

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJE KESİN RAPORU

EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC
RESEARCH PROJECT REPORT

PROJE NO: 06-TIP-002

**FARKLI MOBİLİZASYON REJİMLERİ İLE ELDE
EDİLEN PERİFERİK KÖK HÜCRELERİN
YÜZEY İMMUN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ**

PROJE YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Murat TOMBULOĞLU

ARAŞTIRMACILAR

Doç. Dr. Ayhan DÖNMEZ

Prof. Dr. Hakan AYDIN

Doç. Dr. Okan GÜLBAHAR

Doç. Dr. Nihal GÖKMEN

Prof. Dr. Seçkin ÇAGIRGAN

Doç. Dr. Filiz VURAL

Prof. Dr. Erhan GÖKMEN

Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü

Faculty of Medicine

Department of Hematology

Bornova-İZMİR

2010

ÖNSÖZ

Başta Tıp Fakültesi olmak üzere tüm üniversitemizde hiçbir kısıtlama getirmeden hemen her türlü araştırmanın yapılmasını sağlamak amacıyla kurulan araştırma ve eğitim laboratuvarı (AREL) alt yapısına destek olmak amacı ile bu proje hazırlanmıştır. Ancak alışılmış bir altyapı projesinden farklı olarak özgün bir konu seçilmiş ve ülkemizde ilk kez uygulanan bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hücre ayırıştırma yapabilen akım sitometri cihazının AREL yönetim kurulunun özverili araştırmaları sonunda tahmin edilenden çok daha uygun bir fiyata mal edilmesi sonucu elde kalan kaynak ile de projeye ekleme yapılarak başta microarray sistemi olmak üzere AREL' in pek çok donanımsal eksiği tamamlanmıştır. Proje aynı zamanda ülkemizde bu konuda belki de en deneyimli kullanıcıların geliştirilmesini sağlamıştır.

Cihaz alım prosedüründe sürenin çok uzun olması, kullanıcı eğitimlerinin uzun sürmesi, beklenmeyen arızalar, kök hücre nakil ünitesindeki tadilat çalışmaları nedeniyle hastalardan ürün teminindeki gecikmeler projenin öngörülenden daha uzun sürede tamamlanmasına neden olmuştur.

Proje sonunda hematopoetik kök hücre ürünlerinde CD34 pozitif hücre sayısı yanında kök hücreleri immunfenotipik özelliklerinin de nötrofil ve trombosit yamanma sürelerinde etkili olabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca literatürde ilk kez olarak kök hücre ürünlerinde tüm genom profili bakılmış ve gen ekspresyon düzeyleri ile “graft versus host” hastalığı ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna, AREL yönetim kuruluna, her türlü özveriyi gösteren ve katkıda bulunan AREL teknik elemanlarına, Hematoloji Bilim Dalı Aferez ünitesi görevlilerine gönülden teşekkür ederim

Dr. Murat Tombuloğlu

Proje yürütücüsü.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. Şekil Dizini	2 – 3
2. Çizelge Dizini	4
3. Kısaltmalar	5
4. Öz (Abstract)	6 – 9
5. Metin	
5.1. Giriş	10 – 14
5.2. Literatür Özeti	15
5.3. Materyal ve Yöntem	
5.3.1. Hastalar	16 – 17
5.3.2. Örnekler	18
5.3.3. Akım sitometri ile örneklerin çalışılması	19 – 27
5.3.4. Microarray tüm genom ekspresyon analizi	28 – 38
5.3.5. İstatistik yöntem	39 – 40
5.4. Bulgular	41 – 67
5.5. Tartışma, Sonuç ve Öneriler	68 – 71
5.6. Teşekkür	72
5.7. Kaynaklar	73 - 74

1. ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1	12
Şekil 2	19
Şekil 3	20
Şekil 4	21
Şekil 5	22
Şekil 6	23
Şekil 7	24
Şekil 8	25
Şekil 9	26
Şekil 10	27
Şekil 11	38
Şekil 12	43
Şekil 13	43
Şekil 14	44
Şekil 15	45
Şekil 16	45
Şekil 17	46
Şekil 18	47

Şekil 19	47
Şekil 20	48
Şekil 21	49
Şekil 22	49
Şekil 23	50
Şekil 24	50
Şekil 25	53
Şekil 26	62
Şekil 27	64
Şekil 28	66

2. ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1	16
Çizelge 2	28
Çizelge 3	29
Çizelge 4	30
Çizelge 5	31
Çizelge 6	31
Çizelge 7	32
Çizelge 8	34
Çizelge 9	35
Çizelge 10	36
Çizelge 11	41 – 42
Çizelge 12	51 – 52
Çizelge 13	54 – 61
Çizelge 14	63
Çizelge 15	63
Çizelge 16	65
Çizelge 17	65
Çizelge 18	67
Çizelge 19	67

3. KISALTMALAR

AREL	Araştırma ve eğitim laboratuvarı
AGVHH	Akut graft versus host hastalığı
CD	Cluster of differentiation
CXCL12	CXC Ligand12 (önceki adıyla stromal cell derived factor [SDF-1])
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
GVHH	Graft versus host hastalığı
KGVHH	Kronik graft versus host hastalığı
KH	Kök hücre
HKHN	Hematopoetik kök hücre nakli
IVT	İn vitro transkripsiyon
SDF-1	Stromal cell derived factor 1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	Very late antigen 4

ÖZ

Farklı mobilizasyon rejimleri ile elde edilen periferik kök hücrelerin yüzey immun fenotipik özellikleri.

Hematopoetik kök hücre (HKH)'lerin kemik iliğindeki yuvalarından çevresel kana mobilize olmalarının mekanizmaları üzerinde ayrıntılı bilgiler yoktur.

Çalışmamızda, 50 hastadan değişik rejimler (grup I: tek başına büyüme faktörü, grup II: Endoksan + büyüme faktörü, grup III: ESHAP + büyüme faktörü) ile mobilize edilerek elde edilen kök hücre (KH) ürünlerinden akım sitometri cihazında ayrıştırma sonrası elde edilen HKH'lerde yüzey immun fenotipik özellikler araştırılmış ve elde edilen sonuçlar ile hastaların nötrofil ve trombosit yamanma süreleri arasında ilişki araştırılmıştır. Ayrıca tek başına büyüme faktörü ile mobilize edilmiş 9 vericiye ait kök hücre ürünleri gen sunumları araştırılarak alıcılardaki graft versus host hastalığı (GVHH) ile ilişkileri değerlendirilmiştir.

Başarılı şekilde mobilize olan 44 olgunun (ortanca yaş: 46, K/E: 18/28) sonuçları değerlendirmeye alındı. Nakil sonrası dönemde hastaların ortanca nötrofil yamanma süresi 12 (9 – 21) ve trombosit yamanma süresi 12 (7 – 100) gün olarak bulundu. Grup I, II ve III mobilize HKH'lerin immun fenotipik özellikleri farklı bulunmadı. CD34 pozitif kök hücrelerin en yüksek oranda CD31,CD44,CD90,CD117 ve CD135 antijenini sundukları görüldü. Tüm grupta; HKH'lerin CD31 sunum oranları ile hastaların nötrofil ($r = -0.32$, $p = 0.03$) ve trombosit ($r = -0.36$, $p = 0.02$) yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı. Grup I HKH' de, CD11a ($r = -0.47$, $p = 0.02$) ve CD31/CD11a ($r = -0.51$, $p = 0.01$) sunumları ile nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı. Grup II HKH' de; CD18 ($r = -0.80$, $p = 0.03$) ve CD18/CD31 ($r = -0.80$, $p = 0.03$) sunumları ile hastaların nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı. Trombosit yamanma süreleri ile CD117/CD44 sunumları arasında tersine ($r = 0.78$, $p = 0.04$) ilişki bulundu. Grup III HKH' de; birlikte CD184/CD38 sunumu ile hastaların nötrofil yamanma süreleri arasında ($r = 0.61$, $p = 0.02$) ilişki saptandı. Trombosit yamanma süreleri ile CD117 ($r = -0.57$, $p = 0.03$)

ve CD117/CD44 ($r = -0.56$, $p = 0.04$) sunumları arasında tersine ilişki bulundu. HKH' in CD184 sunum oranları ile yamanma süreleri arasında fark saptanmadı.

Kök hücre ürünlerindeki immün sistem, hücreler arası iletişim ve metabolik işlemler ile ilgili genlerin sunumlarındaki artışın akut GVHH (AGVHH), büyüme ve metabolik işlemler ile ilgili genlerin sunumlarındaki artışın' da kronik GVHH (KGVHH) ile ilişkili olabileceği gösterildi. HKH ürünlerindeki gen sunum değişikliklerinin GVHH üzerindeki etkileri nedeniyle bu alanda klinik çalışmaların planlanması uygun olacaktır

Gruplara göre mobilize HKH' in yüzey immün fenotipik özelliklerinde fark saptanmadı. HKH' in CD31 sunumu ile tüm grupta hem nötrofil hem de trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptanması literatürde ilk kez ortaya konmuştur. HKH' in CD184 sunumu ile yamanma süreleri arasında ilişki saptanmaması ve CD184 sunumu negatif olan hastalarda bile yamanma sürelerinin farklı olmaması, homing sürecinde CD184' e ek faktörlerinde (CD31 gibi) etkili olabileceğini düşündürmektedir..

Anahtar kelimeler: hematopoetik kök hücre, homing, tüm gen ekspresyonu, mobilizasyon, yüzey immünfenotip,

4. ABSTRACT

The immune phenotypic profile of peripheral blood stem cells in different mobilization regimens.

There is no detailed information about the mechanism of mobilization of hematopoietic stem cells (HSC) from the bone marrow into the peripheral blood.

In this study, surface immune phenotypic features of HSCs which had been mobilized with three different regimens (group I: growth factor alone, group II: Endoksan + growth factor, group III: ESHAP + growth factor) from a total of 50 patients have been investigated. CD34-positive cell sorting was done (has been carried out) by flow cytometry. The relationship between HSC immune phenotype and the duration of the neutrophil and platelet engraftment has also been studied. In 9 stem cell products which had been mobilized by using G-CSF alone, whole genom expression profiling was carried out. Moreover the effects of these gen profiles on graft versus host disease was evaluated.

Mobilization was successful in 44 patients (median age: 46, F / M: 18/28). The median duration of neutrophil engraftment after transplantation was 12 (9 - 21) days and platelet engraftment was 12 (7 - 100) days respectively. The immune phenotypic features of group I, II and III mobilized HSCs were not significantly different. The surface antigens most commonly expressed by CD34 positive stem cells were CD31, CD44, CD90, CD117 and CD135. In the whole group the CD 31 positivity ratio of the HSCs were inversely correlated with the duration of the neutrophil ($r = -0.32$, $p = 0.03$) and platelet ($r = -0.36$, $p = 0.02$) engraftment. In group I the expression of CD11a ($r = -0.47$, $p = 0.02$) and CD31/CD11a ($r = -0.51$, $p = 0.01$) were also inversely correlated with the duration of neutrophil engraftment. Neutrophil engraftment was also negatively affected by CD18

expression of HSCs in group II ($r = -0.80$, $p = 0.03$) and CD18/CD31 ($r = -0.80$, $p = 0.03$). It has been found out there is an inverse correlation between the duration of platelet engraftment and CD117/CD44 presentations ($r = 0.78$, $p = 0.04$). In group III there was a positive correlation between the co-expression of CD184/CD38 ($r = 0.61$, $p = 0.02$) of HSCs and the duration of neutrophil engraftment. In the same group platelet engraftment was negatively affected by the expression of CD117 ($r = -0.57$, $p = 0.03$) and co-expression of CD117/CD44 ($r = -0.56$, $p = 0.04$) of HSCs. No relationship was found between engraftment duration and the expression status of CD184.

There was a relationship between the acute graft versus host disease and the increased expression of genes that are associated with immunity, cell communication and metabolic processes. Another relationship was also found between the development of chronic graft versus host disease and the expression levels of genes which are related to growth and metabolic processes. More studies investigating the effects of stem cell whole genome expression on graft versus host disease are needed.

As a result we found that the surface immune phenotypic profiles of CD34-positive peripheral HSCs harvested by different mobilization regimens were not different. To our knowledge it has been demonstrated for the first time that CD31 expression of HSC could negatively affect both neutrophil and platelet engraftment. CD184 expression ratio and even CD184 negativity of HSCs have no effect on neutrophil or platelet engraftment. In the homing process additional surface antigens (such as CD31), along with CD184 positivity, might be more effective.

Keywords: Hematopoietic stem cells, homing, mobilization, surface immune phenotyping, gene expression profile

5. METİN

5.1. Giriş:

İnsanlarda ilk başarılı kemik iliği nakli 1959 yılında Thomas ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. Doku tipi antijenlerinin keşfi ve GVHH ile ilgili bilgilerin artışı ile hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) yaklaşık 40 yıldan beri başta hematolojik kanserler olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde standart bir klinik uygulama haline gelmiştir. Günümüzde allojeneik veya otolog kök hücreler transplant yanında regeneratif tıp uygulamalarında da giderek artan bir sıklıkta kullanılmaktadır (1).

İlk uygulamalarda hematopoetik kök hücre kaynağı olarak iliak kemiklerden genel anestezi altında çok sayıda aspirasyonla alınan kemik iliği ürünü kullanılmıştır. Normal şartlarda kemik iliği çekirdekli hücrelerinin % 0.01 kadarını multipotent kök hücreler oluşturmaktadır. Bu kök hücrelerin zaman zaman dolaşıma geçtikleri ve tekrar kemik iliğine döndükleri bilinmektedir. Hematopoetik kök hücrelerin temel özellikleri yaşam boyu kendini yineleyebilmeleri ve gerektiğinde kandaki olgun hücreleri oluşturan progenitör hücrelere farklılaşabilmeleridir.

Periferik kandan yeterli sayıda hematopoetik kök hücre elde edilmesine olanak sağlayan yöntemlerin gelişmesinden sonra kemik iliği kök hücre kaynağı olarak giderek daha az kullanılmaktadır. Bunun başlıca sebepleri periferik kandan kök hücre elde edilmesi için genel anestezi gerekmemesi, elde edilen kök hücre ürünü ile daha hızlı bir hematopoetik yeniden yapılanma sağlanmasıdır. Ancak periferik kandan elde edilen kök hücre ürünüde daha fazla lenfosit bulunmasının sonucu olarak bu hücrelerle yapılan allojeneik kök hücre nakli sonrasında kronik GVHH oranlarında artışlar olduğu ortaya çıkmıştır. Tümör kontaminasyon olasılığının daha düşük olması nedeniyle otolog kök nakillerinin hemen tamamında periferik kandan elde edilen kök hücreler tercih edilmektedir. Periferik kandan yaşam boyu hematopoetik yapılanmayı sürdürecektir sayıda kök hücre elde edilmesi ise bu hücrelerin kemik iliğinden periferik kana geçişini sağlayacak “mobilizasyon” rejimlerinin başarısına bağlıdır.

Hematopoetik kök hücre mobilizasyonu:

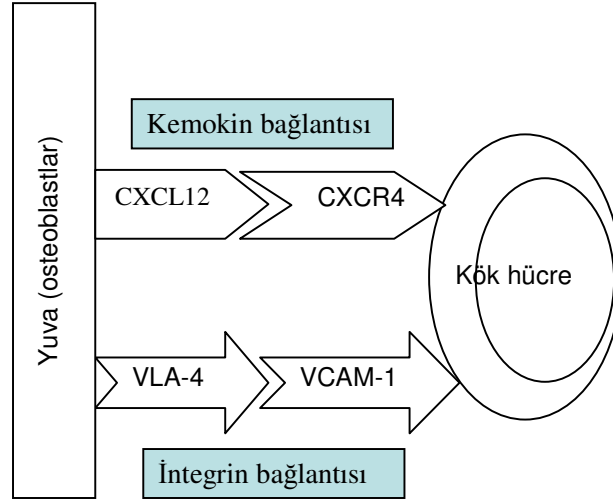
Bir ömür boyunca kendilerini sürekli yenileyebilen diğer taraftan da olgun hücrelerine farklılaşabilen hematopoetik kök hücreler, kemik iliğinde kendilerine özel yuvalarda (niş) bulunurlar. Non-vasküler olan bu komponent ile kemik iliği vasküler yapıları arasında ilişki sinüzoidler aracılığı ile sağlanmaktadır. Sinüzoid endoteli ise kan/kemik iliği bariyerini oluşturur. Bu nişlerde bulunan hematopoetik kök hücreler normal şartlarda belirgin bir proliferatif aktivite göstermezler ve sessiz durumda bulunurlar.

Kemik trabekülleri etrafında yer alan bu yuvalar esas olarak osteoblastlar ve diğer stromal hücrelerle (fibroblast, adipozit, makrofaj, endotel ve diğer) çevrilmiştir (2, 3). Hücreler yanında immunglobulin, integrin, selektin, proteoglikan gibi matriks yapıları da yuvayı destekler. Yuva, kök hücrelerin yerleşmesinde (homing) ve biyolojik aktivitelerinin kontrolünde önemli rol oynar (2 - 4).

Kök hücre ile mikroçevre arasındaki hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkileri adezyon molekülleri ile sürdürülmektedir. Kök hücrelerin yuvalara tutunmaları kemokinler (CXCL12 [önceki adıyla – stromal cell derived factor SDF-1] / CXC chemokine receptor 4 [CXCR4]) ve integrinler (very late antigen 4 [VLA-4] / vascular cell adhesion molecule 1 [VCAM-1]) aracılığı ile olmaktadır (Şekil 1).

Kök hücrelerin kemik iliğinde bulunduğu yuvalarından ayrılarak endoteli aşırp çevresel dolaşıma geçmesine mobilizasyon adı verilmektedir. Mobilizasyonun moleküler mekanizmasının son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır (4). Kök hücre yüzey antijen profili değişiklikleri, adezyon molekül ekspresyonunda değişimler, kök hücrenin sessiz durumdan proliferatif duruma geçmesi, büyüme faktörü ve kemokinlere yanıt durumunda değişiklikler mobilizasyon üzerine etkili olmaktadır.

Kemik iliği mikroçevresinde bu değişiklikleri yaparak HKH mobilizasyonunu sağlamak amacıyla günümüzde tek başına veya kemoterapi ile birlikte büyüme faktörleri (en sık G-CSF ve GM-CSF) kullanılmaktadır.



Şekil 1. Kök hücrelerin yuvalarına kemokinler ve integrinler aracılığı ile tutunması (3).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mobilizasyon rejimlerinin etki mekanizmaları da büyük oranda açıklığa kavuşturulmuştur. Günümüzde kullanılan yöntemlerin çoğu kök hücre – yuva bağlanmasındaki kemokin köprüsü üzerine etki göstermektedir. Bu bağlantı değişik şekillerde kırılabilir.

Kemokin bağlantısını etkileyen mekanizmalar ve kullanılan ilaçların etkileri:

1. Metalloproteinazların salınımı: Özellikle kemik iliğindeki miyelositer seri hücrelerinin artması sonucunda yapılarında bulunan metalloproteinazların mikroçevreye salınması ile ilişkilidir. Artan metalloproteinazlar (özellikle jelatinaz) kemokin bağlantısını yıkarak ve bazal membran bütünlüğünü bozarak kök hücrenin mobilizasyonuna neden olur (4). Bu mekanizma özellikle G-CSF uygulamalarında geçerlidir. Ayrıca yüksek doz siklofosfamid gibi değişik kemoterapi uygulamaları sonrası aplaziden çıkan kemik iliğinde bu mekanizmanın etkili olduğu gösterilmiştir (4, 5).

2. Osteoblastlardan CXCL12 sunumunun baskılanması: Yapılan çalışmalarda G-CSF uygulamalarının nişi oluşturan osteoblastlardan CXCL12 sunumunu baskılayarak mobilizasyona neden olduğu ortaya konmuştur (6).

3. Bağlantıyı doğrudan zayıflatan ajanlar: Plerixafor (eski adıyla AMD 3100) kemokin bağlantısını doğrudan etkileyerek zayıflatmakta ve daha kısa süre içinde mobilizasyona neden olmaktadır. Özellikle diğer yöntemler ile yeterli mobilizasyon sağlanamayan vakalar için klinik kullanıma girmiştir (4).

Yuvada integrin bağlantısı üzerinden etkisini gösteren ajanlar üzerinde ise çalışmalar daha yakın döneme aittir. Bu alanda gerek insan gerekse hayvan çalışmaları devam etmekte olup ilk sonuçlar etkin oldukları yönündedir (7).

Bu güncel bilgilerden mobilizasyonu etkileyen esas faktörlerin kök hücre – yuva bağlantılarında rol oynayan kemokinler ve adezyon molekülleri olduğu açıktır. Günümüzde kullanılan değişik mobilizasyon ajanları bu bağlantılar üzerinden etkilerini gösterse de mekanizmaları farklıdır. Farklı mobilizasyon rejimleri ile elde edilen çevresel HKH' lerin yüzey immun fenotiplerindeki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada (8); tek başına G-CSF ve kemoterapi sonrası G-CSF kullanımı sonrası elde edilen kök hücrelerin immun fenotipik özelliklerinin benzer olduğu buna karşın yüksek doz kemoterapi sonrası büyüme faktörü uygulaması ile elde edilen kök hücrelerin ise “homing” üzerinde negatif etki gösterecek fenotipik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

HKH naklinde engrafmanı etkileyen en önemli faktör kök hücre sayısıdır. Sayı yanında elde edilen kök hücrelerin yüzey immunfenotiplerinin engrafman ve hastalık relapsı (malign kök hücre kontaminasyon) üzerine etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. Allojeneik kök hücre naklinden sonra gelişen GVHH üzerine etkileri ise bilinmemektedir.

GVHH ile vericilerin gen sunumunu değerlendiren ve kısa süre önce yayınlanan (çalışmamız devam ederken) çok az sayıda çalışmada; KGVHH' da hücre siklus, hücre profilerasyonu ve immun ilişkili süreçlerin etkisi (8, 9) ile AGVHH' da gen sunum profili tanımlanmıştır (10). Bu çalışmaların hiçbirinde verilen kök hücre ürünü değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda üç farklı mobilizasyon rejimi ([a] tek başına büyüme faktörü, [b] ESHAP (etoposid 40 mg/m² 1 – 4 gün, metilprednizolon 500 mg/m² 1 – 4 gün, sisplatin 25 mg/m² 1

– 4 gün, Ara-C 2000 mg/m² 5. gün) ve benzeri kemoterapi protokolleri ile birlikte büyüme faktörü ve [c] Endoksan (2 – 4 gr/m²) ile birlikte büyüme faktörü) ile elde edilmiş çevresel kan ürününden akım sitometri cihazı ile CD34+ hematopoetik kök hücreler ayrıştırılmış (sorting) ve bu hücrelerin yöntem bölümünde belirtilen yüzey immunfenotipik özellikleri belirlenerek engrafman (yamanma – hematopoetik yeniden yapılanma) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca büyüme faktörü ile mobilize allojeneik kök hücre ürünlerinin gen profili ile GVHH arasında ilişki araştırılmıştır.

Ülkemizde akım sitometri ile kök hücre ayrıştırması yapılarak gerçekleştirilen ilk çalışma olması yanında ulaşabildiğimiz kadarıyla uluslar arası literatürde mobilizasyondaki önemi giderek artan CXCR4 reseptörü (CD184) bu yöntemle ilk kez çalışılmış olmaktadır. Bunun yanında bir ön çalışma olarak elde edilen allojeneik kök hücre ürünlerinden RNA ayırımı yapılarak gen ekspresyon profilinin yüzey immun fenotipik ve klinik özelliklerle ilişkisi değerlendirilmiştir.

5.2. Literatür özeti

Literatürde çalışmamıza benzer bir çalışma bulunmaktadır (8). Çalışmamızda farklı olarak akım sitometri ile ayırıştırma sonrası elde edilen kök hücreler kullanılmıştır. Ayrıca kemokin bağlantısında önemli bir role sahip olan ve gerek mobilizasyonda gerekse homing süreçlerinde de önemli bir yere sahip olan CXCR4 reseptörü (CD 184) çalışmamızda diğer önemli farklardan biridir.

(de Boer F, Dräger AM, Van Haperen MJ, van der Wall E, Kessler F, Huijgens PC, Pinedo HM, Schuurhuis GJ. The phenotypic profile of CD34-positive peripheral blood stem cells in different mobilization regimens. Br J Haematol. 2000;111:1138-44.)

5.3. Hastalar ve yöntem:

5.3.1. Hastalar:

Hematoloji Bilim Dalında KH mobilizasyonu uygulanan 50 olgu çalışmaya alındı. Başarılı mobilizasyon sağlanan 44 kişiden elde edilen ürünler (17 allojeneik donör, 13 Multipl Myelom ve 14 lenfoma [Hodgkin: 4, Non-Hodgkin: 10]) onay formları alındıktan sonra ileri dönük olarak çalışmaya alınmıştır. Olguların 26' sı erkek 18' i kadın olup ortalama yaşları 46 bulunmuştur (çizelge 2).

Çizelge 1. Çalışma grubunun özellikleri

Sayı	44
Yaş (ortalama, en alt - en üst) (yıl)	46 (22 – 67)
Kadın/Erkek	18/26
Lenfoma (Non-Hodgkin / Hodgkin)	14 (10 /4)
Multipl myelom	13
Donör	17

Mobilizasyon:

Kök hücre mobilizasyonu aşağıda tanımlanan gruplara göre farklı yöntemlerle yapılmıştır.

Grup I: Tek başına büyüme faktörü (Granulosit koloni stimüle faktör): Allojeneik nakilde sağlıklı vericilere (17 olgu) ve beş Multipl Miyelom hastasına bu protokol uygulanmıştır. 10 µg/kg/gün dozunda büyüme faktörüne başlandıktan sonra beşinci günde (hastalarda çevresel kan CD34+ hücre düzeyi 10/µl üzerine çıktığında) KH toplanmaya başlanmıştır.

Grup II: Endoksan ile büyüme faktörü; Multipl Myelom olgularında bir yıl öncesine kadar rutin uygulanan protokoldür. Günümüzde bu hastalarda tek başına büyüme faktörü kullanımı daha çok önerilmektedir. Endoksan ($2 - 4 \text{ gr/m}^2$) uygulamasını takiben lökosit değerleri düştüğünde (tahmini dip noktasında) büyüme faktörü (10 µg/kg/gün dozunda) eklenmiştir. Lökosit değerleri yükseldikten sonra çevresel kan CD34+ hücre düzeyi $10/\mu\text{l}$ üzerinde olan hastalarda kök hücre toplama işlemine başlanmıştır. 8 Multipl Miyelom hastasına bu protokol uygulanmıştır.

Grup III: ESHAP ve benzeri kemoterapi protokoller ile birlikte büyüme faktörü; Lenfoma (Hodgkin ve Non-Hodgkin) olgularında uygulanan protokoldür. ESHAP veya benzeri kemoterapi protokolü uygulamasını takiben lökosit değerleri düştüğünde (tahmini dip noktasında) büyüme faktörü (10 µg/kg/gün) eklenmiştir. Lökosit değerleri yükseldikten sonra çevresel kan CD34+ hücre düzeyi $10/\mu\text{l}$ üzerinde olan hastalarda kök hücre toplama işlemine başlanmıştır. Çalışmamızda bu grupta 14 hasta bulunmaktadır.

Lökaferez:

Kliniğimize yatışlarında yukarıda tanımlandığı şekilde mobilize edilen hasta veya vericilerden tam otomatik aferez cihazı ile (Fresenius Astec veya Comtec) çevresel kandan kök hücreleri toplanmıştır.

5.3.2. Örnekler

Hasta veya vericilerin lökaferez ile toplanan kök hücre ürünlerinden EDTA içeren üçer adet tüpe (vacuette, K₂EDTA) ikişer ml örnek alındı.

Alınan kök hücre örnekleri bekletilmeksizin ‘Araştırma ve Eğitim Laboratuvarına (AREL)’ gönderildi.

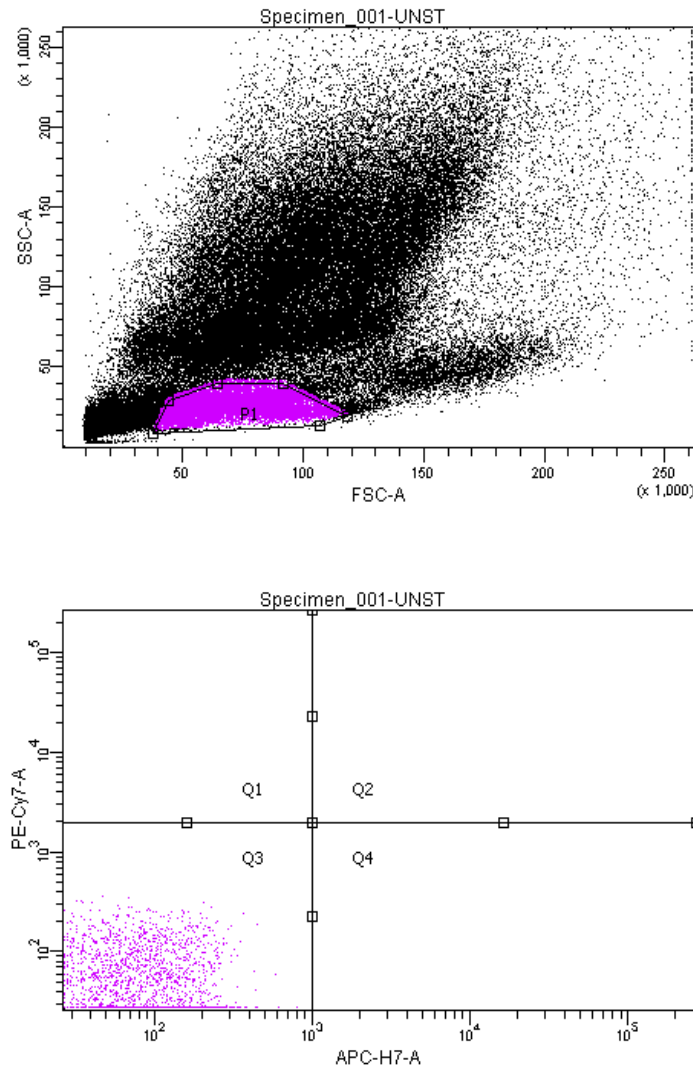
Akım sitometri cihazı ile (BD FACSAria cell sorter, BD Biosciences, 2007, USA) aşağıda tanımlandığı şekilde CD34+/CD45- hücreler ayrıştırılmış ve ayrıştırılan bu hücrelerin fenotipik (PE-CD11a, FITC-CD18, PE-CD31, APC-CD38, FITC-CD44, APC-CD62e, FITC-CD62L, FITC-CD90, PE-CD117, PE-CD135, PE-CD184) özellikleri belirlenmiştir.

Ayrıca Mikroarray gen analizi için Affymetrix U133. 2.0 Plus çipleri ve GeneChip 3 *in vitro transkripsiyon* (IVT) Express Kiti kullanılarak öncelikle üç otolog KHN uygulanan hastanın ürününden tüm genom gen ekspresyon analizi yöntemi test etmek için uygulandı. Yöntemin çalıştığı doğrulandıktan sonra 9 allojenik KHN uygulanan hasta bu amaçla çalışmaya alındı. Mikroarray sonuçlarının değerlendirilmesi ve verilerin analizi Partek Genomic Suite 6.5 (Partek Inc., MO, USA) ve Ingenuity Pathway Analysis 8.7 (Ingenuity Systems Inc. CA, USA) biyoinformatik yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi.

5.3.3. Akım sitometri ile örneklerin çalışılması:

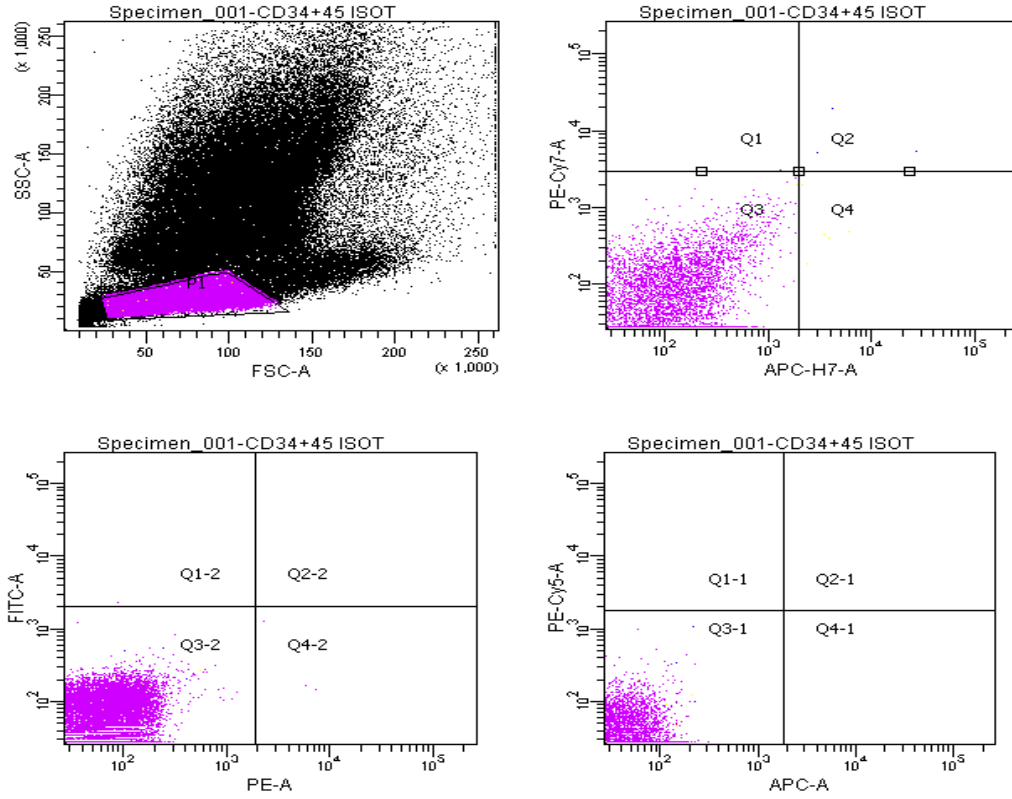
Çalışmanın akış şeması aşağıda sırasıyla özetlenmiştir.

A) Unstain Tüpü (antikorsuz): Yalnızca 100uL aferez örneği kullanılır (şekil 2).



Şekil 2: Tüp A, boyasız analiz

B) İzotipik Kontrol Tüpü: 1 tüp içine izotip kontrol antikorlarından (APC Mouse IgG1, FITC Mouse IgG1, PE Mouse IgG1, PE-Cy5 Mouse IgG1, APC-H7 Mouse IgG1 ve PECy7 Mouse IgG1) 5'er μ L ve aferez örneğinden 100 μ L ilave edilir (şekil 3).



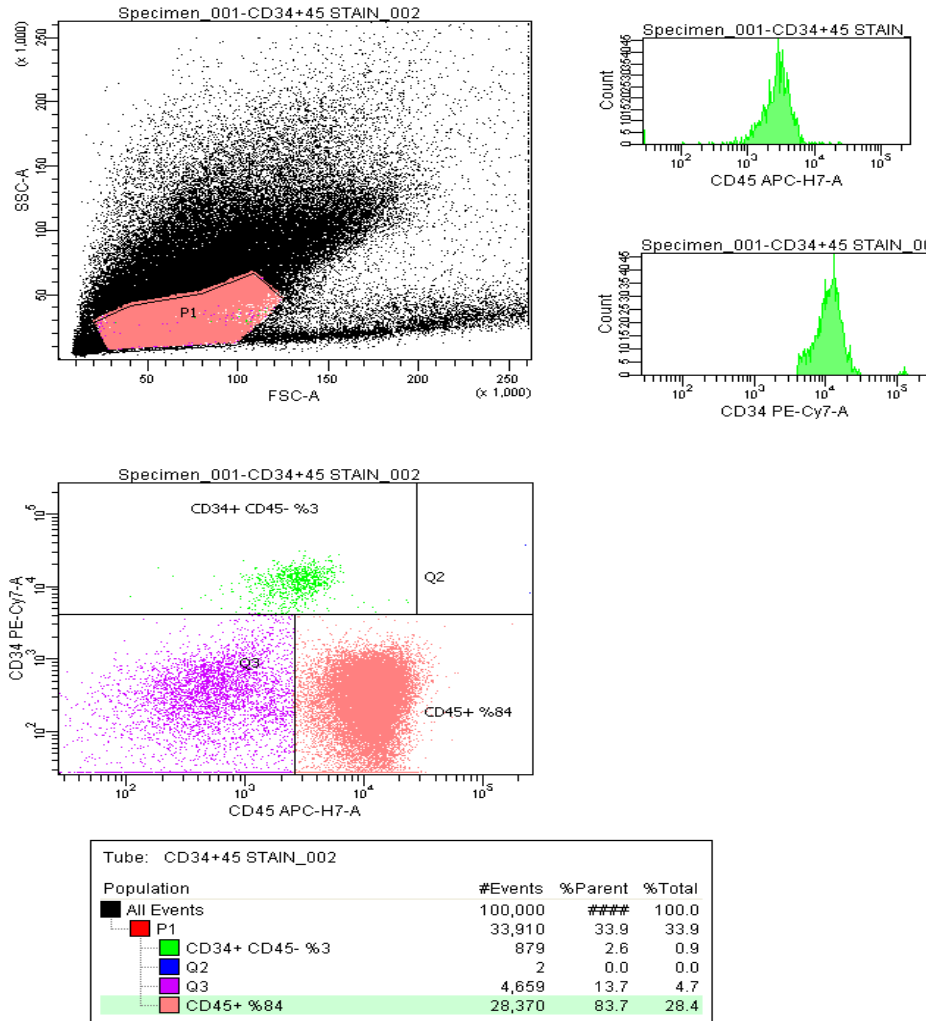
Şekil 3. Tüp B, izotipik kontrol analizi

C) CD34 PECy7 + CD45 APC-H7 Tüpü: Bir tüp içine antikorlardan (CD34 PECy7 ve CD45 APC-H7) 10' ar μ L ve aferez örneğinden 200 μ L ilave edilir. Ayırma aşamasındaki CD34+ hücre yoğunluğuna göre bu tüpten birden fazla hazırlanmıştır.

A, B ve C aşamaları tamamlandıktan sonra tüpler 'vortex' lenir (Heidolph Reax top vorteks). Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 – 30 dakika bekletildikten sonra A ve B tüplerine 2 mL, c tüpüne 4 mL 1 X 'BD FACS Lysing Solution' ilave edilir ve 'vortex' lenir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika bekletildikten sonra yıkama aşamasına geçilir.

Tüpler 300 g de 5 dakika santrifüj edilir (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırılır. Tüplerin içerisine 3–4 mL ‘BD CellWash’ ilave edilir. ‘Vortex’ lenir. 200g de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.

Hücre yoğunluğu dikkate alınarak 500 – 1000 µL ‘BD CellWash’ ilave edilir ve BD FACS Aria cihazında analiz aşamasına geçilir (şekil 4).



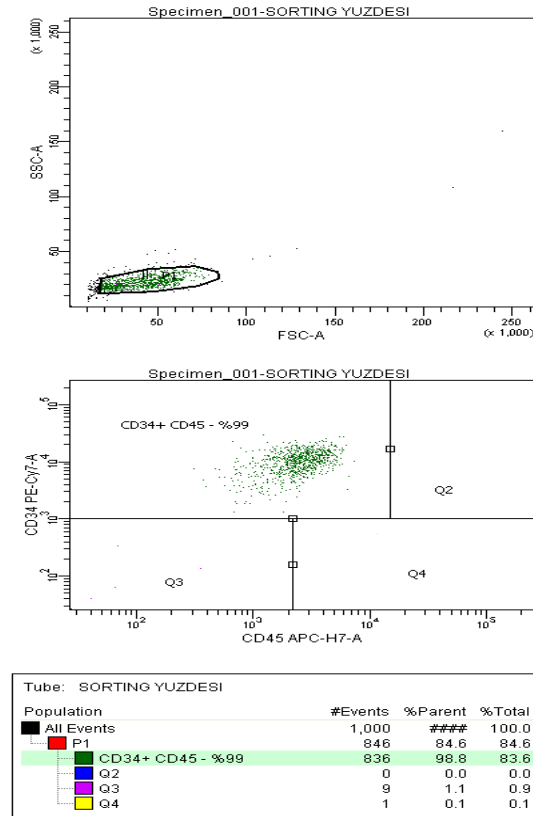
Şekil 4. Tüp C, CD34+/CD45- oranları

AYRIŞTIRMA AŞAMASI:

A, B ve C tüpleri sırasıyla analiz edilir. A ve B tüplerinden kontrol kapıları belirlenir. C tüpü ile CD34+ hücre yüzdesi belirlenir ve ayırma işlemine geçilir. CD34+/45- hücrelerin ayrılma işlemi sonrası toplanacağı tüpün içerisine hücreleri canlı tutabilmek için 500 µL 1X PBS ilave edilir.

AYRIŞTIRMA SONRASI:

En az 150000 CD34+ hücre ayrıştırıldıktan sonra, ayrıştırma yüzdesini belirlemek için ayrıştırma tüpü analiz edilir (şekil 5).



Şekil 5. Ayrıştırma sonrası CD34 oranı

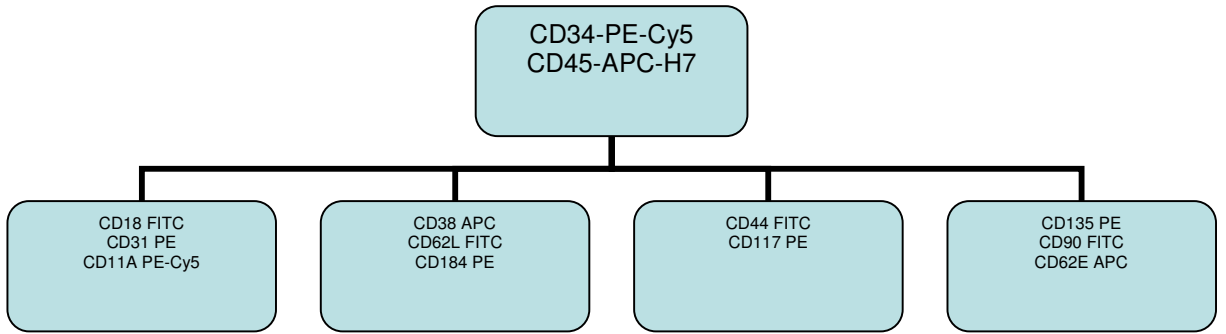
Diğer taraftan her biri içine aşağıda tanımlanan antikorların her birinden beşer µL eklenerek dört ayrı tüp örneği hazırlanır (şekil 6).

Birinci tüp: FITC Mouse AntiHuman CD18, PE Mouse AntiHuman CD31 ve PE-Cy5 Mouse AntiHuman CD11A (şekil 7).

İkinci tüp: APC Mouse AntiHuman CD38, FITC Mouse AntiHuman CD62L ve PE Mouse AntiHuman CD184 (şekil 8).

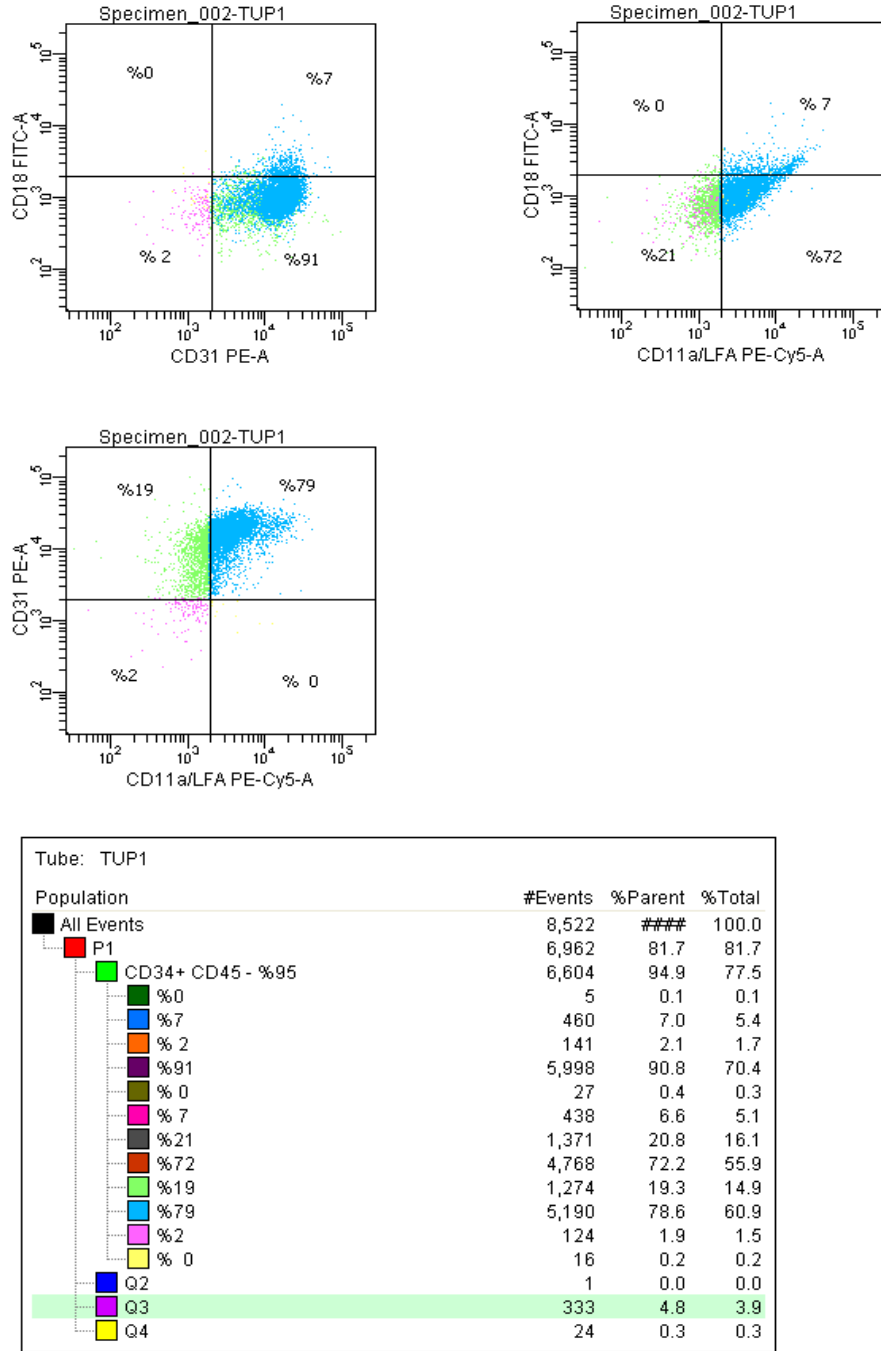
Üçüncü tüp: FITC Mouse AntiHuman CD44 ve PE Mouse AntiHuman CD117 (şekil 9).

Dördüncü Tüp: PE Mouse AntiHuman CD135, FITC Mouse AntiHuman CD90 ve APC Mouse AntiHuman CD62E (şekil 10).

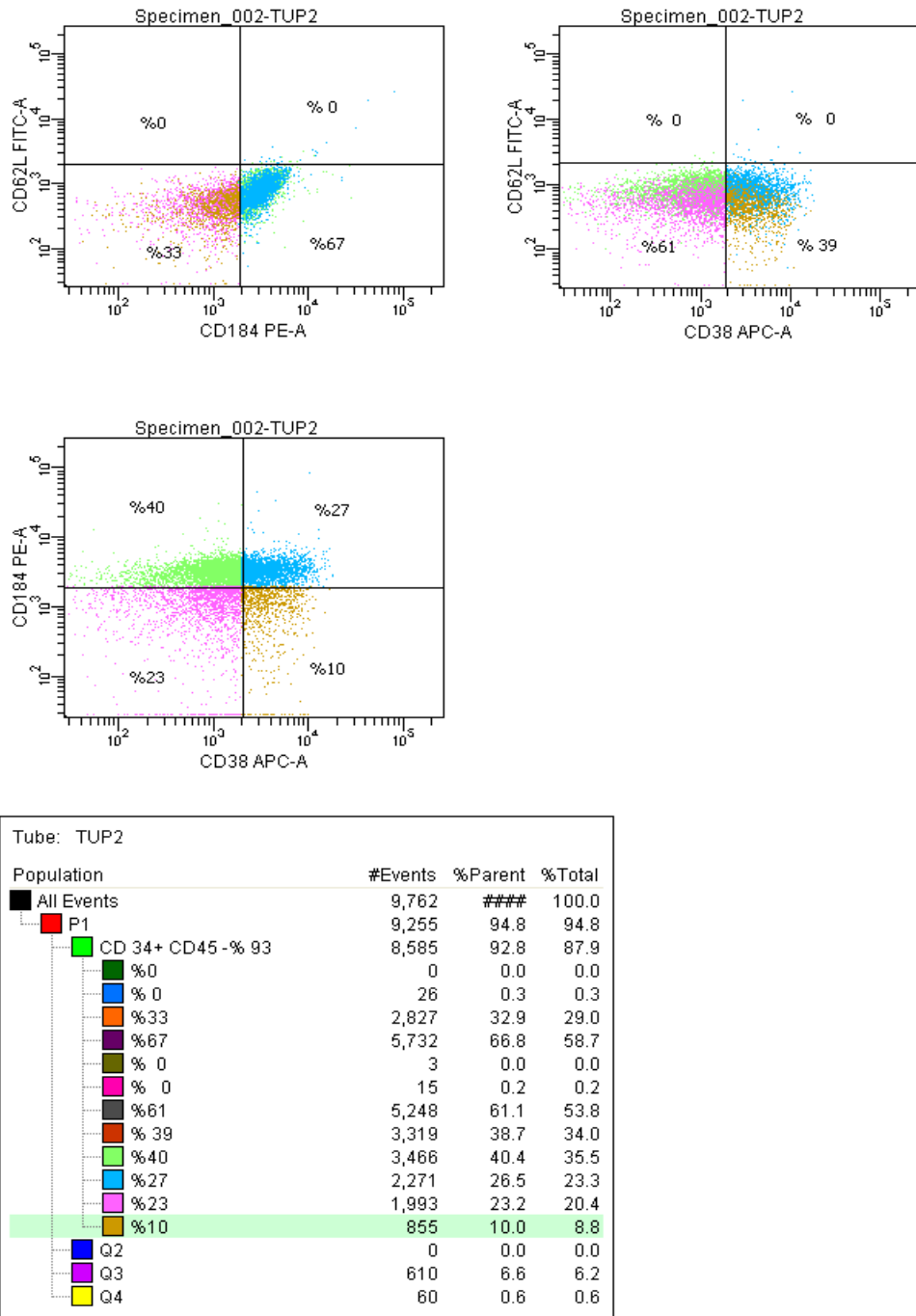


Şekil 6. Ayırıştırma sonrası tüp örnekleri

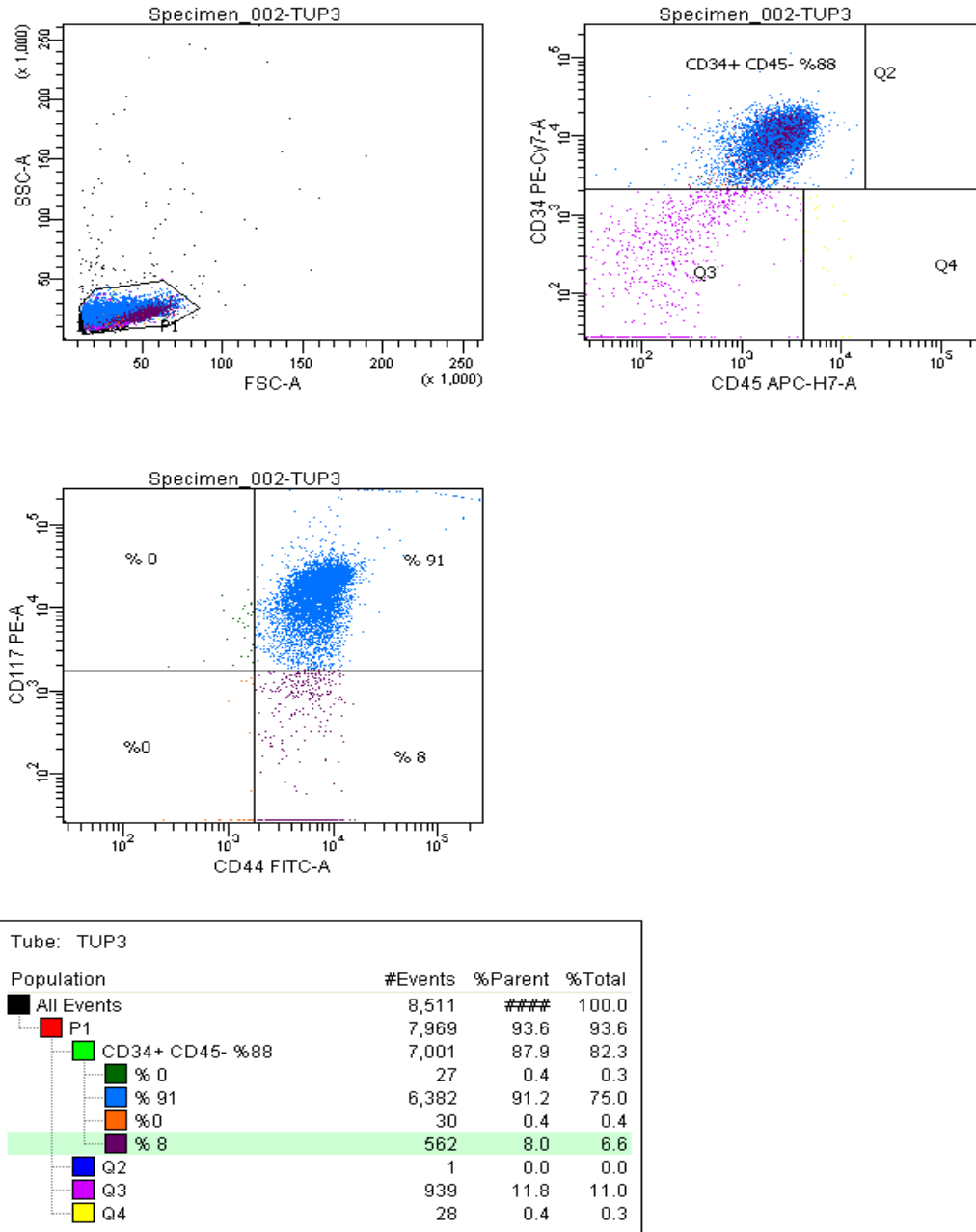
Her bir tüp üzerine ayırıştırılan CD34+ hücreler eşit miktarlarda paylaştırılır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 – 30 dakika bekletildikten sonra 'BD Facsdiva version 6.1.3' yazılımı ile analiz edilerek, kök hücrelerin fenotipik özellikleri belirlenir.



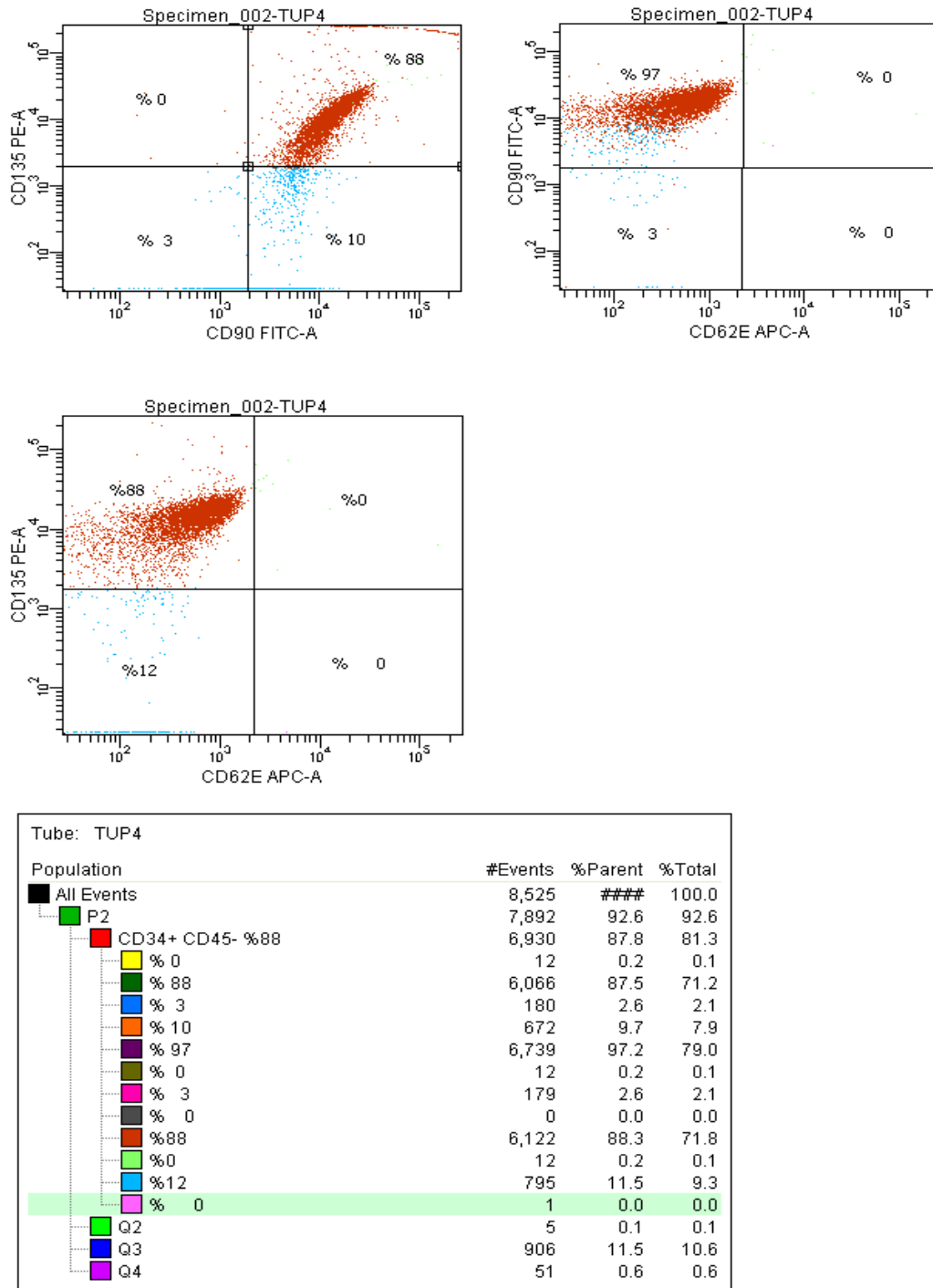
Şekil 7. Ayrıştırma sonrası tüp 1.



Şekil 8. Ayrıştırma sonrası tüp 2



Şekil 9. Ayrıştırma sonrası tüp 3.



Şekil 10. Ayrıştırma sonrası tüp 4.

5.3.4. Microarray tüm genom ekspresyon analizi

5.3.4.1. Örneklerden RNA eldesi

Leukolock kiti (Ambion) kullanılarak örneklerden RNA ekstrakte edildi. Elde edilen örneklerdeki RNA miktarı ve saflığı Nanodrop ND-100 cihazı kullanılarak belirlendi.

5.3.4.2. Tek-iplikli cDNA Sentezi

1. Tek-iplik Son Karışımının Hazırlanması.

A. Tek-iplik sentez reaktifleri çözülür ve buz üzerine yerleştirilir.

B. Buz üzerinde, nükleaz içermeyen bir tüp içerisinde Tek-iplik Son Karışımı Çizelge 2'ye göre hazırlanır.

Çizelge 2. Tek-iplik Son Karışımı (tek bir tepkime için)

Bileşen	Hacim
Tek-İplik Tampon Karışımı	4 µL
Tek-iplik Enzim Karışımı	1 µL
Toplam Hacim	5 µL

C. Karışım nazikçe vortekslenir. Karışımın tüpün dibinde toplanabilmesi için kısa bir (~5 saniye) santrifüj gerçekleştirilir.

D. PCR Tüpleri ya da Plağı buz üzerine yerleştirilir. 5 µL Tek-iplik Son Karışımından her bir tüp ya da kuyucuğa ilave edilir.

2. Toplam RNA/poly-A Kontrol Karışımının İlavesi

A. Toplam RNA/poly-A Kontrol Karışımından, Tek-iplik Son Karışımını içeren her bir kuyucuğa 5er µL ilave edilir. Böylece son hacim 10 µL olmuş olur.

B. Karışım nazikçe vortekslenerek karıştırılır. Karışımın tüpün/plağın dibinde toplanabilmesi için kısa bir santrifüj gerçekleştirilir. Ardından örnekler buz üzerine yerleştirilir.

3. İnkübasyon

- A. “Tek-iplikli cDNA Sentezi” programına göre Thermal Cyclerda 42°C de 2 saat inkübasyon gerçekleştirilir.
- B. İnkübasyondan sonra karışımın tüpün/plağın dibinde toplanabilmesi için kısa bir santrifüj gerçekleştirilir. Ardından örnekler buz üzerine yerleştirilir ve bekletilmeden Çift-iplikli cDNA sentezi aşamasına geçilir.

5.3.4.3. Çift iplikli cDNA sentezi

1. Çift-iplik Son Karışımının Hazırlanması.

- A. Buz üzerinde, nükleaz içermeyen bir tüp içerisinde Çizelge 3’ e göre hazırlanır.

Çizelge 3. Çift-iplik Son Karışımı (tek bir tepkime için)

Bileşen	Hacim
Nükleaz-içermeyen Su	13 µL
Çift-İplik Tampon Karışımı	5 µL
Çift-iplik Enzim Karışımı	2 µL
Toplam Hacim	20 µL

- B. Karışım nazıkçe vortekslenir. Karışımın tüpün dibinde toplanabilmesi için kısa bir (~5 saniye) santrifüj gerçekleştirilir. Santrifüjün ardından tüp buz üzerine yerleştirilir.
- C. 20 µL Çift-iplik Son Karışımından, 10 µL cDNA örnekleri üzerine ilave edilir. Her bir tüp nazıkçe vortekslenerek karıştırılır. Karışımın tüpün dibinde toplanabilmesi için kısa bir (~5 saniye) santrifüj gerçekleştirilir. Santrifüjün ardından tüp buz üzerine yerleştirilir.
- D. Thermal cycler bloğu 16 °Cye getirilir. Tüpler bloğa yerleştirilir.

2. İnkübasyon

- A. “Çift-iplikli cDNA Sentezi” programına göre Thermal Cyclerda önce 16°C de bir saat ardından 65°C de 10 dakika inkübasyon gerçekleştirilir.

B. İnkübasyondan sonra karışımın tüpün/plağın dibinde toplanabilmesi için kısa bir santrifüj gerçekleştirilir. Ardından örnekler buz üzerine yerleştirilir ve bekletilmeden IVT aşamasına geçilir ya da örnekler –20°C de saklanır.

5.3.4.4. İşaretlenmiş RNA' nın in vitro transkripsiyon ile sentezi

1. IVT Son Karışımının Hazırlanması

A. Oda sıcaklığında nükleaz içermeyen bir tüp içerisinde IVT Son Karışımı Çizelge 4' e göre hazırlanır.

Çizelge 4. IVT Son Karışımı (tek bir tepkime için)

Component	Amount
IVT Biotin Label	4 µL
IVT Labeling Buffer	20 µL
IVT Enzyme Mix	6 µL
Total Volüm	30 µL

B. Karışım nazikçe vortekslenir. Karışımın tüpün dibinde toplanabilmesi için kısa bir (~5 saniye) santrifüj gerçekleştirilir. Santrifüjün ardından tüp buz üzerine yerleştirilir.

C. 30 µL IVT Son Karışımından, (30 µL) çift-iplikli cDNA örnekleri üzerine ilave edilir. Her bir tüp nazikçe vortekslenerek karıştırılır. Karışımın tüpün dibinde toplanabilmesi için kısa bir (~5 saniye) santrifüj gerçekleştirilir.

D. Tüpler hazırlandıktan sonra thermal cycler bloğuna yerleştirilir.

2. İnkübasyon.

Thermal Cyclerda 4-16 saat 40°C' de inkübasyon gerçekleştirilir. En baştaki RNA miktarına göre tavsiye edilen IVT inkübasyon süreleri Çizelge 5' de verilmiştir.

3. aRNA buza yerleştirilir ya da hemen dondurulur.

Elde edilen aRNAlar aRNA saflaştırma basamağına (aşağıda) geçiş için buza yerleştirilir ya da gece boyu saklamak üzere –20 °C ye kaldırılır.

Çizelge 5. Tavsiye Edilen IVT İnkübasyon Süreleri

RNA Miktarı	IVT İnkübasyon Süresi
50–250 ng	16 saat
100–500 ng	4 saat

5.3.4.5. RNA saflaştırılması

Sentezden sonra enzimlerin, tuzların ve yapıya katılmamış nükleotidlerin uzaklaştırılabilmesi için aRNA saflaştırılır. Eğer Lab-Line Titer Plate Shaker dışında bir çalkalayıcı kullanılacaksa, her bir basamak için tavsiye edilen ortalama çalkalama hızları çizelge 6’ da verilmiştir.

Çizelge 6. Plak Çalkalama Hızları

aRNA Saflaştırma Basamağı	Çalkalama Hızı	Yaklaşık RPM	Tavsiye Edilen Hız Ayarı	
			Barnstead/Lab-Line Titer Plate Shaker	Boekel “Jitterbug” Plate Shaker
aRNA Bağlanması	Hafif	300-500	4	1
Boncuk Yıkama	Orta	700-900	7	4
Etanol Uzaklaştırması	Sert	1000-1200	10	7
aRNA Elüsyonu	Sert	1000-1200	10	7

aRNA saflaştırmasına başlamadan önce, aRNA Elüsyon Çözeltisi 50–60°C sıcaklıkta en az 10 dakika beklemelidir.

1. aRNA Bağlama Karışımının Hazırlanması.

Oda sıcaklığında nükleaz içermeyen bir tüp içerisinde aRNA Bağlama Karışımı çizelge 7’ ye göre hazırlanır.

Çizelge 7. aRNA Bağlama Karışımı (tek bir tepkime için)

Bileşen	Miktar
RNA Bağlama Boncukları*	10 µL
Konsantre aRNA Bağlama Tamponu	50 µL

*RNA Bağlama Boncuklarını karışıma ilave etmeden önce vorteksleyerek karıştırılır.

2. RNA'nın aRNA Bağlama Karışımına İlavesi.

- A. Her bir örneğe 60' ar µL aRNA Bağlama Karışımından İlave edilir.
- B. Her bir örnek U-tabanlı plağa transfer edilir.
- C. Birkaç kez pipetlenerek karıştırma sağlanır.

3. aRNA Bağlanması.

- A. Her bir örneğe 120er µL 100% etanol ilave edilir.
- B. Birkaç kez pipetlenerek karıştırma sağlanır.
- C. Plak çalkalayıcıda, hafif çalkalama hızında, en az 2 dakika çalkalanır. Bu inkübasyon sırasında örnekteki aRNA, RNA bağlama boncuklarına bağlanacaktır.

4. RNA Bağlama Boncuklarının Elde Edilmesi.

- A. Plak manyetik bir levha üzerine taşınır ve ~5 dakika boyunca boncuklar yakalanır. Yakalama işlemi tamamlandığında karışım saydamlaşır ve RNA boncukları manyetik levha üreinde pellet oluşturur. Kesin yakalama süresi kullanılan manyetik levhaya ve örneğinizdeki aRNA miktarına göre değişmektedir.
- B. Üst faz dikkatli bir şekilde aspire edilir ve süpernatant manyetik boncuklara zarar vermeden atılır. Bu işlemin ardından plak manyetik levhanın üzerinden alınabilir.

5. Boncukların Yıkama

- A. Her bir örneğe 100er µL aRNA Yıkama Çözeltisinden ilave edilir. Plak çalkalayıcıda orta (Lab-Line Titer Plate Shaker için 7. hız ayarı) hızda bir dakika boyunca çalkalanır.

- B. Plak yeniden manyetik levha üzerine taşınır. RNA boncukları önceki basamakta yapıldığı gibi yakalanır.
- C. Üst faz dikkatli bir şekilde aspire edilir ve süpernatant manyetik boncuklara zarar vermeden atılır. Bu işlemin ardından plak manyetik levhanın üzerinden alınabilir.
- D. A basamağından C basamağına kadarki kısım bir kez daha tekrarlanır.
- E. Plak çalkalayıcıda sert (Lab-Line Titer Plate Shaker için 10. hız ayarı) hızda bir dakika boyunca kalan etanolün uçurulması için çalkalanır.

6. aRNA Elüsyonu

- A. Her bir örneğe 50şer μL önceden ısıtılmış ($50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$) aRNA Elüsyon Çözeltilisinden ilave edilerek aRNA Bağlama Boncuklarından elüe edilir.
- B. Plak çalkalayıcıda sert (Lab-Line Titer Plate Shaker için 10. hız ayarı) hızda boncuklar dağılıncaya kadar çalkalanır.
- C. Plak manyetik levha üzerine taşınır. aRNA bağlama boncukları yakalanır.
- D. Elüe edilmiş aRNA'yı içeren süpernatant nükleaz içermeyen bir tüpe aktarılır.

7. aRNA -20°C saklanabilir ya da kantifikasyon ve fragmentasyon için analiz gerçekleştirilebilir.

Saflaştırılmış aRNA -20°C ya da daha düşük bir sıcaklıkta 1 yıla kadar saklanabilir. aRNA bütünlüğünün sağlanabilmesi için dondurma-çözme sayısı minimumda tutulmalıdır.

aRNA kantifikasyonu ve beklenen verim

1. aRNA Veriminin UV Absorbans ile Belirlenmesi:

aRNA çözeltisinin konsantrasyonu 260 nm de absorbansının ölçülmesiyle belirlenebilir. Bu işlem NanoDrop Spektrofotometrelerde gerçekleştirilebilir. Bu işlemde seyreltme ya da kuvvet gerekmez, $2\text{ }\mu\text{L}$ aRNA örneğinin doğrudan ölçümü yeterlidir.

2. aRNA Boyutunun Analizi:

aRNA' nın boyut dağılımı Agilent 2100 biyoanalizör cihazında Agilent RNA 6000 Nano Kit (P/N 5067-1511) kullanılarak değerlendirildi. aRNA'nın biyoanalizörde ölçümü için 300 ng saf aRNA' nın her bir kuyucuğuna yüklendiği RNA 6000 Nano Kit, üreticinin talimatlarına göre kullanıldı.

5.3.4.6. Fragmentasyon

1. aRNA fragmentasyon karışımının hazırlanması.

Çizelge 8' e göre hazırlanır

2. Fragmentasyon reaksiyonu.

A. Hazırlanan örnekler 94° Cde 35 dakika inkübe edilir.

B. Inkübasyon sonrasında örnekler derhal buz üzerine aktarılmalıdır.

Fragmente edilmiş aRNA derhal kullanılmalı ya da dondurularak saklanmalıdır. Seyreltilmemiş fragmente aRNA kısa dönem için -20°C, uzun dönem için -70°C' de saklanabilir.

Çizelge 8. Array Formatına Göre Örnek Fragmentasyon Örnekleri

Bileşen	49/64 Format	100 Format	169/400/HT format
aRNA	15µg (1-32 µL)	12µg (1-25.6 µL)	7.5µg (1-16 µL)
5x Array Fragmentasyon Tamponu	8 µL	6.4 µL	4 µL
Nükleaz İçermeyen Su	Değişken	Değişken	Değişken
Toplam Hacim	40 µL	32 µL	20 µL

5.3.4.7. Hibridizasyon

Bu bölümde **GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit** kullanılarak gerçekleştirilecek kartuş array hibridizasyonunun kurulumu için gerekli bilgiler verilmiştir.

Çizelge 9 kullanılacak probe array formatına göre gerekli aRNA miktarlarını listelemektedir.

1. Çizelge 9' a göre, her bir örnek için hibridizasyon kokteyli hazırlanır.

Bölüştürülmeden önce aRNA'nın tamamen süspanse edilebilmesi için 20X Hibridizasyon Kontrollerinin donmuş stoklarının 65°C' ye ısıtılması (5 dakika).

2. Kullanılmadan hemen önce probe array oda sıcaklığına getirilir.

3. Hibridizasyon kokteyli ısı bloğunda 99°C' ye getirilir (5 dakika).

4. Array uygun miktarda pre-hibridizasyon karışımının (çizelge 10) septa kısmından doldurulmasıyla ısıtılır.

Çizelge 9. Tek Bir Probe Array İçin Hibridizasyon Kokteylinin Hazırlanması

Bileşen	Array Formatı			Son Konsantrasyon
	49 (Standard) / 64 Format	100 (Midi)	169 (Mini) / 400 (Mikro)	
Fragmente edilmiş ve İşaretlenmiş aRNA	12.5 µg (33.3 µL)	10 µg (26.7 µL)	5 µg (13.3 µL)	0.05 µg/ µL
Kontrol Oligonükleotid B2 (3 nM)	4.2 µL	3.3 µL	1.7 µL	50 pM
20X Hibridizasyon Kontrolleri (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	12.5 µL	10 µL	5 µL	1.5, 5, 25, and 100 pM sırasıyla
2X Hibridizasyon Karışımı	125 µL	100 µL	50 µL	1X
DMSO	25 µL	20 µL	10 µL	10%
Nükleaz içermeyen su	50 µL	40 µL	20 µL	
Total Volüm	250 µL	200 µL	100 µL	

Çizelge 10. Pre-Hibridizasyon Karışımı ve Hibridizasyon Kokteyli için Probe Array Kartuş Hacimleri

Array	Volume
49 Format (Standard)	200 µL
64 Format	200 µL
100 Format (Midi)	130 µL
169 Format (Mini)	80 µL
400 Format (Mikro)	80 µL

NOT: Her bir array üzerinde ikişer adet septa bulunmaktadır. Array'in doldurulabilmesi için öncelikle septalardan biri, temiz ve kullanılmamış bir pipet ucu sokmak suretiyle açılır. Bunun ardından pipet ucu mikropipetöre takılarak septanın içine sokulur ve dolum gerçekleştirilir.

5. Pre-hibridizasyon karışımı ile doldurulmuş olan probe array, hibridizasyon fırınında, 45°C' de 10 dakika boyunca döndürülerek inkübe edilir.

6. 3. basamakta 99°C' ye ısıtılmış olan hibridizasyon kokteyli 45°C' deki ısı bloğuna aktarılır (5 dakika).

7. Hibridizasyon kokteyli, hibridizasyon karışımından çözünmeyen bileşenlerin ayrılabilmesi için mikrosantrifüjün maksimum hızında 5 dakika döndürülür.

8. Array hibridizasyon fırınından çıkarılır. Array temiz bir pipet ucuyla açılır ve pre-hibridizasyon karışımı mikropipetör yardımı ile çekilerek atılır. Array uygun hacimde, temizlenmiş hibridizasyon kokteyli ile doldurulur. Bu aşamada tüpün dibindeki çözünmemiş bileşenlerin alınmamasına dikkat edilmelidir.

9. Probe 45°C' ye ayarlanmış hibridizasyon fırınına yerleştirilir.

10. Motorun geriliminin engellenmesi için, probe array'ler eksen çevresinde dengeli bir şekilde yerleştirilmelidir. Array' ler 60 rpm de döndürülür.

11. 16 saat boyunca hibridizasyon gerçekleştirilir.

Microarray tüm genom ekspresyon analizi için tanımlanan basamaklar şekil 11' de özetlenmiştir.

5.3.5. İstatistik yöntem:

Elde edilen sonuçlar öncelikle Gaussian dağılım eğrisine uyumlu dağılım gösterip göstermediği yönünden araştırıldı. Bu amaçla kullanılan Kolmogrov-Siminirnov ve D'Agostino-Pearson testlerinde sonuçlarımızın bazılarının Gaussian dağılım eğrisine uyumlu bazılarının ise uyumsuz dağılım gösterdiği saptandı.

Gaussian dağılım eğrisi ile; uyumsuz olan verilerin istatistik değerlendirmelerinde nonparametrik (ikili grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney, çoklu grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis ve ilişki değerlendirmelerinde Spearman), uyumlu olanların değerlendirmelerinde ise parametrik (ikili grup karşılaştırmalarında Unpaired T test, çoklu grup karşılaştırmalarında One-way ANOVA ve ilişki değerlendirmelerinde Pearson) testler kullanıldı. Anlamlı bulunan çoklu grup karşılaştırmalarında, grupların birbirleri arasında anlamlılık olup olmadığını saptamak için Dunn post test kullanıldı.

Anlamlılık eşik düzeyi $p=0.05$ olarak kabul edildi ve sonuçlar ortanca (en üst ve en alt) olarak sunuldu. İstatistik değerlendirmeler GraphPad Prism 4.03 yazılımı (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) ile yapıldı.

Mikroarray Veri Analizi

Örneklerin kalite kontrolü Affymetrix GeneChip Operation yazılımı ile yapılmıştır. Tarama sonucu elde edilen analiz dosyaları Partek® Genomic Suite 6.4 (Partek In. St. Louis, MO, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası gen ekspresyon farklılıkları için istatistiksel anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ ve en az 2 kat artış ve azalış farklılıkları kabul edilmiştir.

Network Etkileşimi ve Fonksiyonel Analiz

Gen ontolojisi ve gen etkileşim analizi Partek Genomic Suite 6.4 ve Ingenuity Pathway Analysis 7.1 (Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen listesi, Partek analizi sonrası gen ekspresyonları arasında iki kat ve üstü değişim gösteren genlerden oluşturulmuştur ve bu genler Ingenuity Pathways

Knowledge Base (IPKB)'de incelenmiştir. Bu genler daha sonra IPKB veritabanında moleküler etkileşim listesi temel alınarak yolak algoritmalarının oluşturulmasında kullanılmıştır. Ayrıca, array'in referans very setindeki gen listesi kullanılarak belirlenen genlerin anlamlı zenginleştirme değerleri, genler ile ilişkili biyokimyasal ağlar ve anlamlı moleküler ve hücreler fonksiyonların belirlenmesinde kullanılmıştır.

5.4. Bulgular:

On sekizi kadın olan ve ortalama yaşları 46 bulunan 44 olgunun mobilizasyon sonuçları değerlendirmeye alındı. Nakil sonrası dönemde hastaların ortalama nötrofil yamanma süresi 12 (9 – 21) ve ortalama trombosit yamanma süresi 12 (7 – 100) gün olarak bulundu.

Mobilize HKH lerin akım sitometri ile saptanan CD sunum oranları çizelge 11’ de sunulmuştur.

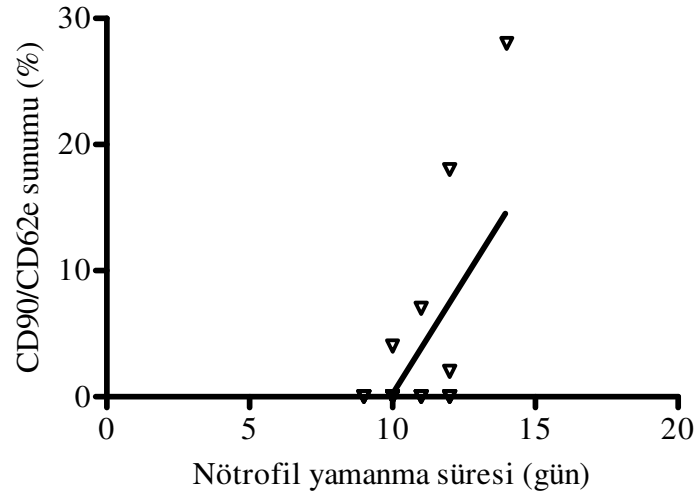
Çizelge 11. Gruplara göre HKH’ lerin CD sunum oranları (%). Tüm grup değerlerinin yanında en düşük ve en yüksek değerlerde sunulmuştur

	Grup 1 (n: 22)	Grup 2 (n: 8)	Grup 3 (n: 14)	Tüm grup (n: 44)
CD11a	57.5	62	54	56 (11 – 99)
CD18	5.5	5	15.5	7.5 (0 – 67)
CD31	92.5	93.5	96.5	94.5 (79 – 99)
CD38	16	5	21.5	14.5 (0 – 61)
CD44	99	99.5	100	99.5 (95 – 100)
CD62e	0.5	0	0	0 (0 – 66)
CD62L	1	0	1.5	1 (0 – 65)
CD90	99	100	100	100 (43 – 100)
CD117	92	94	96	93.5 (60 – 100)
CD135	85	91	94	89.5 (17 – 100)

Çizelge 11' in devamı

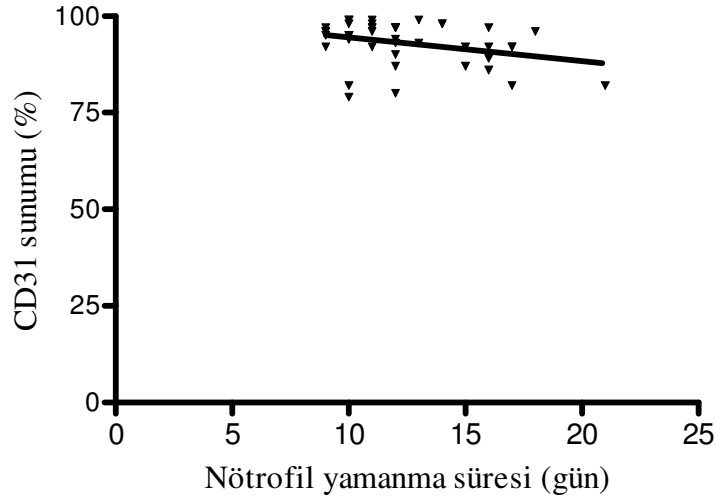
CD184	65.5	27.5	58	60.5 (1 – 99)
CD18a/CD31	5.5	5	14.5	7.5 (0 – 64)
CD18a/CD11	5	7	12	7.5 (0 – 67)
CD31/CD11	57	61	54	55.5 (11 – 91)
CD62L/CD184	1	0	1.5	1 (0 – 60)
CD62L/CD38	1	0	0	0 (0 – 39)
CD184/CD38	6.5	0.5	8	6.5 (0 – 53)
CD117/CD44	92	94	95	93.5 (59 – 100)
CD135/CD90	85	91	94	89.5 (16 – 100)
CD90/CD62e	0	0	0	0 (0 – 66)
CD135/CD62e	0	0	0	0 (0 – 99)

Farklı mobilizasyon rejimleri ile mobilize edilmiş HKH' lerin sundukları CD oranları gruplar arası karşılaştırmada (grup I, II ve III) farklı bulunmadı. Kemoterapi ve büyüme faktörü ile mobilize olan (grup II ve III) HKH' ler, sadece büyüme faktörü ile mobilize olan (grup I) HKH' ler ile karşılaştırıldığında; her iki grup HKH' lerin CD sunum oranları arasında fark saptanmadı. Kemoterapi + büyüme faktörü alan grupta (grup II + III) HKH' lerin CD90/CD62e sunum oranları ile nötrofil yamanma süreleri arasında ($r= 0.48$, $p= 0.01$, şekil 12) ilişki bulundu



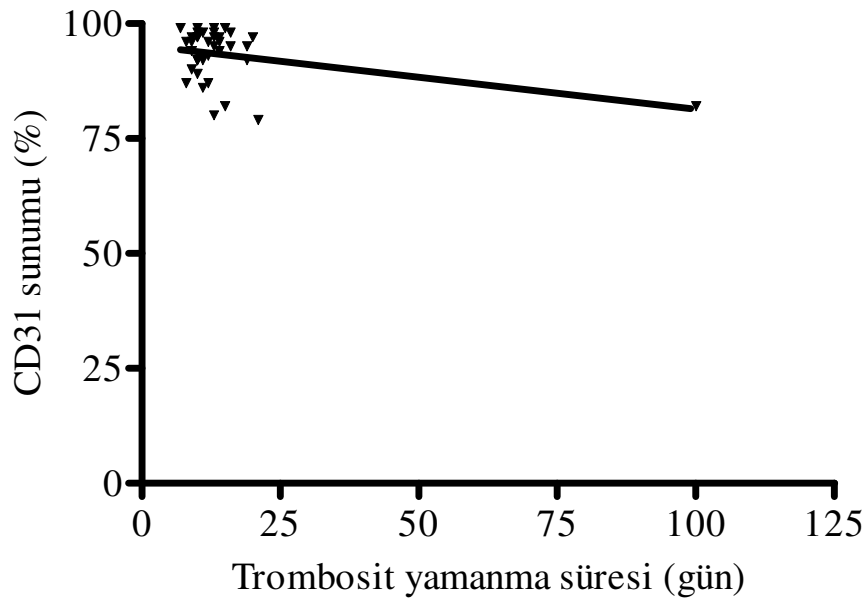
Şekil 12. Grup II ve III HKH' de CD90/CD62e sunumu ile nötrofil yamanma süreleri arasında ($r= 0.46$, $p= 0.03$) ilişki bulundu

Tüm grupta; HKH' lerin CD31 sunum oranları ile hastaların nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ($r= -0.32$, $p= 0.03$, şekil 13) ilişki saptandı. HKH' lerin diğer CD sunum oranları ile nötrofil yamanma süreleri arasında ilişki bulunmadı.



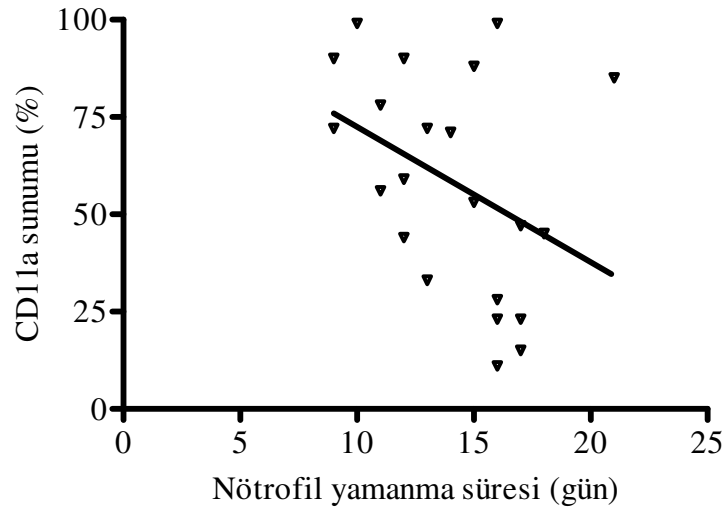
Şekil 13. Tüm grup HKH' de CD31 sunumu ile nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r= -0.32$, $p= 0.03$) saptandı.

Tüm grupta; HKH' lerin CD31 sunum oranları ile hastaların trombosit yamanma süreleri arasında tersine ($r = -0.36$, $p = 0.02$, şekil 14) ilişki saptandı. HKH' in diğer CD sunum oranları ile trombosit yamanma süreleri arasında ilişki bulunmadı.

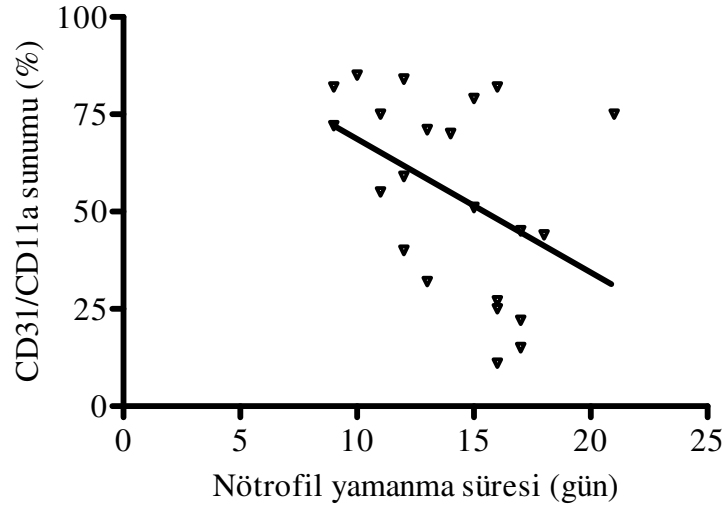


Şekil 14. Tüm grup HKH' de CD31 sunumu ile trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r = -0.36$, $p = 0.02$) saptandı.

Tek başına büyüme faktörü ile mobilize (grup I) HKH' de, CD11a ($r = -0.47$, $p = 0.02$, 15) ve CD31/CD11a ($r = -0.51$, $p = 0.01$, şekil 16) sunumları ile nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı.

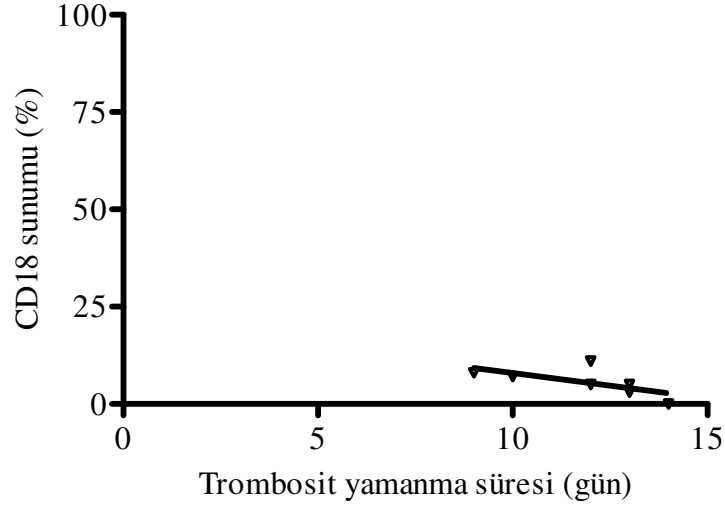


Şekil 15. Grup I HKH' de CD11a sunumu ile nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r = -0.47$, $p = 0.02$) saptandı.

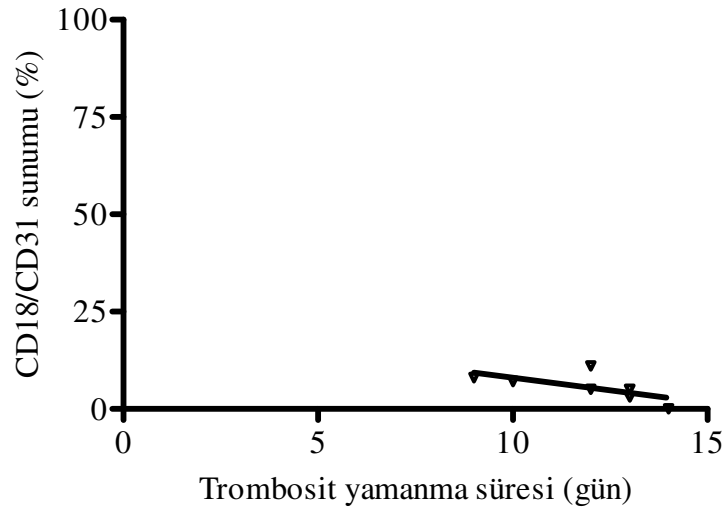


Şekil 16. Grup I HKH' de CD31/CD11a sunumu ile nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r = -0.51$, $p = 0.01$) saptandı.

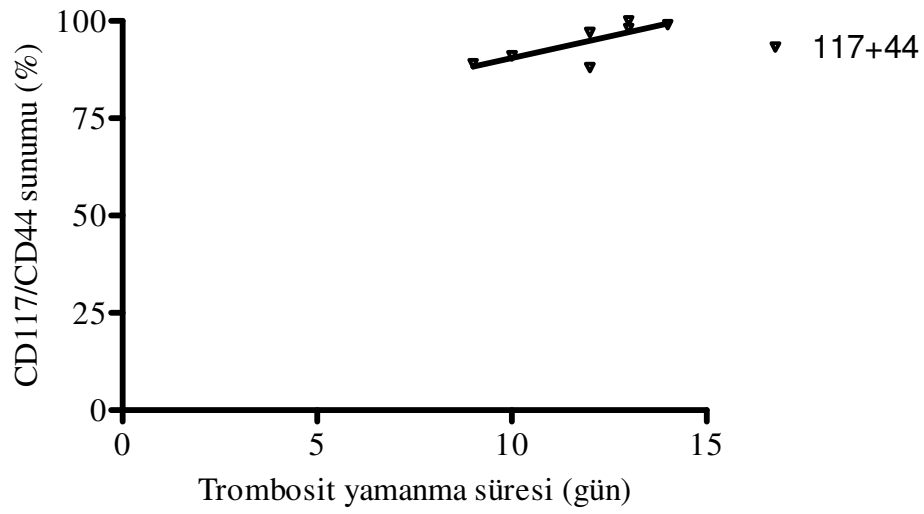
Grup II (Endoksan + büyüme faktörü ile mobilize) hastalarda; CD18 ($r = -0.80$, $p = 0.03$, şekil 17) ve CD18/CD31 ($r = -0.80$, $p = 0.03$, şekil 18) sunumları ile hastaların nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı. Trombosit yamanma süreleri ile CD117/CD44 sunumları arasında tersine ($r = 0.78$, $p = 0.04$, şekil 19) ilişki bulundu.



Şekil 17. Grup II HKH' de CD18 sunumu ile trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r = -0.80$, $p = 0.03$) saptandı.

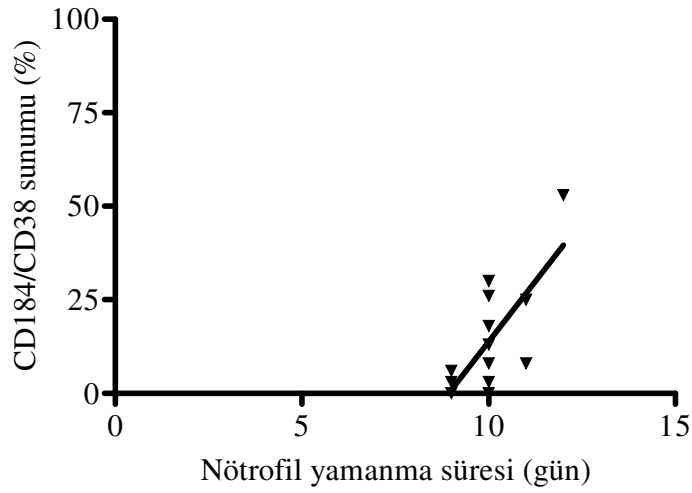


Şekil 18. Grup II HKH' de CD18/CD31 sunumu ile trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r = -0.80$, $p = 0.03$) saptandı.

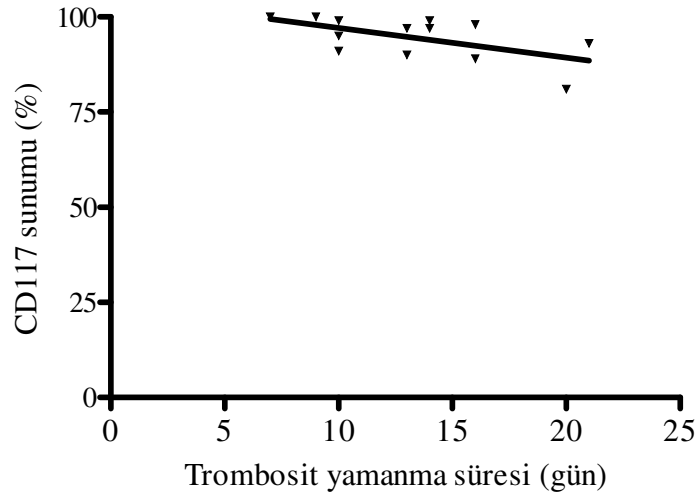


Şekil 19. Grup II HKH' de CD117/CD44 sunumu ile trombosit yamanma süreleri arasında ilişki ($r = 0.78$, $p = 0.04$) saptandı.

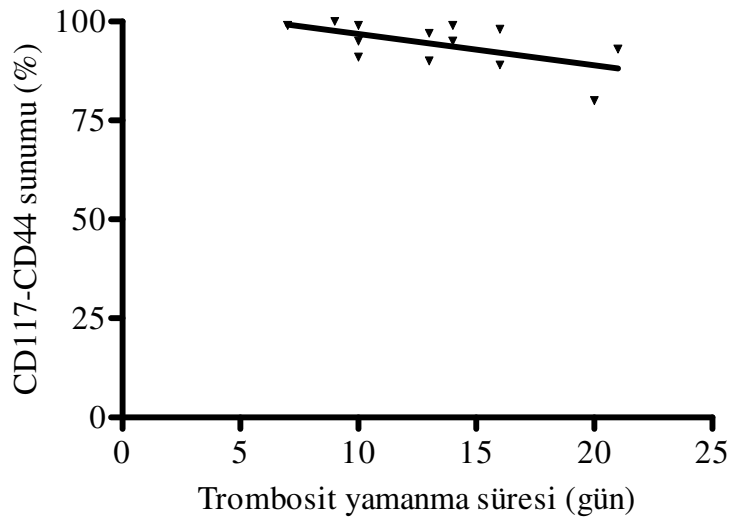
Grup III (ESHAP veya benzeri kemoterapi + büyüme faktörü ile mobilize) hastalarda; birlikte CD184/CD38 sunumu ile hastaların nötrofil yamanma süreleri arasında ($r= 0.61$, $p= 0.02$, şekil 20) ilişki saptandı. Trombosit yamanma süreleri ile CD117 ($r= -0.57$, $p= 0.03$, şekil 21) ve CD117/CD44 ($r= -0.56$, $p= 0.04$, şekil 22) sunumları arasında tersine ilişki bulundu.



Şekil 20. Grup III HKH' de CD184/CD38 sunumu ile nötrofil yamanma süreleri ile arasında ilişki ($r= 0.61$, $p= 0.02$) saptandı.



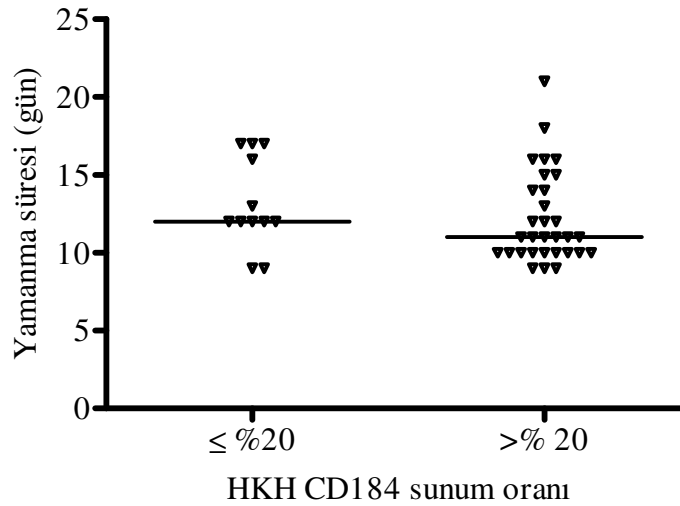
Şekil 21. Grup III HKH' de CD117 sunumu ile trombosit yamanma süreleri ile arasında tersine ilişki ($r = -0.57$, $p = 0.03$) saptandı.



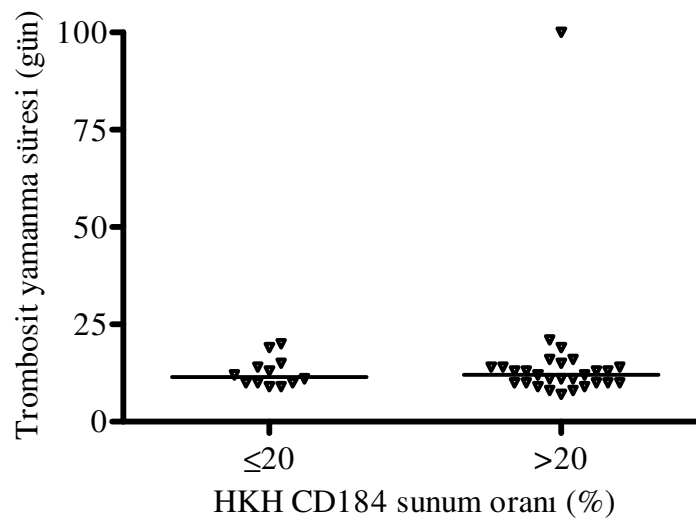
Şekil 22. Grup III HKH' de CD117/CD44 sunumu ile trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki ($r = -0.56$, $p = 0.04$) saptandı.

CD184 sunumu % 20 ve altında olan HKH' ler, sunumu % 20 üzerinde olanlar ile karşılaştırıldığında; gerek nötrofil (ortanca 12 güne krş 11 gün, $p > 0.05$, şekil 23) gerekse

trombosit (ortanca 11.5 güne karşı 12 gün, $p > 0.05$, şekil 24) yamanma süreleri farklı bulunmadı.



Şekil 23. CD 184 sunum oranlarına göre nötrofil (12 gün krş 11 gün) yamanma süreleri arasında fark saptanmadı.



Şekil 24. CD 184 sunum oranlarına göre trombosit (11.5 gün krş 12 gün) yamanma süreleri arasında fark saptanmadı.

AGVH Gelişen ve Gelişmeyen Hastalarda Gen Ekspresyon Profilleri

Akut graft versus host hastalığı gelişen ve gelişmeyen hastalara verilen kök hücre ürünlerinin tüm genom gen ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında 15 gen ve prob setinde gruplar arasında iki kat ve üstü anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Çizelge 12, $p < 0.05$).

Çizelge 12. AGVH gelişen ve gelişmeyen hastalara verilen kan hücrelerinde anlamlı farklılık gösteren genler ($p < 0.05$).

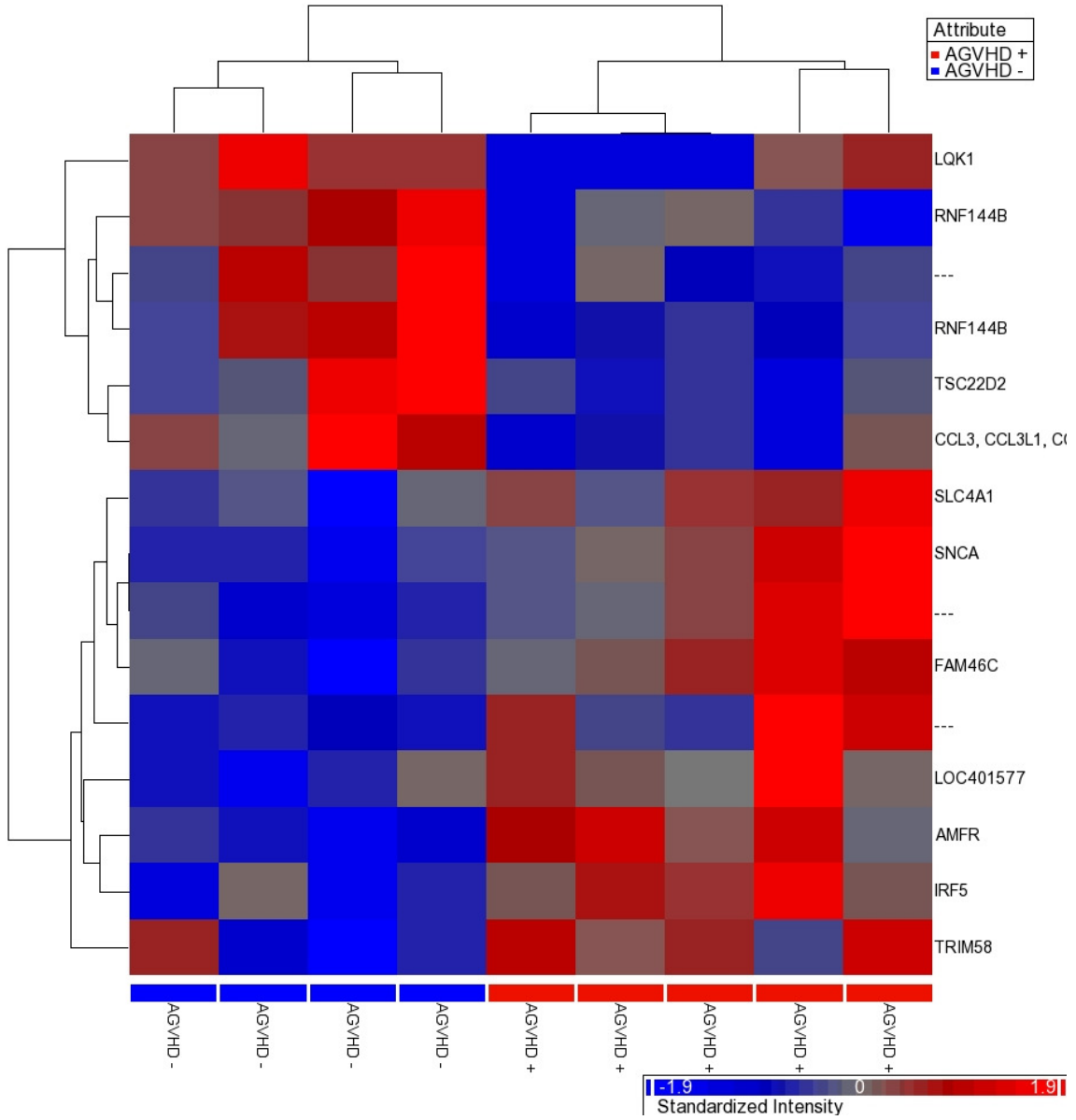
Probeset ID	Gen Sembolü	Gen İsmi	p-değeri	Fold-Değişikliği
202203_s_at	AMFR	autocrine motility factor receptor	0.00253072	3.36804
235549_at	RNF144B	ring finger 144B	0.0105159	-2.07716
239412_at	IRF5	interferon regulatory factor 5	0.0115311	2.81808
239704_at	RNF144B	ring finger 144B	0.0125992	-3.68307
226811_at	FAM46C	family with sequence similarity 46, member C	0.0144731	2.42829
205114_s_at	CCL3 ///	chemokine (C-C motif)	0.0157976	-3.35924
	CCL3L1 ///	ligand 3 /// chemokine (C-		
	CCL3L3 ///	C motif) ligand 3-like 1 ///		
	LOC728830	che		
204467_s_at	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	0.0177262	2.21481
236081_at	---	---	0.0216783	2.3166
233228_at	---	---	0.0254806	-2.08788
231078_at	---	---	0.0307715	2.19323

Çizelge 12' nin devamı

239247_at	LOC401577	Hypothetical protein LOC401577	0.0380668	2.51234
205592_at	SLC4A1	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein	0.0444037	2.09569
210954_s_at	TSC22D2	TSC22 domain family, member 2	0.0461539	-2.08201
235126_at	LQK1	LQK1 hypothetical protein short isoform	0.0476013	-2.14069
215047_at	TRIM58	tripartite motif-containing 58	0.0480479	2.57952

AGVHH' da altı genin sunum düzeylerinde azalma saptanmasına karşın 9 gende artış tespit edilmiştir. En yüksek anlamlı artış gösteren başlıca genler AMRF (3.37 kat artış, $p=0.0025$), IRF5 (2.82 kat artış, $p=0.011$), FAM46C (2.42 kat artış, $p=0.314$) ve SNCA (2.21 kat artış, $p=0.017$) olarak saptanmıştır. Sunumda azalma gösteren başlıca genler RNF144B (2.08 kat azalış, $p=0.01$), RNF144B (3.68 kat azalış, $p=0.012$) ve CCL3 /// CCL3L1 /// CCL3L3 /// LOC728830 (3.36 kat azalış, $p=0.015$) olarak ortaya konmuştur (şekil 25).

KGVHH gelişen ve gelişmeyen hastalara verilen kök hücre ürünlerinin tüm genom gen ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında, 108 gen ve prob setinde gruplar arasında iki kat ve üstü anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Çizelge 13, $p < 0.05$)



Şekil 25. AGVHH olan ve olmayan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösteren genlerin hiyerarşik küme analizi. Her bir horizontal sıra farklı bir hastayı göstermektedir. Örneklerdeki mRNA düzeylerindeki ekspresyon farklılıklarını gösteren mavi ve kırmızı kutucuklar sırasıyla gen ekspresyonundaki azalış ve artışı göstermektedir. Renk skalası artışı ve azalışın miktarına işaret etmektedir.

Çizelge 13. KGVHH gelişen ve gelişmeyen hastalara verilen kök hücre ürünlerinde anlamlı farklılık gösteren gen sunumları ($p < 0.05$).

Probeset ID	Gen Sembolü	Gen İsmi	p-değeri	Fold-Değişikliği
215275_at	LOC100133233 /// TRAF3IP3	hypothetical protein LOC100133233 /// TRAF3 interacting protein 3	0.000147191	-2.03407
1553678_a_at	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes	0.000212188	-2.13138
201976_s_at	MYO10	myosin X	0.000358171	2.08108
231118_at	ANKRD35	ankyrin repeat domain 35	0.000383881	2.48679
219990_at	E2F8	E2F transcription factor 8	0.000677633	2.92815
205425_at	HIP1	huntingtin interacting protein 1	0.000820923	2.14753
235334_at	ST6GALNAC3	ST6 (alpha-N-acetyl- neuraminyl-2,3-beta- galactosyl-1,3)-N- acetylgalactosaminide	0.000849893	2.19061
226765_at	SPTBN1	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1	0.000870704	2.01893
1555691_a_at	KLRC4 /// KLRC1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4 /// killer cell lectin-li	0.000932698	-3.23221
223836_at	FGFBP2	fibroblast growth factor binding protein 2	0.0013438	-3.35709
218638_s_at	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	0.00160086	-2.02397

204103_at	CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	0.00170412	-2.18991
1552321_a_at	CCDC65	coiled-coil domain containing 65	0.00195564	-2.45545
210321_at	GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	0.00219989	-4.38555
203628_at	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	0.00273061	2.1051
220651_s_at	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10	0.00285334	2.12883
	HERC2P2 ///	hect domain and RLD 2		
217317_s_at	HERC2P3 ///	pseudogene 2 /// hect domain	0.00429578	-2.19576
	LOC440248	and RLD 2 pseudogene 3 /// he		
212023_s_at	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	0.00430304	2.60638
222680_s_at	DTL	denticleless homolog (Drosophila)	0.00433942	2.25526
220477_s_at	C20orf30	chromosome 20 open reading frame 30	0.00436219	-2.60954
213800_at	CFH	complement factor H	0.00449787	-2.14215
		apolipoprotein B mRNA		
214995_s_at	APOBEC3F ///	editing enzyme, catalytic	0.00457828	-2.35277
	APOBEC3G	polypeptide-like 3F ///		
		apolipop		
201791_s_at	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	0.00472605	2.05523
204011_at	SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	0.0049948	2.47477

205471_s_at	DACH1	dachshund homolog 1 (Drosophila)	0.00515764	2.22073
210690_at	KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4	0.00534471	-4.26147
1553530_a_at	ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes	0.00547705	-2.72719
201890_at	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	0.00567084	2.34379
227004_at	---	---	0.00578682	2.33716
205488_at	GZMA	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte- associated serine esterase 3)	0.00594653	-2.43674
241938_at	QKI	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	0.00609098	-3.55639
204444_at	KIF11	kinesin family member 11	0.00636089	2.44861
209426_s_at	AMACR /// C1QTNF3	alpha-methylacyl-CoA racemase /// C1q and tumor necrosis factor related protein	0.00662283	2.01508
209891_at	SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	0.00687633	2.45038
238825_at	ACRC	acidic repeat containing	0.00812505	-2.10987
37145_at	GNLY	granulysin	0.00865017	-2.58608
217640_x_at	C18orf24	chromosome 18 open reading frame 24	0.00882038	2.12581
244413_at	CLECL1	C-type lectin-like 1	0.00916341	-2.28649

1565358_at	RARA	retinoic acid receptor, alpha	0.0100538	3.62091
1558048_x_at	---	---	0.0102203	3.68131
205495_s_at	GNLY	granulysin	0.0102215	-2.90038
219493_at	SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	0.0102245	2.07708
1555759_a_at	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.0106647	-2.27927
225239_at	---	---	0.0109603	-3.38055
202458_at	PRSS23	protease, serine, 23	0.011861	-2.00572
211597_s_at	HOPX	HOP homeobox	0.013984	-2.43379
232027_at	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	0.0141822	2.01609
204151_x_at	AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (	0.0144263	2.49715
228915_at	DACH1	dachshund homolog 1 (Drosophila)	0.0151395	2.18949
207795_s_at	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	0.0157532	-2.61296
205821_at	KLRK1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	0.0159676	-2.22112
201292_at	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	0.0168765	2.47645
201104_x_at	KIAA1245 /// NBPF1 /// NBPF10 /// NBPF11 ///	KIAA1245 /// neuroblastoma breakpoint family, member 1 /// neuroblastoma breakpo	0.0172282	-2.25823

	NBPF12 ///			
	NBPF14 ///			
	NBPF15 ///			
	NBPF16 ///			
	NBPF20 ///			
	NBPF8 ///			
	NBPF9 ///			
	XXyac-			
	YX155B6.1			
210606_x_at	KLRD1	killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1	0.0176124	-2.2854
227062_at	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	0.0180168	-3.98184
203231_s_at	ATXN1	ataxin 1	0.0186014	-2.08264
229843_at	FAM82B	Family with sequence similarity 82, member B	0.0189124	-2.64022
1555659_a_at	TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	0.0202358	-2.40017
213906_at	MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	0.020325	-2.29214
241420_at	---	---	0.0210525	2.2035
210187_at	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	0.0215257	2.27544
220368_s_at	SMEK1	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 (Dictyostelium)	0.0232721	-2.01025
226456_at	C16orf75	chromosome 16 open reading frame 75	0.0244141	2.02949

225496_s_at	SYTL2	synaptotagmin-like 2	0.0255919	-2.02564
243602_at	MGC40069	T cell receptor alpha variable 8-3	0.0274737	-2.30397
231181_at	---	---	0.0275803	-2.15314
227297_at	ITGA9	integrin, alpha 9	0.0281369	2.12043
1555226_s_at	C1orf43	chromosome 1 open reading frame 43	0.0281561	-2.00709
205316_at	---	---	0.0281713	-2.1635
228387_at	---	---	0.0285385	-2.01635
230753_at	PATL2	protein associated with topoisomerase II homolog 2 (yeast)	0.0286682	-2.03119
212062_at	ATP9A	ATPase, class II, type 9A	0.0301555	2.2058
234970_at	TC2N	tandem C2 domains, nuclear	0.031237	-2.02768
244579_at	---	---	0.0318601	-2.35818
239561_at	---	---	0.032464	-2.16351
1553635_s_at	TCTEX1D1	Tctex1 domain containing 1	0.0329094	2.01834
214798_at	ATP2C2	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 2	0.0335785	2.05725
239597_at	---	---	0.0339412	-2.41745
210139_s_at	PMP22	peripheral myelin protein 22	0.0341444	2.40572
202869_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0.0342125	-2.09378
221268_s_at	SGPP1	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	0.0346093	-2.18931
AFFX-r2-Bs- phe-5_at	---	---	0.0350083	-2.10995

226279_at	PRSS23	protease, serine, 23	0.0352103	-2.19732
209211_at	KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	0.0354535	2.16706
239264_at	---	---	0.0371071	-2.07911
220646_s_at	KLRF1	killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1	0.0375801	-2.30014
201946_s_at	CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	0.0375887	-2.02588
231093_at	FCRL3	Fc receptor-like 3	0.0380475	-2.20952
239285_at	---	---	0.0385164	-2.32457
236646_at	C12orf59	chromosome 12 open reading frame 59	0.0394208	2.22335
1554343_a_at	STAP1	signal transducing adaptor family member 1	0.039462	-2.08517
243824_at	---	---	0.0395217	-3.19073
209773_s_at	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	0.0411919	2.16849
213478_at	RP1-21O18.1	kazrin	0.0418567	2.18549
214567_s_at	XCL1 /// XCL2	chemokine (C motif) ligand 1 /// chemokine (C motif) ligand 2	0.0418867	-2.35692
235126_at	LQK1	LQK1 hypothetical protein short isoform	0.0429678	-2.51928
1553604_at	ABCA13	ATP-binding cassette, sub- family A (ABC1), member 13	0.0430177	2.15626
230337_at	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	0.043874	-3.01619

235879_at	MBNL1	Muscleblind-like (Drosophila)	0.0442698	-2.21193
1556173_a_at	---	---	0.0444416	-2.84974
1553605_a_at	ABCA13	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13	0.0448872	2.23186
227140_at	---	---	0.045019	2.35355
222608_s_at	ANLN	anillin, actin binding protein	0.0455414	2.0655
239108_at	FAR2	Fatty acyl CoA reductase 2	0.0471919	2.03331
1557240_a_at	---	---	0.0481452	-2.51763
243115_at	---	---	0.0483233	-2.31836
214119_s_at	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	0.0484366	2.15464
239811_at	---	---	0.0497422	-2.25714

KGVHH' da 64 gende sunum düzeyleri azalmasına karşın 44 genin sunumunda artış tespit edilmiştir. En yüksek anlamlı artışlar MYO10 (2.08 kat artış, $p= 0.0003$), ANKRD35 (2.49 kat artış, $p= 0.0003$), E2F8 (2.93 kat artış, $p= 0.0006$), H1P1 (2.15 kat artış, $p= 0.0008$), ST6GALNAC3 (2.9 kat artış, $p= 0.0008$) ve SPTBN1 (2.19 kat artış, $p= 0.0008$) genlerinde izlenmiştir. TRAF31P3 (2.03 kat azalış, $p= 0.00001$), ITGB1 (2.13 kat azalış, $p= 0.0002$), KLRC4//KLRC1 (3.23 kat azalış, $p= 0.0009$), FGFBP2 (3.25 kat azalış, $p= 0.001$), SPON2 (2.02 kat azalış, $p=0.001$) ve CCL4 (2.19 kat azalış, $p=0.001$) genlerinde belirgin azalma izlenmiştir (şekil 26).

Gruplar Arasında Farklı Eksprese Olan Genlerin Fonksiyonel Analizi

Tüm genom gen profilinin AGVHH’ de analizi bu genlerle ilgili olarak başta hücre siklusu ve morfolojisi olmak üzere farklı hücresel moleküler ve biyolojik fonksiyonların öne çıktığını ortaya koymaktadır (Çizelge 14). İki kat ve üstü anlamlı farklılık gösteren genleri GO Enrichment analizinde Forest grafiği immun sistem, hücresel iletişim ve metabolik işlemler ile ilgili genlerin ekspresyonlarının arttığını göstermektedir (Şekil 27).

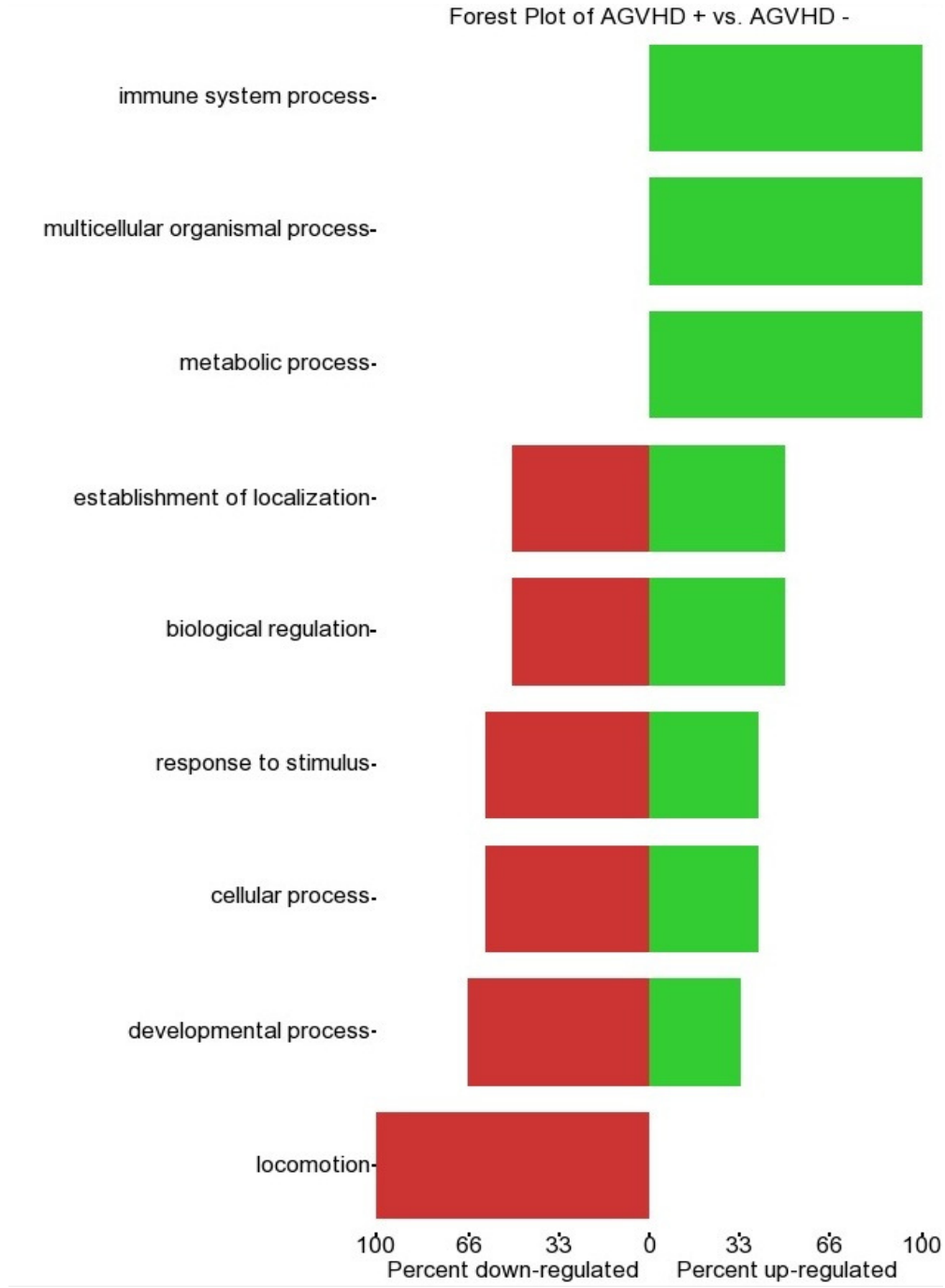
Çizelge 14. AGVHH gelişmesi ve KH ürünlerinin gen sunum profili arasında ilişki saptanan genlerin anlamlı ilişkili oldukları moleküler ve hücresel fonksiyonlar.

İsim	P değeri	Molekül Sayısı
Hücre siklusu	5,69E-04 - 5,69E-04	1
Hücre morfolojisi	5,69E-04 - 3,97E-02	3
Hücreden hücreye sinyal ve etkileşim	5,69E-04 - 4,90E-02	3
Hücresel organizasyon	5,69E-04 - 2,76E-02	3
Hücresel uyuma	5,69E-04 - 2,92E-02	3

IPKB veri tabanından elde edilen bilgiler ile bu prob setlerinin ilişkili olduğu biyolojik kanonikal (standart kabul edilmiş) yollar ve ilgili en anlamlı gen listesi sırasıyla çizelge 15 ve 16’ da verilmiştir.

Çizelge 15. AGVHH gelişmesi ve KH ürünlerinin gen sunum profili arasında ilişki saptanan genlerin ilişkili olduğu kanonikal yollar.

Kanonikal Yolak	P değeri	Oran
TREM1 Sinyal Yolağı	2,92E-02	1/69 (0,014)
Makrofajlarda CCR5 Sinyal Yolağı	3,59E-02	1/95 (0,011)



Şekil 27. AGVHH' na göre gen ekspresyon analizinde artış ve azalışları 2 kat ve üstü istatistiksel olarak anlamlı olan genlerin rol oynadığı hücresel faaliyetlerin 'Forest' grafiği ile sunumu.

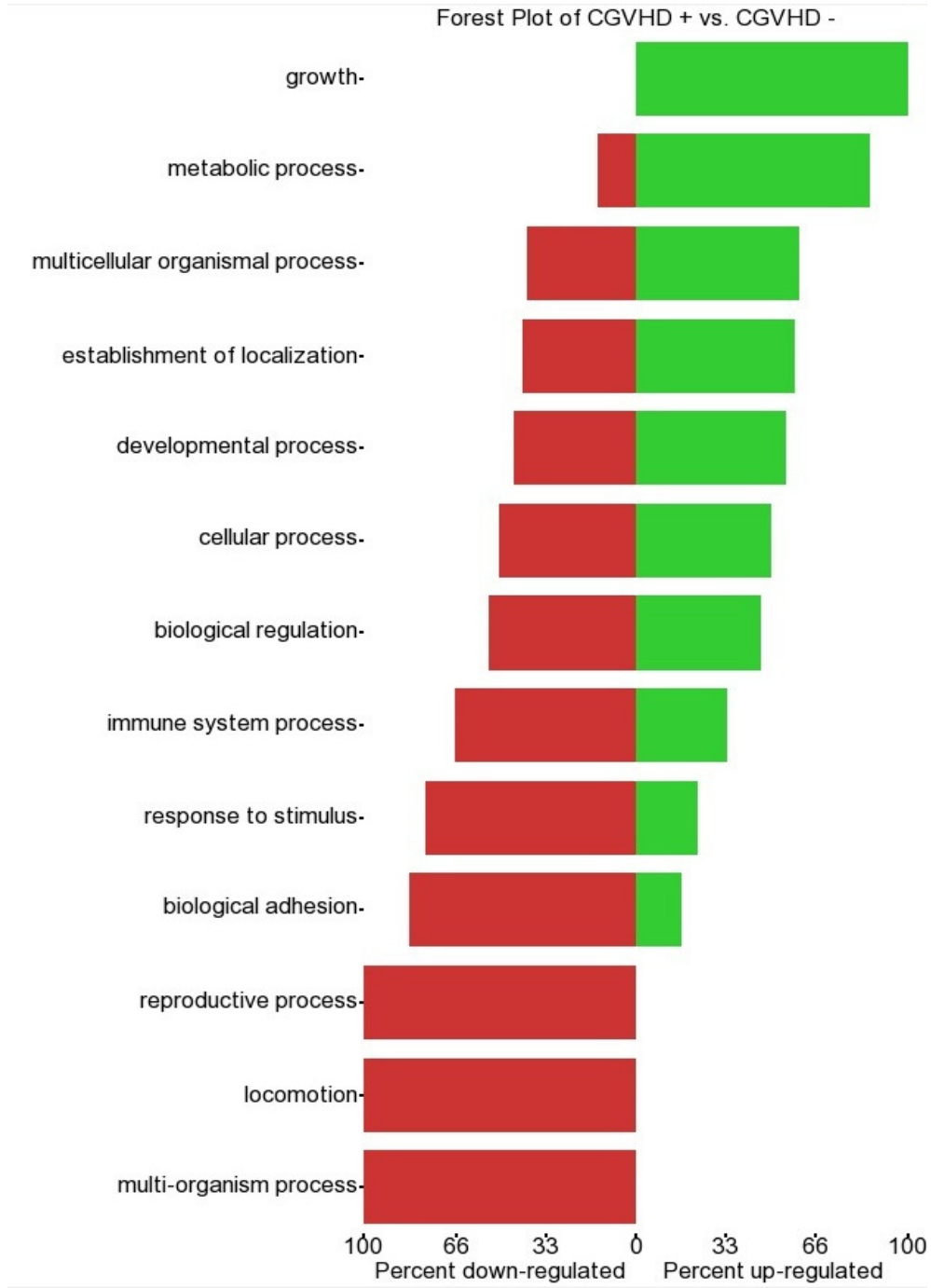
Çizelge 16. AGVHH' na göre KH ürünlerindeki gen sunum profili farklılıklarına göre en çok anlamlılık gösteren genler

Gen	Exp. Değeri
AMFR	2,53E-03
RNF144B*	1,05E-02
IRF5	1,15E-02
FAM46C (includes EG:54855)	1,45E-02
CCL3	1,58E-02
SNCA*	1,77E-02
SLC4A1	4,44E-02
TSC22D2	4,62E-02
TRIM58	4,80E-02

Buna karşın KGVHH' da başta hücresel büyüme ve proliferasyon, hücresel hareket, DNA replikasyonu, rekombinasyonu, onarımı ve hücre ölümü ile ilgili moleküler ve biyolojik fonksiyonların öne çıktığını göstermektedir (Çizelge 17). KGVHH' da immun sistem ile ilgili gen ekspresyonlarının azaldığı buna karşın büyüme ve metabolik işler ile ilgili anlamlı değişiklik gösteren genlerin ekspresyonlarının arttığı ortaya konmuştur (Şekil 28).

Çizelge 17. KGVHH' da anlamlı değişiklik gösteren genlerin anlamlı ilişkili oldukları moleküler ve hücresel fonksiyonlar.

İsim	P değeri	Molekül Sayısı
Hücresel Büyüme ve Proliferasyon	1,28E-06 - 1,61E-02	28
Hücresel Hareket	1,75E-05 - 1,90E-02	16
DNA Replikasyonu, Rekombinasyonu ve Onarımı	2,40E-05 - 1,61E-02	8
Hücre Ölümü	8,00E-05 - 1,79E-02	28
Hücresel Gelişim	1,02E-04 - 1,61E-02	19



Şekil 28. KGVHH’ da gen ekspresyon sunum artışı ve azalışları 2 kat ve üstü istatistiksel olarak anlamlı olan genlerin rol oynadığı hücrel faaliyetlerin ‘Forest’ grafiği ile sunumu.

Bu genler ile ilişkili kanonikal yollar AGVH gruplarından elde edilen sonuçlar ile farklılık göstermekte ve natural killer hücre, PTEN ve Myc aracılı apoptoz sinyal yollarının KGVH grupları arasında ekspresyon değişikliği gösteren genlerle ilişkili bulunmuştur (çizelge 18). Bu yollar ile ilişkili olarak en anlamlı bulunan genlerin listesi çizelge 19’da verilmiştir.

Çizelge 18. KGVHH gelişmesi ve KH ürünlerinin gen sunum profili arasında ilişki saptanan genlerin ilişkili olduğu kanonikal yollar.

Kanonikal Yolak	P değeri	Oran
Natural Killer Hücre Sinyal Yolağı	1,63E-02	3/116 (0,026)
PTEN Sinyal Yolağı	1,72E-02	3/123 (0,024)
Myc Aracılı Apoptoz Sinyal Yolağı	4,04E-02	2/64 (0,031)

Çizelge 19. KGVHH’ na göre KH ürünlerindeki gen sunum profili farklılıklarına göre en çok anlamlılık gösteren genler

Gen	Exp. Değeri
TRAF3IP3	1,47E-04
ITGB1*	2,12E-04
MYO10	3,58E-04
ANKRD35	3,84E-04
E2F8	6,78E-04
HIP1	8,21E-04
ST6GALNAC3	8,50E-04
SPTBN1	8,71E-04
KLRK1*	9,33E-04
FGFBP2	1,34E-03

5.5. Tartışma, sonuç ve öneriler

Değişik mobilizasyon rejimleri (grup I, II ve III) ile elde edilmiş kök hücre ürünlerinde akım sitometre ile ayrıştırılan HKH' lerde yüzey immunfenotipik farklılıkları araştırdığımız çalışmamızda; en yüksek oranlarda CD31, CD44, CD90, CD117 ve CD135 sunumları saptarken en düşük oranlarda CD18, CD38, CD62e ve CD62L sunumları olduğunu saptadık. Gruplar arasında antijen sunumları farklı bulunmadı (tablo 1). Bilindiği gibi CD90 (Thy-1), CD117 (c-kit- stem cell faktör reseptörü) ve CD135 (FLT3- FLT3 ligand reseptörü tirozin kinaz) HKH' lerde yapısal olarak sunulmaktadır. Sonuçlarımız bir hücre adezyon reseptörü (hyaluronat reseptörü) olan CD44 ile, yine adezyon ve angiogenezde önemli rol oynayan CD31 antijeninin de mobilize periferik kan CD34pozitif hücrelerde yüksek oranda sunulduğunu göstermektedir. Bazı çalışmalarda G-CSF ile mobilizasyonun kök hücrelerde CD117 sunumunu azalttığı bildirilmiş ise de çalışmamızda tüm gruplarda yüksek oranda CD117 sunumu saptanmıştır. HKH lerde CD38, CD11a ve CD18, E ve L selektin sunumlarının düşük bulunması yüksek oranda ayrıştırma yapılmasının sonucu olarak ortaya çıkabilecektir. Son yıllarda kök hücre – mikroçevre ilişkilerinde önemli rolü olduğu belirlenen Tabloda görüldüğü gibi CD184 (CXCR4) antijeni CD34pozitif kök hücrelerde nispeten yüksek oranda sunulmaktadır. Bu durum büyüme faktörlerinin CXCR4 sunumuna etkilerinin nispeten sınırlı olması ile uyumlu olabilir.

Kemoterapi ve büyüme faktörü (grup II ve III) ve tek başına büyüme faktörü (grup I) ile mobilize HKH' lerin CD sunum oranları farklı bulunmadı. Kemoterapi + büyüme faktörü (grup II + III) ile mobilize HKH' lerin CD90/CD62e sunum oranları ile nötrofil yamanma süreleri arasında ($r= 0.48$, $p= 0.01$, şekil 12) ilişki bulundu. Bu gruplarda yapılan nakillerde; CD90/CD62e sunumu yüksek olan HKH' ler ile yapılan nakillerde nötrofil yamanma sürelerinde gecikmeler olabileceği nakil ekibi için uyarıcı olabilecektir.

Tüm gruplara ait HKH CD31 sunumları ile hem lökosit (şekil 14) hem de trombosit (şekil 15) yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı. HKH' lerin CD31 sunumu düştükçe hastaların yamanma sürelerinde uzama meydana geldiği için nakil ekibi önceden

gerekli önlemleri planlayabilmelidir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmada CD31 polimorfizmi ile GVHH arasında ilişki bildirilmiştir (12). Literatür ile birlikte değerlendirildiğinde, integrinlerin aktivasyonunda ve lökositlerin transendotelyal migrasyonunda rol alan CD31 (diğer adıyla Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)'in, bu özelliklerinden dolayı rutin olarak bakılmasının uygun olabileceği düşünülmüştür. CD31 sunumu yüksek olan HKH' ler gerek integrin aktivasyonu gerekse transendotelyal migrasyonunu (13) daha yüksek oranda gerçekleştirerek homing oranlarını arttırabildikleri düşünülecek olursa yamanma sürelerinde kısalma saptamamız bizim için şaşırtıcı bir sonuç olmamıştır.

Tek başına büyüme faktörü ile mobilize (grup I) HKH' de, CD11a (β_2 integrin α_L zinciri, leukocyte function antigen-1) ve CD31/CD11a sunumları ile nötrofil yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı (şekil 15, 16). β_2 integrin' ler HKH' lerin adezyon ve transendotelyal migrasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (14). Gerek CD11a gerekse yukarıda tartışıldığı şekilde CD31 ile birlikte CD11a sunumu fazla olan hücrelerin homing sürecinin ilk basmağında kendilerine avantaj sağlayarak yamanma sürelerini kısalttıkları sonucuna varılmıştır. Kemoterapi ile mobilize HKH' de bu ilişkinin saptanmaması kemoterapi uygulamaları ile HKH' de CD11a ve CD31/11a sunumlarında değişiklikler meydana gelmesi ile açıklanabilir.

Grup II (Endoksan + büyüme faktörü ile mobilize) hastalarda; HKH' lerin CD18 (şekil 17) ve CD18/CD31 (şekil 18) sunumları ile hastaların trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptandı. β_2 integrin beta zinciri olan CD18 yukarıdaki paragrafta tanımladığımız CD11a ile birlikte HKH' nin adezyon ve transendotelyal migrasyonunda önemli rol oynamaktadır. Yüksek oranda Gerek CD18 gerekse CD18/CD31sunan HKH' ler homing sürecinin ilk bölümünde kendilerine avantaj sağlayarak yamanma sürelerinde anlamlı kısalmalara neden olabilmektedir. HKH' lerin CD117/CD44 sunumları ile trombosit yamanma süreleri ile arasında tersine (şekil 19) ilişki bulunması, HKH' lerin 'tethered' döneminde rol oynayan CD 44 (11) ve ile CD117 (laboratuar koşullarında IL8' e kemotaktik yanıt veren CD117 (111 in 27)) nin birlikte sunumu ile ilişkili olabilir. Bu etkiler mobilizasyonda kullanılan kemoterapötikler içinde altın standart olarak bilinen

Endoksan ile izlenirken diğer uygulamalarda izlenmemiştir. Endoksan ile mobilizasyonuda bu kadar değerli kılan belki de HKH' de CD18 ve CD18/CD31 sunumlarını etkilemesidir.

Grup III (ESHAP veya benzeri kemoterapi + büyüme faktörü ile mobilize) hastalarda; HKH' de birlikte CD184/CD38 sunumu ile hastaların nötrofil yamanma süreleri arasında (şekil 20) ilişki saptandı. CD184 (CXCR4 reseptörü)' in tek başına sunumlarında pozitif veya tersine ilişki saptanmazken birlikte fazla oranda CD184/CD38 sunan HKH' ler ile yapılan nakillerde klinik olarak çok fark olmasa (minimum 9 gün, maksimum 12 gün) da yamanma sürelerinde gecikme saptanmıştır. Bu bulgu yamanmaların önemli geciktiği hastalarda test edilmelidir. Trombosit yamanma süreleri ile CD117 (şekil 21) ve CD117/CD44 (şekil 22) sunumları arasında grup 2 hastalara benzer şekilde tersine ilişki bulundu. Bunun Tethered döneminde görev alan CD44 (112) ile laboratuvar koşullarında IL8' e kemotaktik yanıt veren CD117 (111 in 27) sunumları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda gerek mobilizasyon gerekse homing üzerine etkileri ortaya konan CD184 (CXCR4 reseptörü, şekil 1) sunumlarında farklı mobilizasyon rejimleri ile elde edilmiş HKH' de anlamlı fark saptamamız (tablo 1), kullandığımız rejimlerinin CD184 sunumlarında negatif bir etkiye neden olmadığını ortaya koymuştur. CD184 sunum (% 20 üstü ve altı) oranlarına göre gerek nötrofil (şekil 23) gerekse trombosit (şekil 24) yamanma sürelerinin farklı bulunmaması, homing sürecinin tek başına CD184 – CXCL12 ilişkisi ile açıklanamayacağını ve süreçte ek faktörlerin olabileceğini düşündürmektedir.

Tek başına büyüme faktörü ile mobilize edilmiş kök hücre ürünlerinin gen profilinin gerek akut gerekse kronik GVHH ile ilişkisi literatürde ilk olarak projemizde araştırılmıştır. Gerek akut gerekse kronik GVHH' da farklı gen değişiklikleri ortaya konmuştur (çizelge 12, çizelge 13, şekil 25, şekil 26). Genel olarak özetlenecek olursa; (a) kök hücre ürünlerindeki immun sistem, hücrel iletişim ve metabolik süreçler ile ilgili genlerin sunumlarındaki artışın AGVHH (şekil 27), (b) büyüme ve metabolik süreçler ile ilgili genlerin sunumlarındaki artışın' da KGVHH (şekil 28) ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak; gruplara göre mobilize HKH' in yüzey immun fenotipik özelliklerinde fark saptamadık. HKH' lerin CD31 sunumları ile hem nötrofil hem de trombosit yamanma süreleri arasında tersine ilişki saptanması literatürde ilk kez ortaya konmuş olup, CD31' in homing sürecine katkısı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. HKH' lerin CD184 sunumu ile yamanma süreleri arasında ilişki saptanmaması ve CD184 sunumu negatif olan hastalarda bile yamanma sürelerinin farklı bulunmaması, homing sürecinde CD184' e ek faktörlerinde (CD31 gibi) etkili olabileceğini düşündürmektedir. Homing sürecindeki diğer CD sunumlarının da araştırılması ve özellikle çalışmamızda bizim önemini saptadığımız CD31 sunumlarının da ayrıntılı araştırılmasının uygun olabileceği düşünülmüştür.

5.6. Teşekkür:

Projemizi destekleyerek gerçekleşmesini sağlayan Fakülte yönetimine, AREL yönetim koruluna ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonu Başkanlığına teşekkür ederiz.

Örneklerin çalışılması aşamasında zaman sınırlaması tanımadan, hafta sonu, mesai saati demeden ve büyük bir özveri göstererek bazen saatlerce süren “sorting” ve diğer işlemleri titizlikle uygulayan Özge Tokul, Tayyibe Yeni, Elvan Kurt, Latife Nurten Çetiner ve Serap Güven Top^ a en içten teşekkürlerimizi sunmayı bir borç biliriz.

Hastalardan toplanan kök hücre ürünlerinin kayıtlarının tutulması, örneklerin düzenli olarak AREL laboratuvarına gönderilmesini sağlayan aferez ünitesi sorumlu hemşiresi Yük. Hem. Bahar ARIK ve hemşire Ayser Mesut’a çalışmaya katkılarından dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

PAYLAŞILAN GÖREVLER

Murat Tombuloğlu: Çalışmanın planlanması ve yürütülmesi, örneklerin temini ve metin yazımı

Ayhan Dönmez: Çalışmanın planlanması ve yürütülmesi, örneklerin temini, istatistik değerlendirmelerin yapılması ve metin yazımı

Hakan Aydın: Mikroarray planlaması, değerlendirilmesi

Okan Gülbahar: Akım sitometri işlemlerinin kontrolü ve sonuçlarının değerlendirilmesi

Seçkin Çağırğan, Filiz Vural: Örnek temini

5.7. Kaynaklar:

1. Appelbaum FR. Hematopoietic cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007;357(15):1472-1475.
2. Can A. Kök hücre nişleri. Yapı – İşlev ilişkisi. 4. Ulusal kemik iliği transplantasyonu ve kök hücre tedavileri kongresi. 1 – 4 Mart 2007, Uludağ, Bursa. Kongre konuşma metinleri kitabı. Sayfa: 15 – 16.
3. Forsberg EC, Berdan SS. Parsing the niche code: the molecular mechanisms governing hematopoietic stem cell adhesion and differentiation. *Haematol* 2009;94:1477-1481.
4. Grathwol A, Wodnar-Filipowicz A. A freeway to stem cells. *Blood* 2008;112:923-924.
5. Bensinger W, DiPersio JF, McCarty JM. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:181–195.
6. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005;106:3020-7.
7. Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Deych E, Holt MS, Ritchey JK, DiPersio JF. BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2009;114:1340-3.
8. de Boer F, Dräger AM, Van Haperen MJ, van der Wall E, Kessler F, Huijgens PC, Pinedo HM, Schuurhuis GJ. The phenotypic profile of CD34-positive peripheral blood stem cells in different mobilization regimens. *Br J Haematol*. 2000;111:1138-44.
9. OH SJ, Cho SB, Park SH et al. Cell cycle and immune related processes are significantly altered in chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:1047-1057.
10. Baron C, Somogyi R, Greller LD et al. Prediction of graft versus host disease in humans by donor gene expressing profiling. *Plosmedicine*. 2007;4:69-83
11. Buzzeo MP, Yang J, Casella G, Reddy V. A preliminary gene expression profile of acute graft versus host disease. *Cell transplant*. 2008;17:489-94.

12. Cavanagh G, Chapman CE, Carter V, Dickinson AM, Middleton PG. Donor CD31 genotype impacts on transplant complications after human leukocyte antigen-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*. 2005;79(5):602-5.
13. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells. A prerequisite for cell therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2008;45:514–522.
14. Laird D, vonAndrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*. 2008;132:612-630.