

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MOBİLİZE EDİLEN ÇEVRESEL KAN AFEREZ ÜRÜNLERİNDE
ALDEHİT DEHİDROGENAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ
VE KÖK HÜCRE NAKLİ SONRASI ENGRAFMAN İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ

**HEMATOLOJİ BİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Akın UYSAL**

**ANKARA
2011**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MOBİLİZE EDİLEN ÇEVRESEL KAN AFEREZ ÜRÜNLERİNDE
ALDEHİT DEHİDROGENAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ
VE KÖK HÜCRE NAKLİ SONRASI ENGRAFMAN İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ

**HEMATOLOJİ BİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

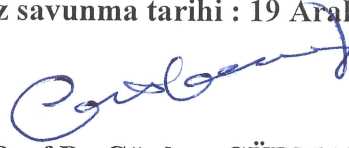
Prof. Dr. Akın UYSAL

**Bu tez 26515 proje numarasıyla Ankara Üniversitesi İç hastalıkları Araştırma
Fonu tarafından desteklenmiştir.**

**ANKARA
2011**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı
Tıpta yan dal uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan
“Mobilize edilen Çevresel kan aferez ürünlerinde Aldehit Dehidrojenaz aktivitesinin
belirlenmesi
ve kök hücre nakli sonrası engrafman ile ilişkisi”
başlıklı Uz.Dr. Sinem Civriz Bozdağ’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından tıpta yan dal
uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi : 19 Aralık 2011



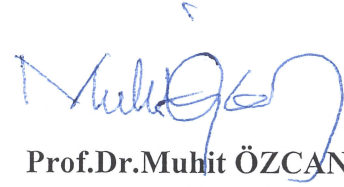
Prof.Dr.Günhan GÜRMAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Akın UYSAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı



Prof.Dr.Muhit ÖZCAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Hematoloji Bilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hematoloji yan dal uzmanlık tezim olan bu çalışmada tez danışmanım Prof. Dr. Akın Uysal'a, Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Günhan Gürman'a, yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Meral Beksaç'a, Prof. Dr. Osman İlhan'a, Doç. Dr. Pervin Topçuoğlu'na, ve diğer Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından ötürü Uz.Dr.Klara Dalva'ya, akım sitometri laboratuvarı çalışanlarına, Uz.Bio.Erol Ayyıldız'a, Aferez Ünitesi çalışanlarına ve tüm aileme teşekkür ederim.

Bu tez, 26515 proje numarasıyla Ankara Üniversitesi İç hastalıkları Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
İçindekiler	ii
Simgeler ve kısaltmalar dizini	iii-iv
Şekiller dizini	v
Tablolar dizini.....	vi
1-GİRİŞ	1
2-GENEL BİLGİLER..	2-9
2.1. Hematopoietik Kök hücre	2
2.2. Aldehit Dehidrogenaz Enzimleri	3
2.2.1 Tanım ve görevleri..	3
2.2.2 Kök hücrede ALDH'ın rolü	4
2.2.3 ALDHbr hücrelerin hematopoietik sistemdeki rolleri ..	5
2.2.4 ALDHbr hücrelerin nonhematopoietik rolleri.....	6
2.2.5 ALDH ölçümü..	7
2.3 Hematopoietik kök hücre nakli	9
3-HASTALAR VE YÖNTEM	10-14
3.1. Hastalar.....	10
3.2 Yöntem	11
3.2.1 Aferez toplama işlemi	11
3.2.2 CD34(+) hücre sayımı.....	13
3.2.3 ALDHbr hücre sayımı.....	13
3.2.4 İstatistik.	14
4-BULGULAR	15-20
5-TARTIŞMA	21-24
6-SONUÇ.....	25
ÖZET.....	26
SUMMARY.....	27
KAYNAKLAR	28-32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AA:** Aplastik anemi
ACD: Asit sitrat Dekstroz
ALDH: Aldehit Dehidrogenaz
ALDHbr: Aldehit Dehidrogenaz bright
ALL: Akut lenfoblastik lösemi
ALLO: Allojeneik kök hücre nakli
AML: Akut myeloblastik lösemi
BEAM: Karmustin, Etoposid, Sitarabin, Melfelan
BUCY: Busulfan, siklofosfamid
CD: Cluster of Differentiation
CYATG: Siklofosfamid, Antitimosit globulin
CYBORD: Siklofosfamid, bortezomib, dekzametazon
CYTBI: Siklofosfamid, Total beden Işınlaması
ÇK: Çevresel Kan
DEAB: Dietilaminobenzaldehit
DHAP: Dekzametason, sisplatin, sitarabin
DMSO: Dimetilsulfoksit
E: Erkek
FLU MEL: Fludarabin, Melfelan
GCSF: Granulosit koloni stimule edici faktör
HDL: Hodgkin dışı Lenfoma
HKH: Hematopoitik kök hücre
HL: Hodgkin Lenfoma
HYPERCVAD: Siklofosfamid, adriamisin, vinkristin, dekzametazon
K: Kadın
Kİ: Kemik İligi
MEL: Melfelan

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ-2

MKH:Multipotent kök hücre

MM: Multipl myelom

NOD-SCID: Non obez,diabetik ciddi immünyetmezlikli

OTO: Otolog kök hücre nakli

PET:Pozitron Emisyon Tomografi

RA: Retinoik asit

RPMI: Hücre kültür media

SPECT: Single pozitron emission tomography

UKK:Umbilikal Kord Kanı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1 Hücre içinde ALDH'in rolü

Şekil 2 ALDH'in ilaç direncindeki rolü

Şekil 3 .ALDEFLUOR çalışma mekanizması

Grafik 1.Çevresel kanda CD34(+) ve ALDHbr hücre yüzdelerinin korelasyonu

A.Otolog nakil hastaları B Sağlıklı vericiler

Grafik 2.Üründeki CD34(+) ve ALDHbr hücre yüzdelerinin korelasyonu

A.Otolog nakil hastaları B Sağlıklı vericiler

Grafik 3.Nakil edilen CD34(+)hücre sayısı ile nötrofil, trombosit engrafmanı arası ilişki

Grafik 4.Nakil edilen CD34(+)ALDHbr hücre sayısı ile nötrofil,trombosit engrafmanı arası ilişki

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hasta özellikleri

Tablo 2. Çevresel kan ve üründeki CD90(+) ve CD38(-) hücrelerin yüzdeleri

1-GİRİŞ

Kök hücreler , kendi kendilerini yenileyebilen, spesifik doku ve organ gelişiminde rol alan, olgun hücrelere differansiyasyon kapasitesi olan hücrelerdir (1). Kök hücreleri saptayabilmek için hücrenin tipine bağlı olarak çok sayıda spesifik belirleyiciler kullanılabilir.

İnsan hematopoietik kök hücreleri (HKH), CD34 yüzey antijeni ifade ederler. CD34 ifadesi, mikroçevresel faktörlere ve hücrel aktivasyona bağlı olarak değişkenlik gösterir. Dolayısıyla bu hücrelerin daha iyi ayırt edilebilmeleri için ek belirleyiciler gereklidir. Yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin Thy1(+), CD38 (lo/-), ckit(-/lo), CD105(+), Lin(-) CD133(+) oldukları gösterilmiştir (2,3). CD34 hücreler differansiye oldukça CD38 ifadesi artar, CD90 ve CD133 ifadeleri ise azalır (4). Erken hematopoietik öncüllerin arasında çokça bulunan ve fonksiyonel bir belirleyici olan aldehit dehidrogenaz (ALDH) ifadesi de hematopoietik kök hücrelerin saptanmasında kullanılabilir. Fenotipik ve fonksiyonel belirleyicileri bir arada değerlendirerek, daha kaliteli kök hücre saptanmasıyla kök hücre naklinde engrafman kapasitesinin artırılacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmamızda biz, otolog kök hücre nakli için mobilizasyon yapılan hastalar ve allojeneik kök hücre nakli için verici olan sağlıklı bireylerden alınan çevresel kan ve aferez ürünlerini değerlendirdik. Çalışmanın amaçlarından biri, mobilize olan çevresel kan ve aferez ürün örneklerinde CD34, CD38, CD90, ALDH ifadesini değerlendirmektir. Hem otolog kök hücre nakli yapılacak ve daha önce sitotoksik tedavi almış hasta grubunu, hem de allojeneik kök hücre nakli yapılacak hastaların sağlıklı vericilerini değerlendirerek mobilizasyon döneminde bu iki grup arasında CD34, CD38, CD90, ALDH ifadesi açısından fark olup olmadığını saptamayı hedefledik.

Çevresel kandan toplanan aferez ürünüdeki CD34(+) hücre miktarı ile engrafman arasındaki ilişki çok sayıda çalışmaya konu olmuştur. Biz üründeki ALDH^{br} hücre sayısının engrafman açısından fark yaratıp yaratmayacağını görmeyi amaçladık.

2-GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoietik Kök Hücre

Hematopoietik sistemdeki hiyerarşik düzen, hematopoietik kök hücrenin (HKH) ve öncülerinin saptanmasıyla her geçen gün daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Hematopoietik kök hücre, en iyi belirlenmiş kök hücre tipi olup, rutinde kullanılan tek kök hücre tipi olma özelliğini korumaktadır. Kemik iliğinden (Kİ), umbilikal kord kanından (UKK), mobilize edilmiş çevresel kandan izole edilebilmektedir. Kendi kendini yenileyebilen hematopoietik kök hücreler multipotenttir. Kök hücreler lenfosit, dendritik hücre, granülosit, eritrosit, megakaryosit, doğal öldürücü hücrelere farklılaşabilir. Hematopoietik kök hücreden farklılaşan ilk hücre serisi multipotent progenitör hücrelerdir (MKH). Bu hücreler de HKH gibi tüm hematopoietik seriye farklılaşabilir. Ancak proliferasyon hızları daha yavaştır.(2,5) MKH, oligopotent hücrelere farklılaşır. Bu hücreler de seri bağımlı kök hücrelerin gelişiminde rol oynarlar. Ardarda oluşan bu farklılaşma sürecinde kök hücreler, özellikleri ve fonksiyonlarıyla ilişkili olarak antijenik karakteristikler gösterirler. Bu özellikler sayesinde kök hücre transplantasyonunda kullanılmak üzere hücrelerin tanımlanıp ayrıştırılabilmesi sağlanmaktadır. Kök hücrenin fenotipik özellikleri dışında fonksiyonelliğinin de önemli olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kullanılabilen yüksek intraselüler aldehit dehidrogenaz aktivitesinin (ALDH), klonojenik progenitör popülasyonu göstermede oldukça değerli olduğu düşünülmektedir. CD34(+) hücrelerin çoğunlukla myeloid ve lenfoid kompartmanlar için kısa dönem progenitörleri içerdiği bilinmektedir. ALDH ekspresyonuna ise myeloid progenitörlerde daha sık olarak rastlanmaktadır. CD34(+)ALDH(-) hücrelerin kısa dönem lenfoid hücrelere öncülük ettiği düşünülmektedir. Bu durumsa ALDH'ın erken lenfopoezde negatif etkili olabileceği düşüncesini doğurmaktadır (5).

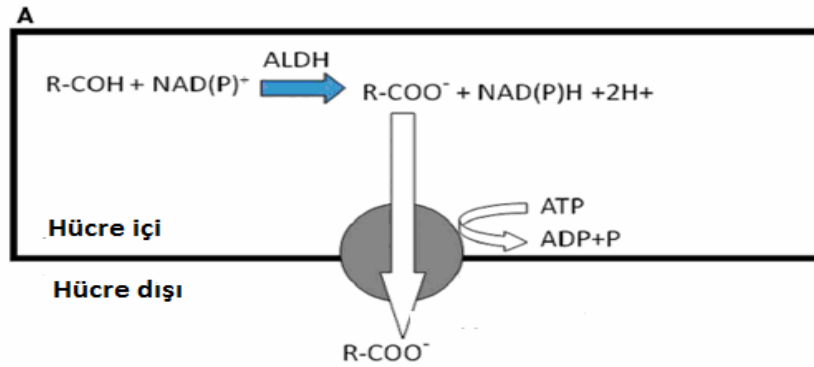
- Hematopoietik kök hücreleri, izole edebilmek için;
- a) Karakteristik kök hücre antijenlerini (örneğin; CD34 ve CD133) göstermek,

- b) Seri (lineage) olgunlaşma belirleyicilerini (Lin⁻) saptamak,
- c) Yüksek aldehit dehidrogenaz (ALDH) ifadesini göstermek ,
- d) Hoechst 3342(Hoe3342 low), Pyronin Y (Pyronin Y low) veya Rhodamin 123 (Rh123 low) boyalarının az birikimini göstermek gereklidir.

2.2.Aldehit Dehidrogenaz Enzimleri

2.2.1. Tanım ve Görevleri :

Aldehit dehidrogenaz enzim ailesi, aldehitin piridin nükleotidine bağlı olarak karboksilik aside oksidasyonunda rol alan ondokuz enzimden oluşur (şekil 1) (6). Aldehitler uzun yaşam süresi olan oldukça reaktif eoznofilik bileşiklerdir. Fizyolojik süreçlerde rol alabildikleri gibi mutajenik, karsinojenik ve sitotoksik rolleri de vardır. Aldehit dehidrogenaz ailesi üyesi olan bazı enzimler, substrat olarak farklı aldehitleri seçebilirler. Endojen aldehitler, lipid peroksidasyonunda, aminosit katabolizmasında, nörotransmitter, karbonhidrat biyotransformasyonunda, vitamin ve steroid metabolizmasında yer alırlar. Ekzojen aldehitlerin kaynağı ya ksenobiotikler ya da ilaçlar gibi ekzojen aldehit prekürsörlerin biyotransformasyon ürünleridir. (1,7,8).



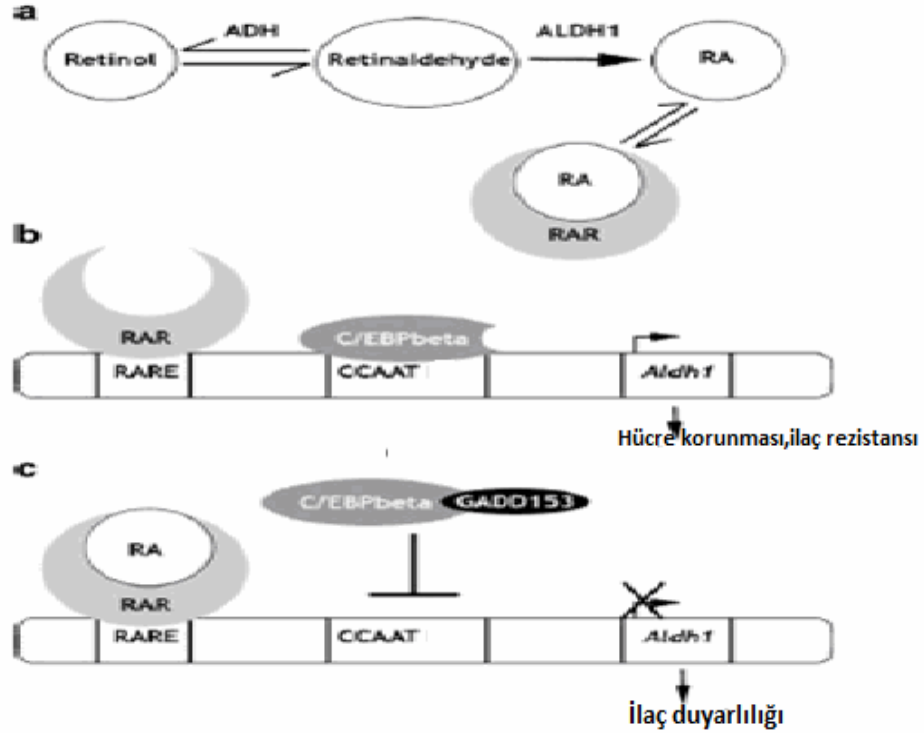
Şekil.1 Hücre içinde ALDH'in rolü

ALDH enzimi sitoplazma, çekirdek, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunabilmektedir. İnsanlarda gösterilmiş ondokuz ALDH geni mevcut olup, onbir ayrı grupta (grup 1-9,16,18) toplanmıştır. Altı üyesiyle bu grupların en büyüğü olan birinci grupta A,B,L altgrupları vardır (9). İzofomların çoğunun başta böbrek ve karaciğer olmak üzere vücutta yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir (12-13). Karaciğerde ALDH1A1, A vitaminin retinoik aside (RA) dönüşümünde katalizör görevi yapan retinoik asit enzimi olarak yer almaktadır. ALDH1A1ve ALDH2 alkol metabolizmasında rol alırlar. Retinaldehit dehidrogenaz aktivitesi olan diğer ALDH enzimleri (ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 ve ALDH8A1) embriyogenezde gerekli olan bazı retinaldehitlerin retinoik aside oksidasyonunda rol alırlar.

2.2.2. Kök Hücrede ALDH'ın Rolü

İnsan normal ve kanser kök hücrelerinde ALDH enzimlerinin bulunduğu gösterilmiştir(ALDH1A1,ALDH1A2,ALDH1A3,ALDH1L1,ALDH1L2,ALDH2*2,ALDH3A1,ALDH4A1ALDH7A1). Retinoid sinyal yollarının kök hücrede ve kanser hücrelerinde kullanıldığı gösterilmiştir. Retinoik asit ve türevleri, gen ekspresyonu, morfogenez ve gelişim gibi çok önemli fizyolojik olaylarda yer alırlar. ALDH ise retinoik asit oksidasyonunda rol alan dört enzimden biridir. Retinaldehit geri dönüşümsüz olarak ALDH1 tarafından retinoik asite okside olur. Bu işlem doku spesifiktir ve enzim negatif feedback etki altındadır. ALDH1A ailesi proteinleri ve diğer ALDH izoenzimleri, oksidatif strese maruz kalan hücrelerden oluşan lipid peroksidasyon ürünleri gibi bazı retinoid dışı aldehidleri okside edebilirler (7). Bu da kanser kök hücrelerinin de içinde olduğu birçok kök hücre tipinin hipoksik ortamlara uyum sağlamasında önemlidir.

ALDH1 ve ALDH3'ün kanser kök hücrelerinin sitotoksik ilaçlara karşı korunmasında rol aldığı düşünülmektedir. İki dekad önce ALDH aktivitesi yüksek olan hematopoietik ve lösemik hücrelerin siklofosfamide daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Sitoplazmik ALDH1 ve ALDH3, siklofosfamidin inaktif hidroksiepisiklofosfamide dönüşmesine neden olur (Şekil 2) (10,11).



Şekil 2 ALDH'in ilaç direncindeki rolü

2.2.3. ALDHbr Hücrelerin Hematopoietik Sistemdeki Rollerini

İnsan kordon kanı, kemik iliği ve mobilize edilmiş çevresel kandan elde edilen ALDHbr popülasyonunun erken hematopoietik progenitör hücrelerin arasında çokça bulunduğu gösterilmiştir (7). Differansiasyon arttıkça ALDH ifadesi azalmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, ALDH ekspresyonunun lenfopoezi inhibe ettiği, eritropoezi etkilemeden myelopoezi artırdığı gösterilmiştir (5). Fare modellerinde; tüm myeloid seri hücreleri, B hücreler ve doğal öldürücü hücrelerin ALDHbr kordon kanı hücrelerinden köken aldığı gösterilmiştir. Liu ve arkadaşları, nonobez, diabetik ciddi immünyetmezlikli (NOD-SCID) c-/- farelerde T lenfositlerin pürifiye kordon CD34(+)ALDHbr hücrelerden geliştiğini göstermiştir. Aynı çalışmada, kemik iliği engraftman başlangıcı, kısa ve uzun süreli engraftmanın olması ile çevresel kana olgun hücrelerin salınımının verilen CD34(+)ALDHbr hücrelerin miktarına bağlı olduğu düşünülmüştür (12).

Yapılan geriye dönük klinik çalışmalarda, ALDHbr hücre dozu ile kemik iliği engrafman süresinin ters orantılı olduğu görülmüştür (13,14). Çocuklarda yapılan konvansiyonel allojeneik kord kanı naklinde, ek olarak hazırlanan ALDHbr hücrelerden oluşan ürünlerin verilmesiyle engrafmanın hızlandığı gösterilmiştir (15).

ALDH aktivitesi, hematolojik malignitelerde kullanılabilen önemli bir belirleyicidir. Akut myeloid lösemi (AML) olgularının 1/3'ünde lösemik kök hücre popülasyonunun CD34(+)ALDHbrCD38(-) olduğu saptanmıştır (16). Başka bir çalışmada ise, ALDH pozitifliğinin kötü sitogenetik ile beraberlik gösterdiği dolayısıyla da kötü sağkalımla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. (17,18). Mantle cell lenfoma hastalarında, %0.4-8 oranında oldukça klonojenik, ilaç dirençli bir ALDHbr popülasyonun olduğu saptanmıştır (19). Hodgkin lenfoma hastalarında da, %0.2-0.3 oranlarında saptanan oldukça küçük CD27(+)ALDHbr hücre grubunun klasik Hodgkin ve Reed Sternberg hücrelerine dönüşebildiği rapor edilmiştir(20).

2.2.4. ALDHbr Hücrelerin Nonhematopoietik Roller:

Kordon kanı ve çevresel kandaki ALDHbr hücrelerin %10-15'inin, kemik iliğindeki ALDHbr hücrelerin ise %50'sinin CD34(-)CD133(-) hücreler olduğu bilinmektedir. Bu hücrelerin in vitro ve invivo çalışmalarda, hematopoietik aktivitesinin olmadığı gösterilmiştir. ALDHbr hücrelerin mezankimal multipotent progenitör hücreler ve endotelyal progenitörler arasında da oldukça fazla olması bu hücrelerin nonhematopoietik aktivitelerinin olduğunu göstergesidir. Bu durum, doku tamirinde bu hücrelerin nasıl bir rolü olabileceği sorusunu akla getirmiştir (21,22). İskemik myokard dokusu ile yapılan fare çalışmalarında, ALDHbr hücrelerin infüzyonu ile infarkt gelişmiş myokard dokusundaki kan damarlarında artış saptandığı ancak kardiyak fonksiyonda düzelme olmadığı görülmüştür. Farelerde iskemik ekstremitte üzerine yapılan bir çalışma sonucunda ise, ALDHbr hücrelerin anjiojenik hücre kompartmanları içerdiği gösterilmiştir (23).

2.2.5. ALDH Ölçümü

ALDH aktivitesi, enzim kinetikleri kullanılarak, hücre lizatlarında NAD⁺ substratının NADH ye redüksiyonu ve bunun 37°C, 340 nm dalga boyunda ölçümü yoluyla hesaplanabilir.(24)

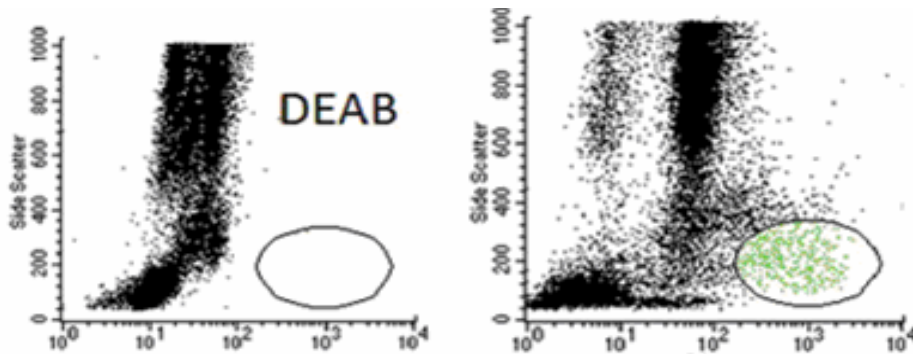
ALDH ölçümü için diğer kullanılabilecek method ise immunblotting yöntemidir. Bu yöntem ile aktivite değil protein düzeyleri ölçülür ve bu yöntemin birkaç dezavantajı vardır. Bunlardan birincisi immunblotting yöntemi ile sadece endojen ALDH enzimi ölçülebildiği için enzimin hücrelerden salınması yani hücre lizisi gereklidir. Ancak ALDH enzimini canlı hücrelerde çalışmak tercih edilmektedir. Yöntemin bir diğer dezavantajı ise, değişik ALDH izoformlarına karşı antikorların aminoasit sekans benzerliklerine göre çarpaz reaksiyon vermesidir. Kaldı ki, ALDH enzimi reaktif sistein bölgeleri içerdiği için stabil değildir ve bu da immunblotting yöntemini daha da güçleştirmektedir.

ALDH aktivitesinin ölçümü için günümüzde altın standart yöntem Beksaç ve arkadaşlarının da belirttiği gibi akım sitometri ve ALDH1 için flörosan substrat kullanımınıdır (24). Bundan yaklaşık 15 yıl önce ilk olarak Jones ve ark, canlı hücrelerde intraselüler ALDH aktivitesinin ölçülebildiğini göstermişlerdir. Dansyl aminoasetaldehit (DAAA) denilen bir flörosan aldehit kullanılarak canlı insan hematopoietik kök hücreleri ve lösemi kök hücrelerinin izole edilip zenginleştirilebildiğini saptamışlardır. Hidrofobik DAAA hücre membranından serbestçe geçmekte ve ALDH1 içeren hücreler DAAA'yı dansyl glisine okside etmektedir. Dansyglisin fizyolojik pH'da negatif şarj olmakta ve hücreden dışarı çıkamamakta böylece hücreler flörosan özellik kazanmaktadırlar (25) Negatif kontrol olarak ise hücreler bir aldehit inhibitörü olan 4-dietilaminobenzaldehit (DEAB) ile inkübe edilir. Ancak, bu yöntemin de bazı problemleri olduğu görülmüştür; DAAA flörosan UV ışınları tarafından emilir ki bu izole edilen hücreler için mutajenik olabilir. Aynı zamanda DAAA emisyon spektrumu diğer flurokromlarla benzerlik göstermektedir. Jones'dan dört yıl sonra Storms ve arkadaşları, hematopoietik hücreleri gösterebilmek için başka bir flörosan substrat olan BODIPY

aminoasetilaldehit (BAAA) kullanmışlardır (26). Bu yöntemde DAAA yerine kullanılan BODIPY® - aminoasetilaldehit (BAAA) ALDH1 sayesinde BAA^- 'e dönüşür. BAA^- ALDH aktivitesi yüksek olan hücre gruplarında birikir ve yüksek oranda flörosan oluşur (ALDHbr) (Şekil 3). Akım sitometrik inceleme sırasında bu flörosan aktiviteden yararlanır. Bu yöntem kullanılan kitin adı ile 'ALDEFLUOR' olarak tanımlanmaktadır.

İn vivo olarak ALDH aktivitesinin değerlendirilebilmesi amacı ile ALDH-1 N formilmethyl-5 iodopiridin-3-karboksamid (FMIC) ve 4-dietilamino-3 iodobenzaldehit (DEIBA) I123 ve I124 ile işaretlenmiştir. Sırasıyla SPECT (single positron emission tomography) ve PET (pozitron emission tomography) kullanılan çalışmalar yapılmıştır. Ancak, radyoaktif aldehitin dönüştüğü asitin hücre içinde yeterince kalamaması nedeni ile çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır (27).

ALDEFLUOR yöntemi ile sadece retinoik asitler üzerinden kök hücre fonksiyonlarında ve doku tamirinde kullanılan ALDH enzimleri mi yoksa tüm ALDH enzimleri mi değerlendirilmektedir sorusu akla gelmiştir. ALDH1A1, normal dokularda retinoik asit oksidasyon rolü olan tek ALDH enzimidir. Ancak, fare kemik iliği çalışmalarında ALDH1A1'in aktivite delesyonunun ALDEFLUOR oksidasyonunu azaltmadığı gösterilmiştir. Bu da diğer ALDH izoenzimlerinin de ALDEFLUOR oksidasyonunda rol aldığını göstergesidir (1). ALDH izoenzimlerinin fazla sayıda olması ve retinoid regülasyonunun karmaşıklığı, hücrelerdeki retinoid bağımlı aktivitelerin tam olarak anlaşılmasına neden olmaktadır.



YEŞİL FLÖROSAN(ALDH AKTİVİTESİ)

Şekil 3 .ALDEFLUOR çalışma mekanizması

2.3. Hematopoietik Kök Hücre Nakli

Kök hücre nakli, birçok malign ve non malign hematolojik hastalığın tedavisinde kullanılabilinen bir tedavi seçeneğidir. Otolog kök hücre nakli, lenfoma ve myeloma gibi hematolojik malignensilerde yüksek doz kemo/radyoterapinin arkasından gelişen aplazik dönemi kısaltmak amacıyla yapılmaktadır. Allojeneik kök hücre naklinde ise kemo/radyoterapinin ardından HLA uyumlu sağlıklı vericiden alınan kök hücreler immunsupresif tedavi altında hastaya infüze edilir. Daha hızlı engrafman sağlanabilmesi nedeni ile kök hücre kaynağı olarak çevresel kan tercih edilmektedir. Granulosit koloni stimule edici faktör (GCSF) ve/veya kemoterapinin ardından çevresel kana çıkan kök hücrelerin identifiye edilebilmesi için günümüzde kullanılan yöntem akım sitometri yöntemi ile CD34 sayımıdır. Ardından aferez yöntemi ile toplanan üründeki CD34(+) hücre miktarının, periferik kök hücre nakli sonrası engrafman süresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (28,29,30). Ancak bunu desteklemeyen çalışmaların olması diğer kök hücre belirleyicilerinin de engrafman üzerine etkilerinin araştırılmasına neden olmuştur (14). ALDH hematopoietik progenitör hücrelerde bulunurken olgun hücrelerde bulunmamaktadır. Dolayısıyla, daha genç bir hücre grubunu gösteren ve fonksiyonel bir belirleyici olan ALDH ekspresyonu otolog kök hücre nakli alanında araştırılmaya başlanmıştır.

3-HASTALAR VE YÖNTEM:

3.1. Hastalar:

Bu çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında Hodgkin Dışı lenfoma, primer amiloid, multipl myeloma, Hodgkin lenfoma tanılarıyla izlenen otolog hematopoietik kök hücre nakli (OKHN) olacak 19 hasta ile allojeneik hematopoietik kök hücre nakli (AKHN) yapılacak olan 6 hastanın sağlıklı vericisi alındı. Hastaların ortanca yaşı 44, Kadın/Erkek oranı 11/8 idi. Sağlıklı vericilerin ortanca yaşı 39, Kadın /Erkek oranı ise 1/5 idi. Hasta özellikleri Tablo1 de özetlenmiştir. Hastalardan biri mobilizasyondan 1 ay sonra hastalığına ikincil ölmüştür. Bir hastada ise takipte kök hücre naklinden vazgeçilmiştir.

Hastalardan kök hücre mobilizasyonu sağlanabilmesi için yalnız GCSF veya kemoterapiye ek olarak GCSF tedavisi verilmiştir. Sağlıklı vericilerde ise GCSF ile mobilizasyon yapılmıştır. Hastaların çevresel kan CD34 sayımı >10 /mikrolitre olduğunda, aferez seansına başlanmıştır. Hastalardan 16 tanesi 2 aferez seansına alınırken, geri kalanlardan bir seansta hücre toplanmıştır. Sadece GCSF alan otolog nakil hastalarında tedavi sonrası 4-5.günde, kemoterapi ve GCSF birlikte alan hastalarda tedavi sonrası ortanca 10 (7-15). günde, sağlıklı vericilerde ise GCSF sonrası 5.günde kök hücre toplama işlemine başlanmıştır. Çalışmaya alınan hastalardan kök hücre toplama işlemi yapıldığı gün çevresel kanda aynı zamanda ALDH, CD90, CD38 ifadeleri değerlendirilmiştir. Ardından hastalardan toplanan aferez ürününden CD34, ALDH aktivitesi, CD90, CD38 değerlendirmeleri tekrar edilmiştir. Toplanan kök hücreler %10 DMSO ile kryopreserve edilerek nitrogen tanklarında otolog kök hücre transplantasyonuna kadar saklanmıştır. Otolog periferik kök hücre naklinin yapılacağı gün çözünen aferez ürününde, viyabilite değerlendirmek amacıyla tekrar CD34 sayımı ve ALDH aktivitesi yapılması planlanmıştır Ancak nakil ünitemiz ve laboratuvarımız arasındaki uzaklıktan kaynaklanan teknik problemler nedeniyle, ALDEFLUOR ile

boyanmanın iyi gerçekleşmediği görüldü. Bu nedenle, çözünme sonrası yapılan CD34 ve ALDH sonuçları değerlendirilmeye alınmadı.

Nakil sonrası nötrofil engrafmanı; nötrofil sayısının $> 0.5 \times 10^9/l$ olması, trombosit engrafmanı ise trombositlerin transfüzyon almadan $> 20 \times 10^9/l$ olması olarak tanımlandı. Nakil sonrası nötrofil ve trombosit engrafman günleri ile verilen CD34(+) ALDHbr, CD90(+), CD38(-) hücreler arasındaki ilişki irdelendi.

Allojeneik kök hücre nakli yapılacak olan hastaların sağlıklı vericilerinde ise mobilizasyon günü çevresel kandan ve ardından da toplanan kök hücre ürününden CD34 sayımı ve ALDH aktivitesi değerlendirildi. Yine verilen ALDHbr hücre miktarı ile engrafman ilişkisi değerlendirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Aferez Toplama İşlemi:

Aferez toplama işlemi, otomatik akım kan hücre ayırıştırıcılarıyla yapıldı (Fresenius AS204 ve Fresenius Comtec). 18G antekubital ven kateteri ya da santral venöz kateter damar yolu olarak kullanıldı; 400-450 ml aferez ürünü 10800 ml kan işlenmesi sonrası elde edildi. C4Y setleri periferik kök hücre toplama işlemi için kullanıldı. Toplama hızı, 50-60 ml kan/dk ve süre 216-252 dk idi. ACD-A antikoagulan olarak kullanıldı. Toplama işlemi 1 veya 2 ardışık günde gerçekleştirildi. Amaç, minimum $2 \times 10^6/kg$ CD34(+) hücre elde etmektir. DMSO-plazma-RPMI-1640 solüsyonu aferez ürünlerine konuldu ve sıvı nitrojende $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ krioprezerve edildi. Reinfüzyon öncesi kök hücre ürünleri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ su banyosunda hasta başında eritildi ve hızlıca hastaya infüze edildi.

	YAŞ	CİNSİYET	TANI	MOB REJİM	NAKİL	HAZIRLIK REJİM
1	52	K	MM	GCSF	OTO	MEL200
2	37	K	MM	CYBORDGCSF	OTO	MEL200
3	41	K	HL	GCSF	OTO	BEAM
4	44	K	MM	GCSF	OTO	MEL200
5	55	E	MM	GCSF	OTO	MEL200
6	45	K	MM	GCSF	OTO	MEL200
7	42	E	HL	CYGCSF	OTO	BEAM
8	40	E	AMİLOID	CYGCSF	OTO	MEL 100
9	52	E	HDL	HYPERCVADGCSF		
10	60	K	MM	GCSF	OTO	MEL200
11	51	K	HDL	CYGCSF		
12	57	E	MM	GCSF	OTO	MEL200
13	17	K	HL	GCSF	OTO	BEAM
14	28	K	HL	GCSF	OTO	BEAM
15	61	E	MM	GCSF	OTO	MEL200
16	57	E	MM	GCSF	OTO	MEL200
17	35	K	HDL	GSCF	OTO	BEAM
18	60	E	HDL	DHAP GCSF	OTO	BEAM
19	26	K	HDL	DHAP GCSF	OTO	BEAM
20	17	E	AML	GCSF	ALLO	BUCY
21	44	E	AA	GCSF	ALLO	CYATG
22	36	K	ALL	GCSF	ALLO	CYTBI
23	18	E	ALL	GCSF	ALLO	CYTBIATG
24	26	E	HL	GCSF	ALLO	FLUMEL
25	42	K	AML	GCSF	ALLO	BUCY

Tablo1.Hasta özellikleri

K:Kadın, E:Erkek, MM:Multipl myelom, HL:Hodgkin Lenfoma, HDL:Hodgkin dışı Lenfoma AML:Akut myeloblastik lösemi, ALL:Akut lenfoblastik lösemi, AA:Aplastik anemi, HL:Hodgkin Lenfoma, GCSF:Granulosit koloni stimule edici faktör, OTO:Otolog kök hücre nakli, ALLO: Allojeneik kök hücre nakli,DHAP:Dekzametason,sisplatin,sitarabin,CYBORD:Siklofosfamid,bortezomib,dekzametazon, HYPERCVAD:Siklofosfamid,adriamisin,vinkristin,dekzametazon,BEAM:BCNU,Etoposid,Sitarabin,Melf elan, Mel:Melfelan, BUCY:Busulfan, siklofosfamid, CYTBI:Siklofosfamid,Total beden Işnlaması. CYATG:Siklofosfamid,Antitimosit globulin,Flu Mel:Fludarabin,Melfelan.

3.2.2. CD34(+) Hücre Sayımı

Çalışma için öncelikle lökosit sayısının saptanması gerekiyordu. Lökosit sayısı 40000/ml olacak şekilde hücre sayısı ayarlandı. Hazır olan tru count tüplere önce 20 mikrolitre CD45/CD34 antikoru, ardından da 20 mikrolitre 7AAD eklendi. Örnekten 100 mikrolitre alınarak vortekslenip hücreler 15 dakika enkübe edildi. Lysing solüsyonu 1 hacim amonyum klorid + 9 hacim distile su olacak şekilde hazırlandı. Enkübyasyon sonucunda hasta başına 2 ml lysing solüsyonu eklendi ve vortekslendi. On dakika daha enkübe edildikten sonra akım sitometri cihazında okuma yapıldı.

3.2.3. ALDHbr Hücre Sayımı

25 mikrolitre dimetilsulfoksit kuru ALDEFLUOR vialine eklendi ve 1 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi. Yirmibeş mikrolitre 2NHcl de eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Üzerine 360 mikrolitre 'ALDEFLUOR assay buffer' eklenerek karıştırıldı. Örnekteki hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde ayarlandı. Ancak RBC/WBC oranı >2 ise amonyum klorid ile eritrositlerin uzaklaştırılması sağlandı. Örneklere amonyum klorid eklendikten sonra 10-15 dakika beklenip, 250 g de santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra 2 ml hücre yıkama solüsyonu ile hücreler yıkanarak 1 kez daha santrifüj edildi. Yıkama işlemi 1 kez daha tekrarlandıktan sonra süpernatant tekrar döküldü ve hücreler 1500 mikrolitre assay buffer ile resüspand edildi. Buradan 500 mikrolitre hücre sayımına götürüldü.

Birinci tüp test, diğeri kontrol olacak şekilde iki tüp alındı. Kontrol tüpüne 5 mikrolitre DEAB solüsyonu eklendi. -20° C den aktif ALDEFLUOR reaktifi çıkartılıp, içinde örnek olan test tüpüne 5 mikrolitre reaktif eklendi. Karıştırılıp bu karışımdan hızlıca 500 mikrolitre alınıp içinde DEAB olan kontrol tüpüne aktarıldı. İki tüp de sıkıca kapatılıp vortekslenildi ve 37° C su banyosuna konuldu. Otuz dakika enkübe edildi. Enkübyasyon sonunda tekrar tüm tüpler 250 g'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, kontrol tüplerine 500 mikrolitre assay buffer konuldu. Test tüplerine ise, 100 mikrolitre 'assay buffer' eklendi. Daha sonra tüplere 34(PE)/90(PERCP)/38(APC) antikoları

eklenip karıştırıldı. Artı 4 °C' de 15 dakika enkübasyon sonrası, test tüplerine 1.5 ml hücre yıkama solüsyonu eklenip yıkandı. Ardından 500 mikrolitre daha assay buffer eklendi. ALDEFLUOR okuma programında 1×10^5 hücre saydırılacak şekilde akım sitometri cihazında sayım yapıldı.

3.2.4. İstatistik

Verilerin dağılımı, nonparametrik testlerden Kogmorov Smilnov ile yapıldı. Buna göre değerlerin ortanca veya ortalamaları verildi. CD34, ALDH, CD90, CD38 ekspresyonları ve engrafman arasındaki korelasyon analizleri Pearson methodu ile yapıldı. Student T test CD90 ve CD38 içeriğinin ALDHbr ve CD34 grupları içerisinde değerlendirmesinde kullanıldı. Mann Whitney U testi ise, otolog nakil hastaları ve allojeneik nakil hastalarının sağlıklı vericileri arasındaki karşılaştırmaların yapılmasında kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak tanımlandı.

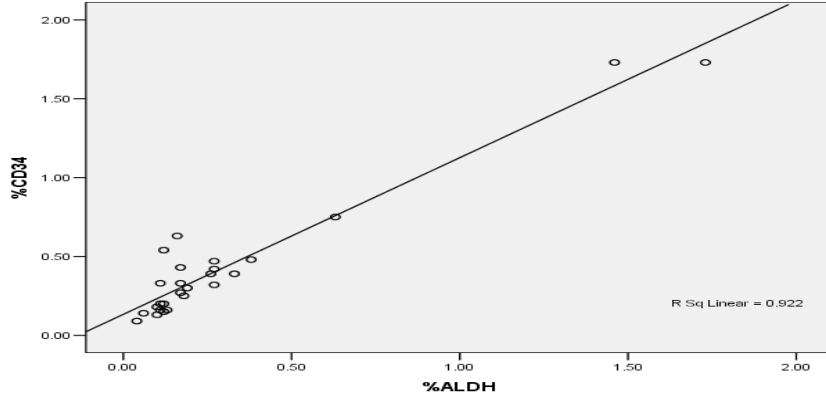
4-BULGULAR

Çalışmaya alınan otolog ve allojeneik kök hücre nakli hastaları, ayrı ayrı değerlendirildi. Otolog kök hücre nakli yapılması planlanan 19 hastanın çevresel kan ve aferez ürünleri değerlendirildi. Ancak, engrafman değerlendirilmesi 3 hastaya nakil yapılmadığı için 16 hasta üzerinden yapıldı. Allojeneik nakil yapılacak 6 hastanın sağlıklı vericisinin çevresel kan ve aferez ürünleri ayrıca değerlendirildi.

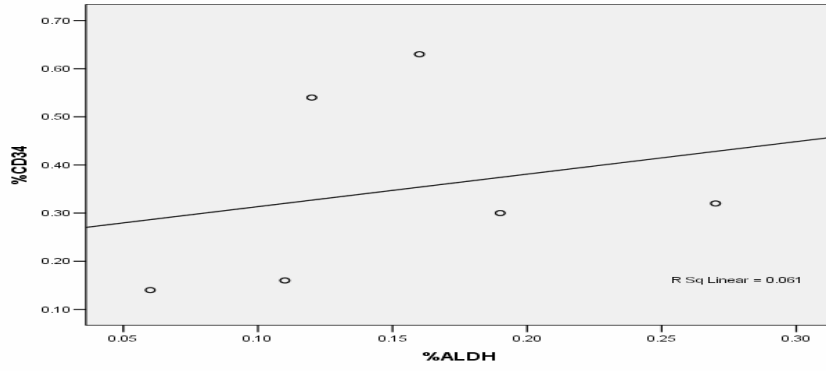
Otolog kök hücre nakli yapılan hastaların çevresel kan örneklerinin değerlendirmesinde CD45 zayıf ifade eden mononükleer hücrelerin ortalama % 0.33 (0.03-1.7)'ünün CD34(+) hücrelerden, % 0.17 (0,04-1.7)'sinin ise CD34(+)ALDHbr hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. ALDHbr hücrelerin %90'ının CD34(+) olduğu saptandı. Mikrolitredeki ortalama CD34(+) hücre sayısı 60 (18-464) ve ALDHbr hücre sayısı ise 42 (13-464) olarak bulundu. Çevresel kanda bulunan CD34(+) ve ALDHbr hücrelerin birbirleriyle korele olduğu görüldü ($r=0.989$, $p<0.001$) (grafik 1).

Allojeneik nakil hastalarının sağlıklı vericilerinden alınan çevresel kan değerlendirmesinde ise, CD45 zayıf ifade eden mononükleer hücrelerin ortalama %0.31(0.14-0.63)'inin CD34(+) hücrelerden, %0.13(0.06-0.27)'ünün ise CD34(+)ALDHbr hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Mikrolitredeki ortalama CD34(+) hücre sayısı 121 (40-176) ve ALDHbr hücre sayısı ise 51 (9-121) olarak bulundu. İlginç olarak, sağlıklı vericilerin çevresel kanında bulunan CD34(+) ve ALDHbr hücrelerin birbirleriyle korele olmadığı saptandı.(grafik 1).

Otolog nakil hastaları ile sağlıklı vericilerinin çevresel kan örneklerinin birbirleriyle karşılaştırılmasında, ne CD34, ne de ALDH ifade yüzdeleri açısından fark saptanmadı (sırasıyla, $p=0.977$, $p=0.216$).



A



B

Grafik 1. Çevresel kanda CD34(+) ve ALDHbr hücre yüzdelерinin korelasyonu

A. Otolog nakil hastaları B Sağlıklı vericiler

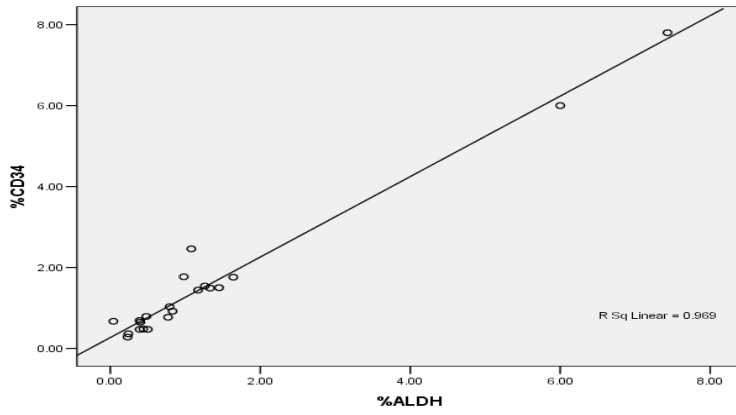
Mobilize edilen çevresel kandan toplanan otolog aferez ürünlerinin değerlendirmesinde ise, CD45 zayıf ifade eden mononükleer hücrelerin ortalanca %0.92(0.28-7)'sinin CD34(+) olduğu ve %0.78(0.04-7)'inin ise CD34(+)ALDHbr hücrelerden oluştuğu görüldü. ALDHbr hücrelerin %86'sının CD34(+) olduğu saptandı. Üründe hastanın kilosu başına düşen ortalama CD34(+) ve CD34(+)ALDHbr hücre sayısı hesaplandığında sırasıyla $9,1 \pm 6.2 \times 10^6/\text{kg}$, $7,2 \pm 6,2 \times 10^6/\text{kg}$ olarak bulundu. Otolog ürünlerdeki CD34(+) hücrelerle ALDHbr hücrelerin yüzdelерinin birbiriyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korele olduğu görüldü ($r=0.985$, $p<0.001$) (grafik 2).

Allojeneik hastaların sağlıklı vericilerinin aferez ürünlerindeki değerlendirmede CD45 zayıf ifade eden mononükleer hücrelerin ortalanca % 0.72(0.39-0.98)'sinin CD34 pozitif hücrelerden, %0.49(0.28-0.72)'unun ise ALDHbr hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Üründe hesaplanan hastanın kilosu başına düşen ortalama CD34(+) ve

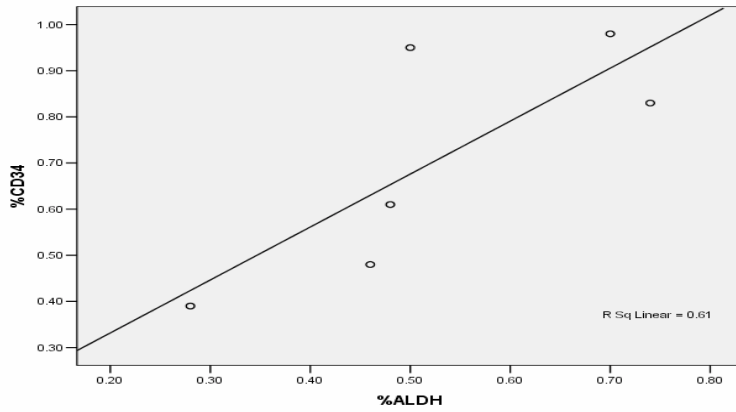
CD34(+)ALDHbr hücre sayısı sırasıyla $8,1 \pm 2,8 \times 10^6/\text{kg}$, $6,2 \pm 2,7 \times 10^6/\text{kg}$ olarak bulundu. Yine, sağlıklı vericilerin ürünlerindeki CD34 ve ALDHbr ifade yüzdelerinin de birbirleriyle korele olduğu gözlemlendi. ($r=0.829$, $p<0.01$) (grafik2).

Otolog nakil hastaları ile sağlıklı vericilerinin aferez ürünlerinin birbirleriyle karşılaştırılmasında, ne CD34 ne de ALDH ifade yüzdeleri açısından fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.315$, $p=0.330$).

Çevresel kan ve üründeki CD34(+) ve ALDHbr hücrelerin birbirleriyle korele olduğu izlendi ($r=0.651$, $p<0.001$, $r=0.710$, $p<0.001$).



A



B

Grafik2. Üründeki CD34(+) ve ALDHbr hücre yüzdelerinin korelasyonu
A. Otolog nakil hastaları B Sağlıklı vericiler

Otolog nakil hastaları ve sağlıklı vericilerdeki, CD34(+)ALDH(-) ve CD34(+)ALDHbr hücre gruplarında CD90(+), CD38(-) alt gruplarının yüzdeleri Tablo2’de özetlenmiştir. ALDHbr hücre grubunun içinde, CD90(+) ve CD38(-) hücrelerin daha düşük olduğu gözlemlendi.

	CD34(+) ALDH(-)CD90(+)	CD34(+)ALDHbr CD90(+)	<i>p</i>	CD34(+) ALDH(-)CD38(-)	CD34(+)ALDHbr CD38(-)	
ÇK						
Oto	%75	%21	0,178	%51	%3,3	<0,05
Allo	%70	%20	0,522	%32	%1,8	<0,045
ÜRÜN						
Oto	%80	%16	<0,05	%44	%2	<0,05
Allo	%75	%21	0,06	%21	%21	0,980

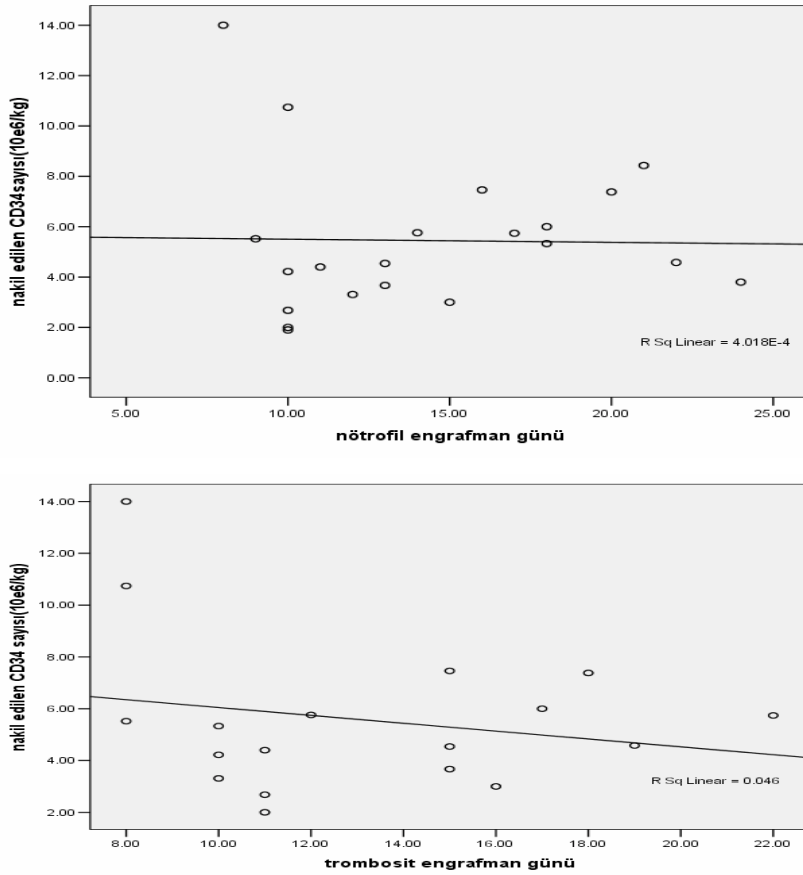
Tablo2. Çevresel kan ve üründeki CD90(+) ve CD38(-) hücrelerin yüzdeleri. ÇK: Çevresel Kan

Nakil sırasında, otolog nakil hastalarına ortalama $5.4 \pm 3.1 \times 10^6/\text{kg}$, allojeneik nakil hastalarına ise ortalama $6.2 \pm 1.4 \times 10^6/\text{kg}$ CD34(+) hücre verilmiştir. İnfüze edilen ortalama CD34(+)ALDHbr hücre sayısı otolog nakil hastaları için $3.5 \pm 3.2 \times 10^6/\text{kg}$, allojeneik nakil hastaları için ise $4.4 \pm 1.9 \times 10^6/\text{kg}$ ’dır. Otolog kök hücre nakli hastaları için, nötrofil engrafman günü ortanca 11 (8-24) iken, trombosit engrafman günü ortanca 11 (8-16)’dir. Allojeneik nakil hastaları için ortanca nötrofil engrafman günü 19 (17-22), ortanca trombosit engrafman günü ise 18 (17-22)dir. Takip sırasında tüm hastalarda nötrofil engrafmanı olmuştur. Trombosit engrafmanı, otolog nakil olan hastalardan sadece birinde elde edilememiştir. Allojeneik nakil grubundaki hastalardan birinde, erken dönemde ölüm nedeni ile, trombosit engrafmanı görülemediği. Nötrofil engrafmanı iki haftadan daha uzun sürede gerçekleşen, üç otolog nakil hastası geriye dönülerek incelendiğinde, iki hastaya tüm hastaların ortanca değerinin altında, CD34(+) ve CD34(+)ALDHbr hücre infüze edildiği görülmüştür.

Tüm nakillerin incelenmesinde, verilen üründeki CD34(+), CD34(+)ALDHbr hücre sayısı ile, nötrofil ve trombosit engrafmanı arasında bir korelasyon saptanamadı

(grafik 3,4). Otolog ve allojeneik nakil hastaları için yapılan ayrı ayrı değerlendirmelerde, engrafman ile infüze edilen hücre miktarı arasında bir ilişki ortaya konulamadı. Nakil sonrası nötrofil sayısının $1.0 \times 10^9/l$ üzerine çıktığı gün gözetilerek korelasyon istatistikleri tekrar edildiğinde, aynı şekilde infüze edilen CD34(+), CD34(+)/ALDHbr hücre sayısı ile, engrafman arasında bir ilişki gösterilemedi. Otolog nakil hastaları nötrofil engrafman günü ortanca değerinin altında ve üstünde kalanlar olarak gruplandı. Her iki grup arasında, ne infüze edilen CD34(+) hücre sayısı, ne de ALDHbr hücre sayıları açısından fark saptanmadı (sırasıyla $p = 0.820$, $p = 0.982$).

İki hasta grubunda da, üründeki ne CD34(+)/ALDHbrCD90(+), ne de CD34(+)/ALDHbrCD38(-) hücre yüzdesi ile nötrofil ve trombosit engrafman süreleri arasında ilişki saptanamadı.



Grafik3. Nakil edilen CD34(+) hücre sayısı ile nötrofil, trombosit engrafmanı arası ilişki

5-TARTIŞMA

Başarılı kök hücre nakli, kemik iliği mikroçevresine infüze edilen kök hücrelerin engrafmanına bağlıdır. Teorik olarak, tek bir hematopoietik kök hücre, myeloablatif antikanser tedavisi ve nakil sonrası hematopoietik sistemin gelişimi için yeterli görünse de; klinik ve deneysel gözlemler bunun doğru olmadığını, engrafman için çok sayıda kök hücrenin infüzyonunun gerektiğini göstermiştir.

CD34(+) hematopoietik kök hücreler, morfolojik ve immunolojik olarak heterojendirler. Fonksiyonel olarak bu hücrelerin, erken ve geç progenitörlerden köken alan klonal agregatlar oluşturduğu, in vitro deneylerle gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda ise, supraletal radyoterapi almış vakalarda myelolenfomatopoietik sistemin gelişiminden sorumlu bulunmuştur. CD34'ün birçok seriye ait nonspesifik belirleyicilerle birlikte ifade edildiği bilinmektedir. Bu hücreler, CD34(+), Thy-1(+), CD38(-), CD45RA(-), Rh -123dull, Hoechst 33342dull, Lin negatif olarak tanımlanmıştır. CD34(+) hücreler normal kemik iliği hücrelerinin %0.5-2 sini, çevresel kan hücrelerinin %0.01-0.1 ini oluşturur (31). Granülosit koloni stimule edici faktör ile mobilizasyon sonrası ise total lökosit sayısının %20-30 kadarını oluşturabilir. Bizim çalışmamızda, otolog nakil yapılan hastalar, kemoterapi ile veya kemoterapi olmaksızın GCSF desteği alarak mobilize edilmiştir. Allojeneik nakil yapılan hastaların sağlıklı vericilerine de GCSF verildikten sonra kök hücre mobilizasyonu yapılmıştır. CD34 ifadesi gösteren hücreler, çevresel kan aferez ürünlerinde yapılan değerlendirmede CD45 zayıf ifade eden mononükleer hücrelerin otolog nakil hastalarında %0.92'sini ve sağlıklı vericilerde ise %0.72'sini oluşturmaktaydı.

ALDH aktivitesi, hematopoietik sistem içinde kök / progenitör hücre gruplarının saptanabilmesi için önemli bir belirleyicidir. İnsan kemik iliği ve çevresel kanı ile yapılan çalışmalarda, diğer belirleyicilere ek olarak yüksek ALDH aktivitesinin klonajenik indifferansiye multipotent kök /progenitör hücrelerin saptanmasında yararlı olduğu gösterilmiştir. Toplanan aferez ürünlerinin hücre yüzeyinde ifade edilen CD34,

CD38, CD90 gibi belirleyicilere ek olarak, hücrelerin viyabilitesi konusunda önemli bir belirleyici olan ALDH ifadesinin değerlendirilmesi, çalışmamızın öncelikli amacıydı.

ALDHbr hücreler, mobilizasyon sonrası çevresel kana çıkabilmekte ve mobilizasyon için önemli bir prediktör olabilmektedir. Fallon ve arkadaşları, otolog kök hücre nakli amacıyla toplanmış olan aferez ürünlerinde ALDHbr hücrelerin bulunduğunu göstermişlerdir (13). Biz de bu çalışmamızda, mobilizasyon yapılmış olan hastaların ve sağlıklı vericilerin hem çevresel kan, hem de aferez ürünlerinde, ALDHbr hücrelerin bulunduğunu gördük. Fallon ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, aferez ürününde değerlendirilen tüm hücrelerin %3-5'inin ALDHbr olduğunu saptamışlardı (13). Biz çalışmamızda, CD45 zayıf ifade eden mononükleer hücrelerin otolog grupta %0.78'inin, allojeneik grupta ise %0.49'unun ALDHbr olduğunu gördük. Storms ve arkadaşlarının kordon kanında yaptıkları çalışmada ise, ALDHbr hücrelerin kordon kanında bulunan hücrelerin %0.96'sını oluşturduğu ve lin(-)ALDHbrCD34(+) hücrelerin ise %0.48 oranında olduğunu göstermişlerdi (4). Kordon kanı ile yapılan başka bir çalışmada ise, tüm hücrelerin %1'inin ALDHbr hücrelerden oluştuğu, lin(+) hücrelerin ayrıştırılması sonrasında bu oranın %16'ya çıktığı gözlenmiştir (12) Biz de çalışmamızda, otolog kök hücre nakli öncesi mobilizasyon yapılan hastaların çevresel kan ve toplanan aferez ürünlerindeki ALDHbr hücrelerin fenotipik olarak hematopoietik kök hücre veya progenitör hücreler olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla, ALDHbr olan hücrelerin aynı zamanda CD34 ifade etme oranı otolog nakil grubunda çevresel kan ve aferez ürününde sırasıyla %90 ve %86 idi. Fallon ve arkadaşları, mobilize insan çevresel kanında yaptıkları çalışmada, ALDHbr hücrelerin %73'ünde CD34 ifadesi olduğunu göstermişlerdir (13). Christ ve ark, kordon kanındaki ALDHbr hücrelerin %80'inin CD34(+) ve üçte birinin ise CD34(+)CD38(-) olduğunu rapor etmişlerdir (31). Bizim çalışmamızda ise bundan farklı olarak aferez ürünüdeki CD38(-) hücrelerin oranı CD34(+)ALDHbr hücrelerin %2 sini oluşturmaktaydı.

Çalışmamızda otolog nakil yapılan hastalarda, çevresel kanda ve aferez ürünlerinde CD34(+) hücreler ile ALDHbr hücrelerin korele olduğu gösterdik. Ayrıca, çevresel kandaki ALDHbr hücre popülasyonu ile aferez ürünüdeki ALDHbr hücrelerin de birbirleriyle korele olduğunu gördük. Gündüz ve arkadaşları da, kendi çalışmalarında bu

korelasyonu desteklemişlerdi (14). Seksensekiz hastadan elde edilen 108 periferik aferez ürününün değerlendirilmesi ile yapılan bir çalışmada, ürünün dondurulmasından önceki total CD34(+) hücre sayısı, canlı CD34(+) hücre sayısı ve çözünme sonrası canlı hücre sayısı ile, ALDHbr hücre sayısının birbiriyle korele olduğu gözlemlendi. Bu noktadan yola çıkarak yazarlar, aferez ürünlerinde total ve canlı CD34 sayısının kullanılması yerine, ALDHbr hücre sayısının kullanmanın doğru olacağını öne sürmektedirler.(32)

Alıcının kilosu başına düşen CD34(+) hücre miktarı, periferik kök hücre ürününün yeterliliğini gösteren en önemli parametredir. Önerilen optimal CD34(+) hücre miktarı 2-5x10⁶/kg olarak bildirilmiştir. Çok sayıda değişik hücre dozları ile yapılan çalışmalarda, hücre miktarı arttıkça trombosit engraftının hızlandığı, nötrofil engraftında ise hafif de olsa bir hızlanma elde edildiği gösterilmiştir (29,30). Biz bu çalışmamızda, üründeki CD34(+) ve ALDHbr hücre sayılarıyla, engraftın arasında bir ilişki saptayamadık.

Fallon ve arkadaşları, otolog kök hücre nakli yapılan hastalara infüze edilen ALDHbr hücre dozu ile nötrofil ve trombosit engraftını arasında ilişki olduğunu savunurken, Gündüz ve arkadaşları ise, bu ilişkiyi ortaya koyamadıklarını bildirmişlerdir (13,14). Veeraputhiran ve arkadaşlarının çalışması da benzer şekilde sonuçlanmıştır(32).

CD34(+)CD90(+) hücrelerin CD34(+) hücrelerin ¼'ünü oluşturduğu bilinmektedir ve bu hücreler CD34(+)CD38(-) hücrelere göre daha fazla bulunmaktadır (24). Bizim çalışmamızda ise, CD34(+)CD90(+) hücre popülasyonu, CD34(+) hücrelerin çok daha yüksek bir oranını oluşturmaktaydı. Bunlar, beklendiği şekilde CD34(+)CD38(-) hücrelerden daha fazlaydı. Hodgkin dışı lenfoma hastaları ve sağlıklı vericilerin lökoferez ürünlerinin içeriğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, CD34(+)CD90(+) hücrelerin lenfoma hastalarında vericilere göre daha fazla oranda olduğu görüldü. Her ne kadar CD34(+) hücreler kemoterapi etkisiyle azalsa da, CD34(+)CD90(+) hücreler gibi en immatür alt grupların artabildiği gösterilmiştir (5). CD34(+)90(+) hücrelerin mobilizasyonu total CD34(+) hücrelerin mobilizasyon pikinden 1-2 gün önce başlar. CD34(+) hücrelerin artmaya başlamasıyla, CD90 ifadesi de bulduran CD34(+) hücrelerin yüzdesi düşer. Ancak mutlak sayı, lökosit sayısının artması nedeniyle artmaya devam eder. Çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak

ALDHbr kök hücre populasyonunun içinde CD90 ifadesinin oldukça düşük olduğu gözlemlendi (33). Sumikuma ve arkadaşları, infüze edilen CD34(+)CD90(+) hücreler ile otolog periferik kök hücre nakli sonrası trombosit engrafmanı arası ilişkiyi ortaya koymuşlardır (34). Ancak biz çalışmamızda, bu ilişkinin olmadığını gördük. Bununla birlikte hasta sayımızın az olması, bu durumun nedeni olabilir.

Ayrıca, CD34(+)CD38(-) olan hücre grubunun ayrıştırılmasının insan hematopoietik kök hücre ve progenitör hücre karakterizasyonu için yararlı olduğu gösterilmiştir (35). Yapılan çalışmalarda, en yüksek ALDH ifadesi gösteren hücrelerin aynı zamanda CD34(+)CD38(-) hücreler olduğu görülmüştür. Henon ve arkadaşları ise, $5 \times 10^6/\text{kg}$ üzeri CD34(+)CD38(-) hücre infüze edilmesiyle, her üç serinin engrafmanının korele olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla bu hastalarda otolog nakil sonrası GCSF kullanılmasının gerekli olmayabileceğini savunmaktadırlar (35). Biz çalışmamızda, CD34(+)CD38(-) hücrelerle engrafman arası ilişki ortaya koyamadık.

6-SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmamız, otolog nakil hastalarına ek olarak sağlıklı vericilerin de değerlendirmeye alındığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda, CD34(+) ve ALDHbr hücre sayıları ile engrafman arasında bir ilişki olmadığını gördük. Bundan başka, sağlıklı vericilerle, nakil hastalarının çevresel kan ve aferez ürünlerinin değerlendirmelerinde, CD34(+) ve ALDHbr hücre içeriği açısından fark saptamadık. ALDHbr hücrelerle nakil sonrası engrafman ilişkisi açısından az sayıda çalışma bulunmaktadır. ALDHbr hücre sayısı ile engrafman ilişkisinin net olarak ortaya konulamaması nedeni ile rutin deneyimde kullanımı, yeni çalışmalar yapılncaya kadar gereksiz görünmektedir.

ÖZET

Kök hücre nakli, birçok malign ve non malign hematolojik hastalığın tedavisinde kür sağlayabilen tek tedavi seçeneğidir. Kök hücre kaynağı olarak çoğunlukla granülosit koloni stimule edici faktör (GCSF) ve/veya kemoterapinin ardından çevresel kana çıkan hücreler kullanılmaktadır. Bu hücrelerin belirlenebilmesi için günümüzde akım sitometri yöntemi ile CD34 sayımı kullanılmaktadır. Erken hematopoietik öncüllerin arasında çokça bulunan ve fonksiyonel bir belirleyici olan aldehit dehidrogenaz (ALDH) ekspresyonu da hematopoietik kök hücrelerin saptanmasında kullanılabilir. Biz de bu çalışmada, mobilize edilmiş çevresel kanda ve toplanan aferez ürünlerinde CD34'e ek olarak ALDH, CD90, CD38 gibi kök hücre belirleyicilerinin ifadelerini değerlendirmeyi amaçladık. Ayrıca, hastaya nakledilen CD34(+)ALDHbr hücre sayısı ile engrafman arasındaki ilişkiyi göstermeyi hedefledik. Çalışmaya değişik tanılar ile otolog kök hücre nakli yapılan 19 hasta ve allojeneik kök hücre nakli yapılan 6 hastanın sağlıklı vericileri alındı. Otolog nakil hastalarının aferez ürünlerinin % 0.78'inin, allojeneik nakil hastalarının sağlıklı vericilerinden alınan aferez ürünlerinin ise %0.49'unun CD34(+)ALDHbr hücrelerden oluştuğu saptandı. Çevresel kan ve ürünlerdeki CD34(+) ve ALDHbr hücrelerin birbirleriyle korele olduğu izlendi ($r=0.651$, $p<0.001$, $r=0.710$, $p<0.001$). Otolog nakil hastalarının ve sağlıklı vericilerin çevresel kan ve aferez ürünlerindeki ALDH, CD34 ifadesi benzerdi. Her iki hasta grubunda da nötrofil, trombosit engrafmanı ile CD34(+)ALDHbr hücre popülasyonu arasında korelasyon gösterilemedi. Sonuç olarak, ALDHbr hücre sayısı ile engrafman ilişkisinin net olarak ortaya konulamaması nedeni ile rutin deneyimde kullanımı, yeni çalışmalar yapılınca kadar gereksiz gözükmemektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Hematopoietik kök hücre nakli, Aldehit Dehidrojenaz, Engrafman

SUMMARY

Stem cell transplantation, is the only curative treatment option for the malign and benign hematological diseases. Mobilized peripheral blood after granulocyte colony stimulating factor, is the mostly preferred stem cell source. Determination and collection of CD34(+) hematopoietic stem cells(HSC) by flow cytometry is the routine method used in transplantation units. Aldehyde dehydrogenase, a functional marker, which is widely expressed in the early hematopoietic progenitors can also be used for identification of HSC. We aimed to assess the expression of ALDH, CD90 and CD38 markers in addition to CD34 in the mobilized peripheral blood samples and apheresis products to identify HSC. We also planned to determine the correlation between neutrophil, platelet engraftment and CD34(+)ALDHbr cell numbers infused. We included 19 autologous stem cell transplantation patients with different diagnosis and 6 healthy donors for allogeneic stem cell transplantation. CD34ALDHbr cell percentage in the apheresis products of autologous and allogeneic transplantation patients were 0.78% and 0.49% respectively. CD34(+) and ALDHbr cell numbers were correlated in the peripheral blood and apheresis products ($r=0.651$, $p<0.001$, $r=0.710$, $p<0.001$). There was no difference in the peripheral blood and apheresis products, between the autologous transplantation group and healthy donors, according to ALDH, CD34 expression. Neutrophil and platelet engraftment was not correlated with CD34(+)ALDHbr cell numbers. In conclusion, as we could not show a relationship between ALDHbr cell number and engraftment, it seems useless to determine ALDHbr cells in apheresis products.

KEY WORDS: Hematopoietic stem cell transplantation, Aldehyde dehydrogenase, engraftment.

KAYNAKLAR

1-Ma Irene, Allan A. The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* 2011 ; 7: 292–306.

2-Klonisch SH, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Osthoff KS, Mackiewicz A, Los M. Potential perspectives and therapeutic applications of stem cell. *J Mol Med* 2008 ; 86 : 1301–1314.

3-Murray L, Chen B, Galy A, Chen S, Tushinski R, Uchida N, Negrin R, Tricot G, Jagannath S, Vesole D.. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+ Thy-1+Lin⁻ subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 1995; 85 : 368–378.

4- Storms RW, Green PD, Safford 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(1) : 95-102.

5- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 2006 ; 169 : 338–346.

6-Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* 2011; May : 283-303.

7- Balber A. Concise Review: Aldehyde Dehydrogenase Bright Stem and Progenitor Cell Populations from Normal Tissues: Characteristics, Activities, and Emerging Uses in Regenerative Medicine. *Stem cells* 2011; 29(4): 570-5.

- 8- Marchitti S. A., Brocker C., Stagos D, Vasiliou, V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 ; (6): 697–720.
9. Black, W. J., Stagos, D., Marchitti, S. A. Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics* 2009 ; 19: 893–902.
- 10-Moreb JS, Gabr A, Vartikor Gr, Gowda S, Zucali JR, Mohuczy D. Retinoic acid down regulates ALDH and increase cytotoxicity of 4 hydroxycyclophosphamide and acethaldhyde. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(1) : 339-45.
- 11-Vasillou V, Papa A, Esten T. Role of human aldehyde dehydrogenase in endobiotic and xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 2004 ; 30(2) : 279-99.
- 12 Liu C, Chen BJ, Deoliveira D. Progenitor cell dose determines the pace and completeness of engraftment in a xenograft model for cord blood transplantation. *Blood* 2010; 116 : 5518–5527.
- 13-Fallon P, Gentry T, BalberA, Boulware D, Janssen W, Smilee R, Storms R, Smith C. Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *British Journal of Haematology* 2003 ; 122: 99–108.
- 14 Gündüz E, DemirelG, Bal C, Gulbas Z. Evaluation of mobilized peripheral stem cells according to CD34 and aldehyde dehydrogenase expression and effect of SSC lo ALDH bri cells on hematopoietic recovery. *Cytotherapy* 2010 ; 12 : 1006–1012.

15 Kurtzberg J, Mendizabal A, Reese M et al. Augmentation of standard umbilical cord blood transplantation with ALDH⁺ cells: Results of a phase I study in pediatric patients. *Biol Bone Marrow Transplant* 2008; 4:105.

16-Pearce DJ, Taussig D, Simpson C.. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells* 2005 ; 23: 752–760.

17-.Ran D, Schubert M, Pietsch L, Taubert I, Wuchter P, Eckstein, Bruckner T, Zoelher P Ho A. Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem cell features and correlates with adverse clinical outcomes. *Exp Hematol* 2009 ; 37: 1423–1434.

18- Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong KY, Liang R, Leung AH. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* 2007 ; 21 : 1423–1430.

19- Brennan SK, Meade B, Wang Q, Merchant AA, Kowalski J, Matsui W. Mantle cell lymphoma activation enhances bortezomib sensitivity. *Blood* 2010; 116(20) : 4185-91.

20 Jones RJ, Gocke CD, Kasamon YL, Miller CB, Perkins B, Barber JP, Vala MS, Gerber JM, Gellert LL, Siedner M, Lemas MV, Brennan S, Ambinder RF, Matsui W. Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009; 113 : 5920–5926.

21-Alison MR, Guppy NJ, Lim S, Nicholson L. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol* 2010; 222: 335–344.

22- Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 17–25.

23 Perin E, Silva G, Gahremanpour A, Canales J, Zheng Y, Cabrera Hansen M, Mendelshon F, Chronos N, Haley R, Willerson J, Annex B. A Randomized, Controlled Study of Autologous Therapy With Bone Marrow–Derived Aldehyde Dehydrogenase Bright Cells in Patients With Critical Limb Ischemia. *Catheter Cardiovasc Interv* 2011 ;May 18.

24-Beksac M, Preffer F. Is it time to revisit our current hematopoietic progenitor cell quantification methods in the Clinic? *BMT (Basım aşamasında)*

25. Jones, R. J., Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, Hilton J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 95 ;85 (10) : 2742-6.

26. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999 ; 96 : 9118–9123.

27-Vaidyanathan G., Song H, Affleck D. Targeting aldehyde dehydrogenase: a potential approach for cell labeling. *Nuclear Medicine and Biology* 2009 ; 36 : 919–929.

28-Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, Sutherland DR, Chin-Yee IH. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *BMT* 2002 ; 29 (12): 967-79.

- 29-. 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 - 77.
- 30- Sezer O, Possinger K, Metzner B, Illiger H J, Wattag M, Heit W, Fuss H, Schultze W. Optimal CD34+ cell dose in autologous peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2000 ; 18(18) : 3319-20.
- 31.Christ O, Lucke K, Imren S, Leung K, Hamilton M, Eaves A, Smith C, Eaves C. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica.* 2007 Sep; 92(9) : 1165-72.
- 32-Verputhiran M,Katragadda G,Balamurugan A,Fox P.Aldehyde dehydrogenase as an alternative to enumeration of total and viable CD34(+) in autologous hematopoietic progenitor cell transplantation. *Cytotherapy* 2011;13: 1256-58.
- 33-Sharma S, Shariatmadar S, Krishan A. Electronic Volume, Aldehyde Dehydrogenase,and Stem Cell Marker Expression in Cells from Human Peripheral Blood Apheresis Samples. *Cytometry* 2010 ; 78 : 123-28.
- 34–Sumikuma T, Shimazaki C, Ochiai N, Okano A,Hatsuse M, Ashiara E, Nakagawa M CD34+/CD90+ cells infused best predict late haematopoietic reconstitution following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *British J Hematol* 2002 :117; 238-244.
- 35-Hénon PH, Sovalat H, Bourderont D Importance of CD34+ cell subsets in autologous PBSC transplantation: the mulhouse experience using CD34+CD38- cells as predictive tool for hematopoietic engraftment. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2001; 15(1) : 62-7.