en bol  $ALDH^{br}CD34^{+}$  hücre grubunda bulunur.  $ALDH^{-}CD34^{+}$  hücreler az miktarda ilkel progenitör ve kısa süreli miyeloid progenitör içerir. Kısa süreli kültürlerde  $ALDH^{-}CD34^{+}$  hücrelerin  $ALDH^{br}CD34^{+}$  hücrelerden daha fazla daha fazla NK progenitörü içerdiği gösterilmiştir. Aynı in vitro koşullar altında  $ALDH^{br}CD34^{+}$  hücreler miyeloid nesiller oluştururken  $ALDH^{-}CD34^{+}$  daha çok lenfoid nesiller oluşturur.

$ALDH$  ve  $CD34$  ekspresyonu insan hematopoezinin gelişimsel aşamalarını ayırmada da kullanılabilir. En ilkel hematopoetik hücreler  $ALDH$  ve  $CD34$  eksprese

eder. Erken miyeloid farklılaşma süresince CD34 ve ALDH ekspresyonu korunur. Lenfoid farklılaşma süresince ALDH ekspresyonu CD34 ekspresyonundan önce kaybolur. İnsan CD34<sup>-</sup> hücreler NOD/SCID farelerde direkt kemik iliğine enjekte edilmezlerse engrafman göstermezler. Kemik iliğinde en fazla yenilenme sağlayan hücreler hem CD34 hem ALDH eksprese edenlerdir. ALDH<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> hücreler uzun süreli NOD/SCID rekonstitüsyonda sadece sınırlı kapasiteye sahiptir ve sadece kısa süreli in vitro kültürlerde lenfoid potansiyelleri gösterilmiştir. Fakat bazılarının transplantasyon sonrası kısa süreli immüniteyi yeniden oluşturması mümkündür (22).

Kök hücrelerin lineage deplezyonunu takiben yüksek ALDH aktivitesine göre seçimi klinik uygulamaya çok uygundur ve klasik fenotipik izolasyona göre bazı avantajları vardır. Boyama ve seçim yöntemleri etkilidir, yüksek oranda tekrarlanabilir ve aşırı hücre manipülasyonu yapmadan klinik uygulamalara adapte edilebilir. Aldefluor substratı insan hücrelerine toksik değildir ve insan hücrelerinin yeniden çoğalma fonksiyonunu değiştirmez. Deoksiribonükleik asit (DNA) arasına girmez ve işaretli hücrelerden etkili olarak temizlenme sağlayacak şekilde çoklu direnç pompası için bir substrattır. Sonuç olarak ALDH seleksiyonu DNA'ya bağlanan boyalarla seçime kıyasla relatif olarak daha güvenli gözükmektedir. Yüksek ALDH ekspresyonu çeşitli kök hücrelerin intrinsik bir özelliği olduğundan bu yöntemin modifiye edilmesi seriye sınırlı olabilen karakterize edilmemiş veya değişken hücre yüzey molekülleri kullanmadan kök hücreleri diğer dokulardan ayırmada standart bir yöntem sağlayabilir (21).

SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücreler BAAA boyası ve FACS analizi kullanılarak toplanan mobilize edilmiş periferik kan örneklerinde sayılabilir ve izole edilebilir. BAAA ile boyama yüksek oranda tekrarlanabilen basit bir işlemdir. BAAA'nın emisyon spektrumu diğer florokromlarla önemli ölçüde çakışmaz böylece çok parametrelili FACS analizi ile ilave belirteçlerin kombinasyonuna izin verir. SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücreler ilkel hematopoetik hücrelerin fenotipik özellikler, kısa ve uzun süreli CFU oluşturma yeteneği, primer ve sekonder LTC'de yüksek proliferasyon potansiyeli, multipl hematopoetik seriler oluşturma ve otolog periferik kök hücre nakli sonrası nötrofil ve trombosit engrafmanı ile korelasyon gibi birçok özelliğini taşır. BAAA'nın hücrenin canlılığını gösteren bir boya olması onu kriyoprezervasyon uygulanan hücrelerin ve canlılığı bozulmuş diğer örneklerin boyanmasında da yararlı

kılar. CD34'e dayalı yöntemler canlı ve cansız hücreleri ayıramaz (139). BAAA boyası hem lineage negatif CD34<sup>+</sup> hücreleri hem de CD34<sup>-</sup> hücreleri kapsar. SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> popülasyonunun bir alt grubu olan lineage negatif CD34<sup>-</sup> hücrelerin biyolojik önemi halen bilinmemekle birlikte yeni tanımlanan CD34<sup>-</sup> ilkel HKH ve lenfoid prekürsörleri içerebilir (103,104).

BAAA boyama ve akım sitometrik hücre tiplendirme hematopoetik hücre sayımına ilave olarak SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücrelerin izolasyonunda da yararlı olabilir. Lökoferezle toplanan örneğin HKH ve progenitörlerden zenginleştirilmesi klinik yararlar sağlayabilir. Transplant örneğinin hacminin azaltılması kök hüce nakli sırasında büyük hacimli sıvı ve DMSO infüzyonunun toksisitesini en aza indirebilir (105). SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücrelerin izolasyonu tümör hücreleriyle kontaminasyonun temizlenmesinde yararlı olabilir (105-108). SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücrelerin izolasyonu T hücre eksiltme tekniği olarak da yararlı olabilir (107,108). Bu yöntem kullanılarak yapılan T hücre eksiltme otoimmün hastalıklardaki otoreaktif T hücrelerin ortadan kaldırılmasında da yararlı olabilir. SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hematopoetik hücrelerin izolasyonu gen tedavisi ve kök hücrelerin ex vivo ekspansiyonunda da kullanılabilir (106-107). Son olarak, birçok dokudaki kök hücreler yüksek miktarda ALDH eksprese edebileceğinden SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücrelerin tanımlanması hematopoetik sistem dışındaki barsak, karaciğer ya da deri gibi diğer dokulardan kök hücrelerin izole edilmesinde yararlı bir yöntem olabilir (113-116).

**Side Population (SP) Fenotipi:** Fenotipik ve fonksiyonel değerlendirmeler ilkel hematopoetik hücrelerin rhodamine-123 ve Hoechst 33342 gibi floresan mitokondriyal ve DNA bağlayıcı boyaları dışarı pompalama yetenekleriyle tanımlanabileceğini göstermiştir. Tipik akım sitometrik profilleri nedeniyle Hoechst<sup>lo</sup> kök hücre topluluğu side population (SP) fenotip olarak adlandırılır. SP hücreler çeşitli hayvan türlerinin hematopoetik dokularında da tanımlanmıştır. SP fenotip non hematopoetik dokulardaki kök hücrelerin de özelliğidir. SP hücreler Lin<sup>-</sup>'tir. SP fenotipi tümör hücrelerin çoklu ilaç direncinden de sorumlu olan membran trasporterlerinin yüksek oranda ekspresyonuna bağlanmıştır. İlkel hücrelerde birkaç çoklu ilaç taşıyıcı molekül eksprese edilmesine rağmen ABCG2 ya da BCRP1 molekülünün SP hücrelerin Hoechst boyasını dışarı pompalayabilmesi için gerekli ve



yeterli olduğu gösterilmiştir. ABCG2 ekspresyonu ilkel hücrelerde en fazladır ve farklılaşma oldukça azalır.

**CD201 (EPCR):** CD201(Endotelyal protein C reseptörü, EPCR), ilkel hematopoetik hücrelerde tanımlanan ilginç bir belirteçtir. Başlangıçta endotelyal hücrelerde tanımlanmıştır ve koagülasyon ve inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar. Protein ve aktive protein C doğal ligandlarıdır. Fare hematopoetik kök hücrelerinin izolasyonunda yararlı bir belirteç olabilir. İnsan CD201/EPCR gen ekspresyonu ilkel insan hematopoetik hücrelerinde de bulunmuştur ve insan HKH saflaştırılmasında yararlı olabilir (94).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hasta Grubu

Çalışma için ESOGÜTF etik kurulundan izin alınmış (2007/229) ve çalışmaya katılan hastalara gerekli açıklamalar yapılarak bilgilendirilmiş yazılı onay alınmıştır.

Çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda prospektif olarak gerçekleştirildi. Çalışmaya kök hücre nakli uygulanması planlandığı için kök hücre toplama işlemi gerçekleştirilen 22'si erkek, 15'i kadın toplam 37 hasta dahil edildi (Kadın/Erkek oranı = 0,68). Yeterli mobilizasyon sağlanamayan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Hastaların yaş ortalaması  $45.62 \pm 13.48$  yıldır. Primer tanıları multipl miyelom (n=15), Hodgkin lenfoma (n=8), non-Hodgkin lenfoma (n=5), akut miyeloid lösemi (n=4), akut lenfoblastik lösemi (n=2), kronik miyeloid lösemi (n=1), aplastik anemi (n=1) ve germ hücreli testis tümörü (n=1) şeklindeydi. Kök hücre nakli uygulanan hastaların 27'sine otolog, 7'sine allogeneik nakil yapıldı. Üç hastaya ise çalışmaya hasta alındığı süre içinde henüz nakil uygulanamamıştı. Yeterli hücre toplanamadığından 7 hastaya bir kezden fazla mobilizasyon yapıldı. Yapılan mobilizasyon sayısı toplam 46'ya ulaştı. Tek başına G-CSF ile mobilizasyon sayısı 28, siklofosfamid ve G-CSF kullanılarak yapılan mobilizasyon sayısı 18'di. G-CSF olarak tüm hastalarda filgrastim kullanıldı. Filgrastim; tek başına G-CSF ile mobilizasyon durumunda  $10 \mu\text{g/kg/gün}$  dozunda, siklofosfamidle kombine kullanıldığında  $5 \mu\text{g/kg/gün}$  dozunda subkutan uygulandı. Toplama işlemine allogeneik nakil yapılan hastaların donörlerinde ve tek başına G-CSF ile mobilizasyon yapılanlarda filgrastimin 4.günü, diğerlerinde beyaz küre sayısı  $\geq 1000$  ve periferik kanda bakılan  $\text{CD34}^+$  hücre sayısı  $\geq 10/\mu\text{l}$  olduğunda başlandı. Hastaların toplama günü periferik kanlarından ve toplanan üründen alınan örnekte  $\text{CD34}^+$  ve  $\text{ALDH}^+$  hücre miktarı analiz edildi.

#### 3.2. CD34 Analizi

Tüp içine  $\text{CD45FITC/CD34PE}$  monoklonal antikordan (Beckton Dickinson, USA)  $20\mu\text{l}$  kondu. Üzerine periferik kan/ürün  $1 \times 10^6/\text{mm}^3$  hücreye ayarlanarak antikorun üzerine  $100 \mu\text{l}$  eklendi. Karanlıkta oda ısısında 20 dk bekletildi. Üzerine 2 cc amonyum klorid kondu. Oda ısısında ışıktan koruyarak 10 dk bekletildi. 1800

rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. İki kez 2 cc fosfat buffer salin (PBS) ile yıkandı. Pellet üzerine 500 µl PBS kondu. Resüspanse edildi. BD FACS Calibur akım sitometri cihazıyla Cell Quest programında en az 60.000 hücre saydırıldı. ISHAGE protokolüne göre analiz edildi.

### 3.3. ALDH Analizi

Kuru Aldefluor (Aldagen, USA) vialinin içerisine 25 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 dk bekletildi. Bunun üzerine 25 µl 2N HCl kondu ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerine 360 µl Aldefluor assay buffer eklendi ve karıştırıldı. Eritrositin beyaz küreye oranı 2/1'den fazla ise amonyum kloridli solüsyonlarla eritrositler lize edildi. Hücreler Aldefluor assay buffer ile  $1 \times 10^6$  'ya ayarlandı. İçinde  $1 \times 10^6$  hücre olan 1 ml hücre süspansiyonu hazırlandı. 2 tüp alınarak birine test, diğerine kontrol yazıldı. Kontrol tüpüne 5 µl DEAB solüsyonu eklendi. Tüplerin ağzı hemen kapatıldı. Test tüpüne içinde  $1 \times 10^6$  hücre olan 1 ml hücre süspansiyonu kondu. Test tüpüne 5 µl Aldefluor reagent eklendi, karıştırıldı ve 0.5 µl'si derhal kontrol (DEAB) tüpüne kondu. Her 2 tüp de 37 derecede 30 dk inkübe edildi. FACSCalibur akım sitometri cihazında CellQuest programında 60 bin hücre sayılarak analiz edildi.

### 3.4. Kök Hücre Toplama İşlemi

Çalışmaya alınan hasta ve donörlerden periferik kök hücre toplama işlemi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Aferez Ünitesi'nde bulunan Fresenius-AS-204 ve Fresenius Comtec modeli cihazlarla gerçekleştirildi. Damar yolu olarak 18G intraketle kateterize edilen antekubital ven ya da santral venöz kateterler kullanıldı. İşlemlerde 10800 ml kan işlenerek ortalama 400-460 ml kök hücre içeren ürün toplandı. Periferik kök hücre toplama programında C4Y seti ve mononükleer hücre toplama programında P1Y seti kullanıldı. İşlem hızı 50-60 ml/dk kan akımı olarak gerçekleştirildi ve 216-252 dk sürede bitirildi. Antikoagülan olarak ACD-A (ortalama 1:10 ± 1) kullanıldı.

Allogeneik nakil yapılan hastalar için toplanan ürünlerden kan grubu hasta ile aynı olanlar hemen verildi. ABO uyumsuz ürünler eritrosit veya plazma eksiltmesi yapıldıktan sonra verildi. Otolog nakil amacıyla toplanan kök hücreler miktar düşürüldükten sonra DMSO+Plazma+RPMI 1640 solüsyonu ile karıştırılarak Planer

CryoIII otomatik dondurma cihazı ile dondurularak sıvı azot buhar fazında -196 °C'de nakil zamanına kadar saklandı.

### **3.5. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel analizlerde SPSS for Windows 13.0 kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk's testi ile analiz edildi. Bağımsız 2 grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, bağımlı verilerin karşılaştırılmasında Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı. Değişkenler arası ilişkilerin belirlenmesinde Spearman Correlation Coefficient hesaplandı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (S.S.) olarak özetlendi.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Otolog ve Allogeneik Kök Hücre Nakli Yapılan Tüm Hastaların Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda otolog kök hücre nakli yapılmak amacıyla hastaların kendisinden ve allogeneik kök hücre nakli yapılmak amacıyla sağlıklı donörlerinden elde edilen periferik kan ve kemik iliği örneklerinden CD34 ve ALDH analizi yapıldı. Hastaların hem periferik kanında hem de toplanan üründe CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre sayıldı. Periferik kan örnekleri tek başına G-CSF ya da siklofosfamid+G-CSF ile mobilizasyon sonrası elde edildi. Yeterli ürün toplanana kadar geçen gün sayısı 1-3'tü.

**Tablo 4.1.** Ürün toplama öncesi hasta ve donörlerden elde edilen tam kan sayımı sonuçları

	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
	Ortalama ± S.S.		
<b>Hemoglobin (gr/dl)</b>	11.60 ± 2.39 (n=46)	11.75 ± 2.21 (n=40)	11.26 ± 2.18 (n=17)
<b>Beyaz Küre (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	21108.70 ± 19233.72 (n=46)	24690.24 ± 15510.83 (n=41)	36388.24 ± 23385.84 (n=17)
<b>Absolü Nötrofil Sayısı (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	17308.89 ± 16165.41 (n=45)	20295.0 ± 13324.26 (n=40)	30176.47 ± 21970.62 (n=17)
<b>Absolü Lenfosit Sayısı (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	1575.55 ± 1490.14 (n=45)	1685.00 ± 1225.06 (n=40)	1452.94 ± 800.87 (n=17)
<b>Trombosit (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	164130.40 ± 118850.70 (n=46)	133450.00 ± 68522.86 (n=40)	111176.50 ± 46248.29 (n=17)

Hasta ve donörlere ait tam kan sayımı sonuçları toplama işleminin günlerine göre karşılaştırıldığında, 1. ve 2.gün hemoglobin (Hb) değerleri arasında fark saptanmazken 3.güne ait Hb değerleri 1 ve 2. günlere göre anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0.05). Beyaz küre (BK) değerleri için de 1. ve 2.günler arasında fark saptanmadı. Üçüncü güne ait beyaz küre değerleri hem 1. hem de 2.güne göre

yüksek bulundu (sırasıyla  $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Birinci gün elde edilen absolü nötrofil sayısı (ANS) ile 2 ve 3.günler arasında anlamlı fark gözlenmezken 3.günde 2.günden anlamlı düzeyde fazlaydı ( $p<0.01$ ). Absolü lenfosit sayıları (ALS) arasında günlere göre fark saptanmadı. Trombosit değerleri ise 3.günde 1 ve 2. günlerden anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.01$ ).

**Tablo 4.2.** Hasta ve donörlerden elde edilen periferik kan ve ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları

	1.GÜN		2.GÜN		3.GÜN	
	Ortalama $\pm$ S.S.					
	Periferik Kan	Ürün	Periferik Kan	Ürün	Periferik Kan	Ürün
CD34 %	0.67 $\pm$ 0.93 (n=41)	1.90 $\pm$ 2.89 (n=42)	0.43 $\pm$ 0.82 (n=36)	1.30 $\pm$ 2.30 (n=36)	0.16 $\pm$ 0.18 (n=16)	0.60 $\pm$ 0.62 (n=16)
CD34/ $\mu$ l	45.90 $\pm$ 55.30 (n=41)	4646.23 $\pm$ 8479.76 (n=42)	64.18 $\pm$ 109.53 (n=36)	4379.32 $\pm$ 9004.85 (n=36)	42.12 $\pm$ 44.29 (n=16)	2189.06 $\pm$ 2250.58 (n=16)
ALDH%	0.65 $\pm$ 0.91 (n=38)	1.74 $\pm$ 2.54 (n=39)	0.43 $\pm$ 0.82 (n=36)	1.41 $\pm$ 2.40 (n=36)	0.18 $\pm$ 0.19 (n=16)	0.67 $\pm$ 0.68 (n=16)
ALDH/ $\mu$ l	52.49 $\pm$ 66.54 (n=38)	3842.20 $\pm$ 6363.79 (n=39)	67.02 $\pm$ 107.25 (n=36)	4691.70 $\pm$ 9337.44 (n=36)	59.41 $\pm$ 67.90 (n=16)	2505.33 $\pm$ 2692.96 (n=16)

Hasta ve donörlerden elde edilen periferik kan örneklerindeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı % olarak değerlendirildiğinde 1,2 ve 3.günler arasında fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı olarak bakıldığında ise 2.gün elde edilen miktar 1.gün elde edilenden fazlaydı ( $p<0.05$ ), diğer günler arasında anlamlı fark yoktu. ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı için % ve mikrolitrede olarak günler arasında fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Birinci gün ortalama ALDH<sup>+</sup> hücre 52.49 $\pm$ 66.54/ $\mu$ l iken CD34<sup>+</sup> hücre 45.9 $\pm$ 55.3/ $\mu$ l idi. İkinci gün ALDH<sup>+</sup> hücre 67.02 $\pm$ 107.25/ $\mu$ l, CD34<sup>+</sup> hücre ise 64.18 $\pm$ 109.53; üçüncü gün ALDH<sup>+</sup> hücre 59.41 $\pm$ 67.9/ $\mu$ l, CD34<sup>+</sup> hücre 42.12 $\pm$ 44.29/ $\mu$ l idi. ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücre birinci gün ortalama 6.59/ $\mu$ l, ikinci gün 2.84/ $\mu$ l, üçüncü gün 17.29/ $\mu$ l idi. Periferik kanda birinci gün %12.5, ikinci gün %4,

üçüncü gün %29 ALDH<sup>+</sup> hücre CD34<sup>+</sup> hücreye göre daha fazla olduğu halde toplanan ürün analiz edildiğinde ALDH<sup>+</sup> hücre birinci gün %3, ikinci gün %6, üçüncü gün %11 daha fazla saptandı.

Hasta ve donörlerden elde edilen ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı % olarak değerlendirildiğinde 1,2 ve 3.günler arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). Mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı olarak bakıldığında ise her ikisi için benzer sonuçlar elde edildi. İkinci gün elde edilen miktar 1.gün elde edilenden anlamlı düzeyde fazlaydı (p<0.05), diğer günler arasında anlamlı fark yoktu.

**Tablo 4.3.** Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 ve ALDH miktarları

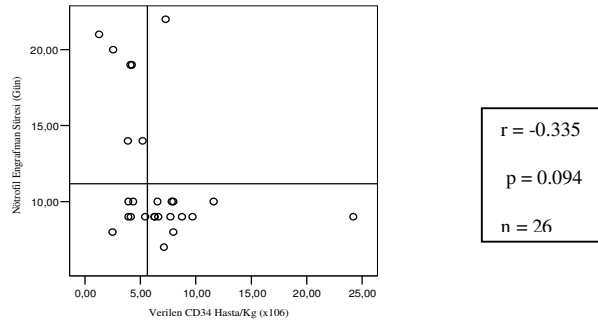
	Ortalama ± S.S.				
	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	TOPLAM	VERİLEN
<b>CD34 Hasta/Kg (x10<sup>6</sup>)</b>	3.39 ± 4.59 (n=42)	4.03 ± 7.27 (n=36)	2.06 ± 1.94 (n=16)	10.21 ± 9.89 (n=28)	6.58 ± 4.31 (n=26)
<b>ALDH Hasta/Kg (x10<sup>6</sup>)</b>	3.50 ± 4.74 (n=39)	4.30 ± 7.54 (n=36)	2.32 ± 2.28 (n=16)	10.86 ± 10.56 (n=26)	7.90 ± 8.18 (n=24)

Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 miktarı günlere göre karşılaştırıldığında 2.gün elde edilen miktar 1.gün elde edilen miktardan anlamlı olarak fazlaydı (p<0.05). Birinci ve 3.gün ile 2. ve 3.gün arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). Toplanan üründe kilogram başına elde edilen ALDH miktarı için ise günler arasında fark saptanmadı (p>0.05).

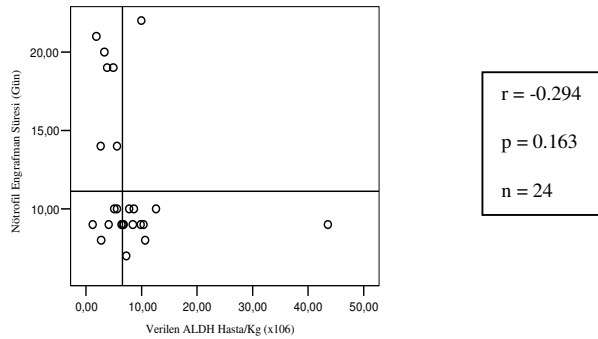
Nötrofil engrafman süresi 11.12 ± 4.15 gün, trombosit engrafman süresi 11.31 ± 4.82 gün ve hastanede yatış süresi 28.14 ± 11.35 gün olarak hesaplandı.

Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile nötrofil engrafman süresi arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p>0.05) (Şekil 1,2). Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki incelendiğinde ise anlamlı negatif ilişki saptandı (p<0.05). Yani verilen üründeki CD34<sup>+</sup> hücre ya da ALDH<sup>+</sup> hücre oranı ne kadar fazlaysa trombosit engrafman süresi o kadar kısa idi (Şekil 4.3,4.4).

Hastalara verilen  $CD34^+$  hücre ve  $ALDH^+$  hücre miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafmanı arasındaki ilişki incelendiğinde verilen  $CD34^+$  hücre miktarı kg başına  $5.63 \times 10^6$  dan fazla olduğunda ve  $ALDH^+$  hücre miktarı  $6.58 \times 10^6$  dan fazla olduğunda nötrofil engrafman süresinin değişmediği gözlemlendi. Trombosit engrafman süresi ise verilen  $CD34^+$  hücre miktarı kg başına  $5.42 \times 10^6$  dan fazla olduğunda ve  $ALDH^+$  hücre miktarı  $7.90 \times 10^6$  dan fazla olduğunda değişmiyordu.

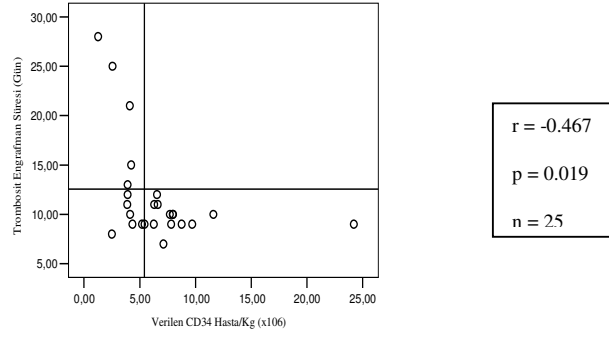


**Şekil 4.1.** Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile nötrofil engrafman süresi arasındaki ilişki

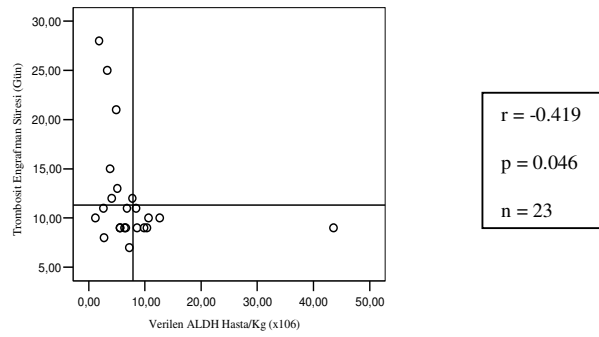


**Şekil 4.2.** Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam ALDH miktarı ile nötrofil engrafman süresi arasındaki ilişki

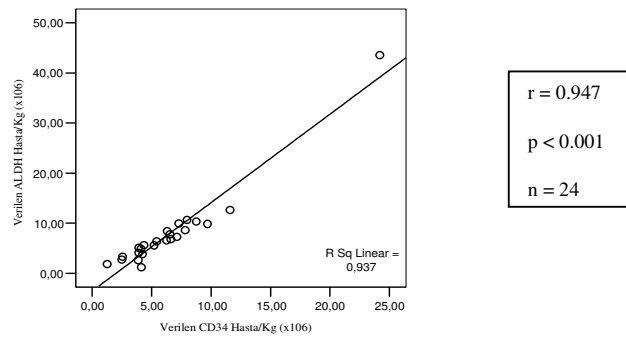




**Şekil 4.3.** Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki



**Şekil 4.4.** Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam ALDH miktarı ile trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki

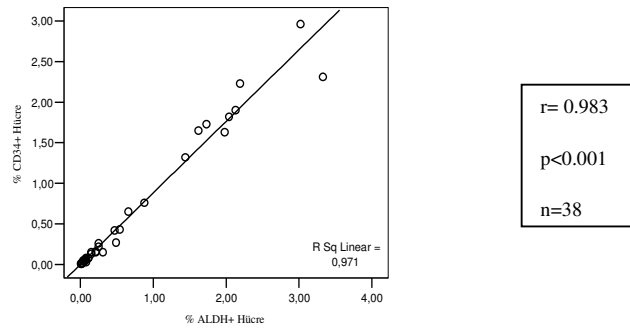


**Şekil 4.5.** Tüm hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasındaki ilişki

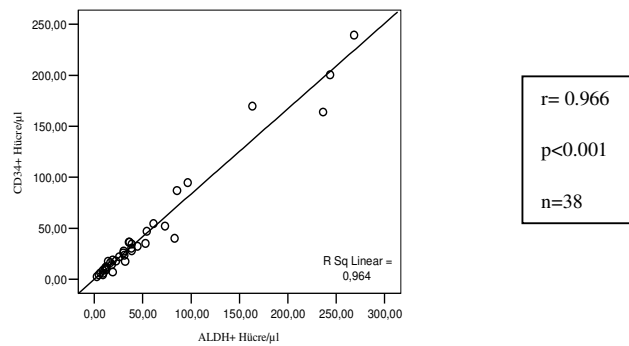
Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile yatış süresi arasındaki ilişki incelendiğinde negatif yönde ilişki olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ ).

Hastalara infüze edilen kilogram başına toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasında pozitif yönde kuvvetli ilişki mevcuttu ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.5). Ayrıca periferik kandaki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları üründeki miktarlarla korele idi ( $p<0.001$ ).

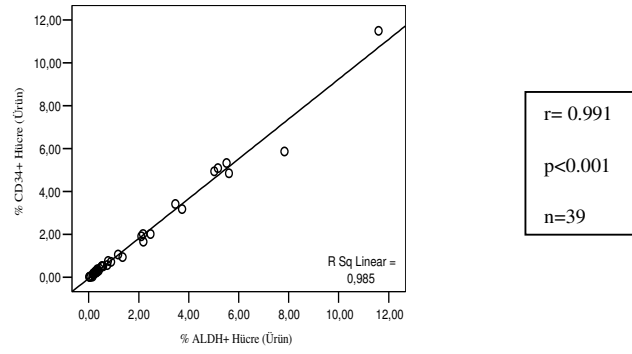
Toplama işleminin 1.gününde (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9), 2.gününde (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13), 3.gününde (Şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.17) periferik kan ve ürün örneklerinde bakılan CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı arasında hem % hem de  $\mu\text{l}$ 'deki miktar olarak bakıldığında kuvvetli bir doğrusal ilişki saptandı.



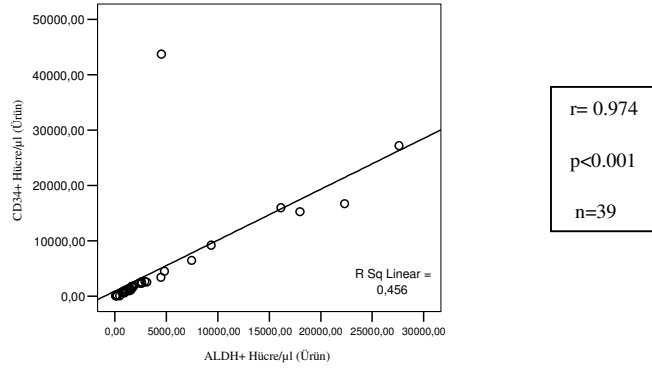
**Şekil 4.6.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 1. günü periferik kanda bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



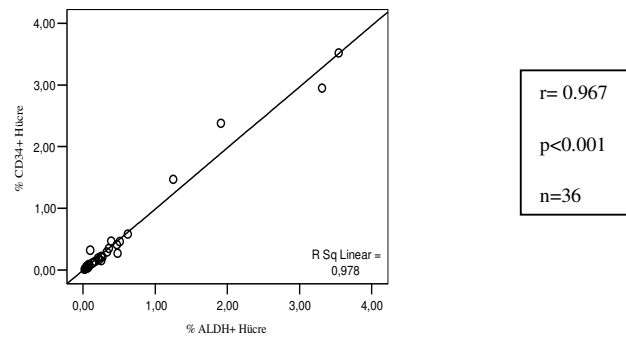
**Şekil 4.7.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 1. günü periferik kanda bakılan mikrolitredeki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



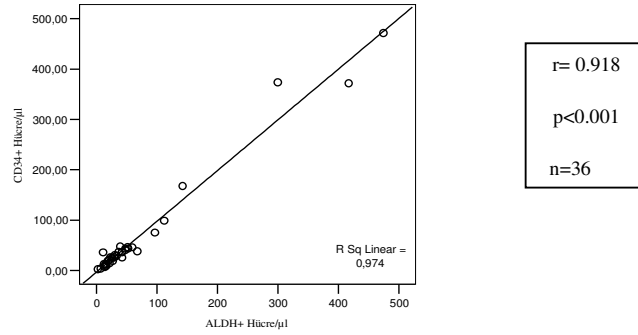
**Şekil 4.8.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 1. günü elde edilen üründe bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



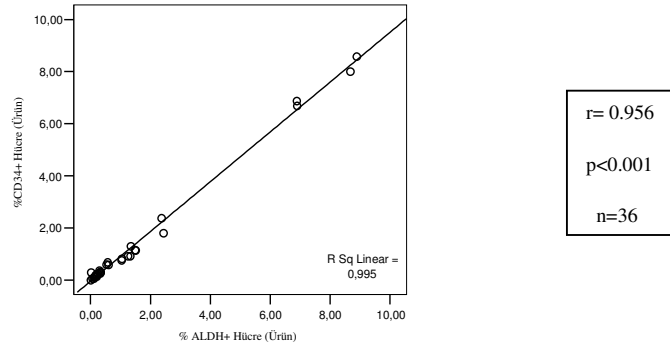
**Şekil 4.9.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 1. günü elde edilen üründe bakılan mikrolitredeki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



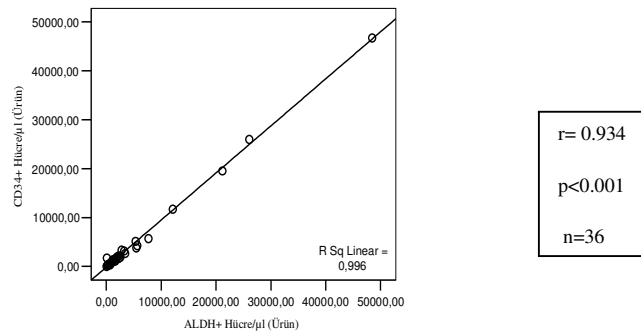
**Şekil 4.10.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 2. günü periferik kanda bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



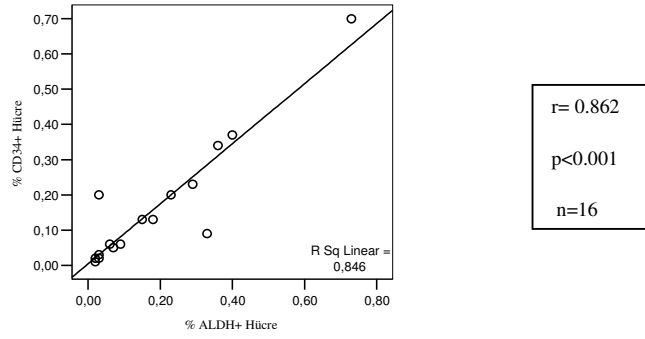
**Şekil 4.11.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 2. günü periferik kanda bakılan mikrolitredeki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



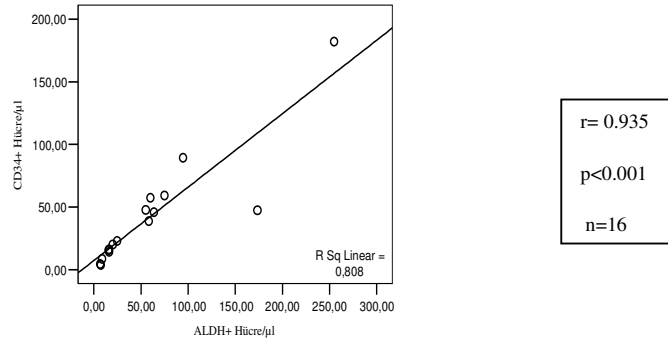
**Şekil 4.12.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 2. günü elde edilen üründe bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



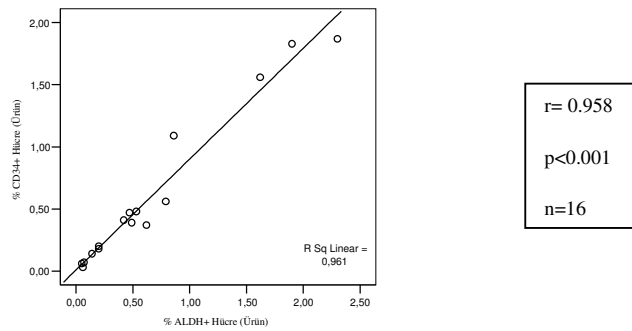
**Şekil 4.13.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 2. günü elde edilen üründe bakılan mikrolitredeki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



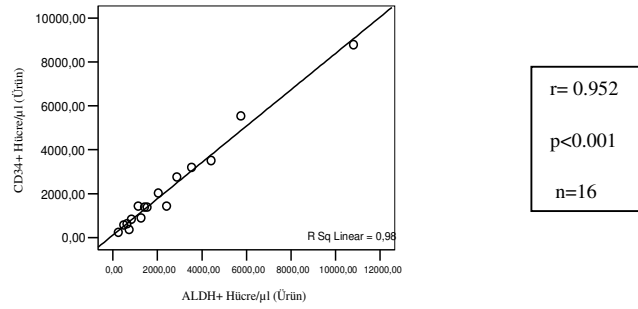
**Şekil 4.14.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 3. günü periferik kanda bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



**Şekil 4.15.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 3. günü periferik kanda bakılan mikrolitredeki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki

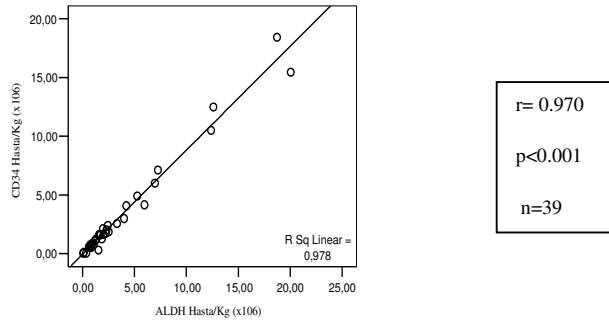


**Şekil 4.16.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 3. günü elde edilen üründe bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki

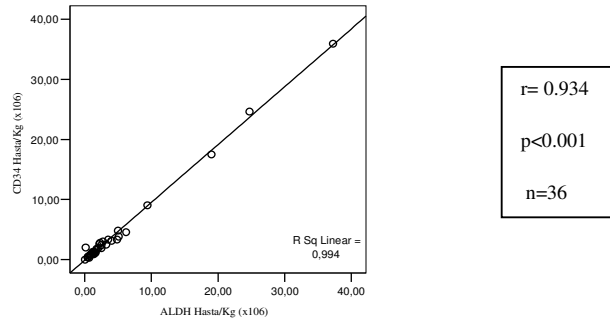


**Şekil 4.17.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 3. günü elde edilen üründe bakılan mikrolitredeki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki

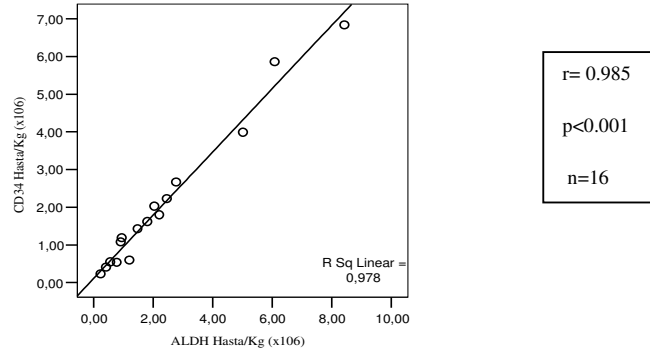
Toplama işleminin 1.gününde(Şekil 4.18), 2.gününde (Şekil 4.19), 3.gününde (Şekil 4.20) elde edilen kilogram başına CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı arasında da kuvvetli bir doğrusal ilişki saptandı.



**Şekil 4.18.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 1. günü elde edilen kilogram başına CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



**Şekil 4.19.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 2. günü elde edilen kilogram başına CD34 Miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



**Şekil 4.20.** Tüm hastalardaki toplama işleminin 3. günü elde edilen kilogram başına CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki

#### **4.2. Otolog Kök Hücre Nakli Yapılan Hastaların Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi**

Otolog kök hücre nakli yapılan 27 hasta ayrı bir grup olarak incelendiğinde hastaların 17'si erkek, 10'u kadındı. Yaş ortalaması  $46.62 \pm 13.45$  yıl olarak bulundu. Hastaların tümünde kök hücre kaynağı olarak periferik kan kullanıldı. Altı hastaya yeterli mobilizasyon sağlanamadığı için birden fazla mobilizasyon uygulandı. Mobilizasyon 16 uygulama için siklofosamid + G-CSF, 21 uygulama için tek başına G-CSF ile yapıldı. Primer tanılar multipl miyelom (n=14), Hodgkin hastalığı (n=7), Hodgkin dışı lenfoma (n=2), akut miyeloid lösemi (n=2), kronik lenfositik lösemi (n=1) ve germ hücreli testis tümörü (n=1) şeklindeydi.

**Tablo 4.4.** Otolog kök hücre nakli yapılan hastalardan ürün toplama öncesi elde edilen tam kan sayımı sonuçları

	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
	Ortalama ± S.S.		
<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	11.37 ± 2.28 (n=37)	11.63 ± 2.00 (n=31)	11.32 ± 2.26 (n=15)
<b>Beyaz Küre (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	20108.11 ± 19215.06 (n=37)	22915.63 ± 15090.55 (n=32)	34313.33 ± 24202.42 (n=15)
<b>Absolü Nötrofil Sayısı (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	16847.22 ± 16936.17 (n=36)	18458.06 ± 12713.32 (n=31)	27800.00 ± 22365.89 (n=15)
<b>Absolü Lenfosit Sayısı (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	1430.55 ± 1430.44 (n=36)	1474.19 ± 973.64 (n=31)	1400.00 ± 823.75 (n=15)
<b>Trombosit (x10<sup>3</sup>/µl)</b>	159270.30 ± 118863.10 (n=37)	127580.60 ± 59277.19 (n=31)	101333.33 ± 39407.52 (n=15)

Hastalara ait tam kan sayımı sonuçları toplama işleminin günlerine göre karşılaştırıldığında 2.güne ait Hb değerleri 3.günden fazla saptandı ( $p<0.05$ ). Üçüncü gün çalışılan beyaz küre sayısı 1 ve 2.günden anlamlı olarak fazlaydı (sırasıyla  $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). İkinci gün elde edilen absolü nötrofil sayısı 3.günde 2. günden anlamlı düzeyde fazlaydı ( $p<0.05$ ). Trombosit değerleri ise 3.günde 1 ve 2. günlerden anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.01$ ).

Nötrofil engrafman süresi  $9.51 \pm 1.50$  gün, trombosit engrafman süresi  $9.55 \pm 1.42$  gün ve hastanede yatış süresi  $23.62 \pm 4.60$  gün olarak hesaplandı.



**Tablo 4.5.** Hastalardan elde edilen periferik kan ve ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları

	1.GÜN		2.GÜN		3.GÜN	
	Ortalama ± S.S.					
	Periferik Kan	Ürün	Periferik Kan	Ürün	Periferik Kan	Ürün
CD34%	0.73 ± 0.97 (n=33)	2.20 ± 3.17 (n=32)	0.42 ± 0.83 (n=29)	1.25 ± 2.32 (n=29)	0.17 ± 0.18 (n=15)	0.57 ± 0.63 (n=15)
CD34/µl	43.45 ± 56.60 (n=33)	5715.50 ± 9427.07 (n=32)	55.83 ± 106.48 (n=29)	4269.85 ± 9069.77 (n=29)	41.77 ± 45.83 (n=15)	2239.08 ± 2320.35 (n=15)
ALDH%	0.69 ± 0.95 (n=31)	1.87 ± 2.74 (n=30)	0.43 ± 0.86 (n=29)	1.35 ± 2.45 (n=29)	0.17 ± 0.19 (n=15)	0.65 ± 0.71 (n=15)
ALDH/µl	49.59 ± 69.88 (n=31)	4518.34 ± 7008.25 (n=30)	59.35 ± 110.343 (n=29)	4560.97 ± 9485.93 (n=29)	51.80 ± 62.83 (n=15)	2596.67 ± 2761.70 (n=15)

Hastalardan elde edilen periferik kan örneklerindeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı % olarak değerlendirildiğinde 1,2 ve 3.günler arasında fark saptanmadı (p>0.05). Mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı olarak bakıldığında ise 2.gün elde edilen miktar 1.gün elde edilenden anlamlı düzeyde fazlaydı (p<0.05), diğer günler arasında anlamlı fark yoktu. ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı için % ve µl'de olarak günler arasında fark saptanmadı (p>0.05).

Hastalardan elde edilen ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı % ve µl'deki miktar olarak değerlendirildiğinde 1,2 ve 3.günler arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0.05).

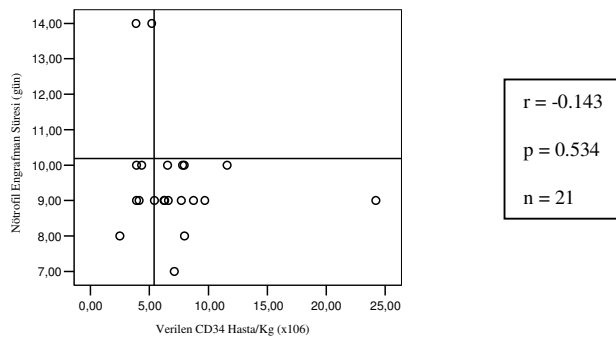
**Tablo 4.6.** Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 ve ALDH miktarları

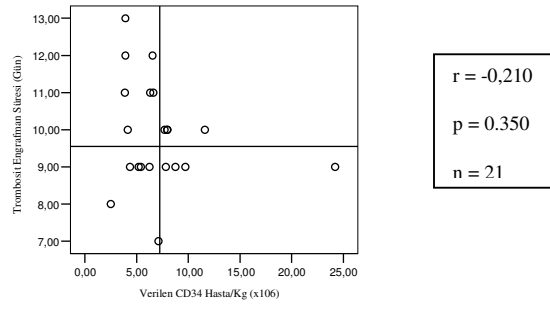
	Ortalama ± S.S.				
	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	TOPLAM	VERİLEN
<b>CD34 Hasta/Kg</b> (x10 <sup>6</sup> )	3.77 ± 5.13 (n=32)	3.66 ± 7.08 (n=29)	2.12 ± 1.99 (n=15)	10.94 ± 9.95 (n=21)	7.22 ± 4.47 (n=21)
<b>ALDH</b> <b>Hasta/Kg</b> (x10 <sup>6</sup> )	3.62 ± 5.30 (n=30)	3.87 ± 7.43 (n=29)	2.41 ± 2.33 (n=15)	11.47 ± 10.84 (n=19)	8.72 ± 8.93 (n=19)

Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 miktarı günlere göre karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Toplanan üründe kilogram başına elde edilen ALDH miktarı için de benzer sonuçlar elde edildi.

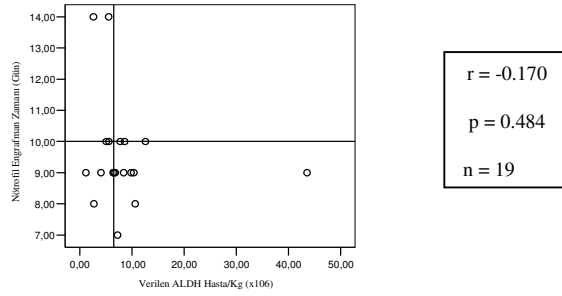
Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (Şekil 4.21, 4.22, 4.23, 4.24). Kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasındaki pozitif yönde kuvvetli ilişki saptandı (Şekil 4.25).

Hastalara verilen CD34<sup>+</sup> hücre ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafmanı arasındaki ilişki incelendiğinde verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına  $5.40 \times 10^6$  dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı  $6.53 \times 10^6$  dan fazla olduğunda nötrofil engrafman süresinin değişmediği gözlemlendi. Trombosit engrafman süresi ise verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına  $7.22 \times 10^6$  dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı  $8.72 \times 10^6$  dan fazla olduğunda değişmiyordu.

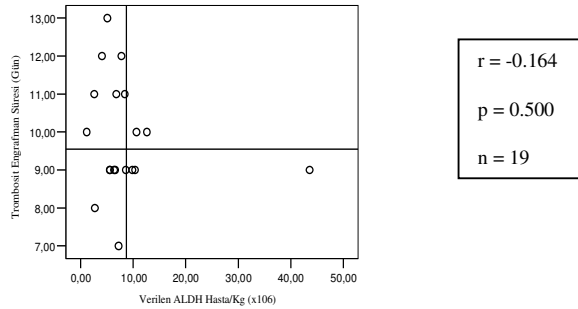
**Şekil 4.21.** Otolog nakil yapılan hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile nötrofil engrafman süresi arasındaki ilişki



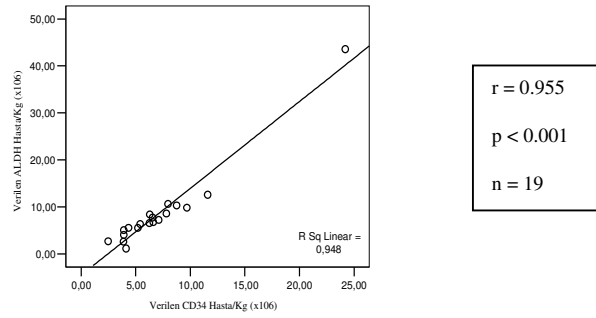
**Şekil 4.22.** Otolog nakil yapılan hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki



**Şekil 4.23.** Otolog nakil yapılan hastalardaki kilogram başına verilen toplam ALDH miktarı ile nötrofil engrafman süresi arasındaki ilişki



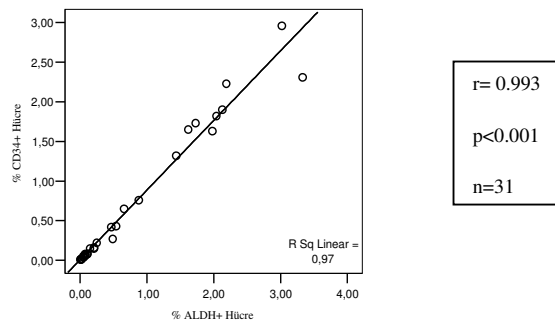
**Şekil 4.24.** Otolog nakil yapılan hastalardaki kilogram başına verilen toplam ALDH miktarı ile trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki



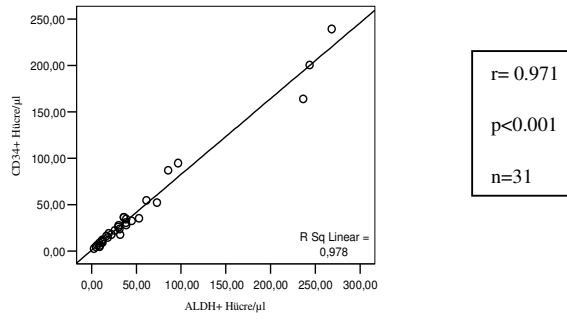
**Şekil 4.25:** Otolog nakil yapılan hastalardaki kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasındaki ilişki

Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile yatış süresi arasındaki ilişki incelendiğinde verilen CD34 miktarı ve ALDH miktarı ile yatış süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $p > 0.05$ ).

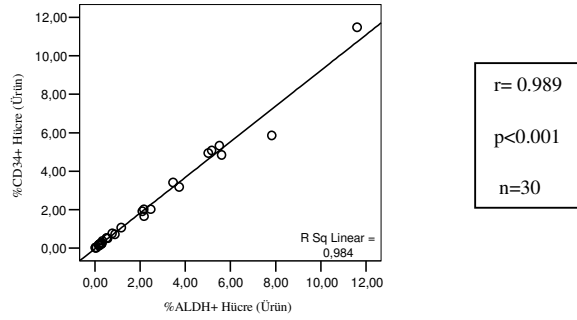
Toplama işleminin 1.gününde (Şekil 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30), 2.gününde (Şekil 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35), 3.gününde (Şekil 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40) periferik kan ve ürün örneklerinde bakılan CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı arasında hem % hem de  $\mu\text{l}$ 'deki miktar olarak bakıldığında kuvvetli bir doğrusal ilişki saptandı.



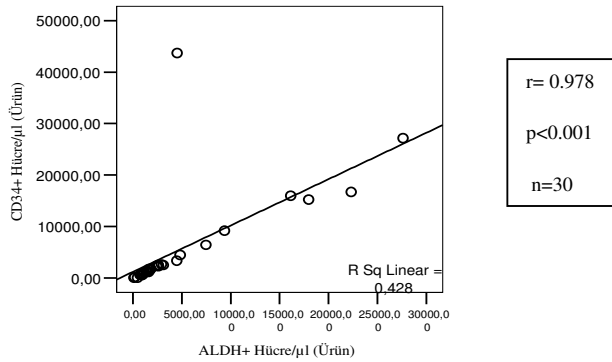
**Şekil 4.26.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 1. günü periferik kanda bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



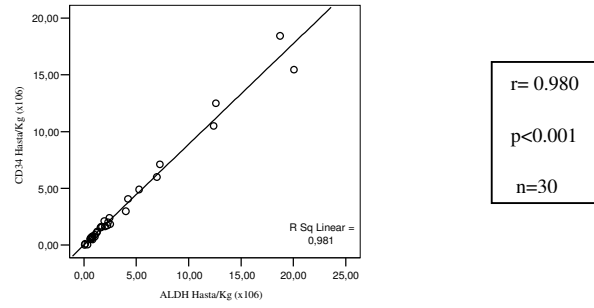
**Şekil 4.27.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 1. günü periferik kanda bakılan µl'deki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



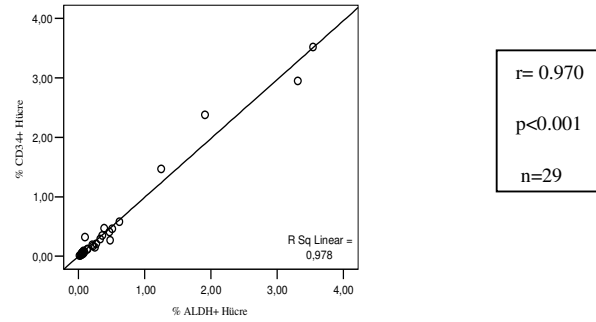
**Şekil 4.28.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 1. günü elde edilen üründe bakılan CD34% 'si ile ALDH% 'si arasındaki ilişki



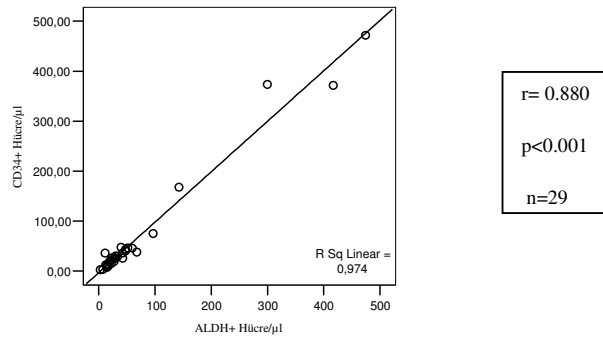
**Şekil 4.29.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 1. günü elde edilen üründe bakılan µl'deki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



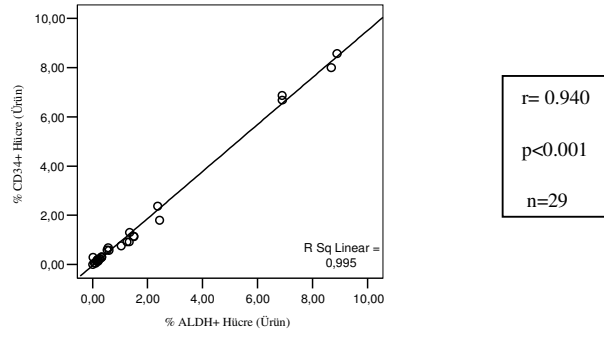
**Şekil 4.30.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 1. günü elde edilen kilogram başına CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



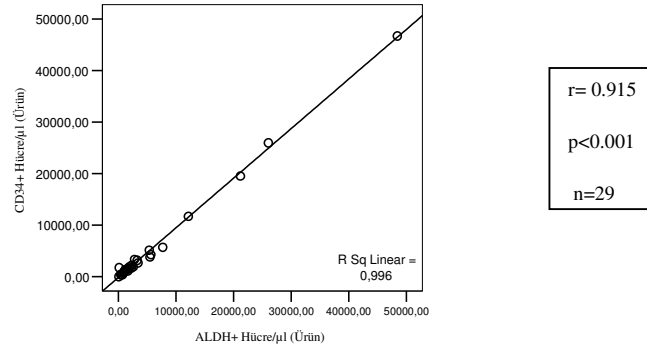
**Şekil 4.31.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 2. günü periferik kanda bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



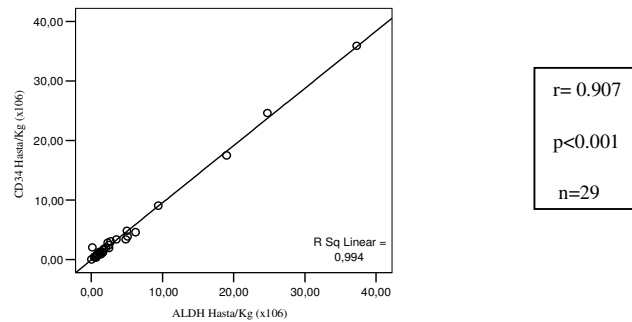
**Şekil 4.32.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 2. günü periferik kanda bakılan µl'deki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



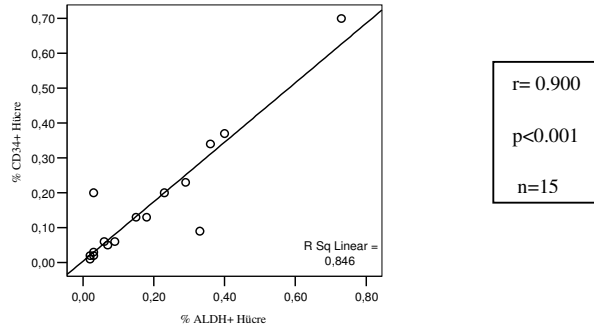
**Şekil 4.33.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 2. günü elde edilen üründe bakılan CD34%'si ile ALDH%'si arasındaki ilişki



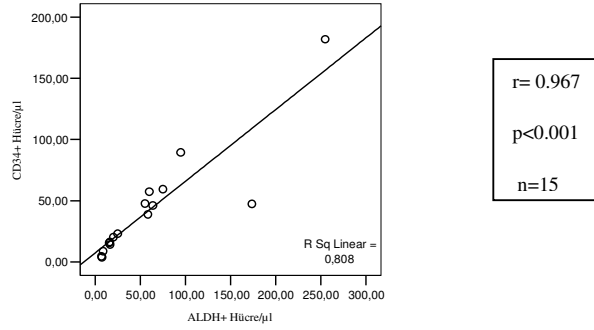
**Şekil4.34.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 2. günü elde edilen üründe bakılan µl'deki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



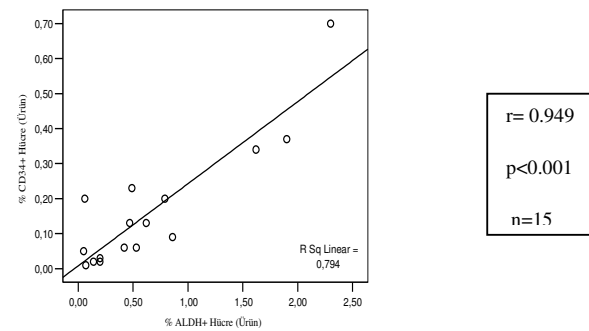
**Şekil 4.35.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 2. günü elde edilen kilogram başına CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



**Şekil 4.36.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 3. günü periferik kanda bakılan CD34%’si ile ALDH%’si arasındaki ilişki

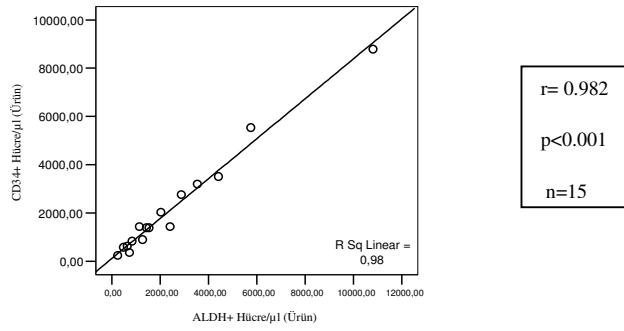


**Şekil 4.37:** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 3. günü periferik kanda bakılan  $\mu\text{l}$ ’deki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki

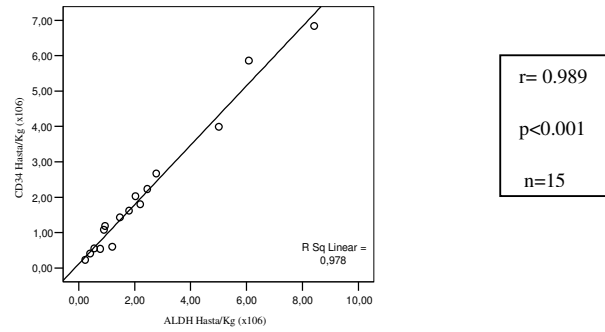


**Şekil 4.38.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 3. günü elde edilen üründe bakılan CD34%’si ile ALDH%’si arasındaki ilişki





**Şekil 4.39.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 3. günü elde edilen üründe bakılan µl'deki CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki



**Şekil 4.40.** Otolog nakil yapılan hastalardaki toplama işleminin 3. günü elde edilen kilogram başına CD34 miktarı ile ALDH miktarı arasındaki ilişki

### 4.3. Otolog Kök Hücre Nakli Yapılan Hastalar Mobilizasyon Şekline Göre Değerlendirildiğinde Elde Edilen Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi

Otolog kök hücre nakli yapılan 27 hasta mobilizasyon şekillerine göre ayrı ayrı incelendi. Tek başına G-CSF ile mobilizasyon yapılan grupta yaş ortalaması  $38.18 \pm 14.75$  yıl iken, siklofosamid + G-CSF grubunda  $52.43 \pm 8.95$  yıldır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.01$ ).

**Tablo 4.7.** Otolog kök hücre nakli yapılan hastalardan ürün toplama öncesi elde edilen tam kan sayımı sonuçları (mobilizasyon şekline göre)

		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
		ORTALAMA ± S.S.		
Hemoglobin (g/dl)	Grup 1	12.78 ± 1.64 (n=21)	12.49 ± 1.79 (n=21)	12.51 ± 1.46 (n=10)
	Grup 2	9.69 ± 1.52 (n=10)	9.84 ± 0.98 (n=10)	9.60 ± 0.84 (n=4)
Beyaz Küre (x10 <sup>3</sup> /µl)	Grup 1	31666.67 ± 18199.54 (n=21)	29819.05 ± 14141.59 (n=21)	44110.00 ± 23312.67 (n=10)
	Grup 2	3727.27 ± 1955.04 (n=11)	9736.36 ± 3851.56 (n=11)	14720.00 ± 10368.55 (n=5)
Absolü Nötrofil Sayısı (x10 <sup>3</sup> /µl)	Grup 1	26950.00 ± 16699.68 (n=20)	23270.00 ± 13280.42 (n=21)	34970.00 ± 23779.77 (n=10)
	Grup 2	3160.00 ± 1816.10 (n=10)	8950.00 ± 3791.29 (n=10)	13460.00 ± 9639.65 (n=5)
Absolü Lenfosit Sayısı (x10 <sup>3</sup> /µl)	Grup 1	2280.00 ± 1414.80 (n=20)	1910.00 ± 875.33 (n=20)	1830.00 ± 583.19 (n=10)
	Grup 2	340.00 ± 236.64 (n=10)	530.00 ± 266.87 (n=10)	540.00 ± 472.22 (n=5)
Trombosit (x10 <sup>3</sup> /µl)	Grup 1	234619.00 ± 102473.64 (n=21)	157142.90 ± 43452.60 (n=21)	116000.00 ± 31066.23 (n=10)
	Grup 2	52200.00 ± 30607.91 (n=10)	65500.00 ± 34574.39 (n=10)	72000 ± 40626.34 (n=5)

Nötrofil engrafman süresi grup 1’de  $9.90 \pm 2.11$  gün ve grup 2’de  $9.25 \pm 0.85$  gün, trombosit engrafman süresi grup 1’de  $9.54 \pm 1.69$  gün ve grup 2’de  $9.56 \pm 1.26$  gün olup 2 grupta birbirinden farklı değildi. Hastanede yatış süresi grup 1 için  $26.00 \pm 4.66$  gün, grup 2 için  $22.00 \pm 3.89$  olarak hesaplandı. Grup 2’nin yatış süresi grup 1’den anlamlı düzeyde kısaydı ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 4.8.** Hastalardan elde edilen periferik kan ve ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları

		1.GÜN		2.GÜN		3.GÜN	
		ORTALAMA ± S.S.					
		Periferik Kan	Ürün	Periferik Kan	Ürün	Periferik Kan	Ürün
CD34%	Grup 1	0.06 ± 0.04 (n=17)	0.26 ± 0.20 (n=17)	0.08 ± 0.07 (n=17)	0.30 ± 0.30 (n=17)	0.07 ± 0.06 (n=10)	0.24 ± 0.17 (n=10)
	Grup 2	1.28 ± 0.96 (n=9)	4.38 ± 4.25 (n=9)	1.14 ± 1.25 (n=9)	3.17 ± 3.49 (n=9)	0.36 ± 0.19 (n=5)	1.24 ± 0.71 (n=5)
CD34/μl	Grup 1	17.71 ± 13.40 (n=17)	1160.87 ± 780.99 (n=17)	20.29 ± 13.38 (n=17)	1556.87 ± 1288.01 (n=17)	38.33 ± 53.07 (n=10)	1208.99 ± 899.85 (n=10)
	Grup 2	38.04 ± 27.31 (n=9)	9103.99 ± 13857.40 (n=9)	134.49 ± 170.71 (n=9)	10419.50 ± 14923.38 (n=9)	48.66 ± 30.41 (n=5)	4299.26 ± 3010.66 (n=5)
ALDH%	Grup 1	0.07 ± 0.06 (n=17)	0.29 ± 0.20 (n=17)	0.08 ± 0.05 (n=17)	0.30 ± 0.31 (n=17)	0.06 ± 0.05 (n=10)	0.27 ± 0.21 (n=10)
	Grup 2	1.21 ± 0.93 (n=8)	3.67 ± 3.51 (n=8)	1.17 ± 1.39 (n=8)	3.06 ± 3.59 (n=8)	0.40 ± 0.19 (n=5)	1.42 ± 0.75 (n=5)
ALDH/μl	Grup 1	23.05 ± 19.39 (n=17)	1292.37 ± 759.30 (n=17)	23.09 ± 14.29 (n=17)	1531.19 ± 1309.24 (n=17)	50.65 ± 75.15 (n=10)	1384.61 ± 1029.59 (n=10)
	Grup 2	37.15 ± 25.92 (n=8)	4450.32 ± 4915.77 (n=8)	139.30 ± 189.89 (n=8)	11324.76 ± 16374.19 (n=8)	54.10 ± 33.14 (n=5)	5020.80 ± 3645.71 (n=5)

Hastalardan elde edilen periferik kan örneklerindeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı % olarak değerlendirildiğinde 1, 2 ve 3. güne ait değerler grup 2’de grup 1’den anlamlı düzeyde fazla bulundu (p<0.001). Mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı olarak bakıldığında 1.gün elde edilen miktar grup 2’de grup 1’den anlamlı düzeyde fazlaydı (p<0.001). 2.güne ait değerler de grup 2’de grup 1’den fazla bulundu (p<0.01).

Üçüncü güne ait miktarlar arasında fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). ALDH<sup>+</sup> hücreler için de benzer sonuçlar elde edildi.

Hastalardan elde edilen ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı % olarak değerlendirildiğinde 1, 2 ve 3.gün elde edilen miktar grup 2’de grup 1’den fazla bulundu (sırasıyla  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.05$  ). ALDH<sup>+</sup> hücreler için de benzer sonuçlar elde edildi.

**Tablo 4.9.** Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 ve ALDH miktarları

		ORTALAMA ± S.S					
		1.GÜN		2.GÜN		3.GÜN	
CD34 Hasta/Kg (X10 <sup>6</sup> )	Grup 1	1.09 ± 0.76 (n=17)	p<0.001	1.51 ± 1.26 (n=17)	p<0.05	1.19 ± 0.72 (n=10)	ns
	Grup 2	3.77 ± 3.90 (n=9)		8.36 ± 11.66 (n=9)		3.98 ± 2.51 (n=5)	
ALDH Hasta/Kg (X10 <sup>6</sup> )	Grup 1	1.22 ± 0.78 (n=17)	p<0.001	1.46 ± 1.29 (n=17)	p<0.01	1.32 ± 0.79 (n=10)	ns
	Grup 2	3.61 ± 3.98 (n=8)		9.14 ± 12.83 (n=8)		4.61 ± 2.95 (n=5)	

G-CSF ile mobilizasyon yapılan hastalarda kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafman süresi arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasındaki pozitif yönde kuvvetli ilişki saptandı ( $r=0.929$ ,  $p=0.003$ ,  $n=7$ ).

Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile yatış süresi arasındaki ilişki incelendiğinde verilen CD34 miktarı ve ALDH miktarı ile yatış süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $p>0.05$ ).

Siklofosfamid+G-CSF ile mobilizasyon yapılan grupta da benzer sonuçlar elde edildi.

#### 4.4.Otolog Kök Hücre Nakli Yapılan Hastalar ve Allogeneik Kök Hücre Nakli Yapılan Hastaların Sağlıklı Donörlerine Ait Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi

Otolog kök hücre nakli yapılan hastalara ve allogeneik kök hücre nakli yapılan hastaların donörlerine ait tam kan sayımı sonuçları Tablo 4.10'da; CD34 ve ALDH sonuçları Tablo 4.11, 4.12 ve 4.13'te gösterildi.

**Tablo 4.10.** Otolog kök hücre nakli yapılan hastalara ve allogeneik kök hücre nakli yapılan hastaların donörlerine ait tam kan sayımı sonuçları

		1.GÜN		2.GÜN	
		ORTALAMA ± S.S.			
Hemoglobin (g/dl)	Hasta	11.37 ± 2.28 (n=37)	p<0.001	11.63 ± 2.00 (n=31)	p<0.001
	Donör	14.62 ± 1.49 (n=5)		14.48 ± 0.93 (n=5)	
Beyaz Küre (x10 <sup>3</sup> /µl)	Hasta	20108.10 ± 19215.06 (n=37)	n.s.	22915.62 ± 15090.54 (n=32)	p<0.001
	Donör	37440.00 ± 16467.63 (n=5)		41820.00 ± 8122.31 (n=5)	
Absolü Nötrofil Sayısı (x10 <sup>3</sup> /µl)	Hasta	16847.22 ± 16936.17 (n=36)	n.s.	18458.06 ± 12713.32 (n=31)	p<0.001
	Donör	28200.00 ± 7686.67 (n=5)		35840.00 ± 7042.58 (n=5)	
Absolü Lenfosit Sayısı (x10 <sup>3</sup> /µl)	Hasta	1430.55 ± 1430.44 (n=36)	p<0.001	1474.19 ± 973.64 (n=31)	p=0.001
	Donör	3360.00 ± 1167.47 (n=5)		3700.00 ± 1079.35 (n=5)	
Trombosit (x10 <sup>3</sup> /µl)	Hasta	159270.27 ± 118863.05 (n=37)	p=0.05	127580.64 ± 59277.18 (n=31)	p<0.05
	Donör	268600.00 ± 85359.82 (n=5)		213600.00 ± 66436.43 (n=5)	

**Tablo 4.11.** Ototolog kök hücre nakli yapılan hastalara ve allogeneik kök hücre nakli yapılan hastaların donörlerine ait periferik kan örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları

		1.GÜN		2.GÜN	
		ORTALAMA ± S.S.			
CD34 %	Hasta	0.73 ± 0.97 (n=33)	n.s.	0.42 ± 0.83 (n=29)	n.s.
	Donör	0.12 ± 0.09 (n=5)		0.12 ± 0.07 (n=4)	
CD34/µl	Hasta	43.45 ± 56.60 (n=33)	n.s.	55.83 ± 106.48 (n=29)	n.s.
	Donör	56.35 ± 65.45 (n=5)		51.16 ± 32.59 (n=4)	
ALDH %	Hasta	0.69 ± 0.95 (n=31)	n.s.	0.43 ± 0.86 (n=29)	n.s.
	Donör	0.16 ± 0.11 (n=5)		0.13 ± 0.09 (n=4)	
ALDH/µl	Hasta	49.59 ± 69.88 (n=31)	n.s.	59.35 ± 110.34 (n=29)	n.s.
	Donör	66.73 ± 60.81 (n=5)		56.85 ± 38.57 (n=4)	

**Tablo 4.12.** Ototolog ve allogeneik kök hücre nakli yapılan hastalara ait engrafman zamanları, yatış süreleri ve verilen CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları

	OTOLOG	ALLOGENEİK	
	ORTALAMA ± S.S.		
Nötrofil Engrafman Zamamı (Gün)	9.51 ± 1.50 (n=27)	18.33 ± 4.71 (n=6)	p<0.01
Trombosit Engrafman Zamamı (Gün)	9.55 ± 1.42 (n=27)	20.80 ± 5.84 (n=5)	p<0.001
Yatış Süresi (Gün)	23.62 ± 4.60 (n=27)	45.57 ± 12.99 (n=7)	p<0.001
Verilen CD34 Hasta/Kg (x10 <sup>6</sup> )	7.22 ± 4.47 (n=21)	3.88 ± 2.25 (n=5)	n.s.
Verilen ALDH Hasta/Kg (x10 <sup>6</sup> )	8.72 ± 4.47 (n=19)	4.76 ± 3.10 (n=5)	n.s.

**Tablo 4.13.** Otolog kök hücre nakli yapılan hastalara ve allogeneik kök hücre nakli yapılan hastaların donörlerine ait ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları

		1.GÜN		2.GÜN	
		ORTALAMA ± S.S.			
CD34 %	Hasta	2.20 ± 3.17 (n=32)	n.s.	1.25 ± 2.32 (n=29)	n.s.
	Donör	0.40 ± 0.28 (n=7)		0.38 ± 0.30 (n=4)	
CD34/μl	Hasta	5715.50 ± 9427.07 (n=32)	p=0.001	4269.85 ± 9069.77 (n=29)	p<0.01
	Donör	238.02 ± 336.36 (n=7)		357.04 ± 265.65 (n=4)	
ALDH %	Hasta	1.87 ± 2.74 (n=30)	n.s.	1.35 ± 2.45 (n=29)	n.s.
	Donör	0.52 ± 0.40 (n=7)		0.45 ± 0.40 (n=4)	
ALDH/μl	Hasta	4518.34 ± 7008.25 (n=30)	p=0.001	4560.97 ± 9485.93 (n=29)	p<0.05
	Donör	337.91 ± 482.77 (n=7)		420.92 ± 360.63 (n=4)	

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla 1) Hematopoetik kök hücrelerin belirteç olarak CD34 gibi ALDH bakarak da değerlendirilebileceğini 2) Kök hücre mobilizasyonu yapılan hastalarda kök hücrelerin periferik kana mobilize olup olmadığının ALDH<sup>+</sup> hücre oranına bakarak belirlenebileceğini 3) Daha öncül kök hücreler olarak belirtilen ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücrelerin periferik kana mobilize olduğunu ve periferik kana kök hücre mobilizasyonunun olduğu günler içerisinde bu hücre miktarlarının farklılık göstermediğini 4) Kök hücre nakli yapılan hastalarda 6.58x10<sup>6</sup>/kg dan fazla ALDH<sup>+</sup> kök hücre vermenin trombosit ve nötrofil engraftmanı için ideal olduğunu 5) ALDH<sup>+</sup>lığına bakarak kök hücreleri değerlendirme metodunun CD34<sup>+</sup>lığına bakarak değerlendirmeye göre daha öncül hücreleri de göstermesi, ölü hücrelerde pozitif olmaması nedeniyle avantajlı olduğunu ancak daha az stabil olması nedeniyle kısa sürede analiz yapılması gerekliliğinin dezavantaj olduğunu gösterdik.

ALDH<sup>+</sup>lığının kök hücrelerde neyi ifade ettiği birçok araştırmacı tarafından hayvan çalışmalarıyla irdelenmiştir. ALDH'nın hematopoetik progenitör hücrelerde pozitif olduğu, matür hücrelerde negatif olduğu açık olarak gösterilmiştir. Hess ve ark. (99) yaptıkları hayvan çalışmasında lineage negatif hematopoetik kök hücrelerde ALDH<sup>+</sup>lığı yanı sıra CD133<sup>+</sup>lığını araştırdılar. CD133 primitif insan hematopoetik, endotelyal ve nöral epiteliyal progenitör hücrelerde eksprese edilen bir yüzey molekülüdür. ALDH<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> hematopoetik öncül hücrelerin çoğunda CD34<sup>+</sup> iken bir kısmında CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup> olduğunu ve bu hücrelerin ALDH<sup>+</sup> olup uzun süreli engraftmandan sorumlu olan önemli hücre grubu olduğunu gösterdiler.

Yine Storms ve ark. (22) yaptıkları çalışmada ALDH<sup>+</sup> hücrelerin çoğunda CD34'ün de pozitif olduğunu ancak bazı hücrelerin ya CD34 ya da ALDH eksprese ettiğini gösterdiler. Bulgularına göre; multilineage gelişim sağlayabilen ilkel progenitör hücrelerin çoğu ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> hücre grubundaydı ve kısa süreli miyeloid progenitörlerden zengindi, ALDH<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> hücrelerde ise ilkel progenitör sayısı ve kısa süreli miyeloid potansiyel azdı. Armstrong ve ark.(116) yaptıkları hayvan çalışmasında ALDH<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> hücrelerin tipik primitif hematopoetik öncül hücreler olduğunu ve in vitro hematopoetik progenitör fonksiyonun Lin<sup>-</sup>ALDH<sup>+</sup> grupta Lin<sup>-</sup>ALDH<sup>-</sup> gruptan daha yüksek olduğunu gösterdiler. Bu hücreler daha yüksek



telomeraz aktivitesi ve S fazında en az hücreye sahipti. Araştırmacılar yukarıda saptanan bulgular ışığında  $ALDH^+Lin^-$  hücrelerin diğer hücrelerden ayrılarak izole edilmesiyle en primitif hematopoetik kök hücrelerin izole edilebileceğini ve klinik uygulamalarda kullanılabileceğini belirttiler. Pearce ve ark. (117) da uzun süreli engrafman sağlayan  $Lin^-CD34^-$  side popülasyon hücrelerinin çoğunun aynı zamanda  $ALDH^+$  olduğunu göbek kordonu kanında yaptıkları çalışmada gösterdiler. Bütün bu araştırmalardan çıkarılan sonuç  $ALDH^+CD34^-$  bir hematopoetik kök hücre grubu olduğu ve bunların klinik olarak önem taşıdıklarıdır.

Povsic ve ark. (118) ise  $ALDH^+$  hücreler periferik kana geçmekte midir ve saptanabilir mi sorularının yanıtını kardiyak kateterizasyon yaptıkları hastalarında  $ALDH$  aktivitesine bakarak araştırdılar. Mobilizasyon yapılmadan periferik kanda dolaşan öncül hücrelerin saptanabileceğini gösterdiler. Fallon ve ark. (23) otolog kök hücre nakli için kemoterapi+G-CSF ile mobilizasyon yaptıkları hastaların periferik kan örneklerinde  $ALDH^+$  hücrelerin saptanabileceğini gösterdiler.  $ALDH^+$  hücre grubu  $CD133^+CD34^+CD38^-Lin^-$  hücrelerden zengindi ve kültürde koloni oluşturma özelliğine sahipti. Bu da mobilize periferik kandaki  $ALDH^+$  hücrelerin ilkel hematopoetik hücrelerin fenotipik özelliklerine sahip oldukları sonucuna vardırdı.

Çalışmamızda periferik kana mobilize olan  $CD34^+$  hücrelerin aynı zamanda  $ALDH^+$  olduğunu gözledik ve mobilize olan  $CD34^+$  hücre miktarları ve  $ALDH^+$  hücre miktarları için ilk ve sonraki günler arasında fark bulamadık.  $ALDH^+$  hücrelerin periferik kana mobilizasyonunun  $CD34^+$  hücreler gibi G-CSF sonrası 3-4.günlerde olduğu ve ilk günlerdeki kök hücrelerin sonraki günlerden daha immatür hücrelerden oluştuğu da belirtilmektedir. Yani  $ALDH^+ CD34^-$  olan kök hücrelerin bulunduğu ve bunların daha öncül kök hücreler olduğundan bahsedilmektedir ve daha erken periferik kana mobilize oldukları belirtilmektedir (101,102).  $ALDH^-$  ve  $ALDH^+CD34^-$  hücrelerin kültürde koloni oluşturma yeteneği  $ALDH^+$  ve  $ALDH^+CD34^+$  hücrelere göre çok azdır (23). Bu nedenle G-CSF ile kök hücre mobilizasyonu sonrası 5.gün yerine 4.gün kök hücre toplanmaya başlanması önerilmektedir (117). Biz de kliniğimizde kök hücre toplamaya başlama zamanı olarak 4.günü tercih etmekte ve hastalarımızda bu nedenle 4.günden itibaren periferik kana mobilize olan kök hücreleri değerlendirmekteyiz. Yaptığımız

çalışmada da bu nedenle genellikle G-CSF uygulamasının 4,5,6.günü toplanan kök hücre miktarları kullanılmıştır.

Daha immatür olan progenitör hücrelerin uzun süreli engrafman sağlayan kök hücreler olduğu da ileri sürülen diğer bir durumdur (19,20,24,26). Bu nedenle bizim çalışmamızda 4.gün ve sonrası periferik kana mobilize olan CD34<sup>+</sup> hücre miktarları ile ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları karşılaştırılmıştır. ALDH<sup>+</sup> hücrelerin miktarı ilk günde sonraki günlere göre CD34<sup>+</sup> hücrelerin miktarından göreceli olarak daha yüksek olsaydı bu durum erken progenitör hücrelerin daha önce mobilize olduğu savını destekleyecekti. Ancak çalışmamızda böyle bir fark saptamadık. ALDH<sup>+</sup> hücreler CD34<sup>+</sup> hücrelerden her gün için daha fazla idi. Birinci gün ortalama ALDH<sup>+</sup> hücre 52.49±66.54/μl iken CD34<sup>+</sup> hücre 45.9±55.3/μl idi. İkinci gün ALDH<sup>+</sup> hücre 67.02±107.25/μl, CD34<sup>+</sup> hücre ise 64.18±109.53; üçüncü gün ALDH<sup>+</sup> hücre 59.41±67.9/μl, CD34<sup>+</sup> hücre 42.12±44.29/μl idi. ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücre birinci gün ortalama 6.59/μl, ikinci gün 2.84/μl, üçüncü gün 17.29/μl idi. Fakat bu fark ilk günde diğer günlerden fazla değildi. Bu bulgular ilk gün mobilize olan kök hücrelerin daha öncül progenitör hücreleri içermediğini gösterdi. Hatta 3.gün ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücre oranları daha fazla idi. Geç (3.gün) mobilize olan kök hücrelerdeki ALDH<sup>+</sup> hücre oranının en yüksek olması bu gün mobilize olan ile önceki gün mobilize olan hücrelerin engrafman çalışmalarının yapılması ile engrafman potansiyelleri araştırılabilir görünmektedir ve ayrı bir araştırma konusudur. Yaptığımız analizlerde CD34<sup>+</sup>ALDH<sup>-</sup> hücre yok denecek kadar azdı. Bu nedenle değerlendirilmedi.

Diğer ilginç bir nokta da periferik kanda birinci gün %12.5, ikinci gün %4, üçüncü gün %29 ALDH<sup>+</sup> hücre CD34<sup>+</sup> hücreye göre daha fazla olduğu halde toplanan ürün analiz edildiğinde ALDH<sup>+</sup> hücre birinci gün %3, ikinci gün %6, üçüncü gün %11 daha fazla saptandı. Bu fark ALDH<sup>+</sup> hücrelerin bir kısmının aferez işlemi sırasında toplanamadığı düşüncesini akla getirmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda bu konunun açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

Araştırdığımız diğer bir nokta da mobilize olan kök hücrelerde CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ile ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları arasında nasıl bir ilişki olduğu. Kök hücreleri topladığımız günler karşılaştırıldığında kök hücrelerin belirlenmesinde bugün için standart belirteç kabul edilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ile ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları arasında güçlü bir korelasyon saptadık (p<0.001, r=0.983). Lioznov ve ark. (142)

taze kemik iliği ve periferik kan örneklerinde ALDH<sup>+</sup> hücre sayısı ile CD34<sup>+</sup> hücre sayısının çok iyi korele olduğunu göstermişler ve bu durumun SSC<sup>lo</sup>ALDH<sup>br</sup> hücrelerin hemen tümünde ALDH ve CD34'ün birlikte eksprese edilmesine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer bulgular saptanmış olup ALDH<sup>+</sup>liğinin kök hücre mobilizasyonunu değerlendirmede kullanılabileceğini göstermektedir.

Hess ve ark. (21) da göbek kordonundan elde ettikleri örneklerle yaptıkları çalışmada ALDH<sup>+</sup> hücrelerin içerdiği progenitör hücre miktarının CD34<sup>+</sup> hücrelerin içerdiğine benzer miktarda olduğunu gösterdiler.

Bulgularımız ALDH<sup>+</sup> hücre miktarının 4,5,6. günler için CD34<sup>+</sup> hücre miktarından fazla olduğunu ve bu da periferik kana CD34<sup>-</sup> öncül kök hücrelerin de mobilize olduğunu göstermiştir. Yani CD34<sup>+</sup> hücrelerin hemen hepsi ALDH<sup>+</sup> olup ilaveten ALDH<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> bir hücre grubu da mevcuttur. ALDH<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> hücreler kök hücrelerin mobilize olduğu tüm günlerde pozitif bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda gösterdik ki periferik kanda CD34<sup>+</sup> hücre miktarı arttıkça ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı da artmaktadır (p<0.001).

Periferik kandaki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ile toplanan üründeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı arasında önemli derecede korelasyon mevcuttu (p<0.001). Aynı şekilde periferik kandaki ALDH<sup>+</sup> hücre sayısı arasında da önemli korelasyon vardı (p<0.001). Dolayısıyla periferik kandaki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı gibi ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı bize ne kadar ALDH<sup>+</sup> hücre toplanacağı konusunda bilgi vermektedir.

Periferik kandaki CD34<sup>+</sup> hücre miktarının genellikle 10/μl'nin üzerinde (8-20/μl) olması kök hücre toplamaya başlama zamanı için kriter olarak kabul edilmektedir (28). Bizim çalışmamızda kök hücre toplamada bu kritere uyuldu. ALDH için böyle bir kriter konulabilir mi sorusunun yanıtı çalışmamıza göre CD34 kriterinin de ALDH için kullanılabileceğidir. Çünkü CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ile ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı korele idi ve düzeyleri arasındaki fark ALDH lehine ortalama %3 daha fazla idi. Dolayısıyla ALDH 10/μl kök hücre toplama için başlama zamanı olarak kabul edilebilir.

Hematopoetik kök hücreleri sadece yüzey fenotipine bakarak değerlendirmenin bazı dezavantajları vardır. Hücre yüzey fenotipi türler ve kök hücre kaynağına göre değişebilir. Hücre siklusu ilerlemesi, kültür ve transplantasyon

işlemleri sırasında değişime uğrayabilir. Azalmış fonksiyonel aktiviteye rağmen sabit kalmaya devam eder. Dönüşümlü kök hücre ya da progenitör fonksiyon gösteren hücreleri dışlayabilir (21).

Dondurma ve çözme türü işlemler sırasında membran hasarına uğrayan hücreler ALDH reaksiyonuna ait ürünü kaybeder ve sonuçta tüm ALDH<sup>+</sup> hücreler saptanamayabilir. Bu durum bir dezavantaj gibi görünse de aynı zamanda ALDH aktivitesine göre değerlendirilen hücrelerin membran bütünlüğü korunmuş hücreler olduğu anlamına gelir (122). ALDH ölü hücreleri boyamadığı için dondurulup çözülen kök hücreleri verirken canlılık boyası olan 7-aminoaktinomisin D (7-AAD) ilave etmeden kullanım sağlar.

Biz de çalışmamızda hücre yüzey belirteci olan CD34<sup>+</sup> hücre bakmakla ALDH<sup>+</sup> hücre bakmanın laboratuvar yöntemi olarak zor ve kolay taraflarını karşılaştırdık. ALDH<sup>+</sup>liğinin daha öncül hücreleri ayırt etmesi literatürde (6-9) de bildirilen bir avantaj olarak görülmekle birlikte çözünme işlemi sonrası CD34<sup>+</sup>ten daha az stabil olması nedeniyle kısa sürede analiz gerektirmesi dezavantaj olarak değerlendirildi. Ayrıca monositler ALDH<sup>+</sup> popülasyonu etkilediğinden analizin monositleri ayırarak yapılması gerekmektedir (17). Monositler diğer lökositlerden daha fazla ALDH aktivitesine sahiptir bu nedenle ALDH reaksiyonu öncesi CD14 antikoru ile monositlerin boyanması ALDH<sup>+</sup> popülasyonun daha iyi ayırt edilmesini sağlar ya da CD45/SSC grafiğinde monositlerin kapı alınarak analiz sırasında dışlanması gerekmektedir (122). Biz çalışmamızda CD45, CD34, ALDH'yı boyamada kullandık ve ardışık kapılar alırken CD45/SSC grafiğinde monositleri kapı alarak analiz dışı bıraktık.

Araştırdığımız bir diğer nokta da nötrofil ve trombosit engrafmanını tahmin etmede CD34<sup>+</sup> hücre miktarının mı yoksa ALDH<sup>+</sup> hücre miktarının mı daha yararlı olduğuydu. Otolog ve allogeneik nakil yapılan tüm hastalar için bakıldığında kilogram başına verilen toplam CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı ile nötrofil engrafman zamanı arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile trombosit engrafman zamanı arasında ise anlamlı negatif ilişki mevcuttu.

Hastalar sadece otolog nakil yapılan grup olarak incelendiğinde kilogram başına verilen toplam CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları ile nötrofil ve trombosit

engrafman zamanı arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Tüm hastalar birlikte değerlendirildiğinde trombosit engrafmanı ile olan negatif ilişkinin sadece otolog nakil yapılan hastalar olarak bakıldığında gözlenmemesi olgu sayısının daha az olmasıyla ilişkili olabilir. Zaten tüm hastalar incelendiğinde gözlenen negatif ilişki de kuvvetli bir ilişki değildi. İlişkiyi incelediğimizde CD34<sup>+</sup> veya ALDH<sup>+</sup> hücrenin belli miktardan fazla olması engrafman süresini değiştirmiyordu. Engrafman ile CD34<sup>+</sup> ya da ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı ilişkisi ayrıntılı araştırıldığında ise ilişki başka yönden gözlenebiliyordu. Bulgularımıza göre CD34<sup>+</sup> hücre miktarı  $5.63 \times 10^6$  dan fazla olduğunda engrafman süresi değişmiyordu.

Bazı çalışmalarda (123,124) üründeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarının otolog periferik kök hücre nakli sonrası engrafmana kadar geçen zamanı tahmin etmede yararlı olduğu gösterilmiştir. Fallon ve ark. (23) ALDH<sup>+</sup> hücreler ilkel hematopoetik hücrelerin fenotipik ve fonksiyonel özelliklerine sahip olduğuna göre sayıları otolog transplantasyon sonrası engrafman hakkında bilgi verebilir mi sorusuna yanıt aradılar. Bu amaçla otolog kök hücre nakli yapılan 21 kanser hastasında kilogram başına verilen ALDH<sup>+</sup>, canlı CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>ALDH<sup>-</sup>, ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücre sayılarını değerlendirdiler. Kilogram başına verilen ALDH<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> hücre miktarları  $\geq 5 \times 10^6$  olan hastalarda 11.gün nötrofil ve 20.gün trombosit engrafmanı gözlendi. Bu miktar  $\leq 2 \times 10^6$  olduğunda hastaların yaklaşık yarısında trombosit engrafmanında gecikme oldu. Nakil öncesi taze olarak elde edilmiş lökoferez örneklerinde bakılan CD34<sup>+</sup> hücre sayısı ile nötrofil ve trombosit engrafmanı arasında korelasyon gözlenmedi. CD34<sup>+</sup>ALDH<sup>-</sup> hücreler, taze CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücreler engrafmanla korele değildi ya da zayıf korelasyon gösterdi. Dondurulup saklanmış lökoferez örneklerindeki ALDH<sup>+</sup> hücrelerin viabilitesi CD34<sup>+</sup> hücrelerinkinden daha fazlaydı ( $p < 0.001$ ). Ancak şu ana kadar araştırılan hem otolog hem allogeneik nakil hasta sayıları sınırlı olduğundan daha geniş prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tüm serilerde engrafman sağlanması için gerekli olan minimum CD34<sup>+</sup> hücre sayısı henüz bilinmemektedir. Çünkü bu sayı kök ve progenitor hücre alt gruplarına göre değişkenlik gösterebilir. Fakat kilogram başına 5-10 milyon CD34<sup>+</sup> hücre verilmesinin mutlak nötrofil sayısı ve trombositlerde hızlı iyileşme sağladığı ve engrafman yetmezliği riskinin çok düşük olduğu bilinmektedir. Hastalara en az

$2 \times 10^6$ /kg CD34<sup>+</sup> hücre verilmesi hedeflenmelidir ancak spesifik olgularda daha düşük sayılar kabul edilebilir (125).

Hızlı ve kalıcı engrafman için verilmesi gereken minimum CD34<sup>+</sup> hücre dozunu tanımlamak güç olsa da  $4-5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> hücre/kilogram içeren ürünün bunu sağladığı gösterilmiştir. Kök hücre dozunu bu miktarın üzerine çıkarmak ise sonuçta dramatik bir düzelme sağlamamaktadır (126-128).

CD34<sup>+</sup> hücre miktarıyla transplantasyon sonuçları arasında ilişki olduğu ilk kez Bensinger ve ark. (129) tarafından vurgulanmıştır. Zaucha ve ark. (130) yaptıkları retrospektif çalışmada artmış CD34<sup>+</sup> hücre miktarının daha hızlı engrafmanla ilişkili olduğunu buldular. Fakat bu ilişkinin biyolojik önemini kısıtlı olarak değerlendirdiler. Çünkü  $>12 \times 10^6$ /kg ve  $4-8 \times 10^6$ /kg CD34<sup>+</sup> hücre miktarları için nötrofil engrafman süreleri arasında sadece 1 gün fark saptadılar. Trombosit engrafman süreleri arasında ise fark bulamadılar. Bu bulgular Gianni ve ark. (131)'nin belli bir değerden daha fazla progenitör hücre vermenin nötrofil iyileşmesini hızlandırmadığını gösteren çalışması ile uyumluydu.

Çalışmamızda nötrofil ve trombosit engrafman süresi üzerine kilogram başına verilen CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarlarının etkisini karşılaştırdık. Ototog ve allogeneik kök hücre nakli yapılan hastalar birlikte değerlendirildiğinde kilogram başına verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ortalama  $6.58 \pm 4.31 \times 10^6$  ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı ortalama  $7.90 \pm 8.18 \times 10^6$ , otolog nakil yapılan hastalar tek başına değerlendirildiğinde kilogram başına verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı ortalama  $7.22 \pm 4.47 \times 10^6$  ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı ortalama  $8.72 \pm 8.93 \times 10^6$  idi. Korelasyon grafiği incelendiğinde verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına  $5.63 \times 10^6$  dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı  $6.58 \times 10^6$  dan fazla olduğunda nötrofil engrafman süresinin değişmediği gözlemlendi. Trombosit engrafman süresi ise verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına  $5.42 \times 10^6$  dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı  $7.9 \times 10^6$  dan fazla olduğunda değişiyordu. Bu bulgumuz yukarıda belirtilen yazarların çalışmalarıyla uyumlu idi. Engrafman yetmezliği olan hastamız olmadığı için en az verilmesi gereken miktarlar konusunda yorum yapamıyoruz. Zaten bu konu çalışmamızın amaçları arasında yer almıyordu.

Bazı yazarlar (132,133) periferik kök hücre toplamaya başlamak için en iyi zaman olarak kemoterapiye bağlı nötropeni sonrası beyaz küre sayısının  $>1000/\mu\text{l}$

olduğu dönemi ileri sürse de diğer yazarlarca (134,135) 3000/ $\mu$ l ya da 10000/ $\mu$ l gibi daha yüksek değerlerin toplama zamanını daha doğru belirleyebileceği de ifade edilmiştir. Bu farklılıklar için kesin bir açıklama mevcut değildir. Biz de kemoterapi+G-CSF hastalarımızda BK>1000 olduğunda periferik kandaki CD34<sup>+</sup> hücre miktarını >10/ $\mu$ l olduğunda bulduk. Sadece G-CSF uygulandığında ise 4.günde periferik kanda CD34 baktık ve >10/ $\mu$ l ise kök hücre toplamaya başlandı.

Bazı merkezler periferik kök hücre toplamaya beyaz küre sayısı belirli bir düzeye ulaştığında başlasa da beyaz küre sayıları ve toplanan CD34<sup>+</sup> hücre miktarı arasındaki ilişki zayıftır (132-134). Periferik kan ve aferez ürünündeki CD34<sup>+</sup> hücre sayısı arasında ise yakın ilişki mevcuttur (135,136). Periferik kan ve üründeki CD34 arasında korelasyonun iyi olmadığı çalışmalardaki hasta sayısı genellikle azdır ve CD34 standardizasyonu öncesi yapılmış çalışmalardır (141).

Çalışmamızda 1.gün periferik kanda bakılan beyaz küre sayısı toplanan CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarlarıyla (hasta/kilogram olarak) zayıf yönde negatif ilişkili bulundu. Üründeki beyaz küre sayısıyla toplanan CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları arasında ilişki saptanmadı. Diğer günler için hem periferik kan hem de üründe bakılan beyaz küre sayısıyla ilişki mevcut değildi. Literatürde belirtilen periferik kan ve aferez ürünündeki CD34<sup>+</sup> hücre sayısı arasında yakın ilişki bizim çalışmamızda da gözlemlendi.

Sonuç olarak çalışmamız hematopoetik kök hücrelerinin belirlenmesinde ALDH ekspresyonunun CD34 yerine kullanılabilir bir belirteç olabileceğini desteklemiştir.

## 6. SONUÇLAR

ALDH ekspresyonunun CD34 bakmaya alternatif olabirliğini ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarıyla nötrofil ve trombosit engrafmanı arasındaki ilişkiyi araştırdığımız bu çalışmaya 37 hasta alındı.

1. Tüm hastalar değerlendirildiğinde; periferik kanda mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı 2.günde 1.günden fazlaydı (p<0.05).
2. Periferik kanda mikrolitredeki ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları için günler arasında fark saptanmadı (p>0.05).
3. Periferik kanda 1.gün ortalama ALDH<sup>+</sup> hücre 52.49±66.54/μl, CD34<sup>+</sup> hücre 45.9±55.3/μl; 2.gün ALDH<sup>+</sup> hücre 67.02±107.25/μl, CD34<sup>+</sup> hücre 64.18±109.53; üçüncü gün ALDH<sup>+</sup> hücre 59.41±67.9/μl, CD34<sup>+</sup> hücre 42.12±44.29/μl idi.
4. Periferik kandaki ALDH<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> hücre 1.gün ortalama 6.59/μl, 2.gün 2.84/μl, 3.gün 17.29/μl idi.
5. Periferik kanda birinci gün %12.5, ikinci gün %4, üçüncü gün %29 ALDH<sup>+</sup> hücre CD34<sup>+</sup> hücreye göre daha fazla olduğu halde toplanan ürün analiz edildiğinde ALDH<sup>+</sup> hücre birinci gün %3, ikinci gün %6, üçüncü gün %11 daha fazla saptandı.
6. Ürün örneklerinde mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı 2.günde 1.günden fazlaydı (p<0.05).
7. Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 miktarı 2.günde 1.günden daha fazlaydı (p<0.05).
8. Toplanan üründe kilogram başına elde edilen ALDH miktarı için günler arasında fark saptanmadı (p>0.05).
9. Nötrofil engrafman süresi 11.12 ± 4.15 gün, trombosit engrafman süresi 11.31 ± 4.82 gün idi.
10. Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile nötrofil engrafman süresi arasında anlamlı ilişki saptanmadı (p>0.05).
11. Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile trombosit engrafman süresi arasında negatif ilişki mevcuttu (p<0.05).



12. Hastalara verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına 5.63x10<sup>6</sup>'dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı 6.58x10<sup>6</sup>'dan fazla olduğunda nötrofil engrafman süresinin değişmediği gözlemlendi. Trombosit engrafman süresi ise verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına 5.42x10<sup>6</sup>'dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı 7.90x10<sup>6</sup>'dan fazla olduğunda değişmiyordu.
13. Hastalara infüze edilen kilogram başına toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasında pozitif yönde kuvvetli ilişki mevcuttu (p<0.001).
14. Toplama işleminin 1,2 ve 3. periferik kan ve ürün örneklerinde bakılan CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı arasında kuvvetli bir doğrusal ilişki saptandı (p<0.001).
15. Toplama işleminin 1, 2 ve 3.gününde elde edilen kilogram başına CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı arasında kuvvetli bir doğrusal ilişki mevcuttu (p<0.001).
16. Sadece otolog kök hücre nakli yapılan hastalar değerlendirildiğinde; nötrofil engrafman süresi 9.51 ± 1.50 gün ve trombosit engrafman süresi 9.55 ± 1.42 gün idi.
17. Periferik kan örneklerinde mikrolitredeki CD34<sup>+</sup> hücre miktarı 2.günde fazlaydı (p<0.05).
18. Periferik kan örneklerindeki ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı için günler arasında fark saptanmadı (p>0.05).
19. Ürün örneklerindeki CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarları için 1,2 ve 3.günler arasında fark saptanmadı (p>0.05).
20. Toplanan üründe kilogram başına elde edilen CD34 ve ALDH miktarı günlere göre karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark saptanmadı (p>0.05).
21. Kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafman süresi arasında ilişki saptanmadı (p>0.05).
22. Kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasındaki pozitif yönde kuvvetli ilişki mevcuttu (p<0.001).
23. Verilen CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına 5.40x10<sup>6</sup>'dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı 6.53x10<sup>6</sup>'dan fazla olduğunda nötrofil engrafman süresinin değişmediği gözlemlendi. Trombosit engrafman süresi ise verilen

CD34<sup>+</sup> hücre miktarı kg başına  $7.22 \times 10^6$ 'dan fazla olduğunda ve ALDH<sup>+</sup> hücre miktarı  $8.72 \times 10^6$ 'dan fazla olduğunda değişmiyordu.

24. Otolog kök hücre nakli yapılan hastalar G-CSF (grup 1) ve siklofosamid+G-CSF (grup 2) ile mobilizasyon yapılanlar olarak değerlendirildiğinde; nötrofil engrafman süresi grup 1'de  $9.90 \pm 2.11$  gün ve grup 2'de  $9.25 \pm 0.85$  gün, trombosit engrafman süresi grup 1'de  $9.54 \pm 1.69$  gün ve grup 2'de  $9.56 \pm 1.26$  gün olup 2 grupta birbirinden farklı değildi ( $p > 0.05$ ).
25. Her iki grup için kilogram başına verilen toplam CD34 ve ALDH miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafman süresi arasında ilişki saptanmadı ( $p > 0.05$ ).
26. Her iki grup için kilogram başına verilen toplam CD34 miktarı ile toplam ALDH miktarı arasındaki pozitif yönde kuvvetli ilişki saptandı ( $p = 0.003$ ).

## 7. KAYNAKLAR

1. Barge RMY, Brouwer RE, Beersma RFC, Starrenburg CWJ, Zwinderman AH, Hale G, Waldmann H, Den Ottolander GJ, Falkenburg JHF, Williemze R, Fibbe WE. Comparison of allogeneic T-cell depleted peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation: Effect on stem cell source on short and long term outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27: 1053-8.
2. Erich M, Leiler C, Lang P, Schilbach K, Schumm M, Bader P, Greil J, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Sciegel PG. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34<sup>+</sup> peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32: 379-90.
3. Stewart DA, Guo D, Luider J, Auer I, Klassen J, Ching E, Morris D, Chaudry A, Brown C, Russel JA. Factors predicting engraftment of autologous blood stem cells: CD34<sup>+</sup> subsets inferior to the total CD34<sup>+</sup> cell dose. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 1237-43.
4. Henon PR, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann JC, Lepers M, Wunder E, Kandel G. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant.* 1992; 9: 285-91.
5. Siena S, Bregni M, Di Nicola M, Ravagani F, Peccatori F, Gandola L, Lombardi F, Tarella C, Bonadonna G, Gianni AM. Durability of hematopoiesis following autografting with peripheral blood hematopoietic progenitors. *Ann Oncol.* 1994; 5: 935-41.
6. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood.* 1997; 89: 2233-58.
7. Mohle R, Murea S, Pforsich M, Witt B, Haas R. Estimation of the progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous

- measurement of CD34+ cells in the peripheral blood. *Vox Sang.* 1996; 71: 90-6.
8. Monacada V, Bolan C, Yau Y, Leitman S. Analysis of PBPC yields during large volume leukapheresis of subjects with a poor mobilization response to filgrastim. *Transfusion.* 2003; 43: 495-501.
  9. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakuchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996; 273:242-5.
  10. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID repopulating activity. *Nat Med.* 1998; 4: 1038-45.
  11. Hess DA, Karanu FN, Levac K, Gallacher L, Bhatia M. Coculture and transplant of purified CD34(+)Lin(-) and CD34(-)Lin(-) cells reveals functional interaction between repopulating hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2003;17: 1613-25.
  12. Dorrel C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE. Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood.* 2000; 95: 102-10.
  13. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of stemness. *Exp Hematol.* 2004; 32:585-98.
  14. Jones R, Barber J, Vala M, M Collector, S Kaufmann. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood.* 1995; 85: 2742-46.
  15. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1990; 75: 1947-50.
  16. Kohn FR, Sladek NE. Aldehyde dehydrogenase activity as the basis for the relative insensitivity of murine pluripotent hematopoietic stem cells to oxazaphosphorins. *Biochem Pharmacol.* 1985; 34: 3465-71.

17. Neiderreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet.* 1999; 21: 444-8.
18. Sahovic E, Colvin M, Hilton J, Ogawa M. Role for aldehyde dehydrogenase in survival of progenitors for murine blast cell colonies after treatment with 4-hydroxyperoxycyclophosphamide in vitro. *Cancer Res.* 1988; 48: 1223-6.
19. Knudsen LM, Gaarsdal E, Jensen L, Nikolaisen K, Johnsen HE. Evaluation of mobilized CD34+ cell counts to guide timing and yield of large scale collection by leukapheresis. *J Hematother.* 1998; 7: 45-52.
20. Lasky LA. Sialomucin ligands for selectins: a new family of cell adhesion molecules. *Princess Takamatsu Symp.* 1994; 24: 81-90.
21. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, Nolta JA. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* 2004; 104: 1648-55.
22. Storms RW, Green PD, Saford KM, Niedzwiecki D, Cogle CR, Colvin OM, Chao NJ, Rice HE, Smith CA. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood.* 2005; 106: 95-102.
23. Fallon P, Gentry T, Balber AE, Boulware D, Janssen WE, Smilee R, Storms RW, Smith C. Mobilized peripheral blood SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol.* 2003; 122: 99-108.
24. Danckhoff V. Origin of the blood cells. *Anat Rec.* 1916; 10: 397.
25. Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL. Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55: 186-94.

26. Till JE, McCulloch CE. A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; 14: 213.
27. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol.* 1965; 66: 319.
28. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966; 44: 287.
29. Civin CI, Strauss LC, Fackler MC, Trischmann TM, Wiley JM, Loken MR. Positive stem cell selection-Basic science. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 333: 387.
30. Mathews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hemapoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell.* 1991; 65: 1143.
31. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000; 404: 193.
32. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in Mouse bone marrow. *Cell.* 1997; 91: 661.
33. Kansu E. 4.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi Konuşma Metinleri. 1-4 Mart 2007; Karinna Otel Uludağ, Bursa.
34. Abkowitz JL, Catlin SN, McCallie MT, Guttorp P. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood.* 2002; 100: 2665.
35. Guenechea GE, Gan OI, Dorrell C, Dick JE. Distinct classes of stem cells that differs in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol.* 2001; 2: 75.

36. Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 2003; 9: 959.
37. Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A, Dusich J, Bachmann MH, Negrin RS, Weissman IL, Contag CH. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 221.
38. Özmen S, Fındıkçioğlu F, Siemionow M. Kök Hücreler. *Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg*. 2006; 3: 187-96.
39. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Torok-Storb B, Storb R, Buckner CD. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood*. 1995; 85: 1655.
40. Storek J, Gooley T, Siadak M, Bensinger WI, Maloney DG, Chauncey TR, Flowers M, Sullivan KM, Witherspoon RP, Rowley SD, Hansen JA, Storb R, Appelbaum FR. Allogeneic peripheral stem cell transplantation may be associated with a high risk of graft versus host disease. *Blood*. 1997; 90: 4705.
41. Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic progenitor cells in the peripheral blood of high dose cyclophosphamide treated patients. *Blood*. 1989; 74: 1905.
42. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003; 102: 2728.
43. Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL. Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother*. 2001; 55: 186-94.

44. McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC, Quesenberry PJ. Detection of a human CFC with a high proliferative potential. *Blood* 1989; 74: 609.
45. Runde V, de Witte T, Arnold R, Gratwohl A, Hermans J, van Biezen A, Niederwieser D, Labopin M, Walter-Noel MP, Bacigalupo A, Jacobsen N, Ljungman P, Carreras E, Kolb HJ, Aul C, Apperley J. Bone marrow transplantation from HLA identical siblings as first line treatment in patients with myelodysplastic syndromes: early transplantation is associated with improved outcome. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21: 255.
46. Osgood EE, Riddle MC, Mathew TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; a case report. *Ann Intern Med.* 1939; 13: 357.
47. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst.* 1951; 12: 157.
48. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957; 257: 491.
49. Mathe G, Amie JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, Devries MJ, Tubiana M, Lalanne C, Binet JL, Papiernik M, Seman G, Matsukura M, Mery AM, Schwarzmans V, Flaisler A. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects. *Blood.* 1965; 25: 179.
50. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968; 2: 1366.



51. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*. 1968; 2:1 364.
52. O'Reilly RJ, Dupont B, Pahwa S, Grimes E, Smithwick EM, Pahwa R, Schwartz S, Hansen JA, Siegal FP, Sorell M, Svejgaard A, Jersild C, Thomsen M, Platz P, L'Esperance P, Good RA. Reconstitution in severe combined immunodeficiency by transplantation of marrow from an unrelated donor. *N Engl J Med*. 1977; 297: 1311.
53. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med*. 1980; 303: 565.
54. Negrin RS, Blume KG. Principles of hematopoietic stem cell transplantation. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, editors. *Williams Hematology*. New York: Mc Graw Hill; 2008. p.303-304.
55. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I ve ark. Stem cell mobilization. *Hematology*. 2003; 419-37.
56. Çağırğan S. 1.Ulusal Hemaferes Kongresi Kitabı, 9-10 Ekim 2003, Cevahir Otel, İstanbul.
57. Rock G, Chin-Yee I, Cantin G, Giulivi A, Gluck S, Keating A, Keeny M, Klassen J, Sutherland R. Quality assurance of progenitor cell content of apheresis products. *Transfusion Med*. 2000; 10: 67-75.
58. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood*. 1976; 47: 1031.
59. Krause DS, Mechanic SA, Synder EL. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells. In: *Apheresis: Principles and Practice*. McLeod BC, Price TH, Drew MJ, editors. AAAB Press, Bethesda, 1997. p. 443-51.
60. To LB, Sheppard KM, Haylock DN. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of

- hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol.* 1989; 18: 442-7.
61. Kotasek DD, Sheppard KM, Sager RE. Factors affecting blood stem cell collections following high dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumours. *Bone Marrow Transplant.* 1992;9: 11-8.
  62. Dreger P, Gluckman E, Schmitz N. Source of hematopoietic stem cells. In: *Blood and Marrow Transplantation, The EBMT Handbook.* Apperey JF, Gluckman E, Grathwol A, editor. 2000. p.69-90.
  63. Körbling M. Mobilization regimens for harvesting autologous and allogeneic peripheral blood stem cells. In *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation.* Atkinson K, editors. 2nd ed. Cambridge University Press, 2000.p.1127-46.
  64. Beelen DW, Ottinger H, Kolbe K, Pönisch W, Sayer HG, Knauf W, Stockschräder M, Scheid C, Schaefer UW. Filgrastim mobilization and collection of allogeneic blood progenitor cells from adult family donors: first interim report of a prospective German multicenter study. *Ann Hematol.* 2002; 81: 701-9.
  65. Anderlini P, Przepiorka D, Seong D, Miller P, Sundberg J, Lichtiger B, Norfleet F, Chan KW, Champlin R, Körbling M. Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte colony stimulating factor (filgrastim) mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors and analysis of charges for procedures. *Transfusion.* 1996; 36:590-5.
  66. Becker PS, Wagle M, Matous S, Swanson RS, Pihan G, Lowry PA, Stewart FM, Heard SO. Spontaneous splenic rupture following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): occurrence in an allogeneic donor of peripheral blood stem cells. *Biol Bone Marrow Transplant.* 1997; 3: 45-9.
  67. De Azevedo AM, Goldberg TD. Life-threatening capillary leak syndrome after G-CSF mobilization and collection of peripheral blood

- progenitor cells for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28: 311-2.
68. Kessinger A, Sharp JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31:319-29.
69. Desikan KR, Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Siegel D, Fassas A, Munshi N, Singhal S, Mehta J, Tindle S, Nelson J, Bracy D, Mattox S, Tricot G. Comparable engraftment kinetics following peripheral-blood stem-cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 1547-53.
70. Arslan O, Moog R. Mobilization of peripheral blood stem cells. *Transfus Apher Sci.* 2007;37: 179-85.
71. Schots R, Van Riet I, Damiaens S, Flament J, Lacor P, Staelens Y, Steenssens L, van Camp B, De Waele M. The absolute number of circulating CD34<sup>+</sup> cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be predicted by apheresis. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17: 509-15.
72. Mohle R, Murea S, Pforsich M, Witt B, Hass R. Estimation of the progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous measurement of CD34<sup>+</sup> cells in the peripheral blood. *Vox Sang.* 1996; 71: 90-6.
73. Ford C, Chan K, Reilly W, Peterson F. An evaluation of predictive factors for CD34<sup>+</sup> cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. *Transfusion.* 2003; 43: 622-5.
74. Schwella N, Beyer J, Schwaner I, Heuft HG, Rick O, Huhn D, Serke S, Siegert W. Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor cell dose with engraftment after high dose chemotherapy in patients with germ cell cancer. *J Clin Oncol.* 1996; 14: 1114-21.

75. Ford C, Chan K, Reilly W, Peterson F. An evaluation of predictive factors for CD34<sup>+</sup> cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. *Transfusion*. 2003; 43: 622-5.
76. Tricot G, Jagannath S, Vesole D, Nelson J, Tindle S, Miller L, Cheson B, Crowley J, Barlogie B. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood*. 1995; 85: 588-96.
77. Brecher M, Sims L, Schmitz J, Shea T, Bentley S. North American multicenter study on flow cytometry of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. *J Hematotherapy*. 1996; 5: 227-36.
78. O'Connell B, Ng Y, Rapaport A, Fassas A, Tricot G, Cuttler-Fox M. Maximizing collection of human peripheral blood progenitor cells while minimizing the number of aphereses. *Blood*. 1999; 94: 4749a.
79. Arat M. Engrafman, tanımı ve belirlenmesi, kimerizm tayini. *Kan ve Kemik İliği Transplantasyon Kursu Kitabı*. 17-18 Ocak 2004.
80. Sutherland DR, Watt SM, Dowden GK, Karhi K, Greaves MF, Smart JE,. Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hematopoietic progenitor cell antigen CD34. *Leukemia*. 1988; 2: 793-803.
81. Gülbaş Z. CD34+ hücre analizi. *Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültür Teknikleri Kurs Kitabı 1*. 20-25 Ocak 2003, Trabzon.
82. Haas R, Witt B, Möhle R, Goldschmidt H, Hohaus S, Fruehauf S, Wannemacher M, Hunstein W. Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood*. 1995; 85: 3754-61.
83. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother*. 1992; 1: 115-29.
84. Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, Zanjani ED. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of

- highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood*. 1996; 88: 4102-9.
85. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stem AC, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni AM. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous stem cell transplantation in cancer patients. *Blood*. 1991; 77: 400-9.
86. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, West W. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*. 1995; 86: 3961-9.
87. Van der WE, Richel DJ, Holtkamp MJ, Slaper-Coretnbach IC, van der Schoot CE, Dalesio O, Nooijen WJ, Schomagel JH, Rhodenhuis S. Bone marrow recostitution after high dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of graft size. *Ann Oncol*. 1994; 5: 795-802.
88. Olivieri A, Offidani M, Montanari M, Ciniero L, Cantori I, Ombrosi L, Masia CM, Centurioni R, Mancini S, Brunori M, Leoni P. Factors affecting hematopoietic recovery after high dose therapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Haematologica*. 1998; 83: 329-37.
89. Ketterer N, Salles G, Raba M, Espinouse D, Sonet A, Tremisi P, Dumontet C, Moullet I, Eljaafari-Corbin A, Neidhardt-Berard EM, Boafia F, Coiffier B. High CD34<sup>+</sup> cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood*. 1998; 91: 3148-55.
90. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, Storb R, Sanders J, Lilleby K, Gooley T, Demirer T, Schiffman K, Weaver C. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. *J Clin Oncol*. 1995; 13: 2547-55.

91. Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous peripheral blood stem cell transplantation following high dose therapy for malignancies. *Blood*. 1989; 74: 211-3.
92. Marti G, Johnsen H, Sutherland R, Serke S. A convergence of methods for a worldwide Standard for CD34+ cell enumeration. *J Hematother*. 1998; 7: 105-7.
93. Sovolat H. Multicentric determination of CD34+ cells. In: Wunder E, Sovolat H, Henon PR, Serke S, editors. *Hematopoietic stem cells: The Mulhouse Manual*. Alphamed Press: Dayton, OH, 1994, p 61-6.
94. Cristopherson KW, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*. 2004; 305: 1000-3.
95. Bhatia M, Wang JC, Kappa U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 5320-5.
96. Dao MA, Arevalo J, Nolta JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood*. 2003; 101: 112-8.
97. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, Hotta T, Kato S. Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood*. 1999; 94: 4053-9.
98. <http://www.stemcell.com/technical/aldh.aspx> (16/08/2008).
99. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, Eades WC, Creer MH, Nolta JA. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2006; 107: 2162-9.
100. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 9118-23.

- 101.Schuurhuis GJ, Muijen MM, Oberink JW, de Boer F, Ossenkoppele GJ, Broxterman HJ. Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34 positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27: 487-98.
- 102.Goodell MA, Rozenweig M, Goodell HK, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. Dye efflux studies suggests the existence of CD34-negative/low hematopoietic stem cells in multiple species. *Nat Med.* 1997; 3:1337-51.
- 103.Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood.* 2000; 95: 2813-20.
- 104.Zambelli A, Poggi G, Da Prada G, Pedrazzoli P, Cuomo A, Miotti D, Perotti C, Preti P, Robustelli della Cuna G. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res.* 1998; 18: 4705-8.
- 105.Jones RJ, Zuehlsdorf M, Rowley SD, Hilton J, Santos GW, Sensenbrenner LL, Colvin OM. Variability in 4-hydroperoxycyclophosphamide activity during clinical purging for autologous bone marrow transplantation. *Blood.* 1987; 70: 1490-4.
- 106.Russo J, Hilton J, Colvin O. The role of aldehyde dehydrogenase isozymes in cellular resistance to the alkylating agent cyclophosphamide. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism.* H.Weiner & T. Flynn, editors. p.65. New York.
- 107.Colvin O. Pharmacologic purging and bone marrow. In: *Hematopoietic Cell Transplantation.* S.Forman, editor. p. 217-24. Blackwell Science, Inc. Malden.
- 108.O'Reilly RJ. T cell depletion and allogeneic bone marrow transplantation. *Seminars In Hematol.* 1992; 29: 20-6.

109. Champlin RE, Passweg JR, Zhang MJ, Rowlings PA, Pelz CJ, Atkinson KA, Barrett AJ, Cahn JY, Drobyski WR, Gale RP, Goldman JM, Gratwohl A, Gordon-Smith EC, Henslee-Downey PJ, Herzig RH, Klein JP, Marmont AM, O'Reilly RJ, Ringdén O, Slavin S, Sobocinski KA, Speck B, Weiner RS, Horowitz MM. T cell depletion of bone marrow transplants for leukemia from donors other than HLA-identical siblings: advantage of T cell antibodies with narrow specificities. *Blood*. 2000; 95: 3996-4003.
110. Elwood NJ, Smith CA. Current status of retroviral vector mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Leuk Lymph*. 2001; 41: 1-18.
111. Emerson S. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. *Blood*. 1996; 87: 3082-8.
112. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow derived endothelial cells. *Blood*. 1998; 92: 362-7.
113. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-34.
114. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001; 98: 2615-25.
115. Shih CC, Weng Y, Mamelak A, LeBon T, Hu MC, Forman SJ. Identification of a candidate human neurohematopoietic stem cell population. *Blood*. 2001; 98: 2412-22.
116. Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, Ahmad S, Stojkovic P, Hole N, Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive



- hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2004; 22: 1142-51.
117. Pearce DJ, Bonnet D. The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2007; 35: 1437-46.
118. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Peterson ED. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Col Cardiol*. 2007; 50: 2243-8.
119. Hildebrandt M, Schuler M, Rautenberg K, Gerecke C, Ludwig WD. Aldehyde dehydrogenase positive hematopoietic progenitor cells in peripheral blood and progenitor cell apheresis products: characterization and correlation with kinetics of engraftment. *Blood*. 2005; 106: 313 (Abstract).
120. Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, Luthra PM. Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion and homing. *Stem Cells Development*. 2006;15: 305-13.
121. Fischmeister G, Gardner H. Granulocyte colony stimulating factor versus granulocyte macrophage colony stimulating factor for collection of peripheral blood progenitor cells from healthy donors. *Curr Opin Hematol*. 2000;7: 150-5.
122. Gentry T, Deibert E, Foster SJ, Haley R, Kurtzberg J, Balber AE. Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH bright cell population of cryopreserved banked UC blood. *Cytother*. 2007; 9:596-606.
123. Bender JG, Williams LB, Schwarzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother*. 1992; 1: 329-41.
124. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood stem cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 1360-1377.

- 125.Serke S, Johnsen HE. A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell. *Bone Marrow Transpl.* 2001;27: 463-70.
- 126.Shpall EJ, Champlin R, Glaspy JA. Effect of CD34+ peripheral blood progenitor cell dose on hematopoietic recovery. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1998;8: 84-92.
- 127.Glaspy JA, Shpall EJ, LeMaistre CF, Briddell RA, Menchaca DM, Turner SA, Lill M, Chap L, Jones R, Wiers MD, Sheridan WP, McNiece IK. Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients. *Blood.* 1997;90: 2939-51.
- 128.Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34+ cell dose on resource utilization in patients after high dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support. *J Clin Oncol.* 1999; 14: 1227-33.
- 129.Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Torok-Storb B, Storb R, Buckner CD. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood.* 1995; 85; 1655.
- 130.Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, Heimfield S, Chauncey TR, Zaucha R, Martin PJ, Flowers MED, Storek J, Georges G, Storb R, Torok-Storb B. CD34 cell dose in granulocyte colony stimulating factor mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft versus host disease after human antigen identical sibling transplantation. *Blood.* 2001;98:.3221-7.
- 131.Gianni AM, Bregni M, Siena S, et al. Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells: a changing role for high dose chemo-radiotherapy. *Hematol Oncol.* 1989;7: 139-48.

132. Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A, Bonadonna G. Granulocyte macrophage colony stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*. 1989; 580-5.
133. To LB, Shepperd M, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts MM, Sage RE, Jutter CA. Single high doses cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol*. 1990;18: 442-7.
134. Kotasek D, Shepherd KM, Sage RE, Dale BM, Norman JE, Charles P, Gregg A, Pillow A, Bolton A. Factors affecting blood stem cell collections following high dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone Marrow Transplant*. 1992;9: 11-7.
135. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, Lilleby K, Longin K, Rowley S, Clift R, Hansen J, Shields T, Storb R, Weaver C, Weiden P, Buckner CD. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood*. 1993; 81: 3158-63.
136. Stewart AK, Imrie K, Keating A, Anania S, Nayar R, Sutherland DR. Optimizing the CD34+ and CD34+Thy-1 stem cell content of peripheral blood stem cell collections. *Exp Hematol*. 1995; 23: 1619-27.
137. Elliot C, Samson DM, Armitage S, Lyttelton MP, McGuigan D, Hargreaves R, Giles C, Abrahamson G, Abboudi Z, Brennan M, Kanfer EJ. When to harvest peripheral blood stem cells after mobilization therapy: prediction of CD34 positive cell yield by preceding day CD34 positive concentration in peripheral blood. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 970-3.
138. Schots R, Van Riet I, Damiaens S, Flament J, Lacor P, Staelens Y, Steenssens L, van Camp B, De Waele M. The absolute number of

- circulating CD34<sup>+</sup> cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 17: 509-15.
139. Williams O, Demirer T, Lilleby K, Buckner CD, Bensinger WI. Tempo of hematologic recovery correlates with peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell level in patients undergoing stem cell mobilization. *J Clin Apher*. 1998; 13: 1-6.
140. Yu J, Leisenring W, Bensinger WI, et al. The predictive value of white cell or CD34<sup>+</sup> cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield. *Transfusion*. 1999; 39: 442-50.
141. Williams O, Demirer T, Lilleby K, Buckner CD, Bensinger WI. Tempo of hematologic recovery correlates with peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell level in patients undergoing stem cell mobilization. *J Clin Apher*. 1998; 13: 1-6.
142. Lioznov MV, Freiburger P, Kröger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35: 909-14.