

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI ERİŞKİN ÇEVRESEL KANI İLE GÖBEK KORDON KANI
MONONÜKLEER HÜCRELERİNDE KÖK HÜCRE FAKTÖRÜ (SCF)
RESEPTÖR YOĞUNLUĞU

T 1014/1-1

(İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi)

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

Dr. A.Metin Sarıkaya

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Ievent Ündar

(Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir)

ANTALYA 1996

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasının her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr.Levent Ündar'a ; Özellikle laboratuvar çalışmaları sırasında sürekli olarak bilgi ve deneyimlerini aktaran değerli hocam Sayın Yard.Doç.Dr.Burhan Savaş'a; Her konuda gösterdiği ilgi ve yakınlığı tezimin yazılımında da esirgemeyen Sayın Uzm.Dr.İhsan Karadoğan'a; ve Flow sitometrik analizlerde sürekli yardımlarından dolayı Tıbbi Biyolog Seray Demirlioğlu'na ve yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım adına Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr.Gülşen Yakupoğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Dr.A.Metin Sarıkaya

KISALTMALAR

ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut myeloblastik lösemi
BFU-M	"Burst forming unit- megakaryocyte"
CML	Kronik myeloid lösemi
CFU-GEMM	"Colony forming unit- granulocyte erythroid monocyte megakaryocyte"
CFU-GM	"Colony forming unit- granulocyte macrophage"
G-CSF	"Granulocyte colony stimulating factor"
GM-CSF	"Granulocyte macrophage colony stimulating factor"
GVHD	"Graft versus host disease"
HP-CFC	"High proliferative colony forming cell"
IL	İnterlökin
L1BMC-IC	"Long term bone marrow culture initiating cell"
M-CSF	"Macrophage colony stimulating factor"
OFKN	Ortalama floresan kanal numarası
PCR	"Polimerase chain reaction"
PDGF	"Platelet derived growth factor"
PHA	"Phytohemagglutinine"
rhSCF	"Recombinant human stem cell factor"
SCF	"Stem cell factor", "c-kit ligand", Kök hücre faktörü
TNF	"Tumor necrosis factor"

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hematopoezis.....	3
2.1.1.Hematopoetik Kök Hücreler.....	3
2.1.2. Hematopoetik Büyüme Faktörleri.....	6
2.1.3.Hemopoetik Büyüme Faktörlerinin Reseptörleri.....	9
2.2. Kök Hücre Faktörü (C-Kit Ligand).....	10
2.2.1. SCF Reseptörü(C-Kit).....	11
2.2.2. SCF'nin Hematolojik Etkileri.....	13
2.2.3. SCF'nin Potansiyel Kullanım Alanları.....	14
2.3. Kordon Kanının Hematolojide Kullanımı.....	15
2.4.Flow Sitometre Çalışma İlkeleri.....	17
3.GEREÇ VE YÖNEM.....	18
3.1.Denekler.....	18
3.2.Kan Örneklerinin alınması.....	18
3.3.Mononükleer hücrelerin ayrılması.....	18
3.4.Monoklonal antikorlar.....	19
3.5.SCF Reseptörünün yoğunluğunun saptanması.....	19
3.6.Flow Sitometrik analiz.....	19
3.6.1.Periferik kan ve kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerde SCF reseptör yoğunluğunun saptanması.....	20
3.6.2.Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerde CD34 yüzdesinin saptanması.....	20
3.7.İstatistik.....	21

4.SONUÇLAR.....	22
5.TARTIŞMA.....	26
6.ÖZET.....	30
7.KAYNAKLAR.....	32

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yakın tarihlerde, bir çok hematopoetik büyüme faktörü tanımlanmış ve rekombinant olarak üretilerek deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır(1). Bu faktörler arasında GM-CSF, G-CSF, eritropoetin, IL-1,-3,-5 ve -6 sayılabilir. Hematopoetik büyüme faktörleri, hedef hücrelerin proliferasyonu ve matürasyonu yanında, apoptozisi azaltarak hücrenin yaşam süresini de etkilemektedirler(2).

Son yıllarda yapısı, reseptörü ve fonksiyonları hakkında bilgiler edinilen kök hücre faktörü (SCF), multipotent hematopoetik koloni stimulan faktörlerden birisidir(3). Hematopoezde etkili olan büyüme faktörleri arasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle IL-3 ve GM-CSF ile birlikte kullanıldığında *in vitro* ortamda primitif hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu uyarmaktadır(1,2).

SCF, hematopoetik etkilerini hedef hücre yüzeyinde bulunan c-kit reseptörü aracılığıyla gerçekleştirmektedir(4). C-kit transmembran tirozin kinaz reseptörleri ailesinden olup(4,5) kemik iliğindeki CD34+(pozitif) hücrelerde yüksek oranda ekprese edilmektedir(6,7).

Faz-1 çalışmalarda, SCF uygulamasının kemik iliğinde hem primitif hem de diferansiye progenitör hücreleri artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, SCF'nin aplastik anemi, kemoterapinin yol açtığı sitopeni süresinin ve otolog veya allojenik kök hücre transplantasyonlarından sonra aplazi döneminin kısaltılması ve transplantasyon öncesinde donörlerin kök hücre sayısının artırılması gibi bir çok klinik uygulamada kullanılabileceği düşüncesini doğurmaktadır(3,8,9).

Hematopoezin yeniden yapılanması için gerekli olan kök hücrelerinin sağlandığı en önemli kaynağın, kemik iliği olduğu bilinmektedir. Son yıllarda kök hücre kaynağı olarak periferik kan da rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, fetal dolaşımında yüksek oranda kök hücrelerin olduğu bilinmektedir ve yenidoğan kordon

kanından elde edilen progenitör hücre sayılarının, erişkin kemik iliğindeki kadar veya daha fazla sayıda oldukları gösterilmiştir (8,10,11). Bu nedenle diğer bir kök hücre kaynağı olarak kordon kanının da kullanımı gündeme gelmiş ve nitekim kordon kanından elde edilen kök hücrelerle yapılan transplantasyonlar gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta, kordon kanındaki kök ve progenitör hücre sayılarının yeterli olmayabileceği düşünülerek kordon kanı ile yapılan transplantasyonların çoğu çocuk hastalarda uygulanmıştır (6,12).

Ancak, kordon kanındaki kök hücre özelliklerinin diğer kök hücre kaynaklarından elde edilenlere göre daha farklı olduğunu ve yüksek repopülasyon kapasitesine sahip olduğunu destekleyen *in vitro* birçok çalışma bulunmaktadır (6,7,13-16). Ek olarak, kordon kanı ile yapılan transplantasyonlarda aplazi döneminin kısılmasını sağlamak ve hematopoetik yeniden yapılanmayı hızlandırmak için, SCF'nin diğer sitokinlerle birlikte kullanımının yararlı olabileceğini destekleyen *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır (6).

Progenitör hücrelerin SCF'ye verecekleri yanıtın belirlenmesinde progenitör hücreler içinde SCF reseptörü taşıyan hücrelerin oranı önemlidir. Kordon kanındaki CD34 pozitif hücrelerden c-kit eksprese edenlerin yüzdesinin periferik kandakilere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (6). Progenitör hücrelerin SCF'ye verecekleri yanıtın belirlenmesinde, progenitör hücreler içindeki SCF reseptörü taşıyan hücrelerin yüzdesi yanında, her bir hücrenin taşıdığı reseptör yoğunluğu da önemli olabilir. Bildiğimiz kadarı ile kordon kanı veya diğer kök hücre kaynaklarından elde edilen progenitör hücrelerin SCF reseptör yoğunluklarının karşılaştırıldığı İngilizce literatürde yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, sağlıklı 12 erişkinin periferik kan örneklerinden ve 12 yenidoğanın kordon kanından elde edilen mononükleer hücre popülasyonlarında her bir hücre başına düşen SCF reseptör yoğunluğunun flow-sitometrik yöntemle saptanmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Hematopoez

Gestasyonun ilk haftalarında hematopoezin esas yeri *yolk sac'* dir. Karaciğer ve dalak, fetal hayatın 6. haftasından 6-7. ayına kadar hematopoezin ana kaynaklarıdır ve doğumdan sonra 2. haftaya kadar hematopoeze devam ederler. Kemik iliğinde ise hematopoez fetal hayatın 6-7. ayında başlar. Çocukluk ve erişkinlik döneminde hematopoezin tek kaynağı kemik iliğidir. Yenidoğan döneminde tüm kemiklerdeki ilikte hematopoez görülürken, çocukluk çağından itibaren özellikle uzun kemiklerde progresif olarak yağ dokusunun ilik yerine geçişi gözlenir ve yetişkinde iliğin %50'sini yağ dokusu oluşturur. Erişkin çağda hematopoezin devam ettiği kemikler; sternum, kaburgalar, vertebralar, kafa kemikleri, sakrum ve pelvis ile femur ve humerusun proksimal uçlarıdır. Kemik iliğinin bu görevi, normal koşullarda yaşamın sonuna kadar devam eder. Ancak myelofibroz gibi patolojik durumlarda kan yapımı kemik iliği dışında (karaciğer ve dalak) da gerçekleşebilir. Bu duruma ekstramedüller hematopoez denilir(17).

Kemik iliğinde kan hücreleri, endotelial hücre ve fibroblastlarla çevrili sintüzoid denilen bölgelerde yapılır. Burada yapılan kan hücreleri sinüs denilen kemik iliği boşluğuna dökülürler ve buradan da kana geçerler. Tüm kan hücreleri, hematopoetik mikroçevrede gelişirler. Hematopoetik mikroçevrede fibroblastlar, yağ hücreleri, endotelial hücreler, makrofajlar ve mukopolisakkaritler bulunur (17).

2.1.1.Hemopoetik kök hücreler

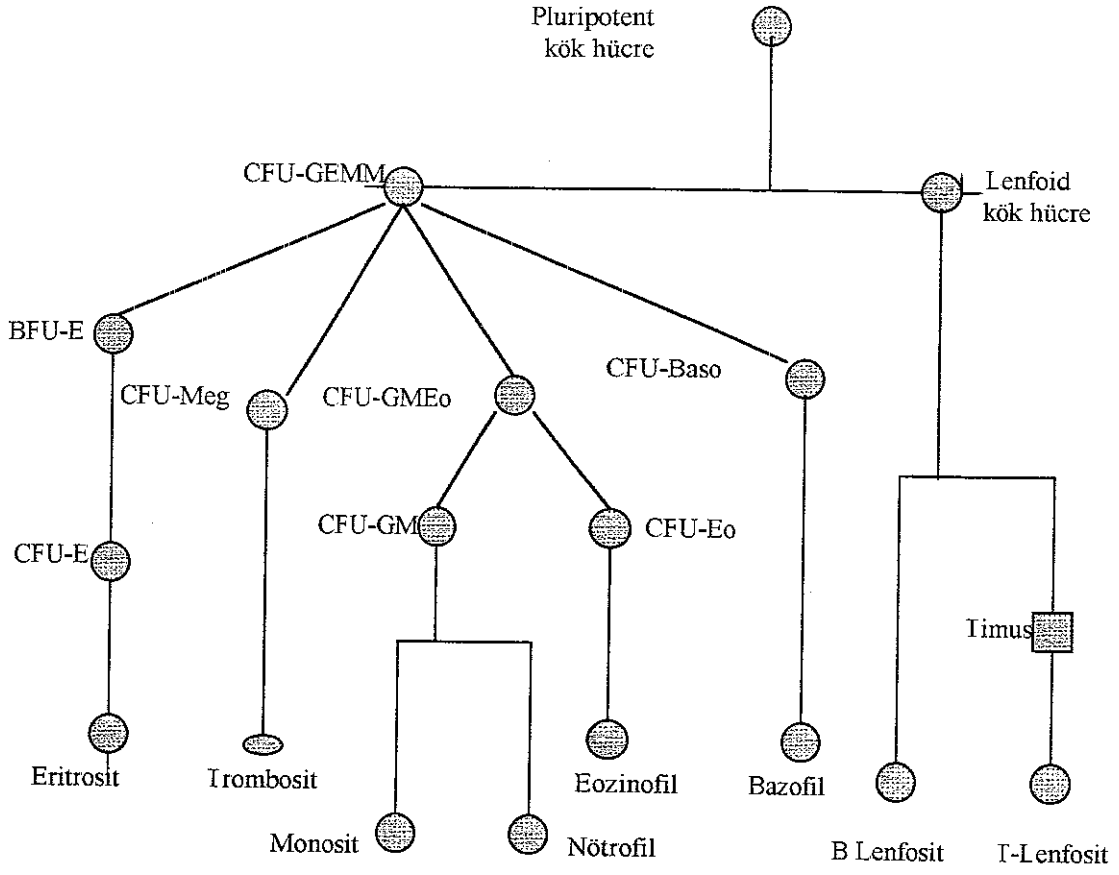
Tüm kan hücreleri, kemik iliğinde bulunan pluripotent kök hücreden farklılaşma yoluyla gelişir. Ana kök hücreden lenfoid ve myeloid dizileri oluşturan kök hücreler gelişirler. Myeloid kök hücre ise eritroid, granülositik-monositik, ve megakaryositik serilerin progenitör hücrelerini oluşturur. Pluripotent ve progenitör kök hücrelerin morfolojik görünümünün, küçük veya orta boy lenfosit benzedikleri çeşitli kültür ortamlarında gösterilmiştir. Saptanabilen en erken myeloid prekürsör CFU-

GEMM'dir ve granülosit, eritrosit, monosit ve megakaryositleri oluşturur(17,18). Lenfoid kök hücreden farklı iki tip hücre grubu oluşur;

a) T lenfosit öncü hücreleri: Bu hücreler hayatın erken dönemlerinde timusa göç ederek olgunlaşma ve farklılaşmalarına burada devam ederler. T lenfosit öncü hücrelerinden sonuçta olgun T lenfositleri oluşur.

b) B lenfosit öncü hücreleri: Bu hücrelerin gelişiminin kemik iliğinde olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerden önce olgun B lenfositleri meydana gelir. Daha sonra antijenik uyarılarla B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşürler(17,18).

Kök hücrelerin farklılaşma özelliği yanında kendini yenileme özellikleri de bulunmaktadır. Kemik iliği yeni hücre yapımının gerçekleştiği ana yerdir ve sağlıklı bir erişkinde üretim belirli bir hız ve sayıda gerçekleşmektedir. Prekürsör hücreler, bir hücre dizisine gereksinimin arttığı durumlarda hemopoetik büyüme faktörlerinin etkisi ile üretimi arttırabilirler. Tek bir kök hücreden 20 bölünmeyi takiben 10^6 olgun kan hücresi oluşabilmektedir(17). (Şekil-1)



Şekil-1: Pluripotent kök hücre ve diğer progenitör hücrelerden kaynaklanan olgun hücrelerin şematik gösterimi.

BFU-E, burst forming unit, erythroid;

CFU-E, Colony forming unit, erythroid;

CFU-GEMM, Colony forming unit, mixed granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte;

CFU-meg, Colony forming unit, megakaryocyte;

CFU-GMEo, Colony forming unit, eozinofil;

CFU-GM, Colony forming unit, granulocyte, monocyte;

CFU-Baso, Colony forming unit, basophil;

CFU-Eo GM, granulocyte, monocyte; Meg, megakaryocyte.

2.1.2. Hemopoetik büyüme faktörleri

Hemopoetik büyüme faktörleri glikoprotein yapıda hormonlar olup, progenitör hücrelerin çoğalma ve farklılaşmaları yanında olgun kan hücrelerinin fonksiyonlarını da düzenlerler (Tablo-1). Etkilerini lokal olarak üretildikleri yerde veya dolaşıma karışarak plazmada gösterirler. Genelde, asıl sentez edildikleri hücreler; T lenfositler, monositler (ve makrofajlar), endotel hücreleri ve fibroblastlar (stromal hücreler) dir(18) . Eritropoetin ise % 90 oranında böbreklerden sentez edilmektedir. Hemopoetik büyüme faktörleri biyolojik etkilerini hedef hücreler üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Bazı büyüme faktörleri normalde plazmada sürekli saptanabilirken, bazıları ise sadece inflamatuvar vb. stimuluslar sırasında saptanabilirler. Antijen veya endotoksinler, T lenfosit ve makrofajları aktive ederek IL-1 ve TNF salınımına neden olurlar, IL-1 ve TNF ise endotel hücrelerini, fibroblastları, diğer T hücreleri ve makrofajları uyararak GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-6 ve diğer büyüme faktörlerinin salınımına yol açarlar (Şekil-2). Bazı büyüme faktörleri değişik hücre grupları tarafından salgılanabilirken, bazıları ise sadece bir hücre grubu tarafından salgılanabilmektedir: Örneğin, T lenfositler görüldüğü kadarıyla IL-3 ve IL-5 salgılayan tek kaynaktır. Büyüme faktörlerinin önemli diğer bir özelliği ise, hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine birden fazla faktörün sinerjistik etki gösterebilmesidir. Ek olarak, bir hücreye etki eden büyüme faktörü, diğer büyüme faktörleri ve/veya reseptörlerinin artışına neden olabilmektedir. Aşağıda büyüme faktörlerinin bazı önemli özelliklerine kısaca değinilmiştir:

IL-1, geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir, ancak özellikle inflamasyonla ilgili olaylarda rol oynar. SCF, pluripotent kök hücre ve erken miyeloid ve lenfoid progenitörler üzerine lokal olarak etki eder. IL-3 ve GM-CSF, multipotansiyel büyüme faktörleridir, IL-3 erken progenitörler üzerine daha etkilidir. IL-3 aktivitesi, granülosit ve monosit üretimi yanında, artmış trombosit üretimine neden olur. IL-1 ve IL-6, SCF'nin etkilerini artırır. Eritropoetin, G-CSF, M-CSF ve IL-5 (eozinofilik büyüme faktörü) geç progenitör-prekürsör hücreler üzerine etkilidirler. IL-6 megakaryosit oluşumunda da rol oynamaktadır. Büyüme faktörleri aynı zamanda

olgun hücrelerin yaşam süresi ve fonksiyonunu da etkilemektedir. Örneğin, GM-CSF olgun nötrofil, monosit ve eozinofillerden çeşitli sitokinler salgılatarak mikrobial öldürme yeteneğini artırmaktadır. Büyüme faktörlerinin bir diğeri ortak özelliği ise programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozisin inhibisyonudur (2,17,19).

Hemopoetik büyüme faktörleri günümüzde bir çok klinik kullanım alanı bulmuştur. Örneğin, GM-CSF ve G-CSF kök hücre nakli yapılan hastalarda aplazi döneminin kısaltılmasında, miyelosüpresif tedavi alan hastalarda gelişen nötropenin düzeltilmesinde; Eritropoetin, kronik böbrek yetmezliğine bağlı anemide; IL-2, renal cell karsinomada kullanılabilir (1).

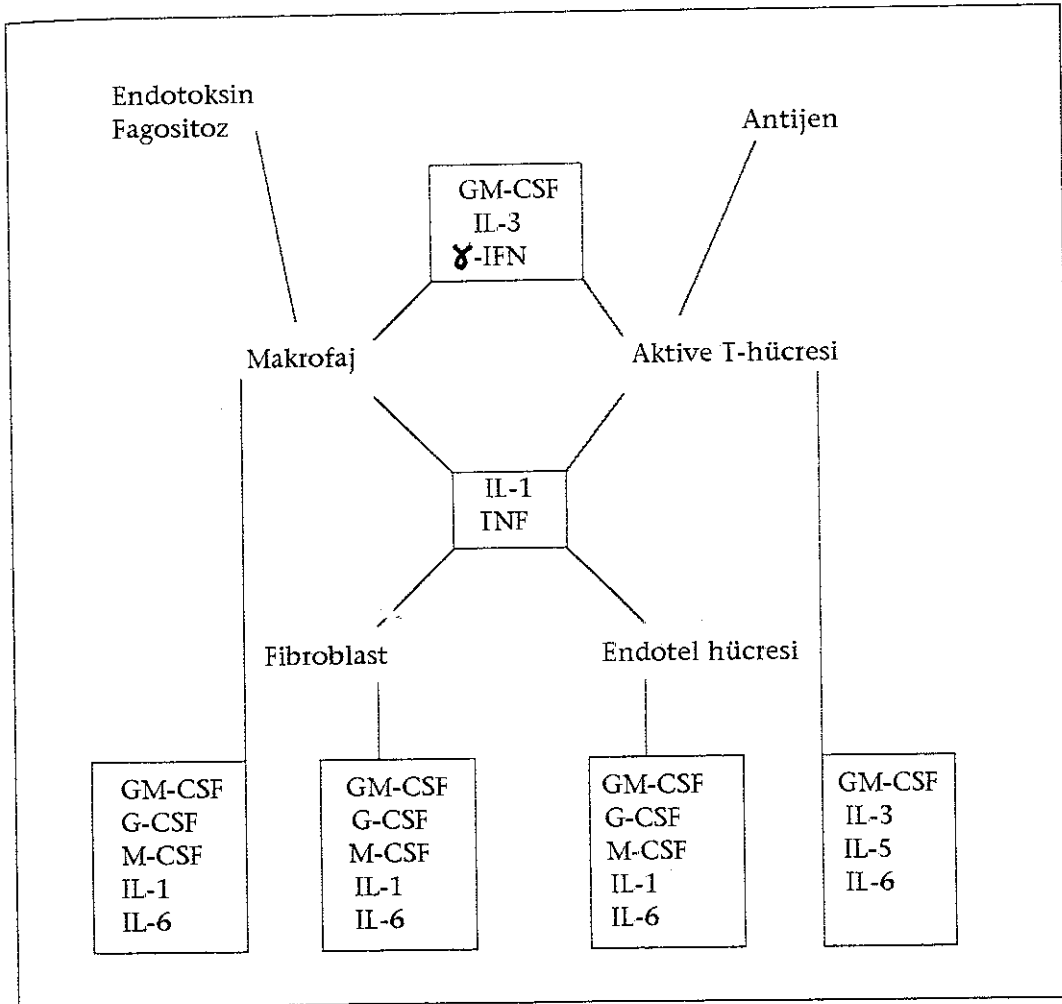
Tablo-1: Hemopoetik Büyüme Faktörleri.

IL-1 ve TNF: Stromal hücreler üzerine etki ederek GM-CSF, G-CSF, M-CSF ve IL-6 salınımını stimüle ederler

SCF: Pluripotansiyel hücreler üzerine etki ederek proliferasyona neden olur

IL-3, IL-6, GM-CSF: Erken multipotansiyel hücreler üzerine etki ederler

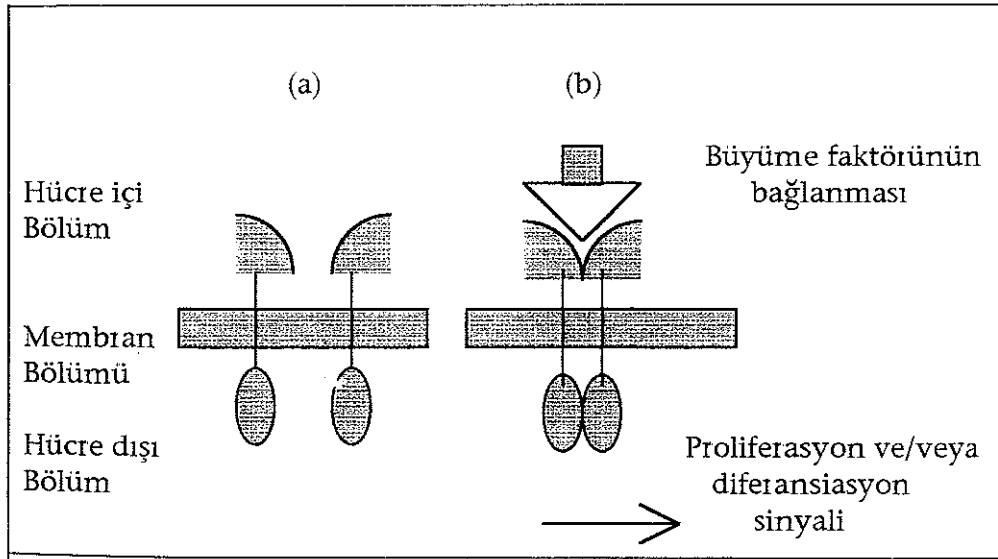
G-CSF, M-CSF, IL-5, Eritropoetin: Geç progenitör hücelere etki ederler



Şekil-2: Büyüme faktörlerinin üretiminin regülasyonu ve hücrel kaynakları.

2.1.3. Hemopoetik büyüme faktörlerinin reseptörleri

Büyüme faktörleri çoğunlukla, hedef hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli reseptörüne bağlanarak hücre içinde bir dizi sinyal üretimine yol açmaktadır (5). Bir çok reseptör, hematopoetin reseptör familyasına ait olup hücre zarında bulunmakta ve glikoprotein yapısındadır (17)(Şekil-3). Büyüme faktörünün reseptöre bağlanması sonucu oluşan dimerizasyon ve reseptörün intraselüler bölümündeki konfigürasyon değişiklikleri, hücre içinde bir seri fosforilasyon olayının başlamasına neden olur ve hücre içine sinyal iletimi gerçekleşir (19). Aralarında SCF reseptörünün de bulunduğu küçük bir reseptör grubu ise, eksternal immünglobulin benzeri yapıya sahiptir. Bu grupta reseptörün hücre içi bölümü tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Büyüme faktörünün reseptörüne bağlanması ve reseptör dimerizasyonu sonucu tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre içi bölüm aktive edilir ve fosforilasyon olayları başlar (4,5,17).



Şekil-3: Büyüme faktörünün hücre yüzeyindeki reseptöre (a) bağlanmasından sonra (b) reseptörde dimerizasyon ve sonrasında intraselüler kısımda değişiklik (örn. fosforilasyon) oluşur. Takiben büyüme sinyali hücre içine iletilir.

2.2. Kök Hücre Faktörü (C-Kit Ligand)

Son yıllarda yapısı, reseptörü ve fonksiyonları hakkında çeşitli bilgiler edinilen glikoprotein yapısında, multipotent hematopoetik koloni stimulan bir faktördür (2,3). Hematopoez dışında, spermatogenez, melanogenez ve mast hücre gelişmesinde, embriyogenez dönemi ve postnatal dönemde rol oynar (4,20). SCF, hedef hücreler üzerindeki etkisini, hücre zarında bulunan c-kit adı verilen reseptörüne bağlanarak göstermektedir (20,21). Hücre zarına bağlı veya plazmada solübl halde olmak üzere 2 formu bulunmaktadır. Membrana bağlı formu 45 kDa ve 32 kDa olmak üzere 2 tip molekülden oluşmaktadır, solubl formu ise SCF'nin membran formundan proteolitik ayrılma ile oluşur (31 kDa ve 23 kDa protein). Erişkinde solubl SCF serum düzeyi yaklaşık 3.3 ng/ml civarındadır (4,20). SCF ürettiği bilinen hücreler arasında başta kemik iliği stromal hücreleri olmak üzere, endotel hücreleri, makrofajlar, sertoli hücreleri, fetal karaciğer ve schwann hücreleri bulunmaktadır (22). Fonksiyonel olarak SCF mast hücre proliferasyonu ve matürasyonunu uyarır, ayrıca diğer büyüme faktörleri (eritropoetin, IL-3, IL-6, IL-7, GM-CSF ve G-CSF) ile sinerjik etki göstererek eritroid ve myeloid koloni formasyonunu stimule eder. IL-7 ile birlikte B-hücre popülasyonunu artırır (21-23).

SCF, özellikle IL-3 ve GM-CSF ile birlikte kullanıldığında primitif hematopoetik progenitör hücreleri (BFU-M, HP-CFC ve LTBMIC) *in vitro* olarak proliferasyon göstermektedir (3). Bu primitif hematopoetik progenitör hücreler CD34+HLA-DR- özelliğinde olup *in vivo* ilik üretme yeteneğindedir, bu yüzden pluripotent hematopoetik kök hücre özelliği gösterirler ve c-kit ligant reseptörü ekspresyon ederler (24). Ayrıca, kordon kanından izole edilen hematopoetik hücreler üzerine SCF'nin etkisine bakılan bir çalışmada, kordon kanı kökenli CD34+ hücrelerin, ilik kaynaklı hücrelere benzer olarak koloniler oluşturduğu ve bu kolonilerin oluşumunda IL-3 ve GM-CSF ile birlikte SCF'nin sinerjistik etki gösterdiği de bildirilmiştir (25).

2.2.1. SCF Reseptörü (C-Kit)

Hematopoezi etkileyen büyüme faktörleri, bu etkilerini hedef hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak gerçekleştirirler. Son bir kaç yılda tirozin kinaz reseptörleri ve ligandlarının hematopoezin regülasyonunda önemli rol oynadığı anlaşılmış ve yeni reseptörlerin varlığı araştırılmaya başlanmıştır (5). C-kit olarak da bilinen SCF reseptörü, SCF'den önce saptanmıştır, yaklaşık 145 kDa molekül ağırlığında olup, tip-3 transmembran tirozin kinaz reseptör familyasındandır ve PDGF ve M-CSF ile benzer yapı gösterir (20,26). C-kit genleri insanda 4. farede 5. kromozomda yer almaktadır (4,5, 27). Reseptörün hücre dışı kısmı YB5.B8 adı verilen monoklonal antikor kullanılarak identifiye edilebilmektedir (28).

C-kit reseptörü, 5S'lik immünglobülin benzeri hücre dışı kısım ve 100 aminoasitten oluşan 7S'lik hücre içi kısım olmak üzere 2 bölümden oluşur (29).

SCF ile stimülasyon sonrasında c-kit dimerizasyonu oluşur. SCF'nin reseptöre bağlanmasında, reseptörün hücre dışı bölümünde bulunan Ig benzeri yapının önemi bulunmaktadır. Dimerizasyon sırasında c-kit'in otofosforilasyona uğramasıyla hücre içi sinyalizasyon başlar. Bir çok mediatör sistem hücre içi sinyalizasyonda rol oynaktadır. Bu sistemler arasında PI-3 kinaz, PLC-y, P21ras, MAP kinaz ve protein kinaz-C sayılabilir(4,30).

Bir çok sitokin gibi C-kit'in de solubl reseptör formu tanımlanmıştır. Soluble reseptörler, sitokin biyoaktivitesi, sitokin transportu ve reseptör sinyalinin modülasyonunda rol oynayabilirler (20,31). Biosentetik çalışmalarda soluble c-kit reseptörünün hücre yüzeyindeki c-kit reseptöründen extraselüler kısmın proteolitik ayrılması ile oluştuğu gösterilmiştir (32). Yakın zamanlarda solubl c-kit reseptörü insan serumundan elde edilmiştir (4). Soluble c-kit düzeylerinin araştırıldığı bu çalışmada 112 sağlıklı donör serumunda c-kit düzeyi bakılmış ve 324 ± 10^5 ng/ml olarak bulunmuştur. Cinsiyet ve yaş ile soluble c-kit düzeyi arasında ilişki bulunamamıştır.

SCF reseptörlerinin insanda, fetal karaciğer, dalak, erişkin kemik iliği ve periferik kandaki erken hematopoetik progenitör hücreler, primer myeloid lösemik hücreler, endotel hücreleri, mast hücreleri, megakaryositler ve primordial germ hücreleri ile plasenta tarafından eksprese edildiği PCR ile gösterilmiştir (4,5). Ayrıca, melanositler, beyin astrositleri ve glial hücreler, renal tubuler hücreler, parotid asiner hücreler, tiroid ve meme epitel hücrelerinden de eksprese edilmektedirler (33).

Hemopoetik seride c-kit daha çok erken dönem progenitör hücrelerde saptanmaktadır. Hemopoetik hücrelerde c-kit ekspresyonunun gösterilmesi için çeşitli kültür hücrelerinde, hayvan ve insan hemapoetik hücrelerinde çalışmalar yapılmıştır. C-kit reseptörü ekspresyonu immatür murine timositlerinde (CD4-CD8-) gösterilmiş fakat daha matür olanlarda (CD4-CD8+, CD4+CD8-, CD4+CD8+) gösterilememiştir (35). C-kit eksprese ettiği saptanan diğer murine hücreleri peritoneal makrofajlar, B hücreleri ve dalak, timus ve periferik kan kaynaklı T lenfositleridir(34). Murine embriyonik kök hücrelerinde reseptör eksprese edilmemektedir(34). Farelerdeki sonuçların aksine insan periferik kanından elde edilen olgun hematopoetik hücrelerde reseptör ekspresyonu görülmemiştir (36). Benzer olarak bir başka çalışmada da insan B ve T hücreleri ile granüositlerde c-kit reseptör ekspresyonu belirlenememiştir (37). Bununla beraber aynı grubun son çalışmalarında monosit ve granüositlerin zayıfta olsa reseptörü eksprese ettiği bildirilmektedir (38). C-kit reseptörü kemik iliğindeki kök hücreleri oluşturan CD34 pozitif hücrelerce eksprese edilmekte, fakat CD34 negatif hücrelerce eksprese edilmemektedir (36). Hematopoetik hücre dizilerinde de c-kit varlığı araştırılmıştır. Bir çalışmada, 7/7 pre-B-cell ve 1/6 B-cell lösemi dizilerinde reseptör gösterilmiş ancak T-cell, myeloid, monositik, eritroid veya megakaryositik lösemi hücre dizilerinde gösterilememiştir(39). Diğer bir çalışmada PCR ile 10/10 pre B-cell ve bazı matür B-cell lösemik hücre dizilerinde, pre T-cell ve bazı T-cell lösemik hücre dizilerinde gösterilmiştir(38). Primer lösemilerde reseptörün ekspresyonu bir çok grup tarafından araştırılmıştır. Bazı lösemilerde c-kit reseptörü belirgin olarak eksprese edilmektedir(38). AML'de %93, T-ALL'de %75, B-ALL'de %100 oranında

reseptör eksprese edilmektedir. KML'de kronik fazda reseptör saptanamazken, akselere fazdaki hastaların %29'unda ve blastik fazdaki hastaların % 75'inde saptanmaktadır(37). Reseptör ekspresyonu ayrıca MCF7 meme kanseri hücre dizisi ve 5637 mesane kanseri hücre dizisinde de gösterilmiştir(38,40). SCF ve reseptörünün lösemi gelişiminde rolü olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir.

2.2.2. SCF'nin Hematolojik Etkileri

SCF'nin hematolojik etkileri hayvan ve insanlarda yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile değerlendirilmiştir. SCF veya reseptöründe mutasyon olan farelerde gelişme bozuklukları ve değişik hematolojik defektler (makrositik anemi ve mast hücre eksikliği) görüldüğü bildirilmektedir (22) ve subkutan rekombinant SCF (r-SCF) enjeksiyonları ile bu bulguların gerilediği gösterilmiştir(41).

r-SCF uygulaması ile farelerde gözlenen hematolojik etkilerin incelendiği bir çalışmada aşağıdaki bulgular saptanmıştır(22); SCF'nin doza bağımlı nötrofili, sola kayma ve lenfositoz yaptığı, kemik iliğinde mast hücre degranülasyonuna yol açtığı, kemik iliğinde sola kayma ile karakterize myeloid ve eritroid hiperplazi yaptığı, perifere salındıkları için kemik iliğinde matür nötrofillerde azalma olduğu, hemoglobin ve hematokrit değerlerinde ise artışa neden olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca mast hücre oranının kemik iliğinde % 26 düzeylerine kadar yükseldiği gözlenmiştir (22). Benzer olarak maymunlarda da SCF uygulamasını takiben lökositoz, retikülositoz, lenfositoz ve kemik iliği selüleritesinde belirgin artış olduğu görülmüştür(42,43).

r-SCF nin ratlarda tek dozda bile hızla myeloid ve eritroid prekürsörlerde artış yapması, insanlarda da bu etkinin araştırılmasını gerekli kılmıştır.

SCF, insanlarda erken hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonunu diğer hemotolojik büyüme faktörleri ile birlikte artırmakta ayrıca mast hücre proliferasyonu ve diferansiasyonunu sağlamaktadır(44).

SCF'nin insan hematopoezisi üzerine *in vitro* etkilerin araştırıldığı bir çalışmada interlökin-3 ve GM-CSF ile birlikte kullanıldığında bir çok primitif hematopoetik progenitör hücrenin (BFU-M, HP-CFC, LTBMIC-IC) proliferasyonuna yol açtığı görülmüştür(3).

SCF'nin etkilerinin insan kemik iliği kültürlerinde bakıldığı bir çalışmada, GM-CSF ve IL-3 ile birlikte HP-CFC koloni formasyonunu 12 kat arttırdığı görülmüştür(3). Aynı çalışmada SCF'nin megakaryositopoezisi artırdığı gösterilmiştir(3). SCF, *in vitro* ortamda eritroid progenitör hücreleride belirgin olarak arttırmaktadır(2).

2.2.3. SCF'nin potansiyel klinik kullanım alanları

Kök hücreler üzerine tek başına ve/veya diğer sitokinlerle birlikte etkileri olduğu bilinen SCF, rekombinant teknikle üretilmeye başlandıktan sonra *in vitro* ve *in vivo* çeşitli çalışmalarda denenmiş ve çeşitli klinik durumlarda uygulanmaya başlanmıştır. SCF'nin tedavideki yerinin araştırıldığı faz-I çalışmalarda kullanılan rekombinant metionil SCF'nin kemik iliğinde hem erken hem de geç dönem progenitör hücreleri arttığı görülmüştür(45). Edinilmiş aplastik anemi ve Fankoni anemisinde stem cell faktörün *in vitro* etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, aplastik anemili hastalarda SCF'nin hemopoetik progenitörlerin proliferasyonunda etkili olduğu, ancak Fanconi anemisinde etkili olmadığı gösterilmiştir(9). Bu çalışmalar, SCF uygulamasının aplastik anemide, otolog veya allojenik kemik iliği transplantasyonlarından sonra greftin kalitesini artırmada etkili olabileceğini düşündürmektedir(3).

SCF'nin potansiyel klinik kullanım alanları aşağıda özetlenmiştir:

- 1- Otolog kök hücre nakilleri için periferik progenitör hücrelerin ve hematopoetik kök hücrelerin *in vivo* mobilizasyonu(46),
- 2- Kök hücre nakli için donörlerden alınacak olan kök hücre sayılarının artırılması(8),
- 3- Kemik iliği yetmezliği durumlarının tedavisinde kullanımı (edinilmiş veya konstitüsyonel (Fanconi) aplastik anemi v.s)(46),
- 4- Kemoterapinin yol açtığı sitopenilerin süresinin kısaltılması(45),
- 5- Kök hücre nakli veya gen transferi sırasında kullanılmak üzere kemik iliği kök hücre sayısının *ex vivo* ekspansiyonu(47,48).

2.3. Kordon kanının hematolojide kullanımı

Kemik iliği kök hücrelerin esas kaynağıdır, bununla beraber kök hücreleri periferik kandan ve kordon kanından da elde etmek mümkündür. İnsan göbek kordonu kanının hematopoetik kök hücre kaynağı olarak kullanılabilmesi ilk kez 1980'lerin başında Edward A.Boyse tarafından ortaya atılmıştır(49). Yakın tarihlerde bir çok pediatrik hastada (örneğin; Fanconi anemisi, Talasemi major) HLA uyumlu veya uyumsuz kardeşlerden alınan kordon kanı infüzyonu ile hematopoez yeniden sağlanmıştır(11,50). Aynı şekilde yüksek doz kemoterapiyi veya radyoterapiyi takiben aplaziye sokulan kemik iliğinde yeniden hematopoezisin başlaması için hematopoetik kök hücre nakli gerekli olabilir, bu hücrelerin ana kaynağı kemik iliği olmasına rağmen, son klinik çalışmalarda alternatif bir kaynak olarak insan göbek kordonu kanının da kullanılabilmesi gösterilmiştir (6,11,49,50).

Transplantasyondaki kritik soru, tek bir kordon kanından toplanan kök ve progenitör hücrelerin engraftment için yeterli olup olmayacağıdır. Genellikle hematolojik rekonstitüsyon olasılığını gösteren parametre 14. günde bakılan CFU-GM ölçümüdür. Bu ölçümün $1.5-5 \times 10^5$ /kg olması genellikle kemik iliği ve periferik kan kök hücre transplantasyonları için yeterlidir(54). CFU-GM sayısının kordon kanında $0.2 \times 10^5 - 25 \times 10^5$ arasında olduğu saptanmıştır. Bu güne kadar yapılan çalışmalar kordon kanında çocuk hastalarda engraftmanı sağlamaya yetecek miktarda kök hücre olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte kordon kanında erişkin bir hastada engraftmanın gerçekleşmesine yetecek sayıda hematopoetik öncül hücre ve pluripotent hematopoetik kök hücre olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber kordon kanı ile yapılan klinik deneyimlerde minimum 6×10^3 CFU-GM bulunmasının kemik iliğinin rekonstitüsyonu için yeterli olduğu gösterilmiştir (55). Broxmayer ve arkadaşları 75-150 ml arasındaki miktarlarda kordon kanının hem çocuklarda hemde erişkinlerde allojeneik transplantasyonu sağlamaya yetecek sayıda CFU-GM içerdiğini göstermişlerdir(59). Ayrıca araştırmacılar kordon kanındaki kök hücrelerin kemik iliğindeki kilerden, kısa dönem hücre kültürleri ve bazı özgün sitokinlerin varlığında daha fazla çoğalma potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir(59,60).

Kordon kanının toplandıktan sonra 4°C - 25°C'de en az 3 gün canlı kaldığının gösterilmesi, hastaneler arasındaki nakil sırasında zaman kısıtlamasının büyük oranda ortadan kaldırılmasına yardımcı olmuştur (51).

Toplama işlemi obstetrik ve transplant ekipleri tarafından kullanılan bir kaç yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Bunlar arasında; 1)Bebek doğduktan sonra plasenta çıkmadan kordonu kesmek, 2)Umblikal damarlardan plasenta çıktıktan sonra drenaj, 3)Kordon ve/veya plasenta venlerden plasenta çıktıktan sonra aspirasyon, 4)Umblikal damarların kanülasyonu ve umblikal damarların serum fizyolojik veya uygun doku kültürü vasatları ile yıkanması, 5)Yukarıdaki yöntemlerin birlikte kullanılması, sayılabilir. Toplanabilecek kordon kanı miktarı 30 ile 300 ml arasında değişmekle birlikte deneyimli araştırmacılar tarafından toplanan 110-120 ml kordon kanı yeterli sayılmaktadır(52,53).

İlk başarılı kordon kanı kök hücre nakli 1988'de Fankoni anemili bir çocukta gerçekleştirilmiştir(56). Bu güne kadarda bir çok hastada kordon kanı kök hücreleri ile başarılı nakiller yapılmıştır. Sonuçlar şu ana kadar umut vericidir. 26 çocuk hastanın değerlendirildiği bir çalışmada; 19 tane HLA uyumlu, 7 tane HLA uyumlu olmayan kardeşten nakil yapılmıştır. Toplanan ortalama kordon kanı miktarı 100 ml ve ortalama çekirdekli hücre sayısı 4×10^7 /kg, CFU-GM sayısı ise 2.4×10^4 /kg olarak hesaplanmıştır. Nötrofil sayısının normale dönmesi için geçen süre ortalama 23 gün, trombosit sayısının normale dönmesi için geçen süre ise ortalama 45 gün olarak bulunmuştur. Bu süreler kemik iliği transplantasyonları sırasında kaydedilenler ile benzerdir (57).

Hematopoetik kök hücre kaynağı olarak umblikal kordon kanının kemik iliğine göre avatajları ve dezavatajları vardır. Avatajları arasında, toplanmasının kolay ve emniyetli oluşu, viral kontaminasyon riskinin düşük oluşu, kesin kanıtlanmamış olsada GVHD'e daha az yol açması sayılabilir. Umblikal kordon kanı transplantasyonları, HLA uyumlu kardeşten yapılan T hücrelerinden arındırılmamış kemik iliği transplantasyonları ile karşılaştırıldığında, transplantasyondan sonra

akut GVH hastalığının daha az sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir (57). Bu, kordon kanında antijene özgü T lenfosit cevabının zayıf olması ile açıklanmaktadır. Kordon kanının diğer bir avantajıda özellikle sitomegalovirüs gibi infeksiyöz ajanların bebeklerde daha seyrek görülmesidir(57). Kordon kanı kök hücreleri ile yapılan transplantasyonların dezavantajlarından biri ise greft versus lösemi etkisinin az olmasıdır(57,58). Ayrıca, kordon kanına anneden gelen T lenfositlerin karışması hayatı tehdit eden GVH hastalığına yol açabilir(58). Bu kontaminasyonu engellemek için toplama işlemi sırasında kordon kanının anne kanı ile temas etmemesine dikkat edilmelidir.

2.4. Flow Sitometre çalışma ilkeleri

Flow sitometre, sıvı bir ortam içinde dağılmış olarak bulunan hücre veya partiküllerin özelliklerinin incelendiği bir tekniktir. Partikül veya hücreler tek sıra şeklinde özel bir bölmeden istenen hızda akarak geçerler. Bu sırada incelenecek olan hücrelerin üzerine belirli bir dalga boyunda laser ışığı gönderilir ve hücrelerden yansıyan ışığın özellikleri alıcılar tarafından kaydedilerek, değerlendirilmek üzere bilgisayara aktarılır. Alıcılardan biri hücrelerin büyüklüklerini, diğeri granülaritesini ve bir diğeri ise yansıttıkları flouresans yoğunluğunu algılar. Bu bilgiler bilgisayar yardımı ile histogramlar şeklinde korele edilerek incelenebilmektedir. Hücreler tek sıra halinde alıcıların önünden geçtiği için, çok kısa bir süre içinde binlerce hücrenin her birinin özellikleri tek tek kaydedilebilmektedir. Histogramlar üzerinde büyüklük ve granülaritelerine göre değişik alanlarda toplanan hücre popülasyonlarının etrafına çizilen pencereler ile sadece istenilen popülasyonlar üzerinde değerlendirme yapmak mümkündür. Flouresans ile bağlanmış monoklonal antikorlar kullanılarak incelenen hücrelerin üzerindeki antijenik yapılar tanınabilmektedir. Böylece hücre yüzey işaretleri saptanarak normal veya patolojik hücrelerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve hastalık durumlarında tedavilere verdikleri yanıtlar monitörize edilebilmektedir. Flow sitometre ile, süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak mümkündür(61).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Denekler:

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda Mart 1996-Mayıs 1996 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Doğum Kliniği'nde, anne ve babaları sağlıklı, normal gebelik süresinde, vaginal yolla doğan ve doğum sonrası problemi olmayan 7 erkek, 5 kız toplam 12 yenidoğandan doğumu takiben alınan umbilikal kordon kanı örnekleri ile yaşları 23 ile 36 arasında değişen, bilinen herhangi bir akut veya kronik hastalığı olmayan ve ilaç kullanmayan, 8 erkek, 4 kadın toplam 12 sağlıklı erişkinden alınan periferik kan örnekleri kullanıldı.

3.2. Kan örneklerinin alınması:

Sağlıklı erişkinlerden, 12 saatlik açlığı takiben saat 08⁰⁰-10⁰⁰ arasında, antekubital venden, 19 gauge iğne ile 5 mL kan örneği steril heparinli tüplere alındı. Yeni doğan grubunda ise kan örnekleri doğumu takibeden ilk yarım saatte umbilikal kordonun klemplenmesini takiben plasental tarafta kalan kısımdaki umbilikal venden, yine steril heparinli tüplere aynı miktarlarda alındı.

3.3. Mononükleer hücrelerin ayrılması:

Heparinli 5 mL kan örneği daha önce içine 5 mL *Hystopaque (ficol-hypaque)*(Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) konulan silikatlı tüpe eklenerek mononükleer hücrelerin ayrıştırılması amacıyla 15 dakika süreyle 850 g (3750 devir/dk) de santrifüje edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen mononükleer hücreler fikol ve kontamine serum komponentlerinin uzaklaştırılması amacıyla 10 mL PBS (*phosphate buffered saline*) solüsyonu içeren tüplerde 10 dakika süreyle 250 g (2000 devir/dk) de 2 kez tekrar santrifüje edilerek yıkandı. Santrifüj sonrasında elde edilen mononükleer hücreler PBS ile dilüe edilerek son konsantrasyondaki hücre sayısının 4×10^6 /mL olması sağlandı.

3.4. Monoklonal antikorlar:

Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerdeki kök hücre yüzdesinin flow sitometrik yöntemle saptanması amacıyla FITC ile direkt olarak bağlı mouse monoklonal antikor (anti-human CD34-FITC, *Becton Dickinson Immunocytometry Systems*, San Jose, CA, U.S.A.) ve non-spesifik bağlanmanın gösterilmesi için anti-CD34 ile aynı izotipte olan mouse monoklonal antikor (negative control IgG1-FITC, *Becton Dickinson Immunocytometry Systems*, San Jose, CA, U.S.A.) kullanıldı.

3.5. SCF reseptör yoğunluğunun saptanması:

Bunun için Avidin-Biotin yöntemi kullanıldı:

Biotinlenmiş rekombinant insan SCF (rh-SCF) 'nin hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanmasını sağlamak için daha önce hazırlanan ve son konsantrasyonunda mL'de 4×10^6 hücre içeren iki kez yıkanmış hücre solüsyonundan 25 μ L alınarak 12x75 mm boyutlarındaki silikatlı tüpler içine konuldu ve üzerine 10 μ L rh-SCF (Fluorokine Human SCF Biotin Conjugate, *R&D Systems*, British Bio Technology, Oxford, U.K.) eklendi. Diğer bir tüpe ise negatif kontrol olarak 10 μ L biotinlenmiş soya fasülyesi tripsin inhibitörü konuldu. Tüpler 60 dakika süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ 'da inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplere 10 μ L avidin-FITC (Avidin-fluorescein *R&D Systems*, British Bio Technology, Oxford, U.K.) eklenerek $+4^{\circ}\text{C}$ de 30 dakika süreyle karanlıkta tekrar inkübe edildi. Ardından hücreler, reseptöre bağlı rh-SCF'ye bağlanmamış avidin-FITC fazlasını uzaklaştırarak non-spesifik boyanmayı en aza indirmek ve spesifik bağlanmayı stabilize etmek için hücreler iki kez 2 mL RDF tamponu (saline-protein solüsyonu) ile yıkandı. 0.2 mL RDF tamponu ile tekrar solüsyon haline getirilen hücreler flow sitometrik analiz için kullanıldı.

3.6. Flow sitometrik analiz:

Flow sitometre ile yapılan analizler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Özel Hematoloji Laboratuvarında bulunan flow sitometre cihazı (*Epics Profile II*, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirildi. Flow

sitometre cihazı 15 µm çapındaki boncuklar (*Immunocheck*, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A.) ile kalibre edildikten sonra periferik kan veya kordon kanından elde edilen mononükleer hücreler flow sitometri cihazına verildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçınım (*forward scatter*) üzerinde ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Mononükleer hücrelerin analizi, hücrelerin büyüklük ve granülaritelerine göre dağılımlarını gösteren ön (*forward*) ve 90°'lik yan saçınım (*right-angle light scatter*) histogramı kullanılarak belirlenen analiz bölgesi içinde gerçekleştirildi.

3.6.1. Periferik kan ve kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerde SCF reseptör yoğunluğunun saptanması:

Önce negatif kontrol (biyotinlenmiş soya fasülyesi tripsin inhibitörü) içeren tüplerde non-spesifik bağlanma oranı saptandı. Negatif kontrolden daha fazla floresans yoğunluğu gösteren olaylar SCF reseptörü için pozitif bölge olarak belirlendi ve bu analiz bölgesinde SCF reseptörü taşıyan hücrelerdeki hücre başına düşen ortalama reseptör yoğunluklarının arbitrary ünitesi olarak ortalama fluoresan kanal numarası (OFKN) kullanıldı.

3.6.2. Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerde CD34 yüzdesinin saptanması:

Her denek için hazırlanan ikişer tüpe 100'er µL mononükleer hücre süspansiyonu konuldu. Birinci tüpe 20 µL negatif izotipik kontrol ikinci tüpe ise 20 µL monoklonal mouse anti-human CD34 eklendi. Örnekler üretici firmanın önerdiği şekilde 30 dakika süreyle +4°C'de karanlık bir ortamda inkübe edildi. En geç 10 dakika içinde flow sitometre ile ölçümler yapıldı.

Negatif izotipik kontrol içeren tüplerde non-spesifik bağlanma oranı saptandı ve CD34 için negatif kontrolden daha fazla floresans yoğunluğu gösteren olaylar CD34 pozitif yüzdesi olarak belirlendi.

sitometre cihazı 15 µ çapındaki boncuklar (*Immunocheck*, Coulter Electronics, Inc., FL, U.S.A.) ile kalibre edildikten sonra periferik kan veya kordon kanından elde edilen mononükleer hücreler flow sitometri cihazına verildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçınım (*forward scatter*) üzerinde ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Mononükleer hücrelerin analizi, hücrelerin büyüklük ve granülaritelerine göre dağılımlarını gösteren ön (*forward*) ve 90⁰'lik yan saçınım (*right-angle light scatter*) histogramı kullanılarak belirlenen analiz bölgesi içinde gerçekleştirildi.

3.6.1. Periferik kan ve kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerde SCF reseptör yoğunluğunun saptanması:

Önce negatif kontrol (biyotinlenmiş soya fasülyesi tripsin inhibitörü) içeren tüplerde non-spesifik bağlanma oranı saptandı. Negatif kontrolden daha fazla floresans yoğunluğu gösteren olaylar SCF reseptörü için pozitif bölge olarak belirlendi ve bu analiz bölgesinde SCF reseptörü taşıyan hücrelerdeki hücre başına düşen ortalama reseptör yoğunluklarının arbitrary ünitesi olarak ortalama fluoresan kanal numarası (OFKN) kullanıldı.

3.6.2. Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerde CD34 yüzdesinin saptanması:

Her denek için hazırlanan ikişer tüpe 100'er µL mononükleer hücre süspansiyonu konuldu. Birinci tüpe 20 µL negatif izotipik kontrol ikinci tüpe ise 20 µL monoklonal mouse anti-human CD34 eklendi. Örnekler üretici firmanın önerdiği şekilde 30 dakika süreyle +4⁰C'de karanlık bir ortamda inkübe edildi. En geç 10 dakika içinde flow sitometre ile ölçümler yapıldı.

Negatif izotipik kontrol içeren tüplerde non-spesifik bağlanma oranı saptandı ve CD34 için negatif kontrolden daha fazla floresans yoğunluğu gösteren olaylar CD34 pozitif yüzdesi olarak belirlendi.

3.7. İstatistik:

İstatistik analizleri SPSS hazır istatistik paket programı (*SPSS for Windows, Version 5.0.1, SPSS Inc., IL, U.S.A.*) kullanılarak gerçekleştirildi. Erişkin periferel kanından ve yenidoğan kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerdeki SCF reseptör yoğunluğunun bir göstergesi olan OFKN arası karşılaştırmalar "*Mann-Whitney U*" testi ile yapıldı. Mononükleer hücrelerdeki CD34 yüzdesi ve yoğunluğu ile SCF reseptör yoğunluğu arasındaki korelasyonlar "*Spearman korelasyon katsayısı*" ile test edildi. Metin içerisinde, tablolarda geçen değerler ortanca (min-max)(minimum-maximum), şekillerde ise gerek "*Box-Whisker plot*" gerekse "*Error bar plot*" (ortalama \pm SD) kullanıldı. 0.05'den küçük *p* değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4.SONUÇLAR

1. Kordon kanındaki mononükleer hücrelerde ortalama CD34 pozitif hücre yüzdesi 0.3 (0.1-2.8) olarak saptandı (Tablo 2 ve 3)

Tablo 2: Kordon kanındaki mononükleer hücrelerde CD34 pozitif hücre yüzdesi

Kordon Kanı	Ortanca	Minimum	Maximum
CD34 (%)	0.3	0.1	2.8

Tablo-3: Herbir olgunun kordon kanındaki mononükleer hücrelerinde SCF reseptör ve CD34 yoğunluğu ile CD34 yüzdeleri

Olgu no	SCF reseptör yoğunluğu (OFKN) kordon kanı	CD34 yoğunluğu (OFKN) kordon kanı	CD34 oranı (%) kordon kanı
1	5.081	2.868	0.3
2	3.692	3.492	0.3
3	2.514	2.627	2.8
4	3.62	2.401	1.1
5	6.555	2.732	0.7
6	5.716	3.131	0.2
7	2.456	2.488	0.2
8	2.243	1.829	0.1
9	3.354	2.083	0.6
10	2.995	2.214	0.9
11	2.456	2.488	0.2
12	9.216	1.545	0.1

2. Kordon kanındaki mononükleer hücrelerde hücre başına düşen SCF reseptör yoğunluğunun bir göstergesi olarak kullanılan ortalama OFKN 3.487(2.243-9.216) olarak saptandı (Tablo 3 ve 4).
3. Sağlıklı erişkinlerin periferal kanındaki mononükleer hücrelerde, hücre başına düşen SCF reseptör yoğunluğunun bir göstergesi olarak kullanılan ortalama OFKN 3.510 (3.012-5.790) olarak saptandı (Tablo 4 ve 5).

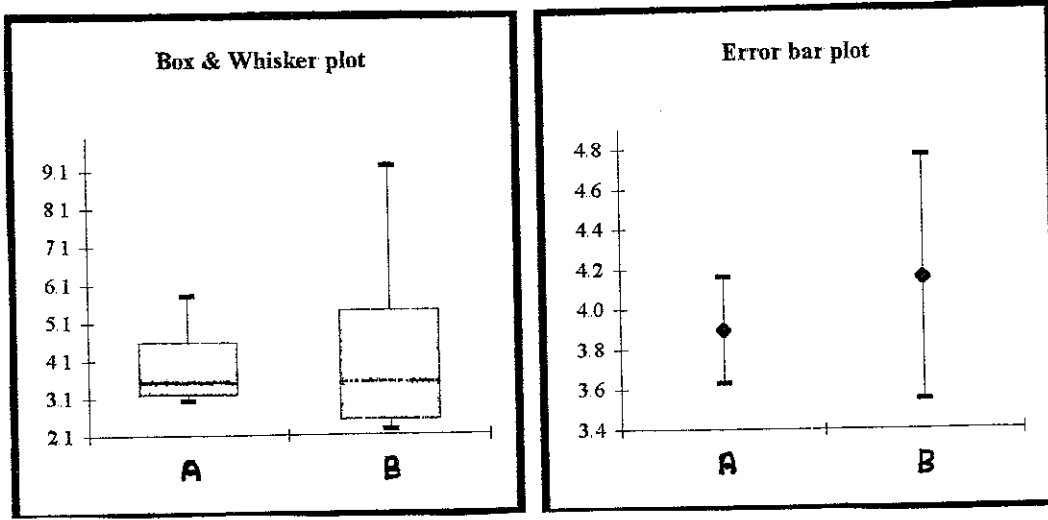
Tablo 4: Kordon kanı ve periferik kandaki mononükleer hücrelerde SCF reseptör yoğunluğu değerleri

SCF reseptör yoğunluğu (OFKN)	Ortanca	Minimum	Maximum
Kordon kanı	3.487	2.243	9.216
Periferik kan	3.510	3.012	5.790

4. Kordon kanı ve erişkin periferal kan örneklerindeki mononükleer hücrelerde SCF reseptör yoğunlukları (OFKN) arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil-4A ve 4B).
5. Kordon kanı mononükleer hücrelerindeki SCF reseptör yoğunlukları (OFKN) ile CD34 yüzdesi arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p=0.07$).
6. Kordon kanı mononükleer hücrelerindeki SCF reseptör yoğunlukları (OFKN) ile CD34 yoğunluğu (OFKN) arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ($p=0.87$).

Tablo-5: Herbir sağlıklı erişkinin mononükleer hücrelerindeki SCF reseptör yoğunluğu (OFKN)

Olgu no	SCF Reseptör yoğunluğu (OFKN)
1	3.645
2	3.012
3	4.219
4	5.79
5	3.078
6	3.019
7	3.285
8	4.172
9	4.97
10	4.909
11	3.374
12	3.269



Şekil-4: Erişkin ve kordon kanı SCF reseptör yoğunluklarının şematik olarak karşılaştırılması. A: Erişkin, B: Kordon kanı OFKN değerlerini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Hemotopoezin yeniden yapılanması için gerekli olan kök hücrelerinin sağlandığı en önemli kaynağın, kemik iliği olduğu bilinmektedir. Son yıllarda kök hücre kaynağı olarak periferik kan da rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, fetal dolaşımında yüksek oranda kök hücrelerin olduğu bilinmektedir. Doğum sırasında kordon kanından elde edilen progenitör hücre sayılarının, erişkin kemik iliğindekiyle göre eşit veya daha fazla sayıda oldukları gösterilmiştir (5,6,49). Bu nedenle diğer bir kök hücre kaynağı olarak kordon kanının da kullanımı gündeme gelmiş ve günümüze kadar çok sayıda kordon kanından elde edilen kök hücreler ile transplantasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kordon kanından elde edilen mononükleer hücre popülasyonundaki CD34 pozitif hücre yüzdesi ortalama 0.3 (0.1-2.8) olarak saptanmıştır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda bu sayının % 1-2 arasında olduğu bildirilmektedir (10). Bu çalışmada CD34 pozitif hücre yüzdesinin beklenenden daha az oranda bulunması, mononükleer hücre seperasyonu sırasında bazı kök hücrelerin kaybedilmesine bağlı olabilir.

Başlangıçta, kordon kanındaki kök ve progenitör hücre sayılarının yeterli olmayabileceği düşünülerek kordon kanı ile yapılan transplantasyonların çoğu çocuk hastalarda uygulanmıştır (6,11,62). Ancak kordon kanındaki kök hücre özelliklerinin diğer kök hücre kaynaklarından elde edilenlere göre daha farklı olduğunu ve yüksek repopülasyon kapasitesine sahip olduğunu destekleyen *in vitro* birçok çalışma bulunmaktadır (6,7,13-16).

Genellikle hematopoezin yeniden yapılanma olasılığı 14.gün CFU-GM assay'leri ile değerlendirilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, kemik iliği ve periferik kan transplantasyonlarında vücut ağırlığının her kilogramı için 1.5×10^5 CFU-GM gerektiği saptanmıştır (54). Kordon kanından alınan örneklerde bu oranın daha düşük olması kordon kanından yapılan transplantasyonların çocuk hastalar için uygun olabileceği sonucunu doğurmuştur (63,64). Ancak kordon kanında minimum

kanı için engraftmanın etkinliğinin değerlendirilmesinde sadece CFU-GM assay'lerinin yeterli olamayabileceği düşündürmüştü ve kordon kanındaki progenitör hücrelerin niceliksel ve niteliksel olarak değerlendirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (6,16,55).

CFU-mix yüzdesi, CD34+CD33- kök hücre altgrup oranı ve c-kit ekspresyonunun saptanması ile değerlendirilen bir çalışmada, kordon kanındaki erken dönem progenitör hücre sayılarının kemik iliğinden daha yüksek olduğu saptanmıştır (6,24). Başka bir çalışmada ise kordon kanındaki CD34 pozitif hücrelerin periferik kandaki CD34 pozitif hücrelerden daha fazla yüzdede c-kit eksprese ettikleri gösterilmiştir (6). Yine aynı çalışmada, PHA ile sitüme edilmiş kordon kanı ile periferik kan mononükleer hücrelerinde sitokin üretiminin kordon kanında daha fazla olduğu ve hücre siklusunun " S " fazındaki progenitör hücre oranının kordon kanında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm bu çalışmalar, kordon kanındaki kök hücre özelliklerinin diğer kök hücre kaynaklarından elde edilenlere göre daha farklı olduğunu ve yüksek repopülasyon kapasitesine sahip olduğunu desteklemektedir.

Progenitör hücrelerin SCF'ye verecekleri yanıtın belirlenmesinde progenitör hücreler içinde SCF reseptörü taşıyan hücrelerin yüzdesi önemlidir. Kordon kanındaki CD34 pozitif hücrelerin periferik kandaki CD34 pozitif hücrelerden daha fazla yüzdede c-kit eksprese ettikleri daha önce gösterilmiştir (6). Progenitör hücrelerin SCF'ye verecekleri yanıtın belirlenmesinde, progenitör hücreler içindeki SCF reseptörü taşıyan hücrelerin yüzdesi yanında, her bir hücrenin taşıdığı reseptör yoğunluğu da önemli olabilir. Bu amaçla, bu çalışmada, periferik kan kök hücrelerinden daha fazla yüzdede SCF reseptörü taşıdığı bilinen kordon kanı kök hücrelerinin, hücre başına düşen reseptör yoğunluğu açısından da farklı olup olmadığının saptanması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada kordon kanından elde edilen mononükleer hücreler ile erişkinlerin periferik kanından elde edilen mononükleer hücreler arasında hücre başına düşen

SCF reseptör yoğunluğu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Bu durum birkaç şekilde açıklanabilir:

1. Kordon kanındaki progenitör hücreler ile periferik kandaki progenitör hücreler arasında hücre başına düşen SCF reseptör ekspresyonu, yani yoğunluğu açısından fark olmayabilir.
2. Bu çalışmada SCF reseptör dansitesi, kordon kanı ve periferik kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücre popülasyonunda ölçülmüştür. Bu nedenle SCF reseptörü taşıyabilme olasılığı olan daha olgun hücreler, örneğin geç progenitör hücreler ve/veya monositler, reseptör yoğunluğunun saptanması için kullanılan OFKN değerlerini etkilemiş olabilirler. Nitekim SCF reseptör yoğunluğu ile CD34 yüzdesi ya da yoğunluğu arasında korelasyon saptanamaması bu olasılığı desteklemektedir.
3. Eğer her iki kaynaktan elde edilen kök hücrelerin nitelik açısından farklı oldukları daha önce yapılan çalışmalar ışığında göz önüne alınırsa, bu çalışmada SCF reseptör yoğunlukları açısından fark bulunamaması, daha fazla SCF reseptörü taşıdığı bilinen kordon kanı kök hücrelerindeki SCF reseptörlerinin SCF'ye karşı olan afinitelerinin daha az olmasına bağlı olabilir.

İlk iki olasılığın test edilmesi için, kordon kanı ile periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerde, kök hücrelerin diğer mononükleer hücrelerden ayrılması gerekmektedir. Bunun için, CD34 pozitif hücreler ile çift renk çalışmalar yapılarak reseptör yoğunluğunun saptanması ve/veya diğer bir kök hücre belirteci olan CD34 pozitif hücre popülasyonlarının sorting yöntemi ile ayrılarak, bu hücre popülasyonlarında çalışılması yararlı olabilir. Üçüncü olasılığın test edilmesi içinse kök hücre belirteci kullanılarak ayrıştırılan progenitör hücrelerin ve daha olgun hücrelerin kültür ortamlarında SCF'ye verdikleri yanıtların değerlendirilmesi gerekmektedir.

Bazı prelininer klinik çalışmalarda, kordon kanı ile yapılan transplantasyonlarda hematopoezin tam olarak yeniden yapılanmasından önce izlenen aplazi döneminin uzun olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, kordon kanındaki hematopoetik progenitör

Bazı prelininer klinik çalışmalarda, kordon kanı ile yapılan transplantasyonlarda hematopoezin tam olarak yeniden yapılanmasından önce izlenen aplazi döneminin uzun olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, kordon kanındaki hematopoetik progenitör hücrelerin sayısını, içinde SCF'nin de bulunduğu çeşitli sitokinler ile arttırabilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (6). Gabutti ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada progenitör hücreler, hücre diferansiasyonunda etkileri daha az olduğu bilinen büyüme faktörleri ile stimüle edilmiş ve IL-6 + IL-3 + LIF + SCF kombinasyonu ile LIF + SCF sitokin kombinasyonlarının kordon kanı progenitör hücrelerinin büyüme ve diferansiasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Yedi gün süreyle uygulanan sitokin kombinasyonları ile BFU-E, CFU-mix ve CFU-GM sayılarında 20-30 kata varan artış izlendiği bildirilmiştir(6). Bu bulgular kordon kanı ile yapılan transplantasyonlarda, aplazi döneminin kısaltılması için SCF'nin diğer sitokinlerle birlikte kullanımını gündeme getirmektedir. Bu nedenle değişik kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin nicelik yanında niteliklerinin de saptanması, özellikle rekombinant tekniklerin gelişmesinden sonra yaygın klinik kullanım alanı bulan SCF'nin de içinde bulunduğu birçok büyüme faktörünün etkinliklerinin değerlendirilmesinde yararlı olacaktır.

6. ÖZET

SCF, son yıllarda tesbit edilen hematolojik büyüme faktörüdür. Etkisini daha çok kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreler üzerinde göstererek proliferasyona neden olmaktadır. SCF, etkisini c-kit adı verilen tirozin kinaz reseptörü aracılığı ile gerçekleştirmektedir. C-kit eksprese eden hücrelerin belirlenmesine yönelik çalışmalar az olup, reseptörün daha çok kemik iliğindeki CD34 pozitif kök hücrelerce eksprese edildiği bildirilmektedir.

Son yıllarda, hematopoetik kök hücrelerin göbek kordonu kanında yoğun olarak bulunduğu bildirilmiştir, bu nedenle kordon kanı kök hücre transplantasyonlarında kullanıma girmektedir. SCF reseptörü olan c-kit'in göbek kordonu kanındaki dansitesini belirlemeye yönelik çalışmalar azdır.

Bu çalışmada sağlıklı 12 erişkinin periferik kan örneklerinden ve 12 yenidoğanın kordon kanından elde edilen mononükleer hücre popülasyonlarında herbir hücre başına düşen SCF reseptör yoğunluğu, flow-sitometrik yöntemle saptanmıştır. Ayrıca yenidoğan grubunda CD34 yoğunluğu ve yüzdesi ile SCF reseptör dansiteleri belirlenerek aralarında istatistiksel anlamlı ilişki varlığı araştırılmıştır.

Sağlıklı erişkinler ile kordon kanı mononükleer hücrelerinde SCF reseptör dansiteleri(OFKN) arasında istatistiksel fark bulunamamıştır($p>0.05$). Kordon kanı CD34 yoğunluğu ile SCF yoğunluğu arasında ve CD34 yüzdesi ile SCF reseptör yoğunluğu arasında fark bulunamamıştır($p=0.07$). Bu durum birkaç şekilde açıklanabilir:

1. Kordon kanındaki progenitor hücreler ile periferik kandaki progenitor hücreler arasında SCF reseptör yoğunluğu açısından fark olmayabilir.
2. SCF reseptörü taşıyabilme olasılığı olan daha olgun hücreler örneğin, geç progenitor hücreler ve/veya monositler, reseptör dansitesinin saptanması için kullanılan OFKN değerlerini etkilemiş olabilirler. Nitekim SCF reseptör dansitesi

ile CD34 yüzdesi arasında korelasyon saptanamaması bu olasılığı desteklemektedir.

3. SCF reseptör dansiteleri açısından fark bulunamaması, daha fazla SCF reseptörü taşıdığı bilinen kordon kanı kök hücrelerindeki SCF reseptörlerinin SCF'ye karşı olan afinitelerinin daha az olmasına bağlı olabilir.

Değişik kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin nicelik yanında niteliklerinin de saptanması, özellikle rekombinant tekniklerin gelişmesinden sonra yaygın klinik kullanım alanı bulan SCF'nin de içinde bulunduğu birçok büyüme faktörünün etkinliklerinin değerlendirilmesinde yararlı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 1-Metcalf D. Haemotopoietic growth factors. *Lancet* 1989;321:885-887
- 2-Koichiro M, Sanford B, Maurice C, Chun-Hua D. Stem cell factor retards differentiation of normal erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 1995;86(July 15):572-580
- 3- Hoffman R, Tong J, Brandt J, Traycoff C, Bruno E. The in vitro and in vivo effects of stem cell factor on human hematopoiesis. *Stem Cells* 1993;11(supp 2):76-82
- 4-Wypych J, Benneth IG, Meredith G, Cloonston LC, Lu HS, Virginia C, Bartley TD, Parker P. Soluble c-kit receptor in human serum. *Blood* 1995;85(January 1):66-73
- 5-Lyman DS. Biology of flt3 ligand and receptor. *Int J Hematol* 1995;62:63-73
- 6-Gabutti V, Timeus F, Ramenghi U, Crescenzo N, Marranca D, Miniero R, Cornaglia G, Bagnara P. Expansion of cord blood progenitors and use for hemopoietic reconstitution. *Stem Cells* 1993;11(supp.2):105-112
- 7- Benedict L, Stefan J, Christa PL. Surface antigen expression on CD34+ cord blood cells: Comparative analysis by flow cytometry and limiting dilution RT-PCR of cymopapain treated and untreated cells. *Cytometry* 1996;25:46-57
- 8-Bagnara GP, Strippoli P, Bonsi L, Brizzi MF, Avanzi GC, Timeus F. Effect of stem cell factor on colony growth from acquired and coctitutional Fanconi aplastic anemia. *Blood* 1992;80:382-387

- 9-Bagnara GP, Strippoli P, Bonsi L, Brizzi MF, Avanzi GC, Timeus F, Ramenghi U. Effect of stem cell factor on colony growth from acquired and constitutional(Fanconi) anemia. *Blood* 1992;80:382-387
- 10- Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, Lee W, Smith S. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immun Immunopath* 1994;70:10-18
- 11-Gluckman E, Broxmeyer E, Auerbach AD, Friedman H, Douglas G, Cooper S. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Eng J Med* 1989;321:1174-1178
- 12- Vilmer E, Stercers G, Rahimy C, et al. HLA mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1991;7(suppl 2):125
- 13- Craig W, Kay R, Cutler RL, Landsdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1993;177:1331-1342
- 14- Murray I, Chen B, Galy A, Tushinski R, Uchida N, Negrin R, Tricot G. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+ Thy-1+ lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 1995;85:368-378
- 15- Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 1990;63:195

- 16-Briddel RA, Broudy VC, Bruno E, Brandt JE, Srour EF, Hoffman R. Further phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. *Blood* 1992;79:3159-3167
- 17-Hoffbrant AV, Pettit JE. *Blood Cell Formation. Essential Haematology*, Blackwell Scientific Publications, London. 1993;1-11
- 18-Groopman JE, Molina JM, Scadden DT. Hematopoietic growth factors: biology and clinical applications. *New Eng J Med* 1989;321:1449-1459
- 19-Kaczmariski RS, Mufti GJ. The cytokine receptor superfamily. *Blood Reviews* 1991;5:193-203
- 20-Turner AM, Benneth IG, Lin NL, Bartley ID, Hunt RW, Atkins HL. Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood* 1995;85:2052-2058
- 21-Galli SJ, Tsai M, Wershill KB. The c-kit receptor, stem cell faktor, and mast cells. *Am J Pathol* 1993;142:965-974
- 22-Ulich TR, Castillo j, Yi SE, Yin S, McNece I, Zsebo MK. Hematologic effects of stem cell factor in vivo and in vitro in rodents. *Blood* 1991;78:645-650
- 23-Okada S, Nakautsi H, Nagayoshi K, Nishikava S, Toshido S. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit and sca-1 positive murine hematopoietic cells. *Blood* 1991;80:3044-3050
- 24-Brandt JE, Baird N, Lu L, Srour E, Hoffman R. Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies in vitro. *J Clin Invest* 1988;82:1017-1027

25-Lyman SD, James L, Johnson L. A growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1994;83:2795-2801

26-Yarden J, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Ulrich U. Human protooncogene c-kit: A new receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1990;6:3341

27-Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal location of a novel tyrosine kinase gene. *Genomics* 1991;9:380-385

28-Broidi CV, Lin N, Zsebo KM, Birkett NC, Smith KA, Bernstein ID, Papayannopoulo I. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood* 1992;79:338-346

29-Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203

30-Lev S, Yarden Y, Givol D. A recombinant ectodomain of the receptor for the SCF retains ligand-induced receptor dimerization and the antagonizes SCF stimulated cellular responses. *J Biol Chem* 1992;267:10866

31-Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: Their role in immunoregulation. *FASEB* 1991;5:2567

32-Heaney ML, Golde DW. Soluble hormone receptors. *Blood* 1993;82:1945

33-Natali PG, Nicotra MR, Sures I, Santoro E, Bigotti A. Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Res* 1992;52:6139

34-Rosnet O, Marchetto S, Birnbaum D. Murine flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGR/CSIR family. *Oncogene* 1991;6:1641-1650

- 35-Methews W, Jordan JT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemscha IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991;65:1143-1152
- 36-Small D, Levenstain M, Kim E. STK-1 the human homolog of flk2/flt3 is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:459-464
- 37-Birg F, Courcoul M, Rosnet O. Expression of the fms/kit like gene flt3 in human acute leukemias of the myeloid and the lymphoid lineages. *Blood* 1992;80:2584-2593
- 38-Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ. Human flt3/flk2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993;82:1110-1119
- 39-DaSilva N, Hu ZB, Ma W, Rosnet O, Birnbaum D, Drexler HG. Expression of the flt3 gene in human leukemia-lymphoma lines. *Leukemia* 1994;8:885-888
- 40-Turner AM, Zsebo KM, Martin F, Jacobsen FW, Bennett G, Broudy VC. Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-kit receptors. *Blood* 1992;80(July 15):374-381
- 41-Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, Broudy VC. Stem cell factor is encoded at the S1 locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 1990;63:213
- 42-Andrews RG, Bartelmez SH, Egrie J, Bernstein ID, Zsebo KB. Recombinant human stem cell factor stimulates in vivo and in vitro hematopoiesis in baboons. *Blood* 1990;76:130a

- 43-Ulich TR, del Castillo J, Busser K, Guo K, Yin S. Acute in vivo effects of IL-3 alone and in combination with IL-6 on the blood cells of the circulation and bone marrow. *Am J Pathol* 1988;133:630
- 44- Mazza JJ. Hematopoiesis and Hematopoietic Growth Factors. *Manual of Clinical Hematology*, Little Brown and Company, Boston 1995:9-16
- 45-Tong J, Gordon MS, Srour EF, Cooper RJ, Hoffmann R. The in vivo administration of recombinant methionyl human SCF expands the number of human marrow hematopoietic stem cells. *Clin Res* 1993;41:195a
- 46-Srouf EF, Brandt JE, Briddel RA, Grigsby S, Hoffman R. Long term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood* 1993;81:661-669
- 47-Andrews RG, Bensinger WF, Knitter GH, Bartelmez SE, Longin K. The ligand for stem cell factor stimulates the circulation of cells that engraft lethally irradiated baboons. *Blood* 1992;80:2715-2720
- 48-Brandt J, Briddel RA, Srour EF, Leemhuis TB, Hoffman R. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992;79:634-641
- 49-Gabutti V, Foa R, Mussa F, Aglietta M. Behavior of human hematopoietic stem cells in cord and neonatal blood. *Haematologica* 1975;69:427
- 50-Wagner JE, Broxmeyer E, Bryd RL, Zehnauer B, Schmeckpeper B, Shah N, Griffin C, Emanuel PD. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood* 1992;79:1874-1881

51-Broxmeyer HE, Douglas GW, Hancog G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem cells. Proc. Natl. Acad Sci USA 1989;86:3828-3832

52-Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Int J Cell Cloning 1990;(suppl 1):76-91

53-Thierry D, Trienau R, Adam M. Study on the hematopoietic stem cells from umbilical cord blood. Bone Marrow Transplant 1991;7:123

54-Lasky LC. Hematopoietic reconstitution using progenitors recovered from blood. Transfusion 1989;29:552-557

55-Gluckman E, Devergia A, Thierry D. Clinical application of stem cell transplantation from cord blood and rationale for cord blood banking. Bone Marrow Transplant 1992;9(suppl 1):114-117

56-Cicuttini FM, Welch KL, Boyd AW. The effect of cytokines on CD34+ Rh-123 high and low progenitor cells from human umbilical cord blood. Exp Hematol 1994;22:1244-1251

57-Wagner JE, Kernan NA, Broxmeyer HE. Allogeneic umbilical cord blood transplantation: Report of results in 26 patients. Blood 1993;10:86a

58-Linch DC, Brenth L. Can cord blood be used? Nature 1989;340:676

59-Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation: an expanded role for cord blood transplantation. Blood cells 1991;17:330-337

60-Hows JM, Bradley BA, Marsh JV . Growth of human umbilical cord blood in long term hematopoietic cultures. Lancet 1992;340:73-76

61-Laerum OD. Flow Cytometry in Hematology. Ed. Laerum OD, Robert B. Academic Press 1992: 3-8

62-Cardoso AA, Batard P, Li ML. Release from quiescence of CD34+CD33- human umbilical cord blood cells reveals their potential to engraft adults. Proc Natl Acad Sci USA 1992;90:8707-8711

63-Thierry D, Traineau R, Adam M. Hematopoietic stem cell potential from umbilical cord blood. Nouv Rev Fr Hematol 1990;32:439-440

64-Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S. Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. Bone Marrow Transplant 1992;9(suppl 1):7-10

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ