

ALLOJENEİK KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU SONRASI Th1/Th2 SİTOKİNLER VE SOLUBL ADEZYON MOLEKÜLLERİ: KÖK HÜCRE KAYNAĞI VE DALTEPARİN KULLANIMININ ETKİLERİ

Harika Çelebi*, Muhit Özcan**, Mutlu Arat**, Klara Dalva**

ÖZET

Allojeneik periferik kök hücre transplantasyonu (AlloPKHT) sonrasında graft versus host hastalığı (GVHH) allojeneik kemik iliği transplantasyonuna (AlloKİT) oranla daha sık görülmektedir. Heparinin deney hayvanlarında bilinmeyen bir mekanizma ile GVHH önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada kök hücre kaynağı veya profilaktik düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) kullanımına göre, 1) Th1 (TNF-alfa, IFN-gama)/Th2 sitokinlerin (IL-10) dengesini değerlendirmeyi ve 2) Solubl adezyon moleküllerinin (SAM) (sVCAM, sICAM, sL-selektin) düzeylerini izlemeyi amaçladık. Çeşitli hematolojik maliniteri olan 30 hasta profilaktik olarak DMAH alan ve almayan olarak prospektif randomize edildi. Kan örnekleri -9.gün, infüzyon günü, aplazi ve engraftman gününde alındı. Sitokin ve SAM düzeyleri ELISA yöntemiyle çalışıldı. Tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde TNF-alfa, IFN-gama ve sICAM-1'in haftalık seyirleri değişiklik göstermeden seyrederken, IL-10, sVCAM-1 ve sL-Selektin düzeyleri hazırlama rejimi ile azalıp, engraftmanla arttı. AlloPKHT ve AlloKİT yapılan olgularda sitokin ve SAM düzeylerinin seyri, AlloPKHT grubunda hazırlama rejimi sonrası azalan ve engraftmanı takiben artan IL-10 düzeyi dışında, benzerdi. DMAH alan ve almayan hastalar arasında sitokin ve SAM düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. IL-10 düzeyleri akut AGVHH şiddeti ile pozitif korelasyon gösterdi ($r=0,517$, $p=0,049$)

Sonuçta, ne kök hücre kaynağı ne de DMAH profilaksininin Th1/Th2 sitokinleri ve SAM'e üzerine bir etkisi olmadı. Bazal sitokin veya SAM düzeyleri allojeneik transplantasyon sonrası görülen akut GVHH gibi komplikasyonlarda belirleyici olmamasına rağmen, IL-10 düzeyleri ile akut GVHH'nin şiddeti arasında pozitif ilişki saptandı.

Anahtar Kelimeler: Graft versus host hastalığı, sitokinler, solubl adezyon molekülleri, düşük molekül ağırlıklı heparin

SUMMARY

TH1/TH2 CYTOKINES AND SOLUBLE ADHESION MOLECULES AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION: INFLUENCE OF STEM CELL SOURCE AND USE OF DALTEPARIN

A higher incidence of graft-versus-host disease (GVHD) has been observed at allogeneic peripheral stem cell transplantation (AlloPBSCT) in comparison to allogeneic bone marrow transplantation (AlloBMT). It has been demonstrated that heparin prevented GVH reaction in animal models by an unknown mechanism. In this study we intended: 1) to evaluate the balance between the levels of Th1 (TNF α and IFN β)/Th2 cytokines (IL10) and 2) to follow the levels of soluble adhesion molecules (SAM) (sVCAM, sICAM, sL-selectin) according to the stem cell source or the use of low molecular weight heparin (LMWH) for prophylaxis. Thirty patients with various hematological malignancies were randomized to use of DMWH or not. Blood samples were obtained on day -9, infusion day, aplasia period and engraftment day. Cytokines and SAM levels were measured by ELISA method. In the group as whole, weekly levels of TNF, IFN and sVCAM remained stable and increased following engraftment. The serial measurements of cytokines and SAM levels with the exception of IL10 levels, which decreased after conditioning regimen and increased during engraftment in the AlloPBSCT group, were similar in patients who underwent AlloPBSCT or AlloBMT. There were significant differences in the serum levels of cytokines and SAMs between the patients who received LMWH and who did not. IL10 levels showed positive correlation with severity of acute GVHD. In conclusion, neither the stem cell source nor the LMWH prophylaxis had any effect on Th1/Th2 type cytokines and SAM. Although baseline cytokines or SAM levels could not predict complications seen after allogeneic transplantation such as acute GVHD, IL10 levels correlated with the severity of acute GVHD.

Key Words: Graft versus host disease, cytokines, soluble adhesion molecules, LMWH

*Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

Hematopoitik hücre transplantasyonu (HHT) hematolojik malinitelerde ve ciddi immün yetmezlik durumlarında sık olarak kullanılan bir tedavi yaklaşımıdır. Graft versus host hastalığı (GVHH) allojeneik kök hücre transplantasyonundan sonra sık görülen ciddi bir komplikasyondur. GVHH'nin patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte bugünkü anlayışa göre afferent ve efferent yollardan oluşmaktadır. Afferent yolu, hazırlama rejiminin oluşturduğu doku hasarı ile verici T hücrelerinin aktivasyon, stimülasyon ve proliferasyonu, efferent yolu ise sitolitik ve inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. Hazırlama rejimi sırasında aktive olmuş alıcı hücrelerinden IL-1, TNF-alfa, GM-CSF ve IFN-gama salgılanır. Salınan bu sitokinler adezyon moleküllerinin ve majör histokompatibilite kompleks antijenlerinin (MCH) ekspresyonunu artırır. Bu şekilde verici T lenfositlerinin bu hücreleri tanınması kolaylaşır (1-4). Verici T lenfositleri alıcı dolaşımına girdiğinde CD4+ T hücreleri MHC II, CD8+T hücreleri ise MHC I ile etkileşir ve her ikisi de GVHH'yi başlatabilir. GVHH'nin gelişmesinde T helper (Th) hücreleri (Th1 ve Th2) önemli rol oynamaktadır. Th1 hücrelerinden IL-2, IFN-gama, TNF-alfa ve beta gibi inflamatuvar sitokinler salgılandıkça, Th2 hücrelerinden IL-4, IL-6 ve IL-10 salgılanır ve immün yanıtı baskırlarlar. GVHH'nin gelişmesinde Th1/Th2 hücreleri arası denge önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bazı adezyon molekülleri GVHH patogenezinde inflamatuvar süreçte doğrudan veya dolaylı yer almaktadır (2-5). Allojeneik periferik kök hücre transplantasyonu (APKHT) sonrası GVHH'nin allojeneik kemik iliği transplantasyonu (AKIT) sonrasına oranla daha sık görüldüğü bildirilmiştir (6). Kemik iliği myeloid hücrelerinden kaynaklanan ve myeloid antijen taşıyan, yaşamı için GM-CSF gerekli olan myeloid dendritik hücre (DH) ve lenfoid DH insan periferik kan ve lenfoid dokularında yeni tanımlanmış olup myeloid belirleyici taşımazlar. Myeloid DH'ler Th1 yanıtı, lenfoid DH'ler ise Th2 yanıtı oluştururlar (7,8). Antikoagulan etkisi yanında heparinin bazı adezyon molekülleri ve sitokin fonksiyonlarını antogonize ettiği ve deney hayvanlarında akut GVHH'yi engellediği bildirilmiştir (9-13).

Bu çalışmadaki amacımız allojeneik HHT'de farklı kök hücre kaynaklarının (PK veya Kl) kullanılmasında Th1/Th2 için belirleyici olabilen sitokinlerin ve solubl adezyon moleküllerinin (SAM) farklı seyredip etmediğini, bu sitokinler ve SAM'ler ile GVHH gelişimi ve şiddeti arasında ilişki olup olmadığını araştırmaktır. Ayrıca düşük molekül ağırlıklı heparin kullanımının inflamasyonda rolü olan SAM ve Th1/Th2 sitokinler üzerindeki etkilerini ve olası anti GVHH etkisini prospektif ve randomize bir çalışma ile araştırdık.

YÖNTEM VE OLGULAR

Eylül 1998- Aralık 1999 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi, Hematoloji Bilim Dalı Kemik İliği Transplantasyon Ünitesinde transplantasyon yapılan 30 hematolojik maliniteli olgu (KML:18, AML:9, ALL:2, MM:1) yazılı onayları alındıktan sonra çalışmaya alındı. Bütün olgulara hazırlama rejimi olarak busulfan 4mg/kg/gün/p.o., dört gün ve siklofosamid 60 mg/gün/i.v., iki gün olarak verilirken, bir olguya total beden ışınlaması+siklofosamid uygulandı. Olgulara GVHH profilaksisi için siklosporin-A (CsA) ve kısa dönem metotreksat (MTX) protokolu kullanıldı. CsA, 3 mg/kg, iki doz halinde, intravenöz olarak kullanıldı. Engrafmanı takiben 5-6 mg/kg/gün, p.o.ya geçildi. MTX ise +1.gün, 15 mg/m², +3 ve +6.günler ise 10 mg/m² verildi. Akut GVHH tanısı daha önce tanımlanan kriterlere göre yapıldı (14). Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) tüm olgulara +1. günden itibaren 5 µg/kg, i.v. infüzyon şeklinde başlanarak, nötrofil sayısı üç gün üst üste >1x10⁹/L oluncaya kadar verildi. Hematopoitik kök hücre kaynağı olarak 14 olguda HLA-uygun kardeşten alınan periferik kök hücre (PKH), 16 olguda ise kemik iliği (Kl) kullanıldı.

Hastalar yürüyen bir klinik protokole göre randomize edildi ve 15 hastaya düşük molekül ağırlıklı heparin (Dalteparin) verilirken, almayan 15 hasta da kontrol grubunu oluşturdu. Dalteparin hazırlama rejiminden bir gün önce (-9. gün) 2500 Ü/gün, s.c. başlandı ve +100. güne kadar devam edildi. Kanama diatezi ve ciddi refrakter trombositopeni gelişmesi durumunda uygulamaya ara verildi. Tüm hastalardan hazırlama rejimine baş-

Tablo 1: Tüm Hastalarda Solubl Adezyon Molekül ve Sitokin Düzeyleri

n=30	KONTROL	-9.GÜN	0.GÜN	APLAZI	ENGRAFMAN	P
TNF- α (pg/ml)	11,61 \pm 4,21	11,89 \pm 3,48	12,40 \pm 4,31	12,49 \pm 3,36	11,13 \pm 3,79	AD
IFN- γ (pg/ml)	2,27 \pm 2,57	1,36 \pm 2,20	1,11 \pm 2,4	2,17 \pm 4,60	2,00 \pm 3,63	AD
IL-10 (pg/ml)	3,09 \pm 3,99	2,42 \pm 2,99	1,06 \pm 1,74	3,66 \pm 5,27	4,86 \pm 5,17	0,001*
sVCAM (ng/ml)	93,23 \pm 50,5	172,51 \pm 114,6	220,11 \pm 109,7	204,29 \pm 94,2	237,54 \pm 102	AD
sICAM (ng/ml)	106,51 \pm 64,55	267,67 \pm 63,72	219,64 \pm 64,29	263,65 \pm 68,30	296,37 \pm 67,81	0,0001 [†]
sL-selektin (ng/ml)	920,00 \pm 223	1103,90 \pm 495	816,00 \pm 439	392,33 \pm 216,6	512,90 \pm 221	0,0001 [‡]

AD: İstatistiksel olarak anlamlı değil

*p=0,21 (-9.gün-0.gün), p=0,006 (0.gün-aplazi), p=0,0001 (0.gün-engrafman)

[†]p=0,0001 (-9.gün-0.gün), p=0,001 (0.gün-aplazi), p=0,003 (aplazi-engrafman), p=0,0001 (0.gün-engrafman)

[‡]p=0,0001 (-9.gün-0.gün, 0.gün-aplazi, -9.gün-aplazi, -9.gün-engrafman, 0.gün-engrafman), p=0,013 (aplazi-engrafman)

lamadan ve dalteparin yapılmadan önce (-9. gün), 0. gün, aplazi ve engrafman günü aç karnına ön kol veninden, 10 ml kan örneği 1:9 oranında %3.8'lik sitratlü tüplere alındı ve bir saat içinde 3000 devirde, 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Alınan serumlar porsiyonlara bölünerek çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. Çalışma günü her test için dondurulmuş serumlar çözülerek oda ısısına gelmeleri sağlandı. Daha sonra TNF-alfa ve IFN-gama, IL-10 ELISA (Endogen, Woburn, MA, ABD) yöntemiyle çalışıldı. Solubl adezyon molekülleri ICAM-1, VCAM-1 ve L-Selektin düzeyleri de aynı yöntemle (ELISA; Parameter, R&D Sistem, Minneapolis, ABD) çalışıldı. Dalteparin alan gruptaki iki hastanın serumları uygun koşullarda saklanmadığı için çalışma dışı bırakıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmede sonuçlar, ortalamaya \pm standart sapma olarak verildi. Bazal, 0., aplazi ve engrafman günleri arasındaki değişiklikler "Friedman" testiyle değerlendirildi. Anlamlılık saptandığında hangi günler arasında olduğunu belirlemek için Wilcoxon testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda nonparametrik test olarak ise "Mann-Whitney U" testi kullanıldı. Üçlü grupların karşılaştırılmasında "Kruskal Wallis" nonparametrik testi kullanıldı. Ayrıca lineer regresyon

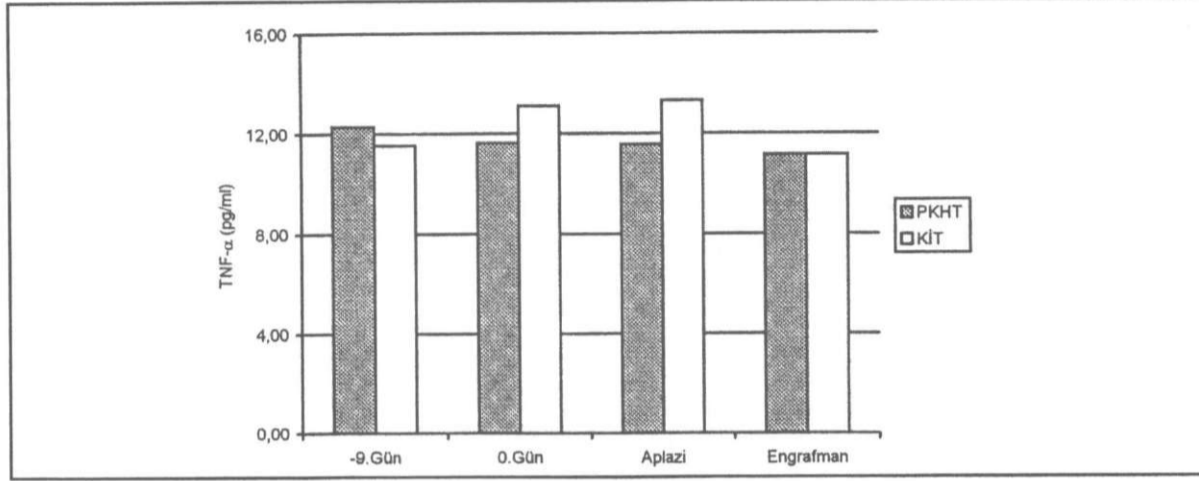
korelasyon analizi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ alındı.

BULGULAR

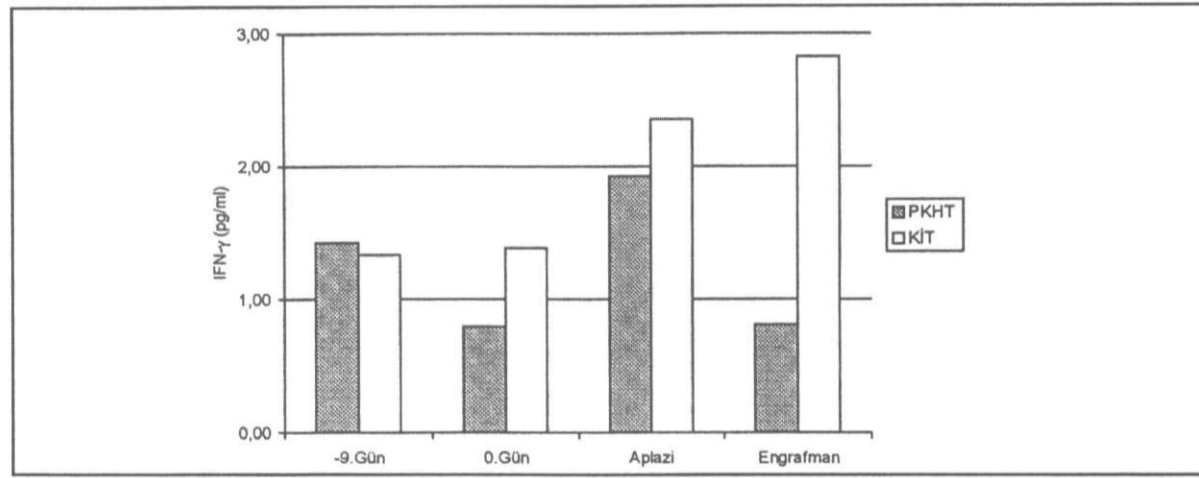
Tüm olgular (n=30) birlikte değerlendirildiğinde (dalteparin alan ve almayan) TNF-alfa, IFN-gama ve sVCAM-1'in 0.gün, aplazi ve engrafman günlerindeki düzeyleri stabil seyrederken, IL-10, sICAM-1 ve sL-Selektin düzeyleri hazırlama rejimi ile azalıp, engrafman haftasında arttı. sL-Selektin düzeyleri ile lökosit sayısı arasında pozitif bir korelasyon bulundu ($r=0,458$, $p=0,005$). Tüm olguların solubl adezyon molekül ve sitokin düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

A-Th1/Th2 Sitokinler

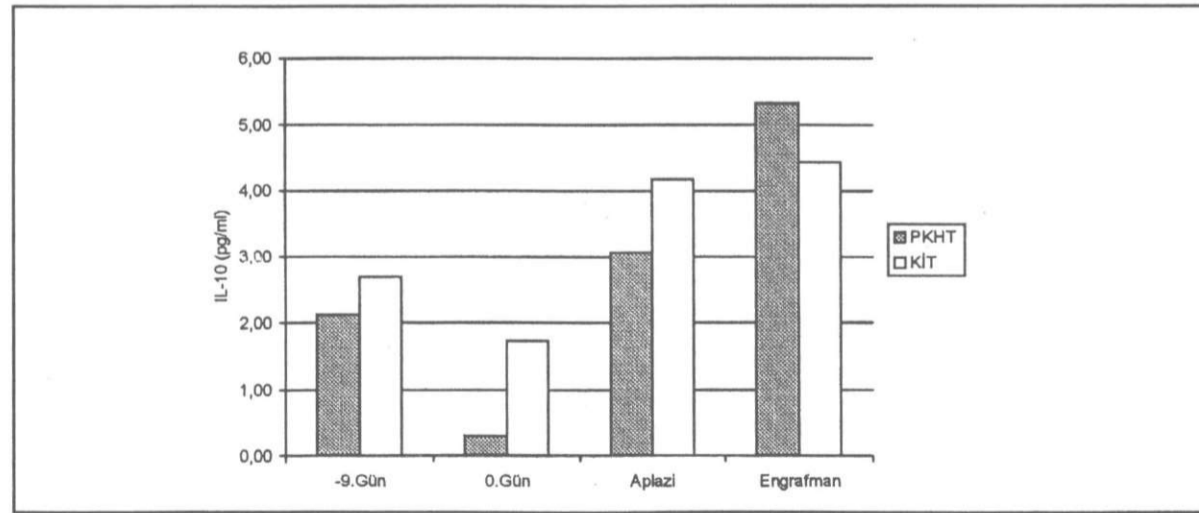
Kök hücre kaynağına göre olguların sitokin düzeyleri Tablo 2'de bildirilmiştir. Kullanılan kök hücre kaynağına göre, karşılaştırma yapıldığında, bazal, 0.gün, aplazi ve engrafman günleri arasında sitokinler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 1a,b,c). Her iki grup kendi içinde değerlendirildiğinde KIT grubunda Th1/Th2 sitokin düzeyleri 0.gün, aplazi ve engrafman fazında stabil seyrederken; PKHT grubunda IL-10 düzeyleri hazırlama rejimi sonunda azalıp, aplazi- ve engrafman fazında anlamlı artışlar gösterdi fakat diğer sitokin düzeylerinde farklılık izlenmedi.



Şekil 1a: PKHT ve KİT olgularında serum TNF-alfa düzeyleri



Şekil 1b: PKHT ve KİT olgularında serum IFN-gama düzeyleri



Şekil 1c: PKHT ve KİT olgularında serum IL-10 düzeyleri

Tablo 2: Solubl Adezyon Molekül ve Sitokin Düzeylerinin Kök Hücre Kaynağına Göre Dağılımı

PKH (+) n=14 KIT(+) n=16	-9.GÜN	0.GÜN	APLAZI	ENGRAFMAN	P
TNF- α (pg/ml)	12,28 \pm 3,89	11,62 \pm 5,58	11,56 \pm 4,04	11,14 \pm 3,62	AD
PKHT	11,52 \pm 3,18	13,09 \pm 2,79	13,30 \pm 2,48	11,13 \pm 4,04	AD
KIT1					
IFN- γ (pg/ml)	1,42 \pm 2,28	0,79 \pm 1,45	1,93 \pm 2,91	0,81 \pm 1,39	AD
PKHT	1,33 \pm 2,21	1,38 \pm 2,45	2,36 \pm 5,71	2,83 \pm 4,46	AD
KIT					
IL-10 (pg/ml)	2,12 \pm 3,24	0,30 \pm 0,51	3,06 \pm 4,99	5,33 \pm 6,28	0,001*
PKHT	2,69 \pm 2,83	1,73 \pm 2,15	4,18 \pm 5,61	4,44 \pm 4,13	AD
KIT					
sVCAM (ng/ml)	172,00 \pm 120,49	229,34 \pm 113,70	211,58 \pm 91,27	220,26 \pm 119,98	AD
PKHT	172,96 \pm 113,20	212,03 \pm 109,27	197,92 \pm 99,35	252,67 \pm 86,47	AD
KIT					
sICAM (ng/ml)	276,49 \pm 62,55	225,91 \pm 51,34	266,46 \pm 67,16	306,10 \pm 58,83	0,001 [†]
PKHT	259,96 \pm 95,75	214,15 \pm 75,08	261,19 \pm 71,38	287,86 \pm 75,66	0,0001 [‡]
KIT					
sL-selektin (ng/ml)					
PKHT	1075,71 \pm 561,82	845,71 \pm 549,93	406,43 \pm 223,49	527,86 \pm 285,61	0,0001 [§]
KIT	1128,56 \pm 446,91	790,00 \pm 330,64	380,00 \pm 216,98	499,81 \pm 153,26	0,0001 [¶]

AD: İstatistiksel olarak anlamlı değil

*p=0,050 (-9.gün-0.gün), p=0,012 (0.gün-aplazi), p=0,005 (0.gün-engrafman)

†p=0,003 (-9.gün-0.gün), p=0,056 (0.gün-aplazi), 0,004 (0.gün-engrafman)

‡p=0,020 (-9.gün-0.gün, aplazi-engrafman), p=0,007 (0.gün-aplazi), p=0,0001 (0.gün-engrafman)

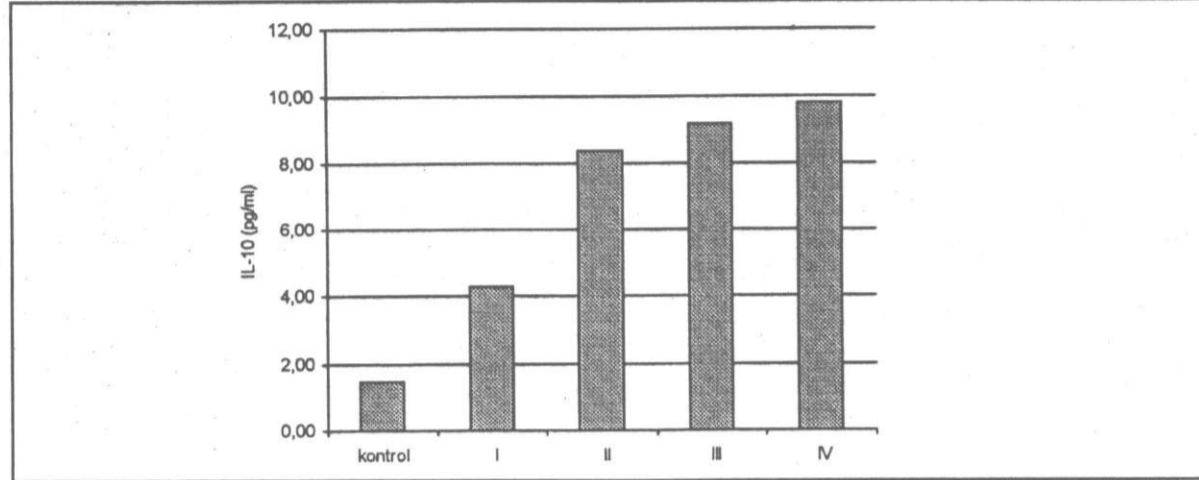
§p=0,008 (-9.gün-0.gün), p=0,001 (-9.gün-aplazi), p=0,004 (-9.gün-engrafman, 0.gün-aplazi), p=0,048 (0.gün-engrafman)

¶p=0,008 (-9.gün-0.gün), p=0,001 (-9.gün-aplazi, 0.gün-engrafman), p=0,0001 (-9.gün-engrafman, 0.gün-aplazi), p=0,041 (aplazi-engrafman)

GVHH ve Sitokinler

Akut GVHH gelişen (n=16) olgular ile izlenmeyen (n=14) olguların ortalama Th1/Th2 sitokin düzeylerinde 0.gün, aplazi, engrafman fazında istatistiksel olarak bir farklılık izlenmedi (Tablo 3). Ancak akut GVHH izlenen olgular kendi içinde değerlendirildiğinde IL-10 düzeylerinin aplazi döneminde, bir önceki düzeye oranla anlamlı düzeyde arttığı izlendi (0,72 pg/dl'den 4,2 pg/dl'ye,

p=0,01). Ayrıca IL-10 düzeyi ile akut GVHH'nin evresi arasında anlamlı bir pozitif korelasyon izlendi (r=0,517, p=0,049, şekil 2). +100.gün alınan örneklerde IL-10 düzeyinin akut GVHH izlenen olgularda, akut GVHH izlenmeyen olgulara göre daha yüksek olduğu görüldü (6,3 pg/ml'ye karşı 1,7 pg/ml, p=0,05). Benzer şekilde IL-10 düzeyi kronik GVHH gelişen olgularda (n=4) gelişmeyenlere göre (n=10) daha yüksekti (8,7 pg/ml'ye karşı 1,8 pg/ml, p=0,003) .



Şekil 2: Akut GVHH'nin şiddeti ile serum IL-10 düzeyleri arasındaki ilişki

B- Solubl Adezyon Molekülleri

Kullanılan kök hücre kaynağına göre (PK veya KI) iki grup farklı olarak ele alındığında hiçbir dönemde sICAM-1, sVCAM-1 ve sL-Selektin düzeylerinde önemli bir farklılık saptanmadı (Tablo 3). sVCAM-1 düzeylerinde ne PK ne de KI grubunda önemli bir değişiklik izlenmedi, sICAM-1 düzeyleri ise her iki grupta hazırlama rejimi sonunda azalırken, aplazi ve engrafman döneminde anlamlı artışlar izlendi. sL-Selektin düzeyi her iki grupta da hazırlama rejimi sonunda azalırken, aplazi ve engrafmanda anlamlı artışlar gösterdi (Tablo 2). sL-Selektin düzeyleri ile hastanın lökosit sayısı arasında pozitif bir korelasyon saptandı ($r = 0,458$, $p = 0,0001$).

GVHH ve Solubl Adezyon Molekülleri

Akut GVHH gelişen ($n=16$) ve akut GVHH izlenmeyen ($n=14$) olguların ortalama solubl adezyon molekül düzeyleri karşılaştırıldığında hiçbir dönemde farklılık göze çarpmadı (Tablo 3). +100.gün yapılan ölçümlerde kronik GVHH gelişen olguların ($n=4$) sICAM-1 düzeyleri kronik GVHH gelişmeyen olgulara ($n=10$) göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (385 ng/ml 'ye karşı 318 ng/ml , $p=0,03$).

C- Dalteparin Profleksisi

Dalteparin kullanımı, TNF-alfa dışı ölçülen parametrelerde hiç bir zaman diliminde ve grupta farklılık oluşturmadı. TNF-alfa düzeyleri dalteparin alanlarda aplazi ve engrafman döneminde

dalteparin almayan olgulara göre daha yüksekti (sırasıyla, $p=0,047$, $p=0,025$, Tablo 4).

Kök hücre kaynağına göre ve GVHH açısından dalteparin alan ve almayan olgular arasında sitokin ve solubl adezyon molekül düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmadı.

TARTIŞMA

Transplant sonrası dönemde plazma sitokin düzeyleri hazırlama rejimi toksitesi, enfeksiyon ve GVHH gibi durumlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (1-5). Farklı kök hücre kaynağı (PK veya KI) veya profilaktik DMAH kullanımında Th1 (TNF-alfa, IFN-gama)/Th2 (IL-10) sitokin ile SAM (sVCAM, sICAM sL-Selektin) düzeylerinin farklı seyredip etmediğini, bu sitokinler ve SAM'ları ile GVHH gelişimi ve şiddeti arasında ki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada; tüm olgular birlikte değerlendirildiğinde TNF-alfa ve IFN-gama düzeyleri hazırlama rejimi ile azalırken, aplazi ve engrafman fazında bazal değerlere göre anlamlı olmayan artışlar görülürken, IL-10 düzeylerindeki aplazi fazında başlayan ve engrafman fazında da devam eden artışlar anlamlıydı. Transplant sonrası sitokin üretimindeki ilk pik ise transplante hücrelerin engrafman zamanında görülmektedir (1, 15).

PKHT son yıllarda allojeneik kök hücre kaynağı olarak daha fazla kullanılmaktadır. Büyüme faktörü kullanılarak mobilize edilmiş periferik kök hücre, kemik iliği ile karşılaştırıldığında 10 kat daha fazla T hücre içermektedir (16). Altı ça-

Tablo 3: Akut Graft Versus Host Hastalığı Olan ve Olmayan Hastalarda Solubl Adezyon Molekül ve Sitokin Düzeyleri

	-9.gün	0.gün	Aplazi	Engrafman	P
AGVHH (+) n=16					
AGVHH (-) n=14					
TNF-α (pg/ml)					
AGVHH (+)	11,39 \pm 4,26	12,43 \pm 5,23	11,82 \pm 3,68	10,25 \pm 4,54	AD
AGVHH (-)	12,43 \pm 2,35	12,37 \pm 3,13	13,25 \pm 2,89	12,14 \pm 2,47	AD
IFN-γ (pg/ml)					
AGVHH (+)	1,64 \pm 2,31	1,64 \pm 2,68	2,91 \pm 5,88	2,40 \pm 3,49	AD
AGVHH (-)	1,07 \pm 2,13	0,55 \pm 0,81	1,37 \pm 2,65	1,85 \pm 3,88	AD
IL-10 (pg/ml)					
AGVHH (+)	2,35 \pm 2,96	0,72 \pm 1,32	4,21 \pm 6,35	4,79 \pm 4,22	0,001*
AGVHH (-)	2,51 \pm 3,12	1,45 \pm 2,12	3,03 \pm 3,82	4,93 \pm 6,25	AD
sVCAM (ng/ml)					
AGVHH (+)	162,84 \pm 93,48	230,77 \pm 102,10	189,65 \pm 73,31	227,51 \pm 81,14	AD
AGVHH (-)	183,57 \pm 137,76	207,92 \pm 120,62	221,03 \pm 114,28	249,01 \pm 125,55	AD
sICAM (ng/ml)					
AGVHH (+)	266,09 \pm 70,32	219,17 \pm 78,92	249,74 \pm 79,38	292,76 \pm 74,12	0,001 [†]
AGVHH (-)	269,49 \pm 57,84	220,17 \pm 45,08	279,55 \pm 51,24	300,49 \pm 62,33	0,0001 [‡]
sL-selektin (ng/ml)					
AGVHH (+)	1069,18 \pm 458,48	715,62 \pm 292,09	327,50 \pm 124,61	534,56 \pm 251,80	0,0001 [§]
AGVHH (-)	1143,57 \pm 549,53	930,71 \pm 552,57	466,43 \pm 275,08	488,14 \pm 186,36	0,0001 [¶]

AD: İstatistiksel olarak anlamlı değil

*p=0,018 (0.gün-aplazi), p=0,002 (0.gün- engrafman)

†p=0,017 (-9.gün-0.gün), p=0,044 (0.gün-aplazi), p=0,002 (0.gün-engrafman), p=0,030 (engrafman-aplazi)

‡p=0,004 (-9.gün-0.gün), p=0,006 (0.gün-aplazi), p=0,001 (0.gün-engrafman), p=0,045 (engrafman-aplazi)

§p=0,001 (-9.gün-0.gün, -9.gün-engrafman), p=0,0001 (-9.gün-aplazi, 0.gün-aplazi), p=0,016 (0.gün-engrafman), p=0,002 (engrafman-aplazi)

¶p=0,048 (-9.gün-0.gün), p=0,002 (-9.gün-aplazi), p=0,001 (-9.gün-engrafman), p=0,004 (0.gün-aplazi, 0.gün- engrafman)

Tablo 4: Dalteparin Alan ve Almayan Olgularda Solubl Adezyon Molekül ve Sitokin Düzeyleri

	-9.GÜN	0.GÜN	APLAZI	ENGRAFMAN	P
TNF- α (pg/ml)					
Dalteparin (+)	12,25 \pm 2,12	14,04 \pm 3,11	12,28 \pm 1,98	12,88 \pm 2,34	AD
Dalteparin (-)	11,55 \pm 4,40	10,97 \pm 4,77	12,67 \pm 4,28	9,061 \pm 4,20	AD
P	AD	0,047	AD	0,025	
IFN- χ (pg/ml)					
Dalteparin (+)	1,16 \pm 1,58	0,98 \pm 1,37	1,99 \pm 2,93	1,61 \pm 3,61	AD
Dalteparin (-)	1,55 \pm 2,71	1,24 \pm 2,57	2,33 \pm 5,85	2,32 \pm 3,75	AD
P	AD	AD	AD	AD	
IL-10 (pg/ml)					
Dalteparin (+)	0,84 \pm 1,55	0,47 \pm 1,04	2,07 \pm 3,81	2,49 \pm 5,66	AD
Dalteparin (-)	3,81 \pm 3,28	1,58 \pm 2,08	5,04 \pm 6,06	6,92 \pm 3,76	0,001*
P	0,003	0,070	0,028	0,0001	
sVCAM (ng/ml)					
Dalteparin (+)	174,83 \pm 118,33	263,11 \pm 119,23	219,86 \pm 95,72	250,95 \pm 116,46	AD
Dalteparin (-)	170,49 \pm 115,12	182,48 \pm 87,97	190,67 \pm 93,90	225,81 \pm 91,69	AD
P	AD	AD	AD	AD	
sICAM (ng/ml)					
Dalteparin (+)	256,60 \pm 46,68	220,85 \pm 54,56	280,83 \pm 59,49	307,16 \pm 73,22	0,0001 [†]
Dalteparin (-)	277,36 \pm 75,80	218,58 \pm 73,54	248,62 \pm 73,72	286,92 \pm 63,56	0,001 [‡]
P					
sL-selektin (ng/ml)					
Dalteparin (+)	1036,92 \pm 505,79	856,43 \pm 507,24	450,00 \pm 273,30	443,07 \pm 173,40	0,0001 [§]
Dalteparin (-)	1162,50 \pm 495,09	780,62 \pm 383,57	341,87 \pm 142	547,00 \pm 244,92	0,0001 [¶]
P	AD	AD	AD	AD	

AD: İstatistiksel olarak anlamlı değil

*P=0,044 (0.gün - -9.gün), p=0,022 (0.gün-aplazi), P=0,001 (0.gün-engrafman)

†P=0,022 (-9.gün-aplazi), P=0,011 (-9.gün-engrafman), p=0,001 (0.gün-engrafman), p=0,006 (aplazi-engrafman)

‡p=0,004 (-9.gün-0.gün), p=0,034 (0.gün-aplazi), p=0,002 (0.gün-engrafman), p=0,016 (engrafman-aplazi)

§p=0,03 (-9.gün-0.gün), p=0,002 (-9.gün-aplazi), p=0,001 (-9.gün-engrafman), p=0,004 (0.gün-aplazi), p=0,005 (0.gün-engrafman)

¶p=0,002 (-9.gün-0.gün, aplazi-engrafman), p=0,0001 (-9.gün-aplazi, 0.gün-aplazi), p=0,020 (0.gün-engrafman)

İşmanın değerlendirildiği bir meta analizde PKHT yapılan olgularda GVHH gelişme riskinin KIT yapılan olgulara göre daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (6). G-CSF kullanımının naive T hücre özelliği taşıyan ve antijen sunan hücre olan dendritik hücreleri (DH) etkilediği gösterilmiştir (7,8). G-CSF kullanımının periferik kanda Th2 yanıtı oluşturan lenfoid DH miktarını artırdığı gösterilmiştir (7, 17). Allojeneik kök hücre kaynağı olarak periferik kök hücre kullanıldığı zaman kemik iliğine göre daha fazla lenfoid DH içerdiği myeloid DH miktarının ise aynı olduğu gösterilmiştir (6). Bizim çalışmamızda da PKHT ve KIT yapılan olgular karşılaştırıldığında iki grup arasında Th1 ve Th2 sitokinleri açısından anlamlı bir farklılık görülmezken PKHT grubunda IFN-gama ve TNF-alfa düzeyleri, aplazi ve engrafman dönemlerinde KIT grubuna göre daha düşüktü. KIT grubunda IL-10 düzeylerinde haftalık seyirlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken PKHT grubundaki aplazi döneminde başlayan ve engrafman döneminde de devam eden anlamlı artışlar görüldü. Bu PKHT'da Th2 hücrelerinin fazla olmasıyla açıklanabilir. Tayebi ve arkadaşlarının (18) yaptığı randomize bir çalışmada transplantasyondan 30 gün sonra PKHT yapılan olgularda periferik kanda dolaşan T hücre sayısının KIT grubuna göre daha yüksek olduğu, fakat aktivitelerinin KIT grubuna göre daha az olduğu saptanmıştır. Bu durum iki grup arasında sitokin düzeylerinin farklı olmasını açıklayabilir.

TNF-alfa düzeylerinin akut GVHH'li olgularda arttığı ilk olarak Holler ve arkadaşlar (19) tarafından gösterilmiştir. Fakat TNF-alfa düzeylerinin akut GVHH'de arttığı ancak bunun klinik seyirle korelasyon göstermediği de bildirilmiştir (20-22). Bu çalışmalardan farklı olarak bizim gibi akut GVHH'de dolaşımda TNF-alfa artışı gözlenmeyen araştırmalar da mevcuttur (23,24). Hill ve arkadaşları, IL-1'in nötralizasyonu sonucunda GVHH'nin mortalitesini azaltırken, TNF-alfanın nötralizasyonunda bu tür bir etki gösterememiştir (25). Bu bilgi TNF-alfanın GVHH gelişimi ve derecesi üzerindeki rolünü kuşkuyla kılmaktadır. IFN-gama ile akut GVHH arasında da ilişki kurulamayan çalışmalar vardır (26,27). Bizim çalışmamızda hem IFN-gama hem de TNF-alfa ile akut GVHH arasında bir ilişki gösteremedik.

Takatsuda ve arkadaşları (15) akut GVHH'li olgularda IL-10 düzeylerinin engrafman günü yüksek olduğunu ve aplazi ile engrafman dönemindeki IL-10 düzeylerinin oranının GVHH'nin şiddeti ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Holler ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada (28) da bazal IL-10 düzeyleri yüksek olgularda akut GVHH ve transplant ile ilişkili ölümlerin daha az olduğu gösterilmiştir. IL-10 düzeyleri ile akut GVHH arasında ilişki olduğu diğer çalışmalarla da desteklenmiştir (22,29,30) Biz çalışmamızda akut GVHH olan ve olmayan olgular arasında IL-10 düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulamadık. Ancak akut GVHH'li olguların +100.gün değerlendirmesinde IL-10 düzeyleri ile akut GVHH şiddeti arasında pozitif korelasyon saptadık. Bazal IL-10 düzeylerinin tüm olgularda saptanabilir limitlerin altında olduğu bir çalışmada; post-transplant IL-10 yüksekliğinin fatal seyirle birlikte olduğu da ileri sürülmüştür (29). Bizim çalışmamızda; akut GVHH olan ve olmayanların bazal değerleri arasında fark olmaması, akut GVHH'nin şiddeti ile IL-10 düzeylerinin ilişkili olması Holler'in (28) sonuçlarının aksine, IL-10 artışının primer değil, daha çok GVHH'ye sekonder bir epifenomen olduğunu düşündürmektedir.

Transplantasyon yapılan olgularda sitokin düzeyleri ile ilgili çalışma sonuçlarının birbirinden farklı olması; hasta, çalışma yöntemi ve hazırlama rejimindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Serumda sitokinlerin tespiti oldukça zordur, ELISA sistemindeki monoklonal antikor ile spesifik epitoplara tanınmasına bağlı sitokin ölçümü, dolaşımdaki solubl reseptörler nedeniyle oldukça zordur (23,24). Sitokin salınımını belirleyici faktörlerden birisi de hazırlama rejimidir. Hazırlama rejiminde total beden ışınlamasının (TBI) olması ve HLA-uygun olmayan vericiden yapılan nakillerde GVHH sıklığının daha fazla olduğu bilinmektedir (31). TBI gastrointestinal sistemde, kemoterapiye göre daha fazla doku yıkımına neden olur ve GVHH'nin gelişmesinde önemli rol oynayan LPS salınımını artırır (25,32). HLA-uygun olmayan vericilerden yapılan nakillerde T hücre aktivasyonu daha fazla olmakta ve buna bağlı olarak da sitokin salınımı artmaktadır. Takatsuda ve arkadaşlarının (15) çalışmasında, olguların çoğu hazırlama rejiminde TBI alırken, bazı olgular-

da HLA-uygun olmayan vericilerden nakil yapılmıştır. Nagler ve Rowbottom'un çalışmaları (20,22) da HLA-uygun olmayan nakillerdir. Bu çalışmalarda bizden farklı olarak akut GVHH'li olgularda IL-10 düzeylerinin yüksek bulunması hazırlama rejimi ve verici tipinin farklı olmasına bağlanabilir. Bizim çalışma grubumuzda olduğu gibi, HLA-uygun transplant yapılan olgularda IFN-gama, IL-2, IL-4 ve IL-10 düzeyleri HLA uygun olmayan transplant olgularına göre daha düşük bulunmuş ve akut GVHH ile bir korelasyon gösterilememiştir (33). Chang ve arkadaşları (23) da HLA uygun kardeşten yapılan transplant sonrası akut GVHH'li olgularda, TNF-alfa düzeylerinde transplant öncesi değerlere göre bir farklılık saptamamışlardır. Bu bulgular bize sitokin salınımlarında hazırlama rejiminin ve vericinin HLA uygun olup olmamasının önemli olduğunu ve bu faktörlerin kontrol edilebildiği çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

Transplant sonrası solubl adezyon molekülleri hakkında bilgi az olup biz çalışmamızda sICAM-1 ve sL-Selektin düzeylerinde lökosit sayısı ile ilişkili değişiklikler saptadık. ICAM ve L-Selektin düzeylerinin engraftman ve lökosit sayısı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (34,35).

GVHH'li olgularda adezyon molekülleri ile ilgili daha çok doku düzeyinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda akut GVHH'nin cilt tutulumunda VCAM-1'in dokuda arttığı, ICAM-1'de ise değişiklik olmadığı gösterilmiştir (36,37). Deneysel bir çalışmada ICAM-1 ekspresyonunun kronik GVHH'nin erken döneminde endotelde arttığı bulunmuştur (38). Deneysel çalışmalarda anti-ICAM ve anti-VCAM tedavisinin GVHH tedavisinde yararlı etkisi olduğu gösterilmiştir (39,40). Matsuda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akut GVHH'li olgularda sICAM-1 düzeylerinin 30-60 günlerde, sVCAM-1 düzeylerinin ise yaygın kronik GVHH'li olgularda yüksek olduğunu göstermişlerdir (5). Bu çalışmada yine yaygın kronik GVHH gelişen olguların gelişmeyen olgulara göre sICAM-1 düzeyleri 30-60 günlerde anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş. Bizim çalışmamızda akut GVHH olan ve olmayan olgularda solubl adezyon molekül düzeylerinde önemli bir farklılık gözlenmedi. Ancak +100.gün yapılan değerlendirmede akut GVHH'li olgularda solubl

adezyon moleküllerinde önemli bir değişiklik bulunmazken, kronik GVHH'li olgularda yalnızca sICAM-1 düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü ki bu daha önceki histopatolojik sonuçlarla da uyumluydu (41,42).

Son zamanlarda heparinin antikoagulan etkisi yanında, tümör yayılımını, transplant sonrası GVHH gelişimini ve inflamasyonu engellediği gösterilmiştir (13,41,42,43). Tümör yayılımı ile adezyon molekülleri arasında ilişki olduğu ve bazı tümörlerde selektinlerin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Heparin bazı selektinlerin ligantlarına bağlanmasını inhibe etmekte ve IFN-gama gibi sitokinleri antogonize ederek anti-inflamatuvar etki gösterebilmektedir (9-12). Yine hayvan çalışmalarında düşük doz heparinin GVHH'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (13). Heparinin sL-Selektin ile ligandı olan sLex arasındaki ilişkiyi bozduğu veya L-Selektin için ligand olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca L-Selektin lökositlerin endotele tutunmasında önemli rol oynamaktadır (11,44). Heparin bunu etkileyerek GVHH'nin engellenmesine katkıda bulunabilir. Bizim çalışmamızda kök hücre kaynağı ve akut GVHH açısından dalteparin alan ve almayan olgular arasında sitokin ve solubl adezyon düzeylerinde bir farklılık izlenmedi.

Sonuç olarak; ne kök hücre kaynağının ne de DMAH profilaksisinin Th1/Th2 sitokin dengesi ve solubl adezyon molekül düzeyleri üzerine önemli bir etkisi olmamaktadır. Bazal sitokin veya SAM düzeyleri allojeneik transplantasyon sonrası görülen akut GVHH gibi komplikasyonlarda belirleyici olmamasına rağmen, IL-10 düzeyleri ile akut GVHH'nin şiddeti arasında pozitif ilişki saptanması bu sitokinin akut GVHH'nin patogeneğinde, birincil veya ikincil, önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Dalteparin kullanımının, eğer varsa anti-GVHH etkinliğinde, solubl adezyon molekülleri ve sitokinleri etkilemek dışında başka mekanizmalar yardımcı görünmektedir. Transplant alıcılarında sitokin çalışmaları yapılması, hazırlama rejimi, verici doku grubu uyumu ve tipi, GVHH profilaksisi v.b. gibi onlarca parametreleri kontrol altında tutulması gerektirdiğinden, multisentrik kontrollü randomize çalışmalar yapılması gereği doğurmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1-Jadus MR, Wepsic HT. The role of cytokines in graft-versus-host reactions and disease. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 1-14
- 2-Krenger W, Ferrara JLM. Graft-versus-Host Disease and the Th1/Th2 Paradigm. *Immunol Res* 1996; 15:50-73.
- 3- Antin JH, Ferrara JLM. Cytokine Dysregulation and Acute Graft-Versus-Host Disease. *Blood*, 1992; 80: 2964-2968.
- 4- Krenger W, Hill GR, Ferrara JLM. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*, 1997; 64: 553-558.
- 5- Matsuda Y, Hara J, Osugi Y, Tokimasa S, Fujisaki H, Takai K, Ohta H, Kawa-Ha K, Okada S. Serum levels of soluble adhesion molecules in stem cell transplantation-related complications. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 977-982.
- 6- Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3685-3691.
- 7-Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000;95:2484-2490.
- 8-Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CDL. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;185:875
- 9-Handa K, Nudelman ED, Stroud MR, Shiozama T, Hakamori S. Selectin GMP-140 (CD62; PAD-GEM) binds to sialosyl-Le^a and sialosyl-Le^x, and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 123-30.
- 10-Norgard-Sunnicht KE, Varki NM, Varki A,. Calcium dependent heparin-like ligands for L-selectin in non-lymphoid endothelial cells. *Science* 1993; 261:480-483.
- 11-Nelson RM, Ceccioni D, Roberts WG, Aurffo A, Lindhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P- selectins and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993; 82: 3253-3258.
- 12-Douglas MS, Rix DA, Dark JH, Talbot D, Kirby JA. Examination of the mechanism by which heparin antagonizes activation of a model endothelium by interferon-gama (IFN- γ). *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 578-584.
- 13-Naparstek E, Slavin S, Weiss L, Sidi H, Ohana M, Reich S, Vlodavsky I, Cohen LR, Naparstek Y. Low-dose heparin inhibits acute graft versus host disease in mice. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 185-189.
- 14-Przepiorcka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15:825-828.
- 15-Takatsuka H, Takemoto Y, Okamoto T, Fujimori Y, Tamura S, Wada H, Okada M, Yamada S, Kanamura A, Kakishita E. Predicting the severity of graft-versus-host disease from interleukin-10 levels after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 1005-1007.
- 16-Bensinger W, Weaver C, Appelbaum F, Rowley S, Demirer T, Sanders J, Strob R, Buckner CD. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cell mobilized by recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Blood* 1995; 85: 1655-1658.
- 17-Ilhan O, Arat M, Dalva K, Arslan Ö, Bakanay M, Topçuoğlu P, Ayyıldız E, Çiftçi A, Akan H. The effect of preapheresis dendritic cell counts on stem cell product. 13rd Congress of the European Society for Haemapheresis, 2001 (Sözel Bildiri)
- 18-Tayebi H, Tiberghien P, Ferrand C, Lienard A, Duperrier A, Cahn JY, Lapierre V, Saas P, Kuentz M, Blaise D, Herve P, Robinet E. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation results in less alteration of early T cell compartment homeostasis than bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 167-175.
- 19-Holler E, Kolb HJ, Moller J, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H, Lehmacher W, Ruckdeschel G, Gleixner B, Rieder C, Ledderose G, Brehm G, Mittermueller J, Wilmanns W. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 1011-1016.

- 20-Rowbottom AW, Riches PG, Downie C, Hobbs JR. Monitoring cytokines production in peripheral blood during acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 635-641.
- 21-Symington FW, Pepe MS, Chen AB, Deliganis A. Serum tumor necrosis factor-alpha associated with acute graft versus host disease in humans. *Transplant* 1990; 50:518-521.
- 22-Nagler A, Bishara A, Brautbar C, Barak V. Dysregulation of inflammatory cytokines in unrelated bone marrow transplantation. *Cytokines Cell Mol Ther* 1998; 4: 161-167.
- 23-Chang DM, Wang CJ, Kuo SY, Lai JH. Cell surface and circulating cytokines in graft versus host disease. *Immunological Investigations* 1999; 28: 77-86.
- 24-Chasty RC, Lamb WR, Gallati H, Roberts TE, Brenchley PEC, Liu Yin JA. Serum cytokine levels in patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:331-336.
- 25-Hill GR, Teshima T, Gerbitz A, Pan L, Cooke KR, Brinson YS, Crawford JM, Ferrara JLM. Differential roles of IL-1 and TNF-alfa on graft versus host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest* 1999; 104: 459-467.
- 26-Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Masauzi N, Matsuura A, Ohizumi H, Morii K, Kiyama Y, Naohara T, Saitho M, Higa T, Honke K, Gasa S, Sakurada K, Miyazaki T. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells during graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *British Journal of Haematol* 1993; 85: 558-565.
- 27-Abu-Ghosh A, Goldman S, Slone V, van de Ven C, Suen Y, Murphy L, Sender L, Cairo MS. Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/cytokines with the incidence of acute graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 535-544.
- 28-Holler E, Roncarolo MG, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Ertl B, Schulz U, Knabe H, Kolb HJ, Andreesen R, Wilmanns W. Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 237-241.
- 29-Hempel L, Körholz D, Nussbaum P, Böning H, Burdach S, Zintl F. High interleukin-10 serum levels are associated with fatal outcome in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 365-368.
- 30-Liem LM, van Houwelingen HC, Goulm E. Serum cytokine levels after HLA-identical bone marrow transplantation. *Transplant* 1998; 15: 863-871.
- 31-Nash A, Pepe MS, Strorb R, Longton G, Pettinger M, Anasetti C, Appelbaum FR, Bowden RA, Deeg HJ, Doney K, Martin PJ, Sullivan KM, Sanders J, Witherspoon R. Acute graft-versus-host disease: Analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. *Blood* 1992; 80: 1838-1843.
- 32-Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JLM. Total body irradiation and acute graft versus host disease: The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90: 3204-3213.
- 33-Cartwright N, Hamon M, Demaine A, Kaminski ER. Failure of cytokine protein secretion in the mixed lymphocyte reaction (MRL) as a predictor of acute graft versus host disease after matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: Suppl 1, page S144.
- 34-Zetterberg E, Richter J. Correlation between serum level of soluble L-selectin and leukocyte count in chronic myeloid and lymphocytic leukemia and during bone marrow transplantation. *Eur J Haematol* 1993; 51: 113-119.
- 35- Arslan Ö, Akan H, Arat M, Dalva K, Özcan M, Gürman G, İlhan O, Konuk N, Bektaş M, Uysal A, Koç H: Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sL-Selectin, sCD44) in healthy allogeneic peripheral blood stem cell donors primed with recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Cytotherapy* 2000; 2:259-265.
- 36-French SN, Guyotat D, French M, Fiere D, Bryon PA, Dechavanne M. Expression of adhesion

- molecules in endothelial cells during allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Haematol* 1994; 52: 296-301.
- 37-Norton J, Sloane P, Al-Saffar N, Haskard DO. Expression of adhesion molecules in human intestinal graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 231-236.
- 38-Schiltz PM, Giorno RC, Claman HN. Increased ICAM-1 expression in the early stages of murine chronic graft-versus-host disease. *Clin Immunol and Immunopath.* 1994; 71: 136-141.
- 39-Schlegel PG, Vaysburd M, Chen Y, Butcher EC, Chao NJ. Inhibition of T cell costimulation by VCAM-1 prevents murine graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. *J Immunol* 1995; 155: 3856-3865
- 40-Poritz LS, Page MJ, Tilberg AF, Koltun WA. Amelioration of graft versus host disease with anti-ICAM therapy. *Journal of Surgical Research* 1998; 80: 280-286.
- 41-Gorelick E, Berr WE, Huberman RB. Role of NK cells in the antimetastatic effect of anticoagulant drugs. *Int J Cancer* 1984; 33:87-94.
- 42-Gunji Y, Gorelick E. Role of fibrin coagulation in protection of murine tumor cells from destruction by cytotoxic cells. *Cancer Res* 1988; 48: 5216-5221.
- 43-Engelberg H. Actions of Heparin That May Affect the Malignant Process. *Cancer*, 1999; 85:257-272.
- 44-Giuffre L, Cordey AS, Monai N, Tardy Y, Schapira M. Monocyte Adhesion to activated aortic endothelium: Role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Bio*, 1997; 136: 945-956.