TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOTELYAL PROGENİTOR HÜCRELERİN rhG-CSF İLE MOBİLİZASYONU VE AFEREZ İLE TOPLANAN ÜRÜNDEKİ MİKTARI

Özlem KARACAOĞLU

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Önder ARSLAN

2010-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOTELYAL PROGENİTOR HÜCRELERİN rhG-CSF İLE MOBİLİZASYONU VE AFEREZ İLE TOPLANAN ÜRÜNDEKİ MİKTARI

Özlem KARACAOĞLU

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Önder ARSLAN

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri tarfından 09B 333 000 5 proje numarası ile desteklenmiştir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 06.04.2009 ve 149- 4615 kararı ile etik onayı alınmıştır.
2010-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Hemaferez Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18.02.2010

Prof. Dr. Önder ARSLAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Osman İLHAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Rüçhan AKAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Pervin TOPÇUOĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Ender SOYDAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İçindekiler **iii**

Önsöz **v**

Simgeler ve Kısaltmalar **vi**

Şekiller **vii**

Çizelgeler ve Grafikler **viii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kök Hücreler 1

1.1.1. Kök Hücre Türleri 3

1.2. Endotelyal Öncül Hücreler 5

1.2.1. Endotelyal Öncül Hücrelerin Özellikleri 6

1.2.2. Endotelyal Öncül Hücrelerin Kemik İliğinden Mobilizasyonu 7

1.2.3. Vasküler Patolojilerde Endotelyal Öncül Hücrelerin Yeri 8

1.2.4. Endotelyal Öncül Hücrelerin Terapötik Kullanımı 9

1.3. Amaç 10

2. GEREÇ VE YÖNTEM **11**

2.1. Örnekleme 11

2.2. Vericilerin Mobilizasyonu 11

2.3. Allojeneik Periferik Kök Hücre Toplanması 12

2.4. Akan Hücre Ölçer ile Analiz 12

2.4.1. Kullanılan Sarf Malzemesi 12

2.4.2. Kullanılan Cihazlar 12

2.4.3. Kullanılan Yazılım 13

2.4.4. Yöntem 13

2.4.5. Verilerin Analizi 14

2.4.6. İstatistik 15

3. BULGULAR 16

3.1. Endotelyal Öncül Hücreler 17

3.2. Aferez Ürünündeki Endotelyal Öncül Hücreler 19

3.3. Kök ve Öncül Hücrelerdeki Endotelyal Öncül Hücre Dağılımı 19

4. TARTIŞMA 20

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 24

ÖZET 25

SUMMARY 27

KAYNAKLAR 29

ÖZGEÇMİŞ 33

ÖNSÖZ

Tez konumun seçimi ve oluşturulmasında emeği geçen tez danışmanım Prof. Dr. Önder Arslan'a, tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Pervin Topçuoğlu'na, Hematoloji Laboratuvarı'nın tüm olanaklarını çalışmamız için kullanan Uz. Dr. Klara Dalva ve çalışanlarına, örnek toplama sürecinde yardımlarını eksik etmeyen Hemaferez Ünitesi Teknik Sorumlusu Uz.Bio.Erol Ayyıldız'a, Uz.Bio.Meltem Bay'a ve ünitede görevli hemşirelere, sağlık ve destek personeline; eğitimim süresince manevi desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dekanı, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Gülsan Türköz Sucak'a, Gazi Üniversitesi Öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Şahika Zeynep Akı'ya, Gazi Üniversitesi Kök Hücre Nakil Ünitesi'nde görevli çalışma arkadaşlarım Çiğdem İlhan ve Talat Babayiğit'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Öğrenim hayatım boyunca maddi manevi destekleri ve sevgileri ile her zaman yanımda olan çok değerli aileme ve sevgili eşime teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC : **A**llo**p**hyco**c**yanin

CD : **C**luster of **D**ifferentiation

EPH : **E**ndotelyal **P**rogenitor **H**ücre

FCS : **F**etal **C**alf **S**erum

FITC : **F**luorcein **I**so**t**io**c**yanate

HKH : **H**ematopoetik **K**ök **H**ücre

PBS : **P**hosphate **B**uffered **S**aline

PE : **P**hyco**e**rythrin

PerCP : **Per**idinin **C**hlorophyll **P**rotein

PKH : **P**eriferik **K**ök **H**ücre

rhG-CSF : **R**ecombinant **H**uman **G**ranulosite **S**timulating **F**actor

SSC : **S**ide **Sc**atter

VEGFR-2 : **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor-2

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Çeşitli Kök Hücre Tipleri **3**

Şekil 1. 2. Asimetrik Hücre Bölünmesi **4**

Şekil 1. 3. Endotelyal Hücrelerin Kaynağı ve Farklılaşması **8**

Şekil 2. 1. EPH' lerin Akan Hücre Ölçerle Gösterilmesi **14**

ÇİZELGELER VE GRAFİKLER

Çizelge 3. 1. Sağlıklı kişilerde bazal durumda dolaşımdaki HKH ve EPH dağılımı. 16

Çizelge 3. 2. Lökosit sayına göre hücre miktarlarının mobilizasyon öncesi ve sonrası karşılaştırılması. 16

Çizelge 3. 3. Lökosit sayına göre hücre miktarlarının mobilizasyon öncesi ve ürün karşılaştırması. 17

Çizelge 3. 4. Aferez ürünündeki hücre miktarlarının hasta ve verici vücut ağırlığına göre dağılımı. 19

Çizelge 3. 5. Kök ve öncü hücrelerdeki EPH'lerin karşılaştırılması. 19

Grafik

Grafik 3. 1. İmmatür ve matür EPH miktarlarının karşılaştırılması. 18

1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

Kök hücre basitçe düşünüldüğünde yaşamın kaynağıdır. Patolojinin öncülerinden Dr. Rudolph Virchow'un dediği gibi "her hücre bir hücreden meydana gelir (omnis cellula e cellula)". Bu zincirin en başında döllenmiş ovum bulunmaktadır. İki haploid gamet hücresinin çok özgün bir araya gelişiyle meydana gelen ve zigot adını alan bu oluşum, canlılardaki en yetkin farklılaşma kapasitesine sahip olan hücredir; kısa süre içinde önce embriyonun sonra da tüm dokuların oluşmasına öncülük etmektedir. Kök hücre bir yandan kendi yedeğini meydana getirirken, bir yandan da yenilenecek dokunun gereksinimi olan ve farklılaşma yönünde ilerleyecek hücrelere dönüşmektedir. Yetişkin dönemde de kök hücreler çeşitli organ ve dokularda bulunmaktadır. Örneğin; olgun kan hücreleri kemik iliğinde yer alan hematopoetik kök hücrelerden köken alırken, bağırsak epitelinin her üç-dört günde yenilenen hücreleri bağırsak kriptalarının dibinde yer alan kök hücrelerden oluşmaktadır. Günümüzde kök hücrelerin kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle bazı hastalıkların tedavisinde kullanılması önemli bir konu olarak gündeme gelmektedir. Kök hücre araştırmaları istenilen doğrultuda geliştiğinde, bazı hastalıklar hücre düzeyinde tedavi edilebileceği gibi hücre ve organ nakli içinde kök hücre yeni bir kaynak oluşturacaktır.(CAN, 2009; BERFOOT et al, 2005).

Kök hücreler vücuttaki diğer hücrelerden farklıdır. Kök hücrelerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

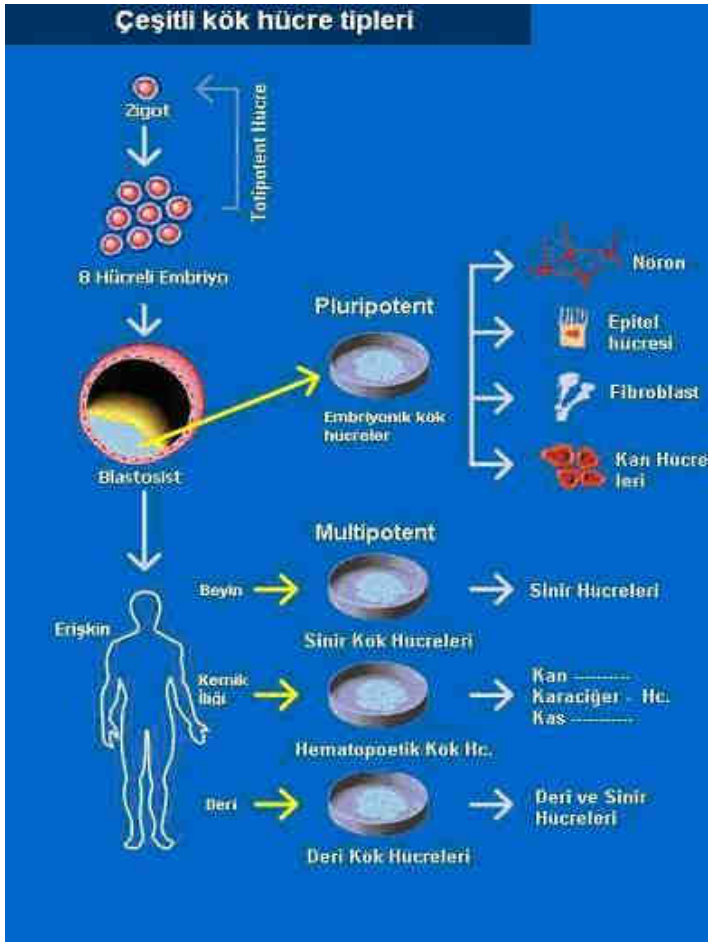
a) Kök hücreler bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptir.
b) Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Kök hücrenin en önemli özelliklerinden biri bu hücrenin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokunun yapısına sahip olmamasıdır.

c) Kök hücreler özelleşmiş hücrelere kaynaklık etmektedir.

Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonel hücrelere totipotent hücreler denir (Şekil 1. 1). Totipotent hücreler teorik olarak tam bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir. Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde bu hücreler blastosiste dönüşmektedir. Blastosist; trofoblast, blastosol boşluğu ve embriyoblast (iç hücre kitlesi) olmak üzere üçlü bir yapıyı içermektedir. Embriyoblastlar, endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan pek çok hücre çeşitine kaynaklık etmektedir. Bu özelliğe sahip kök hücrelere pluripotent hücreler denir (Şekil 1. 1). (KAUFMAN et al, 2001).

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde hücreler biraz daha özelleşmiş görevler edinip erişkin kök hücrelere dönüşmektedir. Erişkin kök hücre yer aldığı dokunun hücre tiplerini üretmektedir. Örneğin kemik iliğindeki bir hematopoetik kök hücre eritrosit, lökosit ve trombosit gibi pek çok değişik kan hücresine kaynaklık etmektedir. Biraz daha özelleşmiş bu hücrelere multipotent hücreler adı verilmektedir (Şekil 1. 1).

Sadece tanımlanan hücre tipine dönüşebilen hücreler de öncül (progenitör veya prekürsor) hücreler olarak adlandırılmaktadır. (YOUNG et al, 2004).



Şekil 1. 1. Çeşitli kök hücre tipleri (KÖGEM)

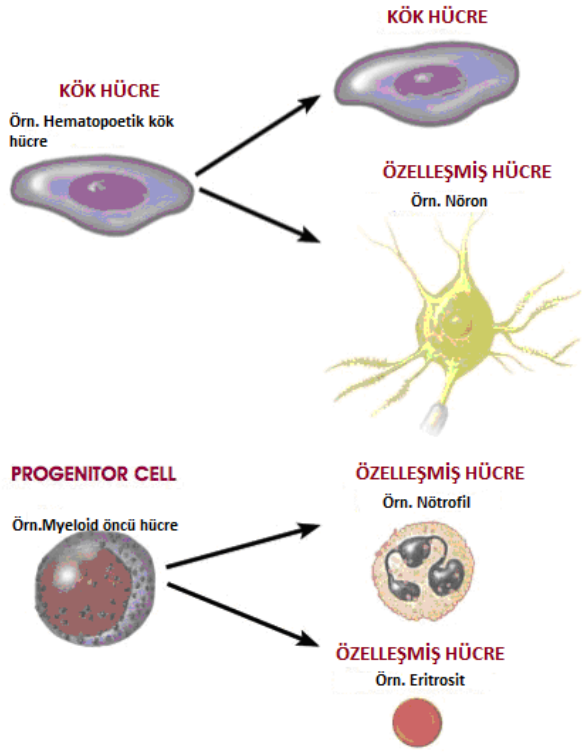
1.1.1. Kök Hücre Türleri

Embriyonik dönemin başlamasıyla, sarı kese adı verilen primitif dokuda embriyonel kök hücreleri, daha sonra bebeğin doğum anında göbek kordonundaki kordon kanı kök hücreleri ve doğum sonrası dönemde erişkin kök hücreleri olmak üzere yaşamın belirli dönemlerinde değişik kök hücreler bulunmaktadır.

Zigotun birbirini izleyen beş altı kez bölünmesiyle blastosist oluşmakta, bu aşamadaki hücreler bütün organizmayı oluşturmak üzere giderek çoğalmakta ve farklılaşmaktadır. Embriyonik blastosistlerin iç hücre tabakasından in vitro olarak elde edilebilen pluripotent bu hücrelere embriyonik kök hücre adı verilmektedir. (CAN, 2009).

Gelişmekte olan organizmada embriyonik kök hücrelerden söz etmek mümkün değildir. Başta kemik iliği olmak üzere çeşitli organlarda ve belirli doku bölgelerinde gerektiğinde kendini çoğaltabilen hücreler varlığını sürdürmektedir. Bunlara da erişkin kök hücreleri adı verilmektedir. Erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretmektedir. Hematopoetik kök hücreler (HKH) buna en iyi örnektir. (BELLANTUONO, 2006).

Embriyonel gelişim sırasında HKH'ler önce sarı keseden fetal karaciğere sonra dalak ve kemik iliğine göç etmektedir. HKH'ler kendini yenileyebilme ve kan hücre serilerine dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Kemik iliğindeki bu hücreler asimetrik hücre bölünmesi ile birbirinden farklı özellikte iki hücre meydana getirmektedir. Bu hücrelerin biri HKH'lerin devamını sağlarken diğeri öncül hücreyi oluşturmaktadır (Şekil 1. 2).



Şekil 1. 2. Asimetrik hücre bölünmesi (Terese Winslow, Lydia Kibiuk,2001)

HKH'lerin fenotipik karakterizasyonu yüzeylerindeki antijenik ekspresyonla yapılmaktadır. HKH'ler CD34 antijeni ekspresyonu gösterirken, CD38 ve CD45

antijeni ekspresyonu göstermemektedir. Kemik iliğindeki hücrelerin %0,1'i CD34+ CD38- fenotipinde olan HKH'lerden oluşmaktadır. (WEİSSMAN and SHİZURU, 2008).

Son dönemde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar; HKH'lerin uygun çevresel koşullarda plastisite özellikleri sayesinde kas hücreleri, kardiyomyositler, endotel hücreler ve diğer hücre serilerine dönüşebileceğini göstermektedir. (ORLİC et al, 1999).

HKH'ler mezodermal kaynaklı endotel hücrelerine de dönüşebilmektedir. Son çalışmalar endotelyal kök hücrelerinin erişkin dönemde de var olduğunu, angiogenezis ve vaskulogenezisten sorumlu olduğunu desteklemektedir. Öncül endotel hücreleri kemik iliği ve dolaşan kandan izole edilebilmektedir. (BARON, 2001).

Kök hücrelerin bir bölümü ise, özellikle son yıllardaki onarımsal tıptaki yerlerinin artmasıyla birlikte fetustan elde edilir ve saklanır hale gelmiştir. Bu hücrelere de fetus kök hücreleri adı verilmektedir. (CAN, 2009).

1.2. Endotelyal Öncül Hücreler

Vaskuler sistemin gelişimi pek çok türde embriyonik gelişim esnasında tamamlanmaktadır. Bu süreç esnasında, bölgesel mezodermal hücreler damar ağını oluşturmak için vaskuler ve endotelyal hücrelere farklılaşmaktadır. Günümüzde dolaşan endotelyal hücrelerin tanımlanması ile vaskulogenezisin yalnızca embriyonik gelişime özgü olmadığı ve doğumdan sonra yeni doğan döneminde de devam ettiği düşünülmektedir. Yaklaşık 10 yıl önce iki farklı grup, in vivo ve in vitro fare modellerinde dolaşımdaki kan, göbek kordon kanı ve kemik iliğinden izole edilen CD34+ hücrelerin endotelyal hücrelere dönüşebildiğini göstermiştir. Sonraki çalışmalarda tümör bölgeleri, iyileşen yaralar, bacak iskemisinde ve deneysel myokard iskemi modellerinde kan damarlarının onarılmasında kemik iliği kaynaklı hücrelerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmalar endotelyal öncül (progenitör) hücrelerin (EPH) endotelyal rejenerasyonda ve angiogenezde fonksiyon gösterdiklerinin kanıtıdır. Hematopoetik dokular arasında öncül hücrelerden kaynaklanan EPH'ler gelecek yıllarda vasküler hastalıkların tedavi yöntemleri arasına girmeye adaydır. Doğumdan sonra yeni doğan döneminde de fonksiyonlarını devam ettirdikleri anlaşılan EPH'ler kemik iliğinde olgunlaşıp, dolaşıma katılarak vasküler hasarın olduğu bölgelerde hasarın tamir edilmesinde rol almaktadır. EPH'ler kemik iliğinden dolaşıma katıldıktan sonra hücre yüzey belirleyicilerinde değişiklikler geçirerek olgun (matür) endotel hücrelere dönüşmektedir. Günümüzde EPH'lerle ilişkili hem klinik hem de deneysel çalışmalar oldukça artmıştır. Fakat EPH'lerin olgunlaşmasını, göçünü ve hasarlı bölgeye yerleşmesini sağlayan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. (ASAHARA et al, 1997).

1.2.1. Endotelyal Öncül Hücrelerin Özellikleri

Nekroz, apoptoz ve kopma yoluyla damarda oluşan iskemi sonucu açık kalan kısım ya mevcut hücrelerin bölünmesiyle ya da dolaşımdaki öncül hücrelerin bu bölgeyi onarmasıyla kapatılmaktadır. Normal şartlarda kanda ml başına 1- 3 tane damar duvarından kopmuş endotel hücre bulunmakta ve bu kopmuş endotel hücrelerin yerlerine yenilerinin konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Aşırı endotel yapımı ihtiyacı belirdiğinde ise mevcut hücrelerin bölünme hızı yetmemekte ve kemik iliğinden dolaşıma öncül hücreler mobilize olmaktadır. (DOMİNİK and GANZ, 2002)

EPH'ler, endotel hücreler ve HKH'ler bir takım ortak yüzey belirleyicileri taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda EPH'lerin, endotel hücre belirleyicisi olan vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2'yi (VEGFR- 2) ve HKH belirleyicisi olan CD34'ü taşıdıkları gösterilmiştir. Ancak çok düşük oranda da olsa endotel hücreleri de CD34 yüzey belirleyicisini taşıyabildiğinden EPH ile endotel hücreyi ayırabilmek için özel bir yüzey belirleyicisi arama ihtiyacı duyulmuştur.

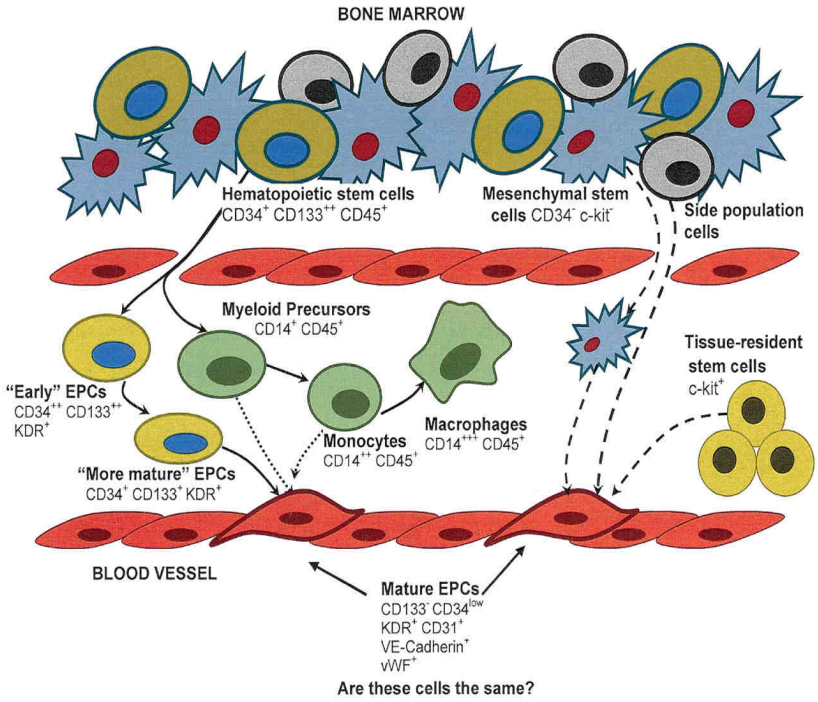
Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki olgunlaşmamış (immatür) EPH'ler yüzey belirleyici CD133'ü taşırken, olgunlaşma sürecinde bu belirleyiciyi kaybederek olgun (matür) endotel hücreye dönüşmektedir. (URBİCH and DİMMELER, 2004)

1.2.2. Endotelyal Öncül Hücrelerin Kemik İliğinden Mobilizasyonu

EPH'ler yaşamın doğumdan sonraki sürecinde de var olan mononükleer hücrelerdir. Erişkin sağlıklı vasküler sisteminde endotel hücrelerin bölünme hızı göreceli olarak düşüktür. Normal koşullarda dolaşımda bulunan EPH'ler dolaşımda bulunan tüm hücrelerin ~ %0,01'i kadardır. Sağlıklı bir erişkinde EPH'ler belirli oranda endotel hücre bütünlüğünün yeniden yapılanmasına katkıda bulunmaktadır.

EPH'ler kemik iliğinin vasküler bölgesinde depolanmakta ve sabit bir hızla dolaşıma katılmaktadır. Aynı zamanda bu depo ihtiyaç halinde dolaşıma gerektiği kadar EPH sağlamaktadır. EPH'lerin dolaşıma katılmasına neden olan birçok patolojik ve fizyolojik etken mevcuttur. Bu olaylar sırasında ortaya çıkan aracı moleküller kemik iliğini uyararak EPH'leri mobilize etmektedir. Bu olaylar içinde EPH'lerin dolaşıma salınmalarını artıran en önemli sebep doku iskemisidir. Kemik iliğinde oluşan EPH'ler çeşitli mediyator ve proteinlerin etkisi ile kemik iliğinin vasküler bölgesine geçerek burada çoğalmakta ve mobilize olmaktadır (Şekil 1. 3). (TEPPER et al, 2003)

Kemik iliğinden mobilize olan EPH'ler hasarlı bölgeden salınan bazı faktörler sayesinde o bölgeyi tespit etmekte burada hasarlı damar duvarının tamirinde görev almaktadır.



Şekil 1. 3. Endotelyal hücrelerin kaynağı ve farklılaşması (SHANTSİLA E., 2007)

1.2.3. Vasküler Patolojilerde Endotelyal Öncül Hücrelerin Yeri

Yeni damar oluşumunda bu kadar önemli role sahip olan EPH'lerin damar hastalıklarında nasıl bir değişikliğe uğradığı da merak konusu olmuştur. EPH sayısında veya fonksiyonunda görülen değişiklik birçok patoloji ile ilişkilendirilmiştir.

Tümörlerde yeni damar oluşumunda EPH'lerin rolü olduğu kanıtlanmıştır. Asahara ve arkadaşlarının çalışmasında tümörlerde yoğun miktarda EPH'lere rastlanmıştır. Ayrıca tümör gelişiminde EPH'lerin önemli bir etkiye sahip oldukları da gösterilmiştir. Bu çalışmalar araştırmacıları kanserde yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeye yöneltmiştir. (LYDEN et al, 2001)

Dolaşımda bulunan EPH sayısının azlığı ile kardiyovasküler hastalık gelişimine neden olabilecek endotel tamir kapasitesinin düşüklüğü arasında bağlantı bulunmuştur. (HİLL et al, 2003) Bir başka araştırmada koroner arter hastalarında EPH sayısının azaldığı ve göç kabiliyetinin bozulduğu gösterilmiştir. EPH'lerde

görülen bu patolojik değişikliklerin kardiyovasküler risk faktörleriyle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. (VASA et al, 2001)

Yapılan çalışmalarda eritropoetinin ve östrojenin EPH mobilizasyonunu sağladığı, bunun yanında sitatinlerin de EPH çoğalmasını ve göç etme kabiliyetini artırdığı görülmüştür. Tüm bunlara ek olarak yaşlanmayla birlikte EPH sayısında ve fonksiyonlarında azalma birçok kez kanıtlanmıştır. (HEESCHEN et al, 2003)

1.2.4. Endotelyal Öncül Hücrelerin Terapötik Kullanımı

Günümüzde EPH'ler kardiyovasküler hastalıkların, tümörlerin tedavisinde ve doku graftlarında terapötik olarak kullanılmaya aday hücreler olarak görülmektedir. Özellikle vasküler graftlarla ilgili çalışmalarda EPH'lerin injekte edildiği vasküler graftların injekte edilmeyenlere göre daha fazla yüzey endotelizasyonu ve vaskülarizasyon gösterdikleri ve stabilitelerini daha uzun süre korudukları saptanmıştır. (KAUSHAL et al, 2001)

İskemi modelleri yaratılan sıçanlarda EPH nakli sonrasında EPH'lerin olgun endotel hücrelere dönüşerek iskemi bölgelerinde neovaskülarizasyonu önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. (KALKA et al. 2000)

Yine sıçanlarda serebrovasküler olayların tedavisi amacıyla kullanılan EPH'lerin yeni damar oluşumuna çok önemli katkı sağladıkları gösterilmiştir. (ZHANG et al, 2002)

Geçmişte yapılan araştırmalarda kardiyomiyositlerden oluşan hücre tabakalarının iskemik kalp hastalığında ve kardiyomiyopatilerde kardiak fonksiyonunu artırdığı gösterilmiştir. EPH'lerin ekleneceği kardiyomiyosit hücre tabakalarının çok daha iyi sonuçlar vereceği düşünülmektedir. (SHİMİZU et al, 2002)

EPH'lerin doğumdan sonraki süreçte de fonksiyonlarını devam ettirdiğinin anlaşılması ile günümüzde mortalitenin sebepleri arasında ilk iki sırayı alan

kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin tedavisinde yeni seçenekler ortaya koymaktadır.

1.3. Amaç

EPH'ler terapötik neovaskülarizasyonda yeni bir strateji olarak görülmektedir. Bu nedenle; EPH'lerin aferezle büyük miktarda toplanması, seçilmesi ve yaralı vasküler dokuya injeksiyonu ile olası terapötik etki artırılabilir. En etkin biçimde EPH'lerin kullanılması için aferez ile toplanan periferik kök hücre (PKH) ürünlerindeki miktarının belirlenmesi ve standardizasyonunun yapılması gerekmektedir.

Bu nedenle, çalışmamızdaki amacımız:

1- Allojeneik PKH nakli yapılacak hastaların sağlıklı vericilerinde kök hücre mobilizasyonu öncesi çevresel kanda EPH miktarının tayini,

2- Mobilizasyon ve kök hücre koleksiyonu için rekombinant insan granülosit koloni uyarıcı faktör (rhG-CSF) kullanımını takiben aferez işlemi öncesi çevresel kanda ve aferez ile toplanan periferik kök ve öncü hücre ürününde EPH miktarının tayini

3- rhG-CSF uygulaması öncesi EPH miktarı ile rhG-CSF sonrası aferez öncesi çevre kanındaki EPH miktarını karşılaştırmak,

4- Benzer olarak ürün ve bazal EPH miktarını karşılaştırmak,

5- Akan hücre ölçer laboratuvarında EPH tayinindeki yöntemin kurulması, geliştirilmesi ve standardizasyonudur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

06.04.2009 tarihinde 149- 4615 karar no ile Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Etik Kurulu tarafından onaylandıktan sonra, sağlıklı vericilere uygulanacak mobilizasyon yöntemi, uygulamanın komplikasyonları ve kendisine ait bilgilerin bilimsel bir yayında kullanılacağı konusunda bilgi verildi. Sağlıklı vericiler aydınlatılmış onam formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya alındı. Çalışmamıza, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Kök Hücre Nakil Ünitesi'nde allojeneik PKH nakli olması planlanan 7 hastanın kardeş vericisi kaydedilmiştir. Vericilerden birinde rhG-CSF sonrası aferez öncesi ve üründe EPH teknik nedenler ile çalışılamadığı için değerlendirme 6 sağlıklı verici üzerinden yapılabilmiştir. Vericilerin 5'i kadın, 1'i erkekti. Ortanca yaş 36 yıl (28- 54) idi.

2.1. Örnekleme

Analizler için vericilerden rhG-CSF ile mobilizasyon işlemi öncesi ve aferez işlemi öncesi alınan çevre kan örnekleri ile aferez işleminden sonra toplanan üründen rutin olarak tam kan sayımı ve CD34+ hücre sayımı için alınan örnekler değerlendirmeye alınmıştır. Kan örnekleri EDTA antikoagulanı içeren tüplere alınmıştır.

2.2. Vericilerin Mobilizasyonu

Çalışmadaki vericilere nakil için gerekli kök hücre mobilizasyonu amacı ile 5 gün süreyle 10 mcg/kg rhG-CSF (Neupogen, Roche®) uygulandı. Mobilizasyonun 5. gününde, rhG-CSF infüzyonundan 2 saat sonra vericiler aferez işlemine alındı.

2.3. Allojeneik Periferik Kök Hücre Toplanması

Aferez işlemi, devamlı akım tekniği ile çalışan Fresenius As Tec marka cihaz ile dakikada 50- 60 ml kan ayırma protokolü uygulanarak yapıldı. Mobilizasyon rejiminin ilk uygulamasını takip eden 5. günde aferez işlemi ile vericinin kök hücrelerini içeren mononükleer hücreler toplandı.

Toplama işlemi sırasında vericiye antikoagulan (ACD), izotonik solüsyon ve kalsiyum desteği verildi. İşlemde vericinin kan hacminin ortalama 2- 3 katı (~15 lt) kan işlendi.

2.4. Akan Hücre Ölçer Analizi

2.4.1 Kullanılan Sarf Malzemeler

FACS Lysing Solution (BD Biosciences San Jose, California, USA)

CellFix (BD Biosciences San Jose, California, USA)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Yıkama Tamponu (%5 fetal calf serum (FCS) içeren PBS)

Antikorlar: $CD45_{FITC}$, $CD34_{PerCP}$, $CD117_{PE}$ (BD Biosciences San Jose, California, USA), anti-$VEGFR\text{-}2_{PE}$ (BD Pharmingen, USA), $CD133_{APC}$ (Miltenyi Biotec, Germany)

17x75 mm polisteren tüpler

2.4.2. Kullanılan Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler: 5-200 µl, 200-1000 µl ayarlanabilir.

Santrifuj (Heraeus, Megafuge 2.0 RS)

Vorteks (Nüve, Türkiye)

Akan Hücre Ölçer: BD FACS Arial II

2.4.3. Kullanılan Yazılım

BD FACS Diva Software

2.4.4. Yöntem

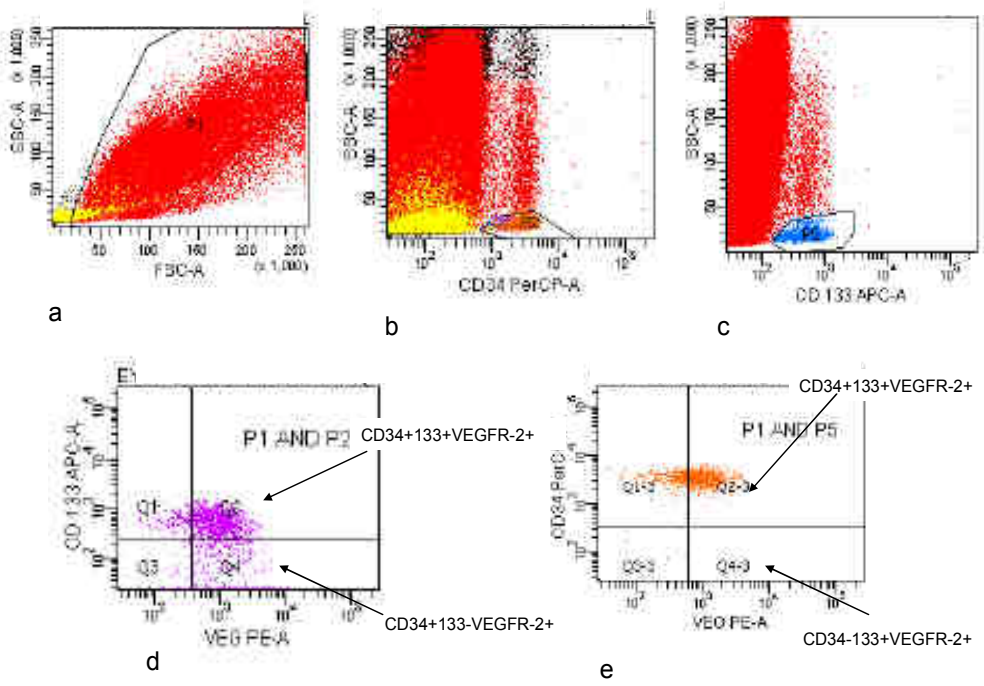
Çevre kan örneğindeki lökositlerin konsantrasyonları PBS kullanılarak $5x10^6$ hücre/µl olacak şekilde ayarlandı. Her bir tüpe 200µl hücre süspansiyonu dağıtıldı. Sırasıyla 1. tüpte 20µl anti $CD45_{FITC}$, 10µl anti-$VEGFR\text{-}2_{PE}$, 20µl anti $CD34_{PerCP}$ ve 5µl anti $CD133_{APC}$; 2. tüpe 20µl anti $CD45_{FITC}$, 20µl anti $CD117_{PE}$, 20µl anti $CD34_{PerCP}$ ve 5µl anti $CD133_{APC}$ monoklonal antikorları eklendi. 30 dakika oda ısısında karanlıkta enkübe edildi. Enkübasyon sonrasında ‘’BD FACS Lysing’’ solüsyonu ile 10 dakika oda ısısında karanlıkta yapılan enkübasyon ile eritrositlerin lizisini takiben, FCS içeren PBS ile 2 kez 300g de 5 dakika yıkama işlemi uygulandı. Son yıkama işlemini takiben hücre pelleti 500µl %1’lik formaldehit solüsyonu ile resüspanse edildi ve bekletilmeden akan hücre ölçerde verilerin toplanması işlemine geçildi.

Veri toplamaya başlamadan önce cihaz açıldı. Laboratuvar çalışanları tarafından ‘’BD Cytometer Setup Tracking (CST) Beads’’ kullanılarak cihazın günlük kontrolleri yapıldı ve cihazın kullanıma hazır hale gelmesi sağlandı.

Çalışma tamamlandıktan sonra tüpteki hücrelerin dağılımları kontrol edilerek, gereken düzenlemelerin yapılmasını takiben her bir tüpten $1x10^6$ hücre sayılacak şekilde veriler toplandı ve kaydedildi.

2.4.5. Verilerin Analizi

Toplanan hücrelerin CD45-SSC nokta grafiği üzerindeki dağılımları kullanılarak CD45- olan hücreler işaretlendi. CD45- olan hücreler arasında VEGFR-2 ifade eden EPH'ler işaretlendi. İşaretlenen hücrelerdeki CD34 ve CD133 ifadeleride değerlendirildi (Şekil 2. 1). Aynı örneklerde eş zamanlı olarak CD45 zayıf + /+ olan hücreler de analize dahil edilerek total CD34 sayımları da yapıldı. Birinci tüpte CD34+ hücrelerde immatür form olan CD133+VEGFR-2+ hücre ve matür form olan CD133-VEGFR-2+ hücre dağılımları belirlendi. Ayrıca aynı tüpte CD133+ olanlarda CD34+VEGFR-2+ ve CD34-VEGFR+ hücrelerin dağılımı hesaplandı (Şekil 2.1). İkinci tüpte ise HKH yüzey belirleyicilerinden biri olan CD117 ve EPH yüzey belirleyicilerinden biri olan CD133 ifadeleri değerlendirildi. Çalışılan örneklerde elde edilen % ler tam kan sayımındaki lökosit sayısına çarpılması sonucu kantitatif değere çevrildi.



Şekil 2. 1. EPH lerin akan hücre ölçerle gösterilmesi; **a)** Debriler ve eritroid seri hücreleri dışında tüm hücrelerin kapılanması; **b)** CD34+ hücrelerin kapılanması; **c)** CD133+ hücrelerin kapılanması; **d)** CD34+ hücreler grubunda EPH'lerin dağılımı; **e)** CD133+ hücre grubunda EPH'lerin dağılımı

2.4.6. İstatistik

Sayısal değişkenler ortanca ve dağılım aralığı olarak verilmiştir. Karşılaştırmalarda Wilkonson matched-pair testi kullanılmıştır. P değeri 0,05 altı istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS 11,5 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

EPH'lerin en immatür formu olan CD34-CD133+VEGFR-2+ hücrelerin, gerçek immatür formu olan CD34+CD133+VEGFR-2+ hücrelerin, ve matür formu olan CD34+CD133-VEGFR-2+ hücrelerin, ayrıca dolaşan kök ve öncü hücrelerden CD34+, CD133+, CD34+CD117+ ve CD34+CD133+ hücrelerin dağılımları incelendi.

Sağlıklı kişilerde toplam çekirdekli hücre içinde HKH ve EPH oranları çizelge 3. 1 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1. Sağlıklı kişilerde bazal durumda dolaşımda ki HKH ve EPH dağılımı.

HÜCRELER	**Bazal (dağılım)**
CD34+	% 0,055 (0,02-0,10)
CD133+	%0,030 (0,01-0,11)
CD34+CD117+	%0,028 (0,01-0,05)
CD34+CD133+	%0,004 (0,0008-0,09)
CD34+CD133+VEGFR-2+	%0,0007 (0,0-0,07)
CD34+CD133-VEGFR-2+	%0,0082 (0,002-0,03)
CD34-CD133+VEGFR-2+	%0,0006 (0,0-0,007)

Mobilizasyon sonrası dolaşımdaki ortanca CD34+, CD133+, CD34+CD117+ ve CD34+133+ hücre miktarlarının anlamlı oranda arttığı saptandı (Çizelge 3. 2). Bu artışın aferez ürününde de devam ettiği görüldü (Çizelge 3. 2).

Çizelge 3. 2. Lökosit sayına göre hücre miktarlarının mobilizasyon öncesi ve sonrası karşılaştırılması.

HÜCRELER/mcl	Bazal (Dağılım)	Mobilizasyon Sonrası (Dağılım)	*p*
CD34+ /mcl	0,42 (0,22-0,79)	8,69 (4,37-36,72)	*0,028**
CD133+ /mcl	0,24 (0,07-0,79)	8,11 (3,61-27,54)	*0,028**
CD34+CD117+ /mcl	0,25 (0,72-0,36)	2,59 (0,19-1,19)	*0,043**
CD34+CD133+ /mcl	0,043 (0,006-0,46)	6,43 (2,17-8,09)	*0,028**
CD34+CD133+VEGFR-2+ /mcl	0,005 (0,0-0,44)	0,33 (0,027-3,19)	*0,028**
CD34+CD133-VEGFR-2+ /mcl	0,056 (0,015-0,27)	0,17 (0,05-5,78)	*0,173*
CD34-CD133+VEGFR-2+/mcl	0,0046 (0,0-0,051)	0,25 (0,0-0,11)	*0,463*

**p<0,05*

Çizelge 3. 3. Lökosit sayına göre hücre miktarlarının mobilizasyon öncesi ve ürün karşılaştırması.

HÜCRELER/mcl	Bazal (Dağılım)	Ürün (Dağılım)	*p*
CD34+ /mcl	0,42 (0,22-0,79)	122,35 (29,62-231,28)	*0,028**
CD133+ /mcl	0,24 (0,07-0,79)	82,31 (14,81-178,23)	*0,028**
CD34+CD117+ /mcl	0,25 (0,72-0,36)	70,47 (21,17-175,11)	*0,043**
CD34+CD133+ /mcl	0,043 (0,006-0,46)	106,56 (52,25-163,15)	*0,043**
CD34+CD133+VEGFR-2+ /mcl	0,005 (0,0-0,44)	2,52 (0,86-18,66)	*0,028**
CD34+CD133-VEGFR-2+ /mcl	0,056 (0,015-0,27)	1,73 (0,82-8,65)	*0,028**
CD34-CD133+VEGFR-2+/mcl	0,0046 (0,0-0,051)	0,069 (0,01-1,84)	*0,116*

**p<0,05*

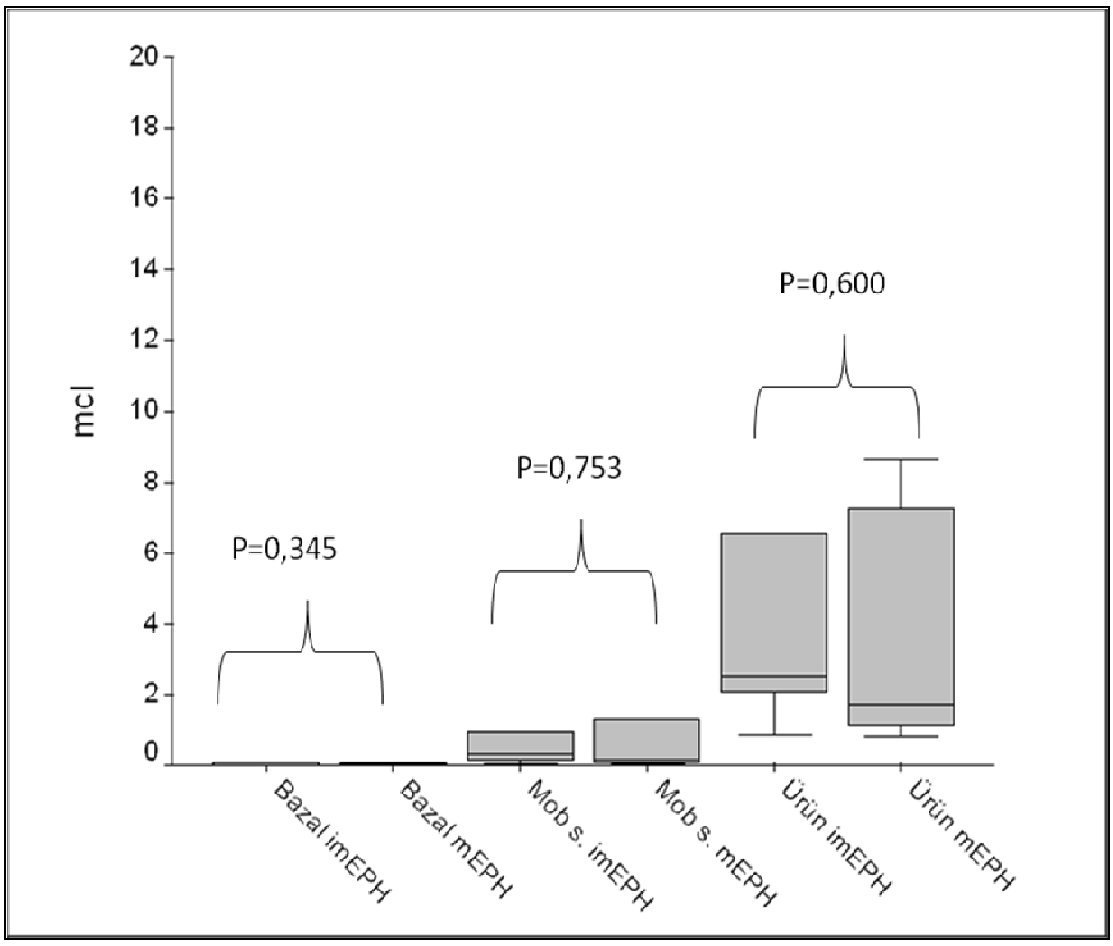
3.1. Endotelyal Öncül Hücreler

EPH'ler olgunlaşma aşamalarına göre (immatür ve matür form) değerlendirildi. Mobilizasyonu takiben, mobilizasyon öncesine göre immatür (CD34+CD133+VEGFR-2) EPH miktarlarının anlamlı oranda arttığı saptandı (Çizelge 3. 2).

Mobilizasyon öncesi ile aferez ürünü karşılaştırıldığında ise bu artış hem immatür hem de matür (CD34+CD133-VEGFR-2) EPH de belirgin idi (Çizelge 3. 3).

EPH oranları kendi aralarında karşılaştırıldığında, bazal durumda immatür EPH miktarı matür EPH ye göre miktarı az olmasına rağmen istatistiksel fark saptanmadı. (Grafik 3.1) Benzer olarak mobilizasyon sonrası ve üründe ise mikrolitrede immatür EPH miktarı matür olanlara göre daha fazla olmasına rağmen, arada fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Grafik 3. 1. İmmatür ve matür EPH miktarlarının karşılaştırılması.



Kısaltmalar: im: İmmatür, m: Matür; EPH: Endotelial progenitör hücre; mob s: Mobilizasyon sonrası

3.2. Aferez Ürünündeki Endotelyal Öncül Hücreler

Hastaların vücut ağırlığı başına düşen EPH oranı $0,08x10^6$/kg idi. (Çizelge 3. 4).

Çizelge 3. 4. Aferez ürünündeki hücre miktarlarının hasta ve vericici vücut ağırlığına göre dağılımı.

HÜCRELER	Ürün (Dağılım)	Üründe mutlak sayı/kg hasta ($x10^6$)	Üründe mutlak sayı/kg donör ($x10^6$)
CD34+	%0,50 (0,20-1,5)	3,3 (1,12-7,15)	3,27 (1,30-9,60)
CD133+	%0,30 (0,10-1,3)	2,0 (0,56-5,84)	2,39 (0,71-8,32)
CD34+CD117+	%0,37 (0,19-1,19)	3,8 (0,44-5,35)	2,42 (0,49-7,16)
CD34+CD133+	%0,28 (0,14-1,21)	1,73 (0,74-5,44)	2,13 (0,83-7,74)
CD34+CD133+VEGFR-2+	%0,13 (0,004-0,13)	0,08 (0,02-0,71)	0,087 (0,02-0,89)
CD34+CD133-VEGFR-2+	%0,007 (0,004-0,05)	0,045(0,02-0,27)	0,058 (0,02-0,35)
CD34-CD133+VEGFR-2+	%0,0003 (0,00007-0,007)	0,0009(0,0-0,05)	0,0011 (0,0-0,078)

3.3. Kök Ve Öncül Hücrelerdeki Endotelyal Öncül Hücre Dağılımı

rhG-CSF uygulaması ile birlikte CD34-133+ ve CD34+CD133- kök hücreleri arasında yer alan immatür EPH oranı azalmakta iken, CD34+CD133+ hücrelerde EPH oranının değişmediği görüldü (Çizelge 3. 5).

Çizelge 3. 5. Kök ve öncü hücrelerdeki EPH'lerin karşılaştırılması.

	Bazal (%)	Aferez öncesi (%)	Ürün (%)	p
CD34+133+VEGFR-2+	1,94 (0-9,4)	2,4 (0,3-4,94)	1,55 (1,1-63,2)	0,409
CD34+133-VEGFR-2+	31,5 (11,1-34,50)	1,6 (1,0-13,30)	1,41 (0,40-25,0)	0,001*
CD34-133+VEGFR-2+	5,39 (0-10,3)	0,35 (0-3,25)	0,30 (0-2,83)	0,018*

4. TARTIŞMA

EPH tek bir yüzey antijenine sahip olmadığı için tanımlamak zordur. İnsanlarda EPH tanımlamada 3 yaklaşım vardır (Yoder, 2009). İlk yaklaşım in vitro kültür yöntemdir. Dolaşımdaki mononükleer hücrelerin izole edilerek, çeşitli endotelyal büyüme faktörü içeren fibronektin ile kaplı plaklara ekilmesidir. Oldukça zaman alıcı ve karmaşık bir yöntemdir. İkinci yaklaşım yine birincisine benzer olarak in vitro kültür ortamında koloni oluşturan hücrelerin sayılmasıdır. Diğer yöntem ise monoklonal antikorların kullanımı ile akan hücre ölçer yöntemi ile kısa sürede olası EPH miktarının belirlenmesidir. Bu yöntem oldukça kolay ve kısa sürede dolaşımdaki EPH miktarını tayin etme avantajı vardır. Peichev ve arkadaşları bu yöntem ile CD34+CD133+VEGFR-2+ hücreleri EPH belirleyicisi olduğunu göstermiştir (Peichev et al, 2000). Sonraki çalışmalar ile bu 3 antijeni taşıyan hücrelerin gerçek dolaşan EPH tanımladığı kabul edilmiştir (Timmermans et al, 2009). Bu nedenle, biz de akan hücre ölçer yöntemi kullanarak sağlıklı kişilerde dolaşımdaki EPH miktarını değerlendirdik. Dolaşımda toplam çekirdekli hücrelerin ortanca % 0,0007 (0,0-0,07) sinin EPH olduğunu saptadık. Hastanın lökosit sayına göre değerlendirdiğimizde EPH miktarı mikrolitre kanda 0,005 (0-0,44) idi.

Dolaşan endotelyal hücreler tanımlanmadan önce, vaskulogenezisin yalnızca embriyonik gelişim esnasında meydana geldiği düşünülüyordu. Bir dekad önce, in vitro ve in vivo fare modellerinde dolaşımda, göbek kordon kanı ve kemik iliğinde izole edilen CD34+ hücrelerin endotelyal hücrelere farklılaşabileceği ve bu hücrelerin yetişkin organizmada yeni damar oluşumu ve endotelizasyona katkıda bulunabileceği bildirildi (Asahara et al, 1997; Shi et al, 1998). Sonraki çalışmalar EPH'lerin endotelizasyon ve angiogenezde rolünü gösterdi (Timmermans F, et al. 2009). Çalışmamızda dolaşımdaki kök hücrelerin içerisinde az oranda da olsa EPH olduğunu saptadık. Dolaşımdaki EPH'lerin immatür ve matür alttipleri bulunabilmektedir.

CD34+CD133+VEGFR-2+ ise bunun gerçek immatür EPH kabul edilir iken, EPH'ler olgunlaşır iken CD133 ifadesini kaybettiği düşünülmektedir (Peichev et al, 2000). Herhangi bir uyaran olmaksızın dolaşımda matür EPH ler immatürlere göre daha

fazla oranda iken, rhG-CSF verilimi sonrası immatür alttipin (CD34+CD133+VEGFR-2+) daha fazla oranda arttığı görüldü. Ancak kendi içlerinde yapılan karşılaştırmalarda bu artma ve azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Grafik 1).

Friedrich ve arkadaşları çalışmalarında CD34-133+VEGFR-2+ olanların daha immatür EPH alttipi olduğunu tanımlamışlardır (Friedrich et al. 2006). Bu alttipin CD34+CD133+ EPH ye farklılaşabilmesinin yanı sıra, CD34+CD133+ olan EPH'ye göre olgun endotelyal hücreye farklılaşma potansiyelinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bazal durumda bu hücre alttipi miktarı hemen hemen immatür EPH (CD34+CD133+VEGFR-2+) miktarı ile benzer olduğu, ancak rhG-CSF kullanımı sonrası artışların anlamlı olmadığını saptadık. Bilindiği üzere sitokinle uyarılan hematopoetik öncü ve kök hücreler EPH miktarlarını da artırmaktadır. Çalışmamızda immatür ve matür EPH miktarları rhG-CSF uygulanması sonrası hem aferez öncesi hem de üründe bazale göre anlamlı artışlar gösterirken, daha immatür alttipteki (CD34-CD133+VEGFR-2+) EPH'deki artış anlamlı değildi. Belki de Friedrich ve arkadaşlarının ifade ettiği gibi bu alttipin daha potent olmasının sonucu olarak, rhG-CSF en immatür alttipin hızla daha olgun EPH ve belki de bu ara basamakları atlayıp olgun dolaşan endotelyal hücreye farklılaşmasına yol açmış olabilir. Kısaca rhG-CSF EPH'lere daha hızlı farklılaşma yeteneği kazandırmış olabilir. CD34+ hücre içinde EPH'lerin dağılımını değerlendirdiğimizde rhG-CSF sonrası hem CD34-CD133+ hem de CD34+CD133- EPH'lerin oranı azalır iken, CD34+CD133+ EPH oranı değişmemekte idi. Bu nedenle rhG-CSF sonrası EPH alttiplerinin vaskulogenezdeki potansiyeli hem in vitro hem de in vivo olarak çalışılması gerekir.

Körbling ve arkadaşları rhG-CSF öncesi çevre kanı ve aferez ürününde mononüklear hücreleri in vitro olarak fibronektin içeren plaklara ektiklerinde bazale göre 10 kat daha fazla EPH koloni oluşturma yeteneği olduğunu saptamışlardır (Körbling et al, 2006). Çalışmamızda in vitro kültür kısmını zaman ve ek maliyet gerektirdiği için yapamadık. Ancak sitokinle uyarılan EPH alttiplerinin koloni oluşturma yetenekleri ve vaskulogenezdeki rollerini değerlendirmek için, EPH alttipleri manyetik boncuklar ile akan hücre yönteminde seçilerek, her biri için in vitro koloni oluşturma yeteneği ve olgun endotelyal hücreye farklılaşma yeteneği değerlendirilmesi gerekir. İn vivo olarak da yeşil

floresan veren protein ile işaretleyerek nakil sonrası farklılaşma potansiyeli için bir çalışma planlanabilir.

EPH mobilizasyonu ve toplanması hakkında çok az bilgi olduğu için, toplanmaları ve mobilizasyonları CD34+ hücre ile birlikte olmaktadır. Mauro ve arkadaşları hematolojik maligniteli hastalarda (Lenfoma ve Multiple Myeloma) mobilizasyon için 4gr/m^2 siklofosfamid takiben 4. günde G-CSF sonrası aferez ürününde ortalama 23,7x10^6 CD34+/VEGFR- 2+/CD133+ EPH topladıklarını göstermişlerdir.(Mauro et al, 2007). Mevcut miktar hasta vücut ağırlığına göre oranlandığında (eğer 70 kg ağırlığa göre hesaplanırsa) 0,34x10^6/kg olup, araştırmacılar bugüne kadar elde edilen en yüksek EPH miktarı olduğunu makalelerinde vurgulamışlardır. Çalışmamızda sağlıklı kişilerde tek başına rhG-CSF sonrası ortanca 0,087x10^6/kg kadar CD34+/VEGFR-2+/CD133+ EPH toplanmıştır. Sağlıklı kişilerde bu oranın Mauro ve arkadaşlarının çalışmalarına göre oldukça düşük olması, çalışma grubumuzun sağlıklı populasyon içermesidir. Bilindiği üzere malin hastalıklarda özellikle myelomada angiogenezin rolü bilinmektedir. Mauro'nun çalışmasındaki hastaların altta yatan malign hastalıkları nedeni ile G-CSF sonrası kemik iliğinden fazla miktarda EPH dolaşıma çıkması çok fazla EPH toplanmasına yol açmış olabilir.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan 2 ayrı çalışmada Burger hastalığında iskemik ayaktaki gastroknemius kasına ve graft yapılamayan koroner arter sahalarına kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerin implantasyonu sonrası vaskulogenezde in vivo artış gözlenmiştir (Durdu ve ark, 2004). Powell ve arkadaşları 16 koroner arter hastalığı olan hastayla kontrollü olarak yaptığı bir çalışmada G-CSF ile dolaşımdaki EPH sayısının ve EPH'nin iskemik dokuya yerleşmesini sağlayan reseptör sayısında artış olduğu gösterilmiştir. (POWELL TM et al 2005). Uyarılmamış kemik iliği mononükleer hücrelerinin vaskulogenezdeki rolü ve G-CSF sonrası dolaşımdaki EPH artışı birlikte değerlendirildiğinde (Körbling M, et al 2006), belki de G-CSF ile uyarılmış kemik iliğinde elde edilen EPH'ler veya G-CSF sonrası çevre kanında aferez sonrası ürünündeki EPH'lerin doğrudan iskemi alanına implantasyonu kardiyovaskuler alanında kullanımı ile ilgili çalışmalar EPH'lerin terapötik kullanımı ile ilgili veriler sağlayabilir. Bunun yanı sıra günümüzde sitokinle kök ve öncü hücre mobilizasyon başarısız olan hastalarda kullanılan plerixafor (AMD3100), CXCR4 antagonisti kullanımı sonrası EPH

miktarlarının değerlendirilmesi gerekir. Tan Y ve arkadaşları fare bacak iskemi modelinde AMD3100 ün iskemik anjiyogenezisi artırdığını ve kan akımını yeniden düzenlediğini göstermişlerdir (Tan et al, 2009).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Allojeneik PKH nakli yapılacak hastaların sağlıklı vericilerinde kök hücre mobilizasyonu öncesi çevresel kanda dolaşımda toplam çekirdekli hücrelerin ortanca % 0,0007 (0,0-0,07) sinin endotelyal öncül hücre (CD34+CD133+VEGFR-2+) olduğunu saptadık. Vericinin lökosit sayına göre değerlendirdiğimizde EPH miktarı (CD34+CD133+VEGFR-2+) mikrolitre kanda 0,005 (0-0,44) idi.

2- Mobilizasyon ve hematopoetik kök ve öncü hücre koleksiyonu için rhG-CSF kullanımını takiben aferez işlemi öncesi çevresel kanda ve aferez ile toplanan periferik kök ve öncü hücre ürününde EPH miktarındaki artışın (CD34+CD133+VEGFR-2+) anlamlı olduğunu saptadık. En immatür EPH alttipinin (CD34-CD133+VEGFR-2+) rhG-SCF sonrasındaki artışın bazal duruma göre anlamlı değildi.

3- Akan hücre ölçer yönteminin EPH miktarı ve alt tiplerini belirlemede bundan sonra planlanacak çalışmalarda kullanımı kolay ve güvenilir bir yöntem olduğunu saptadık.

Sonuçta, rhG-CSF EPH miktarını artırırken, EPH'lerde farklılaşmaya yol açabilir. Çalışmamızda elde edilen verilerin ve yöntemin vaskulogenezi değerlendiren çalışmaların planlanmasına basamak olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca hematopoetik öncü ve kök hücre mobilizasyon için kullanılan yeni ajanların da EPH miktarları üzerine etkisi değerlendirilmesi gerekir.

ÖZET

Endotelyal Progenitor Hücrelerin rhG-CSF İle Mobilizasyonu Ve Aferezle Toplanan Üründeki Miktarı.

EPH'lerin erişkin dönemde de var olduğunun belirlenmesiyle vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılması gündeme gelmiştir. EPH'ler kemik iliğinden dolaşıma katılarak vasküler hasarın olduğu bölgelerde, hasarın tamir edilmesinde rol almaktadır. EPH'ler kemik iliğinden dolaşıma katıldıktan sonra hücre yüzey belirleyicilerinde değişiklik meydana gelmektedir. EPH'lerin CD34-CD133+VEGFR-2+ fenotipinde olanları en immatür form olarak değerlendirilirken, CD34+CD133+VEGFR-2+ fenotipindeki EPH'ler gerçek immatür form olarak değerlendirilmektedir. EPH'ler olgunlaşma sürecinde bu belirleyicilerden CD133'ü kaybederek matür endotel hücrelere (CD34+CD133-VEGFR-2+) dönüşmektedir.

EPH'lerin aferezle toplanması ve yaralı vasküler dokuya injeksiyonu ile terapötik etki sağlanabilmektedir. Çalışmamızda EPH'lerin en etkin biçimde kullanılabilmesini sağlamak için aferezle toplanan periferik kök hücre ürünün içindeki miktarın belirlenmesini amaçladık. Ayrıca mobilizasyon öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinde EPH formlarının dağılımlarını karşılaştırarak rhG-CSF'nin artışa olan etkisini belirlemeye çalıştık.

Çalışmamızda 6 sağlıklı (5 kadın, 1 erkek) allojeneik kök hücre vericisi dahil edildi. Ortanca yaş 36 (28-54) idi. Vericilere mobilizasyon amacıyla 5 gün süre ile 10mcg/kg rhG-CSF uygulandı ve 5. günde rhG-CSF infüzyonundan 2 saat sonra aferez işlemi uygulandı. Vericilerin mobilizasyondan önce (bazal), afereze başlamadan önce (mobilizasyondan sonra) ve aferez ürününden alınan kan örneklerinde CD34-CD133+VEGFR-2+, CD34+CD133+VEGFR-2+ ve CD34+CD133-VEGFR-2+ hücrelerin toplam çekirdekli hücreler içindeki dağılımları incelendi. Örnekler EDTA'lı tüplere alındı ve aynı gün içerisinde akan hücre ölçer analizi yapıldı.

Çalışmamız sonucunda 6 sağlıklı vericiden alınan mobilizasyon öncesi çevresel kanda toplam çekirdekli hücrelerin ortanca %0,0007 (0,0-0,07) sinin EPH (CD34+CD133+VEGFR-2+) olduğunu saptadık. Verici beyaz küre sayısına göre değerlendirdiğimizde mikrolitre kanda EPH miktarı ortanca 0,005 (0,0-0,44) idi. Mobilizasyon amacıyla rhG-CSF uygulamasını takiben aferez işlemi öncesi ve aferez ile toplanan üründe EPH (CD34+CD133+VEGFR-2+) miktarındaki artışın anlamlı olduğunu saptadık ($p<0,05$). En immatür EPH alttipinin (CD34-CD133+VEGFR-2+) rhG-CSF sonrası bazale göre artışı anlamlı değildi. Çalışmamızda sağlıklı kişilerde tek başına rhG-CSF uygulaması sonrasında ortanca $0,087x10^6$/kg (0,02-0.84) EPH (CD34+CD133+VEGFR-2+) toplanmıştır.

Sonuçta, rhG-CSF EPH miktarını artırırken, EPH'lerde farklılaşmaya yol açabilmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilerin ve yöntemin vaskulogenezi değerlendiren çalışmaların planlanmasına basamak olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Endotelyal progenitör hücre, aferez, mobilizasyon, G-CSF, akan hücre ölçer

SUMMARY

The Quantity Of Endothelial Progenitor Cells After rhG-CSF And From Apheresis Product

The use of EPCs in the treatment of vascular diseases has been suggested after the invention of the existence of EPCs in adult life. EPCs take place in the repair of the vascular damages after its mobilization from bone marrow to peripheral blood. EPCs are a heterogeneous group of the cells that can be characterized by the expression of surface markers, such as CD34, CD133 and VEGFR-2. Immature stem cells lost CD133 expression during differentiation to mature endothelial cells. EPCs are thought to be a heterogeneous population of progenitors, consisting of real immature CD34+CD133+VEGFR-2+ cells and mature CD34+CD133-VEGFR-2 subtypes. Although CD34+CD133+VEGFR-2+ phenotype represents immature EPCs, the most immature forms of EPCs are CD34-CD133+VEGFR-2+.

It has been shown that EPCs might have a role in the repair of injured vascular tissue. The aim of our study was to determine the level of EPCs with in the rhG-CSF mobilized peripheral blood stem cell product. Besides, we try to compare rhG-CSFs effects on the increase of EPC subtypes in samples we have taken before and after mobilization.

Six healthy (5 female, 1 male) allogeneic stem cell donors with in median age of 36 years (range 28-54) admitted to our study. Donors received 10µcg/kg rhG-CSF for mobilization of stem cells. On day 5 stem cell collection was performed 2 hours after infusion of rhG-CSF. Blood samples for the analysis of EPCs were obtained prior to rhG-CSF infusion, before stem cell collection and from the stem cell products respectively. Blood samples were taken into tubes with EDTA and the analysis of the EPCs was done on the same day of blood sampling with flow cytometer. We examined CD34-CD133+VEGFR-2+, CD34+CD133+VEGFR-2+ and CD34+CD133-VEGFR-2 cells dispersion in total nucleic cells.

In our study we have found that EPCs are 0,0007% (range 0,0-0,007) of the total nucleic cells in blood samples taken prior to rhG-CSF administration. When we made the analysis according to white blood cells count the median count in microliter

was 0,005 (range0,0-0,44). We have found that a significant increase in EPC counts occur both in blood samples taken prior to apheresis and from stem cell products ($p<0,05$). The increase of the most immature EPC subtype (CD34-CD133+VEGFR-2+) after rhG-CSF was not significant in comparison with the basal condition. We collected a median of $0,087x10^6$/kg (range 0,02-0,89) EPCs after rhG-CSF infusion.

Briefly, rhG-CSF facilitated the mobilization of EPCs to peripheral blood. Our study showed that G-CSF might lead to differentiation of EPCs as well. In conclusion, obtained data and used method from the study might be first step for planning further studies evaluating the role of EPCs on vasculogenesis.

Key Words: Endothelial Progenitor Cells, apheresis, mobilisation, rhG-CSF, flow cytometer.

KAYNAKLAR

ALP CAN, (2009). Kök Hücre Tanımları. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi. Syf:15-22.

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLİVAN A, SİLVER M, VAN DER ZEE R, Lİ T, WİTZENBİCHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM., (1997). Isolation of putative progenior endothelial cells for angiogenesis. Science. 14;275(5302):964-7.

BARON M., (2001). Induction of embriyonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. Differentiation; 68: 175-85.

BELLANTUONO I., (2004). Hematopoietic stem cells. Int J Biochem Cell Biol.; 36:607-20

BERFOOT J., MAUELSHAGEN C., BRUCE D., HENDERSON C., BOWNES M., (2005). Stem Cells. Science and Ethics 2nd edition. The Scottish İnstitute for Biotechnology Education, The Univercity of Edinburgh.

CARMEN URBİCH, STEFANİE DİMMELER, (2004). Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. Circ.Res. 2004: 95;343-353

DOMİNİK M, PETER GANZ, (2002). Endothelial Function: From vascular biology to clinical applications. Am J Cardiol. 21; 90 (10C): 40L-48L.

DURDU S, AKAR R, ARAT M, ARSLAN Ö, SOYDAN E, AYYILDIZ E, EREN NT, TAŞÖZ R, ÇORAPÇIOĞLU T, İLHAN O., (2004) Dirençli bacak iskemisi olan Buerger hastalarında otolog kemik iliği mononükleer hücre transplantasyonu. .Turkish J Haematol.; 21: S1.

FRİEDRİCH EB, WALENTA K, SCHARLAU J, NİCKENİG G, WERNER N., (2006). CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. Circ Res. 2006 Feb 17;98(3):e20-5.

HEESCHEN C. et al. (2003). Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. Blood.;102(4): 1340-6.

HİLL J M, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWİW MA, QUYYUMİ AA. et al.(2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. N Engl J Med.; 348 (7): 593-600.

KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHİ T., et al. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A.; 97 (7): 3422-7.

KAUFMAN DS, HANSON ET, LEWİS RL, AUERBACH R, THOMSON JA., (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embriyonic stem cells. Proc Natl Acad Sci. USA; 98: 10716-21.

KAUSHAL S, AMİEL GE, GULESERİAN KJ., et al.(2001). Functionel small diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. Nat Med.; 7 (9): 1035-40.

KÖRBLİNG M, REUBEN JM, GAO H, LEE BN, HARRİS DM, COGDELL D, GİRALT SA, KHOURİ IF, SALİBA RM, CHAMPLİN RE, ZHANG W, ESTROV Z., (2006). Recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized and apheresis-collected endothelial progenitor cells: a novel blood cell component for therapeutic vasculogenesis. Transfusion.;46(10):1795-802.

LYDEN D, HATTORİ K, DİAS S, COSTA C, BLAİKİ P, BUTROS L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone marrow derived endothelial and hematopoietic precursors cells blocks tumor angiognesis and growth. Nat Med.; 7 (11): 1194-201.

MAURO E, RİGOLİN GM, FRAULİNİ C, SOFRİTTİ O, CİCCONE M, DE ANGELİ C, CASTOLDİ G, CUNEO A., (2007). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with hematological malignancies after treatment with filgrastim and chemotherapy for autologous transplanation. Eur J Haematol. 2007 May;78(5): 374-80.

ORLİC D, BOCK TA, KANZ L., (1999). Hematopoietic stem cells biology and Transplantation. Annals of The New York Academy of Sciences

PEİCHEW M, NAİYER AJ, PEREİRA D, ZHU Z, LANE WJ; WİLLİAMS M., et al. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by ciculating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood.; 95 (3): 952-8.

POWELL TM, PAUL JD, HİLL JM, THOMPSON M, BENJAMİN M, RODRİGO M, MCCOY JP, READ EJ, KHUU HM, LEİTMAN SF, FİNKEL T, CANNON RO., (2004). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Feb;25(2):296-301.

SHİ Q, RAFİİ S, WU MH, WİJELATH ES, YU C, ISHİDA A, FUJİTA Y, KOTHARİ S, MOHLE R, SAUVAGE LR, MOORE MA, STORB RF, HAMMOND WP., (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood.; 92 (2): 362-7.

SHİMİZU T, YAMATO M, ISOİ Y. et al. (2002). Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature responsive cell culture surfaces. Circ Res.; 90 (3): e40

TAN Y, Lİ Y, XİAO J, SHAO H, DİNG C, ARTEEL GE, WEBSTER KA, YAN J, YU H, CAİ L, Lİ X., (2009). A novel CXCR4 antagonist derived from human SDF-1beta enhances angiogenesis in ischaemic mice. Cardiovasc Res.;82(3):513-21. Epub 2009 Feb 5.

TEPPER OM, SEALOVE BA, MUROYAMA T, ASAHARA T., (2003). Newly emerging consepts in blood vessel growth: Recent dicovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. J Investig Med.; 51 (6): 353-9.

TİMMERMANS F, PLUM J, YÖDER MC, INGRAM DA, VANDEKERCKHOVE B, CASE J., (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined? J Cell Mol Med.; 13(1): 87-102.

VASA M, FİCHTLSCHERER S, ALDER K, AİCHER A, MARTİN H, ZEİHER AM, et al. (2001). Increase in circulating endothelial progenitor cells by stain therapy in patients with stable coronary artery disease. Circulation Research; 103 (24): 2885-2890.

WEİSSMAN IL, SHİZURU JA., (2008). The orrigins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. Blood 112:3543-3553.

YODER MC., (2009). Defining human endothelial progenitor cells. J Thromb Haemost; 7 (Suppl 1): 49-52.

YOUNG HE, DUPLAA C, ROMERO-RAMOS M., (2004). et al. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. Cell Biochem Biophys; 40: 1-80.

ZHANG ZG, ZHANG L, JİANG Q, et al. (2002). Bone marrow derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. Circ Res.; 90 (3): 284-8.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: ÖZLEM KARACAOĞLU

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi: 09.12.1982

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Durum: Evli

Adres: Uğur Mumcu Mah. 7. Cad Özlem Sitesi D Blok No: 12

Batıkent/ ANKARA

Posta Kodu: 06370

Telefon: 0312- 251 22 69

0555- 468 97 33

E-Mail: ozlemkaracaoglu@windowslive.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2006-2010 : Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hematoloji BD, Hemaferez Yüksek Lisans

2000-2005 : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1995-2000 : Özel Evrensel Koleji

KATILDIĞI KURSLAR VE SEMİNERLER

6-7 Nisan 2006. Ankara Üniversitesi, Günümüzde Elektroforez Uygulamaları ve Klinik Önemi Sempozyumu

5 Mayıs-5 Temmuz 2008. Gazi Üniversitesi, Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı Kursu

14-16 Kasım 2008. 4. Hemaferez Kursu

SERTİFİKA BİLGİLERİ

Terapötik Aferez Kullanıcı Sertifikası

Donör Aferezi Kullanıcı Sertifikası

Kan Bankacılığı Uygulamaları Eğitim Sertifikası