

İmmun Yapılanma, Tolerans ve Aşılama

Murat TOMBULOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları, Hematoloji Bilim Dalı

Günümüzde yüksek doz kemoterapi veya kemoradyoterapi sonrası kök hücre (otolog veya allojeneik) transplantasyonu neoplastik veya neoplastik olmayan birçok hastalıkta etkin bir tedavi yöntemi olarak uygulanmaktadır. Bu tedavinin başarısı erken dönemde verilen kök hücrelerin alıcıda hızlı ve kalıcı bir şekilde yerleşip fonksiyon görmesine (engrafman) uzun dönemde ise fonksiyonel bir immün sistemin yeniden yapılanmasına bağlıdır(1-3).

Kök hücre kaynağı olarak periferik kanın kullanılması, daha duyarlı HLA belirleme yöntemleri, daha iyi hazırlama rejimleri ve destek tedavilerindeki diğer gelişmeler ile HLA uyumlu akraba dışı vericilerden veya HLA tam uyumlu olmayan aile bireylerinden yapılan kök hücre transplantasyonlarından sonra bile hızlı ve kalıcı şekilde engrafman sağlanabilmektedir. Genellikle transplant sonrası 2 hafta içinde donör kaynaklı yeterli sayıda nötrofil, monosit ve trombosit oluşur. Nötrofil ve makrofajlar doğal immün sistemin en önemli elemanlarıdır. Post transplant C3 veya C4 eksikliği bildirilmemiştir. Aynı süre içinde hazırlama rejiminin etkisi ile bozulan mukozal yapılar da anatomik bütünlüğüne kavuşmaktadır(1-3).

Kazanılmış immün sistemin (hücrel ve humoral) en önemli elemanları olan lenfositlerin sayı ve fonksiyonlarının normale dönmesi transplant sonrası en az 1 yıl devam eden bir süreç içinde gerçekleşmektedir. İmmün sistemin diğer yardımcı hücreleri (en önemli olarak dendritik hücreler) ve elemanlarının (immünglobulinler, sitokinler, kemokinler) gelişmesindeki gecikme ile birlikte bu süreç içinde önemli düzeyde immün yetmezlik durumu oluşmaktadır. Bu durum transplant sonrası mortalite ve morbiditenin en önemli iki nedeni olan infeksiyon ve hastalık relapsından büyük ölçüde so-

rumlu tutulmaktadır. Allojeneik transplantasyon sonrası gelişen kronik "graft versus host" hastalığı ve bunun önlenmesi ve tedavisi için kullanılan immünespresif ajanlar transplant sonrası immün yetmezlik tablosunu daha da ağırlaştırmaktadır. Sonuç olarak kök hücre transplantasyonunun başarısı alıcı "self" antijenlerine karşı tolerans gösteren ancak infeksiyöz veya neoplastik antijenlere karşı etkinliğini tam olarak gösterebilen bir immün sistemin en kısa sürede yapılanmasına bağlı olacaktır. Günümüzde bu yapılanmaya destek olmak amacıyla çeşitli uygulamalar klinik kullanıma girmiştir(1-5).

TRANSPLANT SONRASI İMMUN YAPILANMAYA ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Post transplant ilk birkaç aylık dönemde kazanılmış immün sistem hücrelerinin eksikliğine bağlı olarak derin bir immün yetmezlik durumu oluşur. Yeterli sayı ve fonksiyona sahip immün sistem hücreleri esas olarak verilen kök hücrelerden ve ürün içindeki olgun lenfositlerden gelişir. Alıcıda kalan kök hücreler ve lenfositler de post transplant erken dönemde bu yapılanmaya katkıda bulunabilir. Kök hücre transplantasyonu sonrası immün yapılanma üzerine transplant öncesi, transplant işlemine bağlı ve transplant sonrası çeşitli faktörler (7-18) etkili olmaktadır (Tablo 1).

Transplant öncesi etkili faktörler: Akraba dışı donörlerden veya HLA tam uyumlu olmayan akraba donörlerinden yapılan transplantasyonlarda immün yapılanma gecikmektedir. T hücre yapılanmasını etkileyen en önemli faktör alıcı timusun fonksiyonel durumudur. İleri yaşlarda T hücre yapılanmasındaki gecikmeden timus fonksiyonlarındaki yetersizlik sorumlu tutulmaktadır. Transplant öncesi dönemde alıcıya uygulanmış olan kemoterapi-

Tablo 1. Kök hücre transplantasyonu sonrası immün yapılanmayı etkileyen faktörler²⁷⁻³⁴**I. Transplant öncesi faktörler:**

- Donör - alıcı HLA uyumluluk derecesi
- Alıcı timusunun fonksiyonel durumu.
- Transplant öncesi dönemde uygulanan kemoterapi türleri ve yoğunluğu
- Donör ve alıcının transplant öncesi infeksiyon özellikleri.

II. Transplant işlemine bağlı faktörler:

- Kök hücre kaynağı (kemik iliği, periferik kan, kordon kanı)
- T hücre depleksiyonu uygulamaları
- Hazırlama rejimi (TBI, antilenfosit antikorlar, düşük yoğunluklu hazırlama)

III. Transplant sonrası faktörler:

- GVHD profilaksisi rejimi
- GVHD (özellikle kronik)
- İnfeksiyonlar
- Donör lenfosit infüzyonu ve diğer spesifik hücre uygulamaları
- İntravenöz immün globulin tedavisi

pi doz ve süreleri ile timik radyasyon da aynı yolla immün yapılanma üzerine olumsuz etki gösterebilecektir. CMV, EBV gibi viral infeksiyonlara karşı hem donör hem de alıcının transplant öncesi dönemde immün olması durumunda post transplant daha erken ve güçlü immün yapılanma gelişmektedir.

Transplant işlemine bağlı faktörler: Periferik kandan toplanan kök hücre ürünlerinde kemik iliğine göre en az 10 kat daha fazla lenfosit bulunmaktadır. Özellikle erken transplant sonrası dönemde olgun lenfosit kaynaklı immün yapılanma infeksiyon ve relapsa karşı avantaj sağlayabilir. Her türlü T hücre depleksiyonu işlemi ise immün yapılanmada gecikmeye neden olmaktadır. Hazırlama rejiminde TBI kullanımı veya antilenfositik serum uygulamaları immün yapılanmayı geciktiren miyeloablatif olmayan hazırlama rejimlerinden sonra daha hızlı ve güçlü bir gelişme gözlenmiştir. Verilen hematopoetik kök hücre sayısının ise belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.

Transplant sonrası etkili faktörler: Allojeneik transplant sonrası GVHD profilaksisi için verilen immunsupresif ajanlar, akut GVHD gelişimi ve tedavisi ve özellikle de kronik GVHD immün yapılanma üzerine olumsuz etki gösterir. Deney hayvanlarında kronik GVHD'nin timus kortikal ve medüller hücrelerinde azalmaya, bozulmuş negatif seleksiyona ve otoimmün olayların sıklığında artmaya neden olduğu bildirilmiştir. GVHD aktivasyona bağlı

T hücre kaybına da yol açar. Post transplant donör lenfosit infüzyonu ve diğer adoptif hücre tedavileri, keratonosit büyüme faktörü, İL-7 uygulamaları ise olumlu etki göstermektedir. Özellikle IL-7, timus fonksiyonlarındaki bozukluğa bağlı olumsuzlukları geri çevirebilir. Uzun süreli yüksek doz intravenöz immün globulin verilmesi immün yapılanma üzerine negatif etki göstermektedir. Post transplant viral infeksiyonlar (özellikle CMV) GVHD sıklığında artışa, sitopenilere ve immün sistemin gelişmesinde gecikmeye neden olabilmektedir.

KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU SONRASI İMMÜN YAPILANMA

Kök hücre transplantasyonu sonrası hastaların daha önce almış olduğu kemo/radyoterapi, uygulanan hazırlama rejimi ve GVHD profilaksisine bağlı olarak ilk 1 ayda total lenfosit sayısı genellikle $100/\text{mm}^3$ 'ün altındadır. Lenfositlerin tüm alt gruplarla birlikte sayı ve fonksiyonlarının normale yaklaşması her türlü transplant sonrası en az 1 yıllık bir süre gerektirmekte ve 5 yıl boyunca devam eden bir düzelme olmaktadır. Post transplant 20 yıldan sonra ise normal veya normale yakın bir immün sistemin varlığı gösterilmiştir.(1,2,19,20)

T hücre depleksiyonu yapılmamışsa post transplant ilk iki ay içinde lenfositlerin hemen tamamı kök hücre ürünü içinde bulunan donör kaynaklı lenfositlerdir. Az sayıda alıcıda kalan lenfositler de bulunabilir. Daha sonraki dönemlerde ise kazanılmış immün sistemin asıl yapılanması verilen kök hücreden yeni oluşan lenfositlerle olacaktır (18,21-23).

Doğal Öldürücü Hücreler: Kök hücre transplantasyonu sonrası en erken düzelme doğal öldürücü (NK) hücrelerde olmaktadır. Hastaların hemen tümünde NK hücre sayısı 1-3 ay içinde normale dönmekte ve daha sonra da bu düzeyini korumaktadır. Bu durum otolog veya allojeneik transplantasyona veya kök hücre kaynağına (kemik iliği, periferik kan, kordon kanı) göre önemli bir değişiklik göstermemektedir. Bazen ilk aylarda normalden yüksek sayılar da görülebilir. NK hücreler hematopoetik kök hücreden kaynaklanmaktadır ve CD3- CD16+ CD56+ yüzey işaretleri ile tanımlanırlar. Normalde periferik kan lenfositlerinin % 10 kadarını oluştururlar ve çoğu granüllü büyük lenfosit (LGL) görünümündedir. Yaklaşık 1/3'ünde CD8 pozitifliği bulunur. Yüzey Ig veya T hücre reseptörü (TCR) ekspresyone etmezler. İnsanlarda ve deney hayvanlarında timus olmadan olgunlaşabildikleri gösterilmiştir. Antijen sunan hücrelerden (APC) salgılanan IL-12 NK hücrelerinin çoğalmasını, IFN γ

mRNA transkripsiyonunu ve sitotoksik etkilerini artırır. İn vitro testlerde K562 hücre hattına karşı doğal öldürücü etkilerinin devam etmesi sayısal düzelme yanında işlevsel olarak da normale döndüklerini göstermektedir. Bu hücreler MHC kısıtlaması olmaksızın ve daha önceden uyarılmadan virüsle enfekte veya neoplastik hücreleri öldürebilmektedir. Bu nedenle özellikle post transplant erken dönemde viral enfeksiyonlardan korunmada ve relapsı önlemede çok önemli rolleri olduğu kabul edilmektedir. NK hücreler CD16 molekülleri yoluyla antikör bağlayarak da aktive olabilir. NK hücrelerde "killer immunoglobuline like receptor – KIR" yapıları vardır. KIR diğer hücrelerde bulunan MHC tip I molekülleri ile etkileşir. KIR-MHC uyumsuzluğu NK hücre aktivasyonuna yol açar ve MHC uyumsuz hücre yok edilir. HLA tam uyumlu olmayan transplantasyonda çok sayıda alloreaktif NK hücresi oluşumu akut GVHD gelişiminde etkilidir. NK hücrelerde bulunan KIR reseptörlerinin diğer hücrelerle tam uyumlu MHC tip I molekülü yoluyla etkileşmesi ise NK hücre üzerine inhibitör etki göstermektedir. NK hücreler alıcı immün sistemi hedefleyerek rejeksiyonu önlemede de etkili olurlar(1,2,24-32).

Cd 8+ T Hücreler: İlk 3 ayda düşüken (< 200/mm³) daha sonra hızla yükselir ve 4 – 6 ayda normale döner. T hücre deplesyonu yapılmışsa normal değerlere en az 6 ay sonra ulaşabilmektedir. GVHD olanlarda yüksek sayılara ulaşabilir. Yapılanmaları yaşa, transplant türüne ve kök hücre kaynağına göre pek değişiklik göstermemektedir. CD8 hücrelerin gelişimi CD4+ hücrelere göre timusa daha az bağımlıdır. CD3+CD8+ işaretleri ile NK hücrelerden ayrılır. Önce verilen kök hücre ürünü içinde bulunan donör kaynaklı olgun (bellek) CD8+ hücreler (CD8+CD45RO+) artarken zamanla engraft olan kök hücreden yeni yapılan (naive) CD8+ (CD8+CD45RA+) hücreler baskın olmaktadır. Özellikle ilk birkaç aydaki sayıları ve antijen reseptör repertuarı genişliği ürün ile verilen CD8+ hücre sayı ve repertuarı ile orantılı bulunmuştur (1,2,5,17,31-33) .

CD8+ hücreler özellikle virus ile (CMV, EBV) enfekte hücrelere ve neoplastik hücrelere HLA-kısıtlı sitotoksik aktivite göstermektedir (sitotoksik T lenfositler). Bu etkinin daha uzun süreli ve güçlü olması CD4+ hücre desteğini gerektirir. Aşırı viral yük varlığında T hücre yardımı yoksa sitotoksik CD8+ T hücreleri kısa sürede tükenmektedir. Transplant sonrası ilk aylarda spesifik CD8+T hücre fonksiyonunun yetersiz olması viral enfeksiyonlara belirgin duyarlılık yaratmaktadır. Ex vivo olarak

çoğaltılan antijen spesifik CD8+T hücreler ile spesifik immünte transferi yapılabilmektedir. Bu yoldan hareketle T hücre deplesyonu yapılmış kök hücre verilen hastalarda alloreaktif CD8+ hücrelerin immunotoksinlerle deplesyonu yapıldıktan sonra kalan lenfositler geri verilerek GVHD olmadan antiviral ve antineoplastik etkinliğin devam ettirilebileceği gösterilmiştir. GVHD olmayan hastalarda CD8+ hücrelerin alıcıya karşı donör reaksiyonunu baskılayıcı özgün etkileri (supresif aktivite) daha yüksek bulunmuştur. Supresif aktivitede özellikle CD57+CD8+ hücre kaynaklı solubl faktörler etkili olmaktadır (1,2,17,31-33).

CD4+ Hücreler: Kök hücre transplantasyonu sonrası en önemli ve uzun süreli değişiklikler CD4+ hücre yapılanmasında olmaktadır. Primer hücresel immün yanıtta sorumlu olan CD4+ hücreler en az bir yıllık süre sonunda normal sayı ve fonksiyona ulaşmaktadır. Bunun en önemli nedeni timus fonksiyonlarında yaş, kemoterapi, radyoterapi ve GVHD sonucu oluşan değişikliklerdir. Daha önce de belirtildiği gibi CD8+ hücre gelişimi timus fonksiyonlarına daha az bağlıdır. CD8+ sayısının hızla normale gelmesine karşın CD4+ hücre sayısının uzun süre düşük kalması nedeniyle post transplant yaklaşık 1 yıl süre ile CD4:CD8 oranı tersine döner. Kordon kanı transplantasyonu sonrası ise bu oran 6 ayda normale dönebilmektedir (1,2,15,16,17,32-34).

CD4+ hücrelerin doğal gelişiminde önce timus kaynaklı yabancı antijenle karşılaşmamış "naive" (CD4+CD45RA+) hücreler daha sonra da olgun "memory" (CD4+CD45RO+) hücreler oluşmaktadır. Kök hücre transplantasyonu sonrasında ise ilk 3 aylık dönemde verilen ürünün içinde bulunan donör kaynaklı olgun CD4+CD45RO+ hücreler egemendir. Bu dönemde hastadaki CD4+ hücre sayısı verilen üründeki sayı ile orantılı bulunmuştur. Periferik kök hücre ürününde CD4+ hücre sayısı kemik iliğine göre daha yüksektir. Bu olgun T hücrelerin otolog transplantasyon sonrasında 1. aydan itibaren hızla azaldığı gösterilmiştir. T hücre deplesyonu yapılanlarda ise genellikle ilk 2-3 ay dolasımında CD3+ T hücre bulunmaz. Kök hücre kaynaklı yeni CD4+ CD45RA+ hücre sayısı çoğunlukla 6. aydan sonra artmaya başlar. Bu artış yaşla ters orantılıdır. Timus çıkışlı yeni T hücre miktarı yüzey belirleyicileri yanında, T hücre reseptör gen düzenlemesi yapılırken ayrılan ve daha sonra çoğalmadan hücre içinde kalan DNA "T cell receptor excision circles –TREC" miktarının periferik kanda ölçümü ile oldukça doğru bir şekilde yapılabilmektedir. TREC miktarı artışı TCR repertuar artışı ile

de uyumlu bulunmuştur. Post transplant 2 yıl sonra bile özellikle "naive" CD4+ hücre sayısı yetersiz olabilmektedir. Donör kaynaklı olgun antijen spesifik T hücrelerinin uzun dönem T hücre immunitesindeki rolü belki değildir. Bu hücreler muhtemelen kısa süreli pasif hücrel immünite sağlarlar. Uzun dönem hücrel immünite ise kök hücrelerden yeni oluşan T hücreleri aracılığı ile gelişmektedir(1,2,19,34-42).

Post transplant 1 yıllık dönemde CD4+ T hücre sayılarının yanında TCR repertuarında da belirgin kısıtlılık olduğu gösterilmiştir. TCR'nin değişken bölgesine spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak veya değişken bölgeden sorumlu gen dizilimindeki farklılıkların PCR yöntemleri ile saptanması ile repertuar genişliği belirlenebilir. Yine bu dönemde "helper" T hücrelerin in vitro mitojen yanıtlarında, sitokin (IL-2, IFN γ) salgılamalarında ve in vivo geç aşırı duyarlılık, antijen spesifik proliferasyon reaksiyonlarında bozukluklar gösterilebilir. Transplant öncesi hem donör hem de alıcının aynı antijenle (CMV) karşılaşmış olması daha erken spesifik immün yanıt oluşturabilmektedir (34-43).

B Hücreler ve İmmunoglobulinler: Post transplant ilk 2 ay sayıları mikrolitrede 200'ün altındadır. Gelişim normal B hücre ontogenesisine uyum gösterir. İlk 2 ay B hücrelerinin çoğu donör kaynaklıdır. Bu olgun B hücreleri ile humoral immünite pasif olarak transfer olur. Üçüncü aydan sonra kök hücre kaynaklı öncü B hücreleri artmaya başlar. B hücre sayısı genellikle bir yıl içinde normale döner. Ototog ve kordon kanı transplantasyonu sonrası daha hızlı yükselmektedir. B hücre depleasyonu yapılsa bile B hücre yapılanması normal devam edebilmektedir. Yeni oluşan bu B hücreleri immünofenotipik olarak neonatal B hücrelerine çok benzer. "Naive" (IgD+) hücreler nispeten hızlı artarken "memory" (IgD-) B hücreler daha yavaş artmaktadır. T hücrelere benzer şekilde sayısal artışla birlikte Ig repertuarında da genişleme saptanabilir. Akut GVHD gelişmesi B lenfopoezi olumsuz etkiler. Aktif inflamatuvar hücrelerden B lenfopoezi inhibe eden IFN γ , IL-1 salgılanması, donör T hücrelerinin stromal hücreleri destrüksiyonu ve GVHD için uygulanan tedaviler başlıca nedenlerdir. Kronik GVHD varlığı da B hücre gelişimini olumsuz etkilemektedir (1,2,15,16,44-46).

Erken dönemde B hücrelerinin çoğunun donör kaynaklı olmasına karşın immünglobulinler alıcı kaynaklıdır. Muhtemelen hazırlama rejimine dirençli plazma hücreleri alıcıda immünglobulin üretimini sürdürürler. Zamanla donör tipte antikorlar yapılsa da 8 yıla kadar alıcı tipte antikor üretimi

tanımlanmıştır. Post transplant 3 ay içinde IgM ve total immünglobulin (Ig) düzeyleri normal sınırlara gelirken IgG₂ ve IgA düzeyleri 2 yıl sonra bile düşük kalabilir. Bu durum muhtemelen izotip dönüşümü için gerekli T hücre yardımının yetersizliğine bağlıdır. IgA eksikliğinin IL-5 ve IL-6 yetersizliği ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Total Ig düzeyleri fonksiyonel bir humoral immunitenin göstergesi olamaz. Ig repertuar genişliği daha önemlidir. Post transplant dönemde mono/oligo klonal antikorlara ve oto antikorlara oldukça sık rastlanır. Bu antijenler infeksiyon ajanlarına spesifik bir etki göstermez. Aksine otoimmün olaylara neden olabilir. Protein antijenlere (tetanus toksini) immün yanıt 6-12 ay içinde normale dönerken polisakkarit konjuge antijenlere (pnömokok kapsül antijeni) 2 yıl süre ile yanıt yetersizliği görülebilmektedir. Özellikle kronik GVHD bu yanıtı geciktirir. GVHD bulunmayan hastalarda otolog-allojeneik-sinjeneik transplant sonrası antikor yanıtları benzer bulunmuştur. T hücre depleasyonu ve post transplant anti-T hücre tedavileri de antikor yanıtını belirgin azaltır. Transplant sonrası alıcıda polio, tetanus, H. İnfluenza ve S.pnömonia karşı antikor oluşumu transplant öncesi düzeyler ile uyumlu bulunmuştur. Periferik kök hücre ile antikor yanıtının daha yüksek olduğu gösterilmemiştir. Hem donör hem de alıcı tarafından karşılaşılmış antijenlere humoral immün yanıt daha düzenli ve uzun süreli olmaktadır. Yalnız donör tarafından karşılaşılmış antijenlere ise post transplant dönemde zayıf ve kısa süreli immün yanıt gözlenebilir. Antijen yokluğunda "memory" B hücreler daha kısa süre yaşamaktadır. Allojeneik transplant sonrası humoral immünite transferi (tetanus, varicella, difteri, CMV, hepatitis B) gösterilmiştir. Fonksiyonel B hücre transferi ve post transplant immunizasyonla bunun güçlendirilmesi sağlanabilir. Benzer yolla otoantikorların transferi ile otoimmün patolojiler ortaya çıkabilmektedir (1,2,47-51).

Monosit ve Makrofajlar: Dolaşımdaki monositler bir ay içinde normal sayıya ulaşmaktadır. IL-1 üretimi, antijen sunumu, kemotaksis ise 1 yıl süre ile bozukluk gösterebilir. G-GSF veya GM-CSF ile mobilize edilen kök hücre ürünlerinde yaklaşık 2 log fazla monosit bulunur. Bu monositler T hücrelerin alloreaktif etkilerini baskılayıcı fonksiyon görebilmektedir(52,53).

Dendritik Hücreler: Dendritik hücrelerin antijenle karşılaşmamış "naive" T lenfositleri uyarıcı tek hücre tipi olduğu düşünülmektedir. Olgun T hücreler ise çeşitli antijen sunan hücreler tarafından uyarılabilir. Miyeloid kök hücre kaynaklı olan

langerhans hücreler ve lenf bezlerindeki "interdigiting" dendritik hücreler T hücrelerine antijenik peptid-HLA kompleksini ve aynı zamanda yardımcı uyarıcı sinyalleri (CD80/CD28) gönderirler. Dokular arasında migrasyon da yapabilen profesyonel antijen sunan hücrelerin bu fonksiyonları post transplant 6 ay süre ile yetersiz olabilmektedir. Lenf nodüllerinde bulunan foliküler dendritik hücreler ise germinal merkez reaksiyonlarında rol almaktadır. Bunlar B hücrelerinde IgD/IgM yerine IgG/IgA/IgE izotopik dönüşümde ve somatik mutasyonda etkili olurlar. Hematopoetik veya fibroblastik kökenli olduğu düşünülen foliküler dendritik hücreler ise antijeni uzun süre tutup B ve T hücrelerinin uyarımının devamını sağlarlar. Bu hücrelerin post transplant 1 yıl sonra bile yetersiz oldukları, bunun da transplant sonrası germinal merkez gelişmesinde gecikmeden sorumlu olabileceği belirtilmektedir. Timustaki lenfoid kök hücre kaynaklı dendritik hücreler T hücrelerin negatif seleksiyonunda fonksiyon görmektedirler. Deney hayvanlarında post transplant birkaç hafta içinde timusta ortaya çıkabildikleri gösterilmiştir. Miyeloablatif rejimler dendritik hücrelerin çoğunu elimine etmektedir. Akut GVHD gelişen dokularda bol miktarda dendritik hücre bulunmaktadır. Bunların donör T hücrelerini alıcının minör HLA antijenlerine karşı duyarlılaşmasında etkileri olabilir. Alıcının minör HLA antijenleri donör dendritik hücreleri tarafından da sunulabilmektedir. Periferik kan kaynaklı kök hücre ürünlerinde daha az sayıda dendritik hücre olması GVHD' nin beklenenden daha az olmasının nedenleri arasında olabilir (1,54-59).

POST TRANSPLANT İMMUN YAPILANMANIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Post transplant immün yapılanmanın değerlendirilmesi ve gerekli desteklerin uygulanması enfeksiyon ve relaps sıklığını azaltarak transplant başarısında çok önemli rol oynayabilir. Ancak teknik yetersizlikler, testlerin prediktif değerlerinin düşük oluşu, standardizasyon sorunları ve maliyet gibi nedenler birçok merkezde immün yapılanmanın değerlendirilmesinde kısıtlı sayıda test kullanılmasına neden olmaktadır. En sık izlenenler total lenfosit sayısı, lenfosit alt grupları, lenfosit fonksiyonları ile total ve subgroup immunglobulin düzeyleridir. Post transplant yeni T hücre oluşumu ve T hücre repertuar genişliğini, KIR repertuar genişliğini, mikrobiyolojik veya neoplastik antijenlere karşı spesifik immün yanıtı ölçen testler halen deneysel aşamadadır(1,2,60-63).

Post transplant T, B ve NK hücre sayıları periferik kan mononükleer hücrelerinin immün fenotipleme ile belirlenebilir. Akım sitometrede çoklu monoklonal antikör kullanılarak hücre oranları ve sayıları bulunur.

T hücre proliferatif yanıtları çeşitli mitojenler (PHA, anti CD-3, PKW) veya antijenler (CMV, candida, tetanus toksini, alloantijen) kullanılarak in vivo veya invitro değerlendirilebilir. T ve NK aracılı sitotoksik etkiler için ile karma lenfosit kültüründeki allojeneik yanıt, NK hücrelerinin K562 hücre hattına spontan aktivite göstermeleri, lenfokin aktive hücrelerin (LAK) Daudi hücre hattına etkileri ile değerlendirilebilir.

B hücre fonksiyonları için serum immunglobulinlerinin total ve alt grup miktarlarının ölçümü. İnfeksiyon veya aşılama sonrası spesifik immunglobulinlerin ölçümü ile yapılabilir.

Çeşitli sitokinlerin serum düzeyleri veya hücrelerin belirli sitokinleri (örneğin CD 4+ hücre- İL-2) salgılama kapasitesi değerlendirilebilir.

TRANSPLANT SONRASI İMMUN YAPILANMANIN GÜÇLENDİRİLMESİ

Doğal İmmün Sistemin Desteklenmesi: GiS mukozasını koruma amacıyla glutamin(64), enfeksiyonlara destek amacıyla granülosit transfüzyonları yaygın değildir. En çok G-CSF uygulamaları yapılmaktadır.

Donör Lenfosit İnfüzyonu: Non selektif donör lenfosit infüzyonlarının antilösemik etkisi gösterilmiştir. Ancak işlem sonrası GVHD gelişme riski yüksektir. Bu nedenle alloreaktif lenfositler elimine edilerek yapılabilir. Kalan lenfositlerinin anti-infektif ve anti-neoplastik etkileri devam etmektedir. Ex vivo olarak çoğaltılan CMV veya EBV'ye etkili spesifik sitotoksik lenfosit verilmesi, tedavi ve koruyucu amaçlı uygulamalarda başarı sağlamıştır(65-68).

Tolerans ve İnvitro Olarak Alıcı Antijenlerine Karşı Tolerans Oluşturulan Donör Lenfositlerin Adoptif Transferi: İmmunolojik olarak tolerans immün sistemin kendine ait (self) antijenlere yanıt vermemesidir. Allojeneik kök hücre transplantasyonu sonrası tolerans ise donör kaynaklı immün sistemin alıcı dokularına karşı reaksiyon vermemesi anlamına gelir. Kök hücre ürünü içindeki alloreaktif T hücre oranı % 0.01 ile % 10 arasında değişebilmektedir. Bu hücreler aracılı GVHD oluşmaması için immunsupresif tedavi gereklidir. İmmunsupresif tedavinin kesilmesine karşın GVHD oluşmaması tolerans geliştiğini gösterir. Allojeneik kök hücre transplantasyonu sonrası tolerans geliş-

Tablo 2. Tolerans oluşumunda rol oynayan mekanizmalar

1.	Santral mekanizmalar
a.	fas /fasl ,
b.	bcl-2
2.	Periferik mekanizmalar
a.	Anerji
b.	Supresör hücre ve sitokinler
i.	Supresör dendritik ve T hücreler
ii.	IL-10, TGF- β , NO

mesi için gereken süre yaklaşık 1 yıl olup ileri yaş, cinsiyet uyumsuzluğu (kadın donör erkek alıcı) ve derece II-IV GVHD varlığında uzamaktadır. Solid organ transplantasyonları sonrası ise ömür boyu immunsupresif tedavi gerekmektedir. Yeterli T hücre deplesyonu yapılan kök hücre transplantasyonu sonrası immunsupresif tedavi verilmemesine karşın GVHD görülmemesi ise gerçek anlamda bir tolerans değildir. Tolerans oluşumunda rol oynayan mekanizmalar Tablo 2'de gösterilmiştir (68,69).

Santral tolerans: Lenfosit gelişimi sırasında kendi doku antijenlerine karşı güçlü reaksiyon veren T hücreler timusta, B hücreler ise kemik iliğinde apoptoza uğramaktadır. Yeni doğanlarda immün sistem olgunlaşmadan önce kolaylıkla tolerans oluşturulabilmektedir. Farelerde doğumdan sonra 2 gün içinde verilen MHC farklı kemik iliği engraftı olabilmektedir. İnsanda sadece ilk trimesterde bu mümkündür. Fertilizasyondan sonra 14 hafta içinde donörde olgun T hücre bulunmaması ve fetal karaciğer hücrelerinin umbilikal vene verilmesi ile yapılan prenatal transplantlarda HLA uyumu aranmaz. Alloreaktif T hücreler santral delesyona uğrayacak ve GVHD görülmeyecektir (68-70).

Periferik tolerans: T hücre uyarısında birincil sinyal, antijen ile TCR arasında olup immün yanıtın spesifikliğini sağlar. İkincil sinyal yani yardımcı uyarıcı yol (kostimulasyon) antijen spesifik olmamasına karşın T hücre aktivasyonu için gereklidir. APC'ler T hücrelerine her iki sinyali de gönderebilmektedir. T hücrelerin efektör veya regülatuar hücrelere dönüşümü yardımcı uyarıcı sinyal tipi ve düzeyi ile sitokin ortamına bağlı olarak değişebilmektedir. Yardımcı uyarıcı sinyallerin olmaması ve/veya aktif supresyon (supresör hücreler ve sitokinler) anerji (antijene yanıtızsızlık) ile sonuçlanır. Anerjize T hücrelerin yanıtızsızlığı antijen spesifik T hücrelerin klonal delesyonu sonucu değil fakat T regülatuar tip-1 (Tr1) ve tolerojenik dendri-

tik hücrelerin indüksiyonu ile olmaktadır. Anerji bir çeşit fonksiyonel delesyon durumudur. En iyi bilinen yardımcı uyarıcı yollardan biri T hücre üzerindeki CD28 ile APC'nin üzerindeki B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) etkileşmesidir. Bu etkileşme T hücre yanıtında önemli bir rol oynar ve proliferatif etki gösterir. T hücre üzerinde eksprese edilen diğer bir molekül olan "cytotoxic T lymphocyte associated antijen 4"ün (CTLA4 - CD152) CD 80 veya CD 86 ile etkileşmesi ise tersine T hücre üzerine inhibitör etki göstermektedir. CTLA-4, CD80 ve 86'ya karşı CD28 den daha fazla afinize gösterir. CTLA-4 ile etkileşen Ig yapısında moleküller geliştirilmiştir. CTLA-4Ig'nin dendritik hücrelere bağlanması T hücrelerinin direkt inhibisyonu yanında tolerojenik dendritik hücreler oluşmaktadır. Birçok prelinik ve klinik modelde tolerojenik dendritik hücrelerin ve supresör T hücrelerin periferik toleransın indüksiyonunda ve devamında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu etki inhibitör ürünler aracılığı ile olmaktadır. IL-10 anti inflamatuvar bir sitokin olup T hücre aracılı allojenik yanıtta güçlü supresif etki göstermektedir. MLR'ye invitro olarak eklenmesi allojenik yanıtızsızlık oluşturabilmektedir. İn vitro IL-10 tedavisi ile tolerojenik dendritik hücreler geliştirilebilmektedir. IL-10 ile anerjize edilen T hücreler normal antijenlere (tetanus toksoid, candida, viral yanıt oluşturmaya devam etmektedir. Bu da IL-10 ile indüklenen anerjinin antijen spesifikliği göstermektedir. Ex vivo IL-10 ile anerjize edilen T hücrelerin adoptif transferi ile ilgili klinik protokol geliştirilmiştir. Özellikle haploidentik donörlerde, kök hücre engraftmanından hemen sonra verilmekte ve etkili olmaktadır. G-CSF'le mobilize edilen periferik kök hücreler içinde yüksek sayıda DC2 bulunur. Periferik kök hücre ürününde kemik iliğine göre 10 kat fazla lenfosit olmasına karşın GVHD'nin aşırı artış göstermemesinde bunun etkisi olabilir (68,69,71-77).

Özellikle T hücre deplesyonu yapılmış hastalara ex vivo çoğaltılmış ve allo antijenlere anerjik T hücre klonları verilerek GVHD oluşturmadan immün yapılanma güçlendirilebilir. Donör kök hücre ürünlerinin ex vivo olarak CTLA-4Ig veya anti-CD80 ile inkübe edilmesi anerjiyi indükleyebilmektedir. Benzer şekilde B hücre aktivasyonu için gerekli olan CD40 /CD40L yardımcı yolağını etkileyen ve inhibe eden monoklonal antikolar da üretilmiştir. Farklı sinyal yollarının aynı anda blokağı, birlikte düşük doz siklosporin kullanılması ile etkinlik daha da arttırılabilmektedir. Ayrıca alloantijenlere karşı aktivasyon gösteren hücrelerin toksinle konjuge anti-CD25, anti-CD69 monoklonal

Tablo 3. Kök hücre transplantasyonu sonrası aşı uygulamaları

Aşı	Başlangıç	Şema	Yorum
Tetanus toksoid*	1. yıl	Ayda bir kez (3 doz)	GVHD olsa da yanıt alınabilir
Difteri toksoid*	1. yıl	Ayda 1 kez (3 doz)	GVHD varsa zayıf yanıt
Hib*	1. yıl	6 ay ara ile 2 doz	GVHD varsa zayıf yanıt
Hepatit B*	1. yıl	Değişik	Prevalans yüksek olan yerlerde donör de aşılanmalı
İnaktif polio*	1. yıl	Ayda bir kez (3 doz)	Canlı aşı kontrendikedir. GVHD olsada yanıt olabilir.
İnfluenza	6 – 12 ay	Yılda 1 kez	Evde yaşayan diğer bireyler de aşılanmalı
Kızamık	2. yıl	1 doz	Prevalans yüksek yerlerde
Kahakulak	2. yıl	1 doz	Genel uygulama değil. GVHD varsa yapılmamalı
Rubella	2. yıl	1 doz	Fertil kadınlarda ve prevalansı sık olan yerlerde
Promokuk	2. yıl	1 doz	GVHD varsa tk ilaç profilaksisi

* 12, 14, 24 aylarda uygulanabilir.

antikorlar ile azaltılması sağlanabilir. Böylece elde edilen "allo deleted" T hücrelerin lösemik veya enfeksiyon ajanlarına karşı klonlanması ile elde edilen tümör antijen spesifik sitotoksik T lenfosit klonları da tedavide denenmektedir. Rekombinan olarak üretilen HLA tip-I multimerleri spesifik peptitlere bağlanarak bunlara etki gösteren sitotoksik T lenfosit klonları immunomagnetik izolasyonla ayrılabilen, yardımcı uyarıcı moleküller ile sayı ve etkinlikleri daha da artırılan bu hücreler post transplant geri verilebilmektedir(78,79).

Deney hayvanlarında, majör HLA uyumlu, minör HLA uyumsuz transplantta beta 2 mikroglobulin "knockout" alıcıda GVHD önlenmektedir. Bu bulgu CD8+ T hücreler için hedef antijenlerin alıcı APC'leri ile sunulduğunu ve alıcı doku antijenlerin donör APC ile sunulmasının (çapraz sunum) GVHD oluşturmada yeterli olmadığını gösterir. Tam allojeneik kimerada yalnızca donör APC'leri bulunur. Kemik iliğinden çıkan T hücreleri timik stromanın allojeneik alıcı çevresinde olgunlaşacaktır. Sonuçta alıcı tip-I MHC antijenlerini sunan APC'ler ile ilişkiye giren olgun T hücreler pozitif olarak seçilecektir. Bu antijenler donör kaynaklı APC'ler tarafından sunulmamaktadır. "Mixed" allojeneik kimerada hem donör hem alıcı kaynaklı antijen sunan hücreler vardır. Bunlar her iki kaynaklı T hücrelerle etkileşir. Donör T hücreleri toleransta, alıcı T hücrelerin immün yapılanmada etkili olacak ve sonuçta hem tolerans hem de immün yapılanma daha iyi gelişebilecektir(80-82).

Tolerans oluşumunda ilaçların etkisi ise enfeksiyon, tümör nüksü, ilaç yan etkileri, solid organ transplantasyonu sonrası devamlı tedavi gereksinimi gibi nedenlerle sınırlı kalmaktadır

Sitokinler: Farelerde IL-7 ve IGF-1 uygulamaları ile T hücre yapılanması uyarılmakta, timusta

hipertrofi oluşmaktadır. IL-7, T ve B hücrelerin gelişmesi ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli bir sitokindir. Farelerde KİT sonrası immün yapılanmayı güçlendirmektedir. İnsanlarda henüz veri yoktur). Timik ve splenik T hücre sayı ve fonksiyonlarına olumlu etkisi gösterilen IL-7'nin özellikle erişkin hastalarda T hücre yapılanmasına olumlu etkisi beklenmektedir. Yine deney hayvanlarında solubl CD40 ligand kullanılarak kemik iliğinde B hücre progenitörleri, total IgG , T hücre proliferatif yanıtlar ve IL-4 üretimi artırılabilir(83-88).

Timus graftı: Deney hayvanlarında uygulanabilir bulunmuştur. İnsanlarda kısmi HLA uyumlu veya akraba dışı vericilerden yapılan transplantasyonlarda muhtemelen timusun rejeksiyonu nedeniyle etkili bulunmamıştır(89).

İmmünglobulinler: Transplant sonrası enfeksiyonları önlemede belirgin bir etkinlik sağlanmamıştır. Pahalı olan bu ürünlerin immün yapılanma üzerine olumsuz etkileri olabilmektedir. Total IgG düzeyleri normalin altında olan kişilerde verilebilir. Normalde 22 gün olan yarı ömürleri transplant sonrası dönemde 6 güne düşmektedir. Bu nedenle haftalık 250 – 400 mg / kg uygulama önerilmektedir(90).

AŞILAMALAR

Aşılama ile yarar sağlanan önemli patolojilerin çoğu transplant sonrası dönemde önemli bir sorun oluşturmaz. Donörün transplant öncesi alıcının ise transplant sonrası aşılması daha etkin olabilir. Allojeneik kök hücre transplantasyonu ile donörden alıcıya spesifik immünite transfer edilmesine karşın birçok hastada bakteriyel (tetanus, difteri) ve viral ajanlara karşı bağışıklık zamanla kaybedilmektedir. Bu nedenle yanıt yetersiz olsa da immün

yapılanma oluştuktan sonra sistematik biçimde yeniden aşılama yapılmalıdır (91-96).

Transplant sonrası GVHD olan hastalarda veya immunsupresif tedavi alanlarda tedavi zamanına bakılmaksızın canlı bakteri (BCG) ve virus aşılı kontrendikedir. Diğer aşılar da 1 yıldan önce yapılmalıdır. İnaktif veya subunit aşılı güvenlidir ancak erken yapıldığında yeterli bir yanıt oluşmaz. PKH transplantasyonundan sonra aşılama daha iyi bir yanıt alındığını gösterir kanıt yoktur. Hastalar için tüm aşılar gerekli değildir. Aşılama pratiği de merkezler arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. EBMT tarafından yapılan bir taramada allojeneik transplantasyon yapan merkezlerin % 65'nin, olog transplantasyon yapan merkezlerin ise % 37'sinin rutin aşılama yaptığı belirtilmektedir. En sık yapılanlar tetanus toksoid ve inaktif poliovirus aşısıdır. En çok önerilenler ise tetanus toksoid, difteri toksoid, inaktif polio ve influenza'dır(91-96).

Donörün hepatit B aşısı yaptırması T hücre depresyonu yapılan transplant sonrası bile antikor yanıtının transferini sağlamaktadır. Donör ve alıcının aşılama ise daha güçlü ve uzun süreli yanıt oluşturmaktadır. Benzer şekilde donör ve alıcının H. İnfluenza HiB konjuge aşısı ile transplant öncesi aşılama transplant sonrası aşılama göre daha erken (3 ayda) ve güçlü yanıt oluşturmaktadır. Kök hücre transplantasyonu sonrası önerilen aşılama uygulamaları tablo 3 ve 4 de gösterilmiştir(91-96).

Aile bireylerine ilk yıl Sabin (canlı aşı) yapılmalıdır. Mutlak yapılması gerekiyorsa transplant hastası 8 – 12 hafta süre ile o birey ile görüşmemelidir. Tetanus ve difteri toksoid aşılı kombine şekilde yapılabilir. Difteri aşısının 10 yıl sonra tekrarı önerilir. 7 yaşın altında Boğmaca aşısı da eklenmelidir. Hepatit A aşısı rutin olarak önerilmemektedir. Menengokok aşısı da endemik bölgeler dışında rutin uygulanmayabilir. İnfluenza aşısında ilk uygulama transplant öncesi yapılabilir. Kızamık, kızamıkçık ve kabakulak MMR şeklinde kombine yapılabilir. İmmun yetmezliği olmayan hastalara uygulanmalıdır. Varicella aşısı ile araştırmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Storek J, Witherspoon RP. Immunologic reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Atkinson K (ed). Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation. Second edition. Cambridge University Press. Cambridge 2000; 111- 134.
2. Parkman R, Weinberg KI. Immunological reconstitution following bone marrow transplantation. Immunological Reviews, 1997; 157:73 -78.

3. Maury S, Mary JY, Rabian C, Schwarzing M, Tubert A, Scieux C, Carmagnat M, Esperou H, Ribaud P, Devergie A, Guardiola P, Vexiau P, Charron D, Gluckman E, Socie G. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients British Journal of Haematology 2001; 115: 630-641.
4. Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, Tarantolo SR, Kollath J, Reed EC, Bierman PC, Vose JM, Warkentin PI, Gross TG, Nasrati K, Armitage JO, Kessinger A, Bishop MR Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies . Bone Marrow Transplant 1998; 21: 33-41.
5. Roberts MM, To LB, Gillis D et al. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1993; 12: 469-75.
6. Shenoy S, Mohanakumar T, Todd G, Westhoff W, Dunnigan K, Adkins DR, Brown RA, DiPersio JF. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. Bone Marrow Transplant 1999; 23. 335-346.
7. Talmadge JE, Reed E, Ino K et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. Bone Marrow Transplant 1997; 19:161-72.
8. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers MED, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. Blood. 2001; 97:3380-3389.
9. Lapiere V, Oubouzar N, Aupe´ rin A, Tramalloni D, Tayebi H, Robinet E, Kuentz M, Blaise B, Hartmann O, Herve´ P, Tiberghien P. Influence of the hematopoietic stem cell source on early immunohematologic reconstitution after allogeneic transplantation Blood 2001; 97 (9):2580- 2586.
10. Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer ,UW, Grosse-Wilde H. Improved Immune Reconstitution After Allo transplantation of Peripheral Blood Stem Cells Instead of Bone Marrow Blood 1996; 88(7): 2775-2779.
11. Bensinger WI, Clift R, Martin P et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies.: a retrospective comparison with marrow transplantation. Blood 1996; 88:2794 – 800.
12. Kalwak K, Gorczynska E, Toporski J, Turkiewicz D, Slociak M, Ussowicz M, Latos-Grazynska E, Krol M, Boguslawska-Jaworska J, Chybicka A. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. Br J Haematol. 2002; 118(1):74-89.
13. Martinez C, Urbano-Ispizua A, Rozman C, Montserrat P M, Sierra J, Montfort N, Carreras E, Montserrat

- E. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation: Comparison of recipients of positive CD34+ selected grafts with recipients of unmanipulated grafts. *Experimental Hematology* 1999; 27: 561-568.
14. Lowdell MW, Craston R, Ray N, Koh M, Galatowicz G, Prentice HG. The effect of T cell depletion with Campath-1M on immune reconstitution after chemotherapy and allogeneic bone marrow transplant as treatment for leukaemia. *Bone Marrow Transplantation*, 1998; 21: 679-686.
 15. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, Kotylo P, Brahmi Z, Smith FO. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation *Blood* 2000; 96:2703-2711.
 16. Giraud P, Thuret I, Reviron D, Chambost H, Brunet C, Novakovitch G, Farnarier C, Michel G. Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25:53-57.
 17. Morecki S, Gelfand Y, Nagler A, Or R, Naparstek E, Varadi G, Engelhard D, Akerstein A, Slavin S. Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen *Bone Marrow Transplantation* 2001; 28:243-249.
 18. Friedman TM, Varadi G, Hopely DD, Filicko J, Gagner J, Ferber a, Martinez J, Brunner J, Grosso D, McGuire L, Korngold R, Flonienberg N. Nonmyeloablative conditioning allows more rapid T- cell repertoire reconstitution following allogeneic matched unrelated bone marrow transplantation compared to myeloablative approaches. *Biol Blood Marrow Transpl* 2001; 7: 656-664.
 19. Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey R et al. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS- sorted CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91: 2588-2600.
 20. Storek J, Ansamma J, Esipen G, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98(13):3505-3512.
 21. Roux E, Helg C, Dumont-Girard F et al. Analysis of T cell repopulation after bone marrow transplantation: significant differences between recipients of T cell depleted and unmanipulated grafts. *Blood* 1996; 87: 3984-92.
 22. Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M, Siegrist CA, Helg C, Chapuis B, Roosnek E. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood*. 2000; 96:2299-2303.
 23. Gorla R, Airo P, Ferremi-Leali P et al. Predominance of "memory" phenotype within CD4+ and CD8+ lymphocytes subsets after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11:346-7.
 24. Gorochov G, Debre P, Leblond V et al. Oligoclonal expansion of CD8+CD57+ T cells with restricted T cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 83:587-95.
 25. Mohty M, Faucher C, Vey N, Chabannon C, Sainy D, Arnoulet C, Caugler B, Gastaut JA, Maraninchi D, Oliver D, Blaise D. Features of large granular lymphocytes (LGL) expansion following allogeneic stem cell transplantation: a long-term analysis. *Leukemia* 2002; (16):2129-2133.
 26. Niederwieser D, Gastl G, Rumpold H et al. Rapid re-appearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). *Br J Haematol* 1987; 65:301-5.
 27. Klingemann HG. Relevance and Potential of Natural Killer Cells in Stem Cell Transplantation. *B B & M T* 2000; 90 -99.
 28. Blanchi E, Rogge L. Antileukemic activity of natural killer cells in allogeneic BMT. www.medscape.com/viewarticle/458040
 29. Hokland M, Jacobsen N, Ellegaard J, Hokland P. Natural killer function following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1988;45:1080-4.
 30. Rolstad B, Naper C, Lovik G, Vaage JT, Ryan JC, Backman-Petersson E, Kirsch RD, Butcher GW. Rat natural killer cell receptor systems and recognition of MHC class I molecules. *Immunological Reviews* 2001; 181:149-157.
 31. Cerwenka A, Lanier LL. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity *Immunological Reviews* 2001; 181:158-169.
 32. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood*, 2002; 100(10):3825-3827.
 33. Fagnoni FF, Lozza L, Zibera C, Zambelli A, Ponchio L, Gibelli N, Oliviero B, Pavesi L, Gennari R, Vescovini R, Sansoni P, Prada G, Robustelli G. T-cell dynamics after high-dose chemotherapy in adults: elucidation of the elusive CD8+ subset reveals multiple homeostatic T-cell compartments with distinct implications for immune competence. *Immunology* 2002; 106: 27-37.
 34. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell Regeneration After Bone Marrow Transplantation: Differential CD45 Isoform Expression on Thymic-Derived Versus Thymic-Independent Progeny. *Blood*, 1993; 82 (8): 2585-2594.
 35. Stordek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant*, 1995; 16(3): 413-425.
 36. Velardi A, Terenzi A, Cucciaioli S et al. Imbalances within the peripheral blood T-helper (CD4+) and T-suppressor (CD8+) cell populations after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 71:1196-200.
 37. MacKall CL, Fleisher TA, Brown MR et al. Age, thymopoiesis and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332:143-9.

38. Heitger A, Neu N, Kern H et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45 RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90:850-7.
39. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, Douek DC. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97:1458-1466.
40. Dulude G, et al. Thymic and extrathymic differentiation and expansion of T lymphocytes following bone marrow transplantation in irradiated recipients. *Exp Hematol*, 1997; 25(9):992-1004.
41. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000; 355: 1875-81.
42. Friedrich W, O'Reilly RJ, Koziner B et al. T-lymphocyte reconstitution in recipients of bone marrow transplants with and without GVHD: imbalances of T cell subpopulations having unique regulatory and cognitive functions. *Blood* 1982; 59: 666-70.
43. DeGast GC, Gratoma Jw, Verdonck LF et al. The influence of T cell depletion on recovery of T cell depletion on recovery of T cell proliferation to herpesviruses and candida after allogeneic BMT. *Transplantation* 1989; 48:111-15.
44. Storek J, et al. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant*, 1993; 12(4): 387 - 398
45. Storek J, et al: Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2001; 98(2): 489-491
46. Storek J. B-cell immunity after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*, 2002; 4(5):423-424.
47. Horhagen - Engstrom G, Hammarstrom L, Lllonqvist B et al. Ontogeny of immunoglobulins in bone marrow-transplanted individuals. *Transplantation* 1988; 46:710-15.
48. Brenner MK, Qimperis JZ, Reittie JE et al. Recovery of Ig isotypes following T cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Brit J Haemato* 1986; 64:125-132.
49. Witherspoon RP, et al. Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. *Blood*, 1981; 58(2) 360 -8.
50. Gray D, Skavall H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 1988; 336:70-3.
51. Storek J, Viganego F, Dawson MA et al. Factors affecting antibody levels after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003; (101):3319-3324.
52. Atkinson K. Reconstitution of the haematopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5:209-26.
53. Mielcarek M, Martin PJ, Storb B. Suppression of alloantigen-induced T cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1997; 89:1629-34.
54. Perrault C, Pelletier M, Landry D, Gyger M. Study of langerhans cells after allogeneic BMT. *Blood* 1984; 63:807-11.
55. Dilly SA, Sloane JP. Cellular composition of the spleen after human allogeneic bone marrow transplantation. *J Pathol* 1988; 155:151-160.
56. Dilly SA, Sloane JP, Psalti ISM. The cellular composition of human lymph nodes after allogeneic bone marrow transplantation: an immunohistological study. *J Pathol* 1986; 150:213-21.
57. Galy A, Rudraraju S, Baynes R, Klein J. Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets after autologous CD34+ cell transplantation *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25:1249-1255.
58. Damiani D, Stocchi R, Masolini P, Michelutti A, Sperotto A, Geromin A, Skert C, Cerno M, Michieli M, Baccarani M, Fanin R. Dendritic cell recovery after autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 30:261-266.
59. Walsh LJ, Athanasas-Platsis S, Savage NW. Reconstitution of cutaneous neural-immunological networks following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1995; 61:413-417.
60. Gaschet J, Denis C, Milpied N et al. Alterations of T cell repertoire after bone marrow transplantation: characterization of over-represented subset. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 427-35.
61. Gorski J, Yassai M, Zhu X et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by TCDR spectratyping. Correlation with immune status. *J Immunol* 1994; 152:5109-19.
62. Matsue K, Lum LG, Witherspoon RP, Storb R. Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T cell-derived factors. *Blood* 1987; 69:308-15.
63. Pignata C, Sanghera JS, Soiffer RJ et al. Defective activation of mitogen-activated protein kinase after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88:2334-41.
64. MacBurney M, Young LS, Ziegler TR, Wilmore DW. Nutrition support of glutamine-supplemented parenteral nutrition in adult bone marrow transplant patients. *J Am Diet Ass.* 1994; 94:1263-6.
65. Swartz RS. The New Immunology The End of Immunosuppressive Drug Therapy ? *N Engl J Med* 1999; 340(22):1754-1756.
66. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333:1038-44.
67. Diefenbach A, Raulat DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunological Reviews* 2001; 181:170-184.

68. Hentschke P, Remberger M, Mattsson J, Barkholt L, Aschan PL, Ringden O. Clinical tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2002; 73(6):930-936.
69. Cavazzana-Calvo M, Andre-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S, Bensoussan D, Le Deist F, Fischer a. Improving immune reconstitution while preventing graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation. *Semin Hematol* 2002;39(1): 32-40
70. Touraine J-L. Induction of Transplantation Tolerance in Humans Using Stem Cell Transplants Prenatally or Postnatally. *Transplantation Proceedings* 1999; 31:2735-2737.
71. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM. The role of B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down -regulation of the immun response. *Immunological Reviews* 1996; 153:5-26.
72. Tzachanis D, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 2002; 99:1465-1473.
73. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4 and CD8 anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002; 99: 2468-2476.
74. Lee RL, Rusche JR, Maloney ME, Sachs DH, Sayegh MH, Madsen JC. CTLA4Ig-Induced Linked Regulation of Allogeneic T Cell Responses. *J Immunol* 2001; 166:1572-1582.
75. Tsoi MS, Storb R, Dobbs S, Thomas ED. Specific suppressor cells in graft-host tolerance of HLA-identical marrow transplantation. *Nature* 1981; 292:355-57.
76. Guillot C, Meneret S, Guillonnet C et al. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003; 101:3325-3333.
77. Volpi I, Perruccio K, Tosti A, Capanni M, Ruggeri L, Posati S, Aversa F, Tabilio A, Romani L, Martelli MF, Velardi A. Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood*. 2001; 97:2514-2521.
78. Mavroudis DA, Molldrem DJ, Jiang YZ, et al. Specific depletion of alloreactive T cells in HLA -identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions. *Br J Haematol* 1998; 101:565-570.
79. Guinan EC, Vasiliki AB, Neuberg D et al. Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med*. 1999; 340(22):1704-1714.
80. Abe M, Qi J, Sykes M, Yang YG. Mixed chimerism induces donor-specific T-cell tolerance across a highly disparate xenogeneic barrier. *Blood* 2002; 99:3823-3829.
81. Savage WJ, Bleesing JJH, Douek D, Brown MR, Linton GM, Malech HL, Horwitz ME. Lymphocyte reconstitution following non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation follows two patterns depending on age and donor/recipient chimerism. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 28: 463-471.
82. Maris M, Boeckh BS, Dawson M. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Exp Hematol* 2003; 31:941-952.
83. Bolotin E, et al. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood*, 1996; 88(5):1887-94.
84. Abdul-Hai A, et al. Stimulation of immune reconstitution by interleukin-7 after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Exp Hematol*, 1996; 24(12):1416-22.
85. Mackall CL, et al. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic -independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*, 2001; 97(5):1491-7.
86. Alpdoğan O, et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood*, 2001; 98(7):2256-2265.
87. Sinha ML, et al. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood*, 2002; 100(7): 2642-2649.
88. Alpdogan O, et al. Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) enhances lymphoid and myeloid reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*, 2003; 75(12).
89. Witherspoon RP, Sullivan KM, Lum LG, et al. Use of thymic grafts or thymic factors to augment immunologic recovery after BMT: brief report with 2 to 12 years' follow-up. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3:425-435.
90. Sullivan KM, Storek J, Kopecky KJ, et al. A controlled trial of long-term administration of intravenous immunoglobulin to prevent late infection and chronic GVHD following marrow transplantation: clinical outcome and effect on subsequent immune recovery. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996; 2:44- 53.
91. Matlobian M, Conception RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T cell responses during chronic viral infection. *J Virology* 1994; 68:8056-63.
92. Singhal S and Mehta J. Reimmunization after blood or marrow stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1999; 23:637-646.
93. Ljungman P. Immunization of transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 1999; 23:635-636.
94. Atkinson K, Singhal S. Bacterial infections. Atkinson K (ed). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*. Second edition. Cambridge University Press. Cambridge 2000; 716-736.
95. David A, Pirofski LA, Lazarus HM. Vaccination against infectious disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7:171-183.
96. MMWR 2000; 49(10):84-86.