TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KÖK HÜCRE ÜRÜNÜNDEKİ CD34+ HÜCRE ALT GRUPLARI VE ENGRAFTMAN İLE İLİŞKİSİ

Dr. Gizem ERTEPE KÜÇÜKGÖDE

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin TOPÇUOĞLU

Ankara- 2019

KABUL VE ONAY

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr. Gizem Ertepe Küçükgöde	**Sınav tarihi:** 03 /12 / 2019
Anabilim/Bilim Dalı	: İç Hastalıkları A.B.D.	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Pervin Topçuoğlu	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: Kök Hücre Ürünündeki CD34 + Hücre Alt Grupları ve Engraftman İle İlişkisi

Tezin Niteliği: ☐ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☐ 1 ☑ 2 ☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☑ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☑ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Prof. Dr. Osman İLHAN
Jüri Başkanı
Hematoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Pervin TOPÇUOĞLU
Jüri Üyesi
Tez Danışmanı
Hematoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. İmdat DİLEK
Jüri Üyesi
Ankara Şehir Hastanesi

ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecimde ve bu çalışma sürecinde her zaman desteğini hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Pervin Topçuoğlu'na saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Prof. Dr. Osman İlhan'a değerli katkılarından dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda önemli katkıları olan ve bu süreçte her daim desteğini hissettiğim Ankara Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı sorumlusu Yrd. Doç. Dr. Klara Dalva'ya ve çalışma boyunca desteğini esirgemeyen başta Şenay İpek olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Terapötik Aferez Merkezi çalışanlarına özellikle çalışmama katkılarından dolayı Yasin Yıldırım'a teşekkür ederim.

Bu süreçte desteğini benden esirgemeyen, asistanlığımızı bir arada geçirdiğimiz değerli arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde yanımda olan anneme, babama canım kardeşime ve hayatımı paylaştığım her daim yanımda olan sevgili eşim Doğuş'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY ..... **i**

ÖNSÖZ ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **v**

TABLOLAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. KÖK HÜCRE **3**
2.1.1. Kök Hücre Sınıflandırılması 3
2.1.2. Kök Hücre Tipleri 5
2.1.3. Hematopoetik Kök Hücreler 5

2.2. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ **11**
2.2.1 Hematopoetik Kök Hücre Nakli Tarihçesi 13
2.2.2. Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli 13
2.2.3. Mobilizasyon 14
2.2.4 Engrafman 21

3. GEREÇ VE YÖNTEM **22**

3.1 Çalışmanın Yapıldığı Yer ve Genel Akış **22**

3.2. Kullanılan Yöntem ve Teknikler **23**
3.2.1. Aferez Toplama İşlemi 23
3.2.2. Akım Sitometri Yöntemi 23
3.2.3. İstatistiksel Yöntemler 26

3.3. Hastalar **27**

4. BULGULAR **29**

4.1. Mobilizasyon Rejimlerinin Engraftman Kinetiklerine Etkisi **32**

TARTIŞMA **40**

SONUÇLAR **45**

ÖZET **47**

SUMMARY **49**

KAYNAKÇA **51**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALDH : Aldehit dehidrogenaz

ALL : Akut lenfoblastik lösemi

AML : Akut miyeloid lösemi

APC : Allophycocyanin

BLP : B-lenfoid progenitör

CAR cell : CXCL12'den zengin retiküler hücre

CD34(+) : Farklılaşma kümelenmesi-34(+)

CLP : Ortak lenfoid progenitör

CMP : Ortak miyeloid progenitör

CMV : Sitomegolavirüs

CXCL : Circulating chemokine ligand

CXCR4 : C-X-C kemokin reseptör tip 4

CXCL12 : C-X-C kemokin ligand 12

DMSO : Dimetil sülfoksit

ISS : International Staging System

İPSC : İndüklenmiş pluripotent kök hücre

EKH : Embriyonik kök hücre

EMA : European Medicines Agency

EMP : Eritro-miyeloid progenitör

EPO : Eritropoetin

FDA : Food and drug administration

FGF-4 : Fibroblast büyüme faktörü-4

FITC : Fluorescein isothiocyanate

G-CSF : Granülosit-koloni uyarıcı faktör

GM-CSF : Granülosit makrofaj- koloni uyarıcı faktör

GMP : Granülosit-makrofaj progenitör

Geç GMP : Geç Granülosit-makrofaj progenitör

HL : Hodgkin Lenfoma

HKH : Hematopoetik kök hücre

HKHN : Hematopoetik kök hücre nakli

Kİ : Kemik iliği

Kg : Kilogram

KLL : Kronik Lenfositik Lösemi

KML : Kronik Miyeloid Lösemi

KT : Kemoterapi

L : Litre

LMPP : Lenfoid-primed multipotent progenitör

MDS : Miyelodisplastik Sendrom

m^2 : Metrekare

mg : Miligram

MKH : Mezankimal kök hücre

MLP : Multi-lenfoid progenitör

MM : Multipl miyelom

MPP : Multipotent progenitör

NHL : Non-hodgkin lenfoma

OHKHN : Otolog hematopoetik kök hücre nakli

OPKHN : Otolog periferik kök hücre nakli

OPN : Osteopontin

PTH : Parathormon

PTHrP : Parathormon ilişkili (-related) protein

RT : Radyoterapi

SCF : Stem cell faktör

Sca-1 : Stem cells antigen-1

SDF-1 : Stromal derivated faktör-1

TPO : Trombopoetin

Tie-2 : Angipoietin reseptör -2

U/L : Ünite/litre

VCAM-1 : Vasküler hücresel (cellular) adezyon molekülü -1

VLA-4 : Very late antijen- 4

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

7-AAD : 7-Aminoactinomycin D

YDT : Yüksek doz tedavi

TABLOLAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 2.1. HKHN klinik uygulama alanları 12
Tablo 2.2. Mobilizasyon yetersizliği için risk faktörleri, Mothy M. ve ark. 2014'ten uyarlanmıştır [97]. 20
Tablo 3.1. Hasta Özellikleri 28
Tablo 4.1. Toplanan Kök Hücre Ürünü Özelliklerinin Tedavi Gruplarına Göre Karşılaştırılması 29
Tablo 4.2. CD34 ve Alt Gruplarının Mobilizasyon Yöntemine Göre Karşılaştırılması 30
Tablo 4.3. Mobilizasyon Gruplarına Göre CD34+ Hücrelerde Alt Tiplerin Karşılaştırılması 31
Tablo 4.4. OPKHN Yapılan Hastaların Tedavi Gruplarına Göre Dağılımı 32
Tablo 4.5. Mobilizasyon Gruplarına Göre Verilen Kök hücre Alt Tiplerinin Karşılaştırılması 33
Tablo 4.6. Mobilizasyon Gruplarına Göre Nötrofil ve Trombosit Engraftman Günlerinin Karşılaştırması 34
Tablo 4.7. Verilen CD34 ve Alt Gruplarının Nötrofil Engrafmanı İle İlişkisi 35
Tablo 4.8. Verilen CD34 ve Alt Gruplarının Trombosit Engraftmanı İle İlişkisi 38

Şekil 2.1. Kök hücrelerin totipotent, pluripotent ve unipotent türleri. 4
Şekil 2.2. İnsan hematopoez modeli (revize 'composite model') ve CD34 alt tipleri. Görgen ve arkadaşları 2013'ten uyarlanmıştır [24]. 7
Şekil 2.3. Endostel nişte osteoblastlar ile HKH'ler arasında homeostazı sağlayan iletişimler 10
Şekil 3.1. Akım Sitometri Yöntemi 25
Şekil 4.1. Nötrofil engraftman günü ile verilen CD34x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 35
Şekil 4.2. Nötrofil engraftman günü ile verilen MPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 36
Şekil 4.3. Nötrofil engraftman günü ile verilen LMPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 36
Şekil 4.4. Nötrofil engraftman günü ile verilen GMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 37
Şekil 4.5. Nötrofil engraftman günü ile verilen geç GMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 37
Şekil 4.6. Trombosit engraftman günü ile verilen CD34 x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 38
Şekil 4.7. Trombosit engraftman günü ile verilen MPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 39
Şekil 4.8. Trombosit engraftman günü ile verilen EMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu 39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otolog hematopoetik kök hücre nakli (OHKHN) hastanın kendisinden toplanan kök hücrelerin yüksek doz tedavi (YDT) sonrası hematopoetik yeniden yapılanma amacı ile hastaya geri verilmesi işlemidir. Otolog kök hücre destekli YDT, hematolojik malignitelerden özellikle multipl miyelom (MM) ve kemoterapiye duyarlı nüks/dirençli Hodgkin ve Hodgkin-dışı lenfoma (NHL) tedavisinde sağ kalımı uzatan standart bir tedavi yöntemidir [1]. Otolog periferik kök hücre naklinde (OPKHN) kemik iliğindeki kök hücreler periferik kana çeşitli tedavilerle mobilize edilir. Aferez ile toplanan mobilize kan ürününde akım sitometri yöntemi ile CD34 + hücreler kantitatif olarak sayılır. Günümüzde bu sayımda rutin olarak 7-Aminoactinomisin D (7-AAD), CD45, CD34 kullanılmaktadır [2]. Literatürde greft kalitesini, nakil başarısını, engraftman kinetiğini etkilediği düşünülen farklı CD34 alt grupları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2013 yılında yapılan bir çalışmada 7 farklı CD34 alt grubunun [multi potent progenitörler (MPP), lenfo-miyeloid progenitörler (LMPP), eritro-miyeloid progenitörler (EMP), granülosit-makrofaj progenitörler (GMP), geç GMP, multi lenfoid progenitörler (MLP), B lenfoid progenitörler (BLP)] tanımlandığı yeni bir hematopoez modeli geliştirildi [3]. Bu bulgular sonrasında Dmytrus ve arkadaşları 3 farklı kök hücre kaynağında CD34 alt gruplarını analiz ettiler. Periferik kan kök hücre kaynağı grubunda daha matür CD34 alt gruplarının (geç GMP, MLP, BLP) anlamlı olarak düşük saptandığı, daha primitif olan MPP alt grubunun ve EMP 'nin daha yüksek olduğu görüldü [4]. Yapılan güncel çalışmaların sonucunda kullanılan mobilizasyon yöntemine göre farklı CD34 alt gruplarının daha iyi stimüle olabileceği ve bu alt grupların engrafman kinetiğini etkileyebileceği öne sürülmüştür.

Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda; 3 farklı mobilizasyon rejiminin (Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), Kemoterapi + GCSF, Plerixafor grupları) CD34 alt gruplarına etkisini ve CD34 alt gruplarının engrafman kinetiklerine etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda mobilizasyon rejimleri arasında engrafman kinetiğine pozitif yönde etkisi olan en iyi mobilizasyon

yönteminin saptanması, CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisinin gösterilmesi ve rutin olarak akım sitometride CD34 alt gruplarına bakılmasının maliyet etkin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRE

Kök hücreler embriyonik ve fetal dönemlerde doku ve organların gelişmesini sağlayan, doğum sonrası ve erişkin dönemlerde ise doku ve organların korunma, yenilenme ve onarımında gerekli olan hücrelerdir. Kendilerini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir [5].

Bir hücrenin farklı dokulardaki hücrelere dönüşebilme yeteneğine "Plastisite" ya da "Diferansiyasyon"; o hücrenin değişik hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline ise "Diferansiyasyon Kapasitesi" denilmektedir. Farklılaşma öncesi kök hücreler sürekli bölünerek mevcut sayılarını artırma eğilimine girerler. Kendilerini yenileme olarak adlandırılan bu olayda kök hücrelerin belli bir sayıda sabit tutulması sağlanır [6]. İki farklı hücre bölünme şekli mevcuttur;

Simetrik bölünme: Kaynaklandıkları hücrenin tüm özelliklerine sahip iki identik yavru hücre meydana gelir.

Asimetrik Bölünme: Oluşan iki hücreden bir tanesi kaynak hücrenin tüm özelliklerini korurken, diğeri progenitör hücreyi oluşturur. Progenitör hücre de birkaç bölünme sonrası terminal farklılaşmaya uğrayarak farklılaşmış olgun hücreye dönüşür. Farklılaşmayı uyaran ve sürdüren etkenler ortadan kalkarsa, birçok hücre bölünme döngüsüne tekrar döner [7].

2.1.1. Kök Hücre Sınıflandırılması

Kök hücreler kaynaklarına göre; embriyonik ve erişkin tip kök hücreler, farklılaşabilme yeteneklerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılırlar [8, 9].

Totipotent hücreler: Embriyo, embriyo-sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanır.

Pluripotent hücreler: Blastositin iç tabakasındaki hücrelerdir. Tüm vücut hücrelerinin köken aldığı her üç germ yaprağı (mezoderm, endoderm, ektoderm) hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir. Ancak trofoblastları oluşturamazlar.

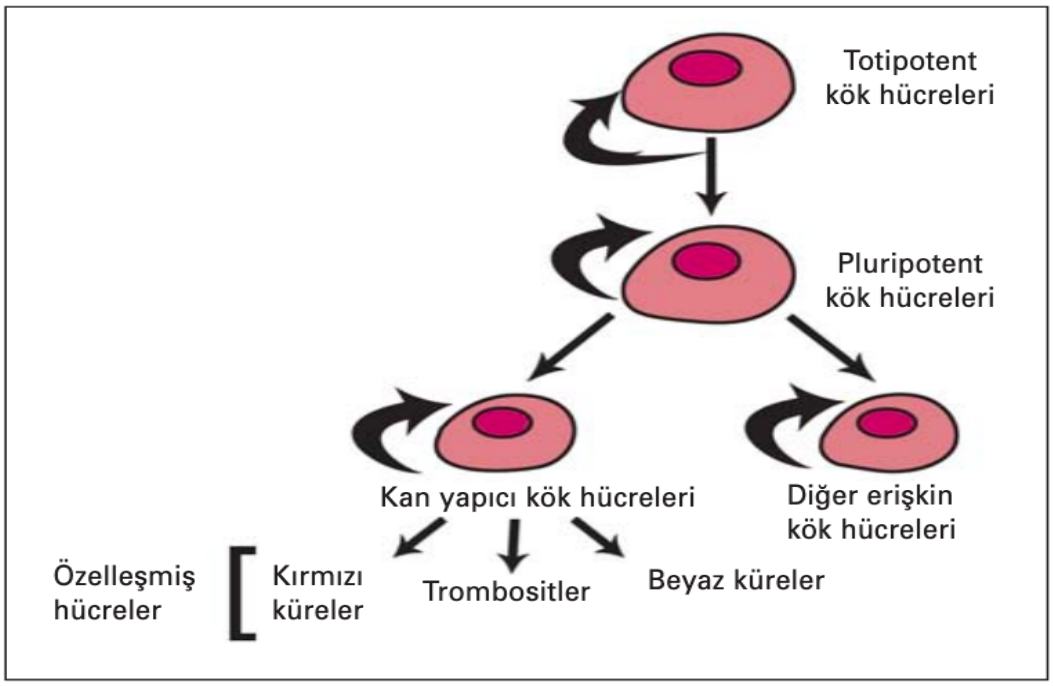
İndüklenmiş pluripotent kök hücre (İPSC): Genellikle erişkin somatik hücreden geriye farklılaştırma yoluyla pluripotent hale dönüştürülmüş hücredir. Pluripotent hücrelerin farklılaşma kapasitesine sahiptirler.

Multipotent hücreler: Tek bir doku ya da germ tabakasının hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerdir.

Oligopotent hücreler: Yalnızca birkaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir (lenfoid ve miyeloid kök hücreler gibi).

Unipotent hücreler: Tek bir hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerdir [10].

Şekil 2.1. Kök hücrelerin totipotent, pluripotent ve unipotent türleri.



2.1.2. Kök Hücre Tipleri

2.1.2.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH)

Blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. EKH'ler invitro olarak döllenmiş, ihtiyaç fazlası embriyolardan veya istemli sonlandırılan gebeliklerden elde edilmektedir.

2.1.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Organizmada çoğu dokuda bulunan ve bulunduğu organın, dokunun özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Esas görevleri bulundukları dokuda hasar tamiri ve bütünlüğü korumaktır. Hematopoetik, mezenkimal (stromal) ve diğer doku kök hücrelerini içerirler. [11]

2.1.3. Hematopoetik Kök Hücreler

Hematopoetik kök hücreler (HKH) kendilerini yenileme ve farklılaşma yeteneği olan klonojenik hücrelerdir. İnsan organizmasında eritrositler, miyeloid hücreler ve trombositler kemik iliğindeki kök hücreler tarafından başlatılan farklılaşma ve matürasyon süreci sonucunda oluşmaktadır. Uygun uyaranlarla diğer dokulara da (kardiyak miyositler, endotel hücreleri, adipositler, pankreatik hücreler gibi) farklılaşma yeteneği olan multipotent hücrelerdir [12-14].

Hematopoez, erişkin kök hücre tiplerinden biri olan ve bütün kan hücre serilerine dönüşme yeteneğindeki HKH'lerin gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini kapsamaktadır [15].
Erişkin bir bireyde günde yaklaşık olarak $2x10^9$ eritrosit, $1x10^9$ lökosit ve $1x10^9$ trombosit üretimi gerçekleşmektedir [16].

2.1.3.1 Hematopoietik Kök Hücrelerin Biyolojik Özellikleri ve Tanınmaları

Hematopoetik kök hücreler memelilerde en iyi tanımlanmış kök hücre türüdür. CD34 yüzey antijeni ifade ederler. CD34 ifadesine ek olarak bu hücrelerin Thy1(+), CD38(zayıf/-), ckit(-/zayıf), CD105(+), Lin (-) ve CD133(+) oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. CD34+ hücreler farklılaştıkça CD38 ifadesi artar, CD90 ve CD133 ifadeleri ise azalır [17]. Erken hematopoetik öncüllerde bulunan ve fonksiyonel bir belirleyici olan aldehit dehidrogenaz (ALDH) ifadesi de hematopoetik

kök hücrelerin saptanmasında kullanılabilir [18]. CD34 alt gruplarının ve fonksiyonel belirleyicilerin kullanıma girmesiyle kök hücre naklinde engrafman kapasitesinin artırılabileceği düşünülmektedir.

Farelerde yapılan in vivo deneylerde multipotent HKH'lerin iki türü izole edilmiştir. Bunlardan biri yaşam boyu hematopoez yenilenmesi sağlayan uzun dönem-HKH (Long-term-HSC) iken diğeri yaklaşık 6-8 haftalık kısa süreli yenilenme (Short term-HSC) sağlar [19].

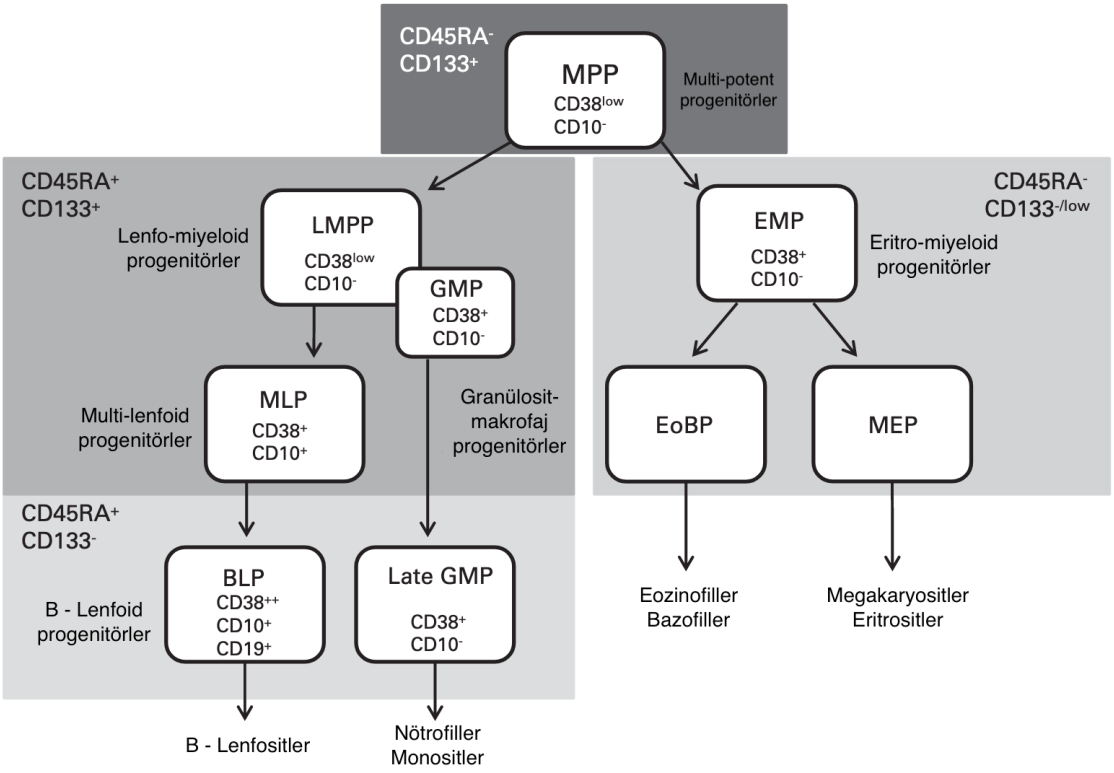
HKH'ler farklılaşmaya yönelirken ilk olarak kendini yenileme özelliklerini aşamalı olarak kaybederler. Farklılaşma ve kendini yenileme fonksiyonları gelişmiş bir homeostatik kontrol mekanizmasıyla yönetilir [20]. Böylece hematopoezin sürekliliği, HKH havuzundaki hücre sayısının idamesi ve doku fonksiyonları için gerekli olgun hücre üretimi sağlanır.

2.1.3.2 Hematopoetik Hiyerarşi

Hematopoetik kök hücreden farklılaşan ilk hücre serisi multipotent progenitör hücrelerdir (MPP). Kendini yenileme potansiyelleri HKH'lere göre daha azdır. MPP hücreler, seri bağımlı oligopotent kök hücrelerin gelişiminde rol oynarlar. Klasik hematopoez modelinde, MPP hücreler, ortak lenfoid progenitör ve ortak miyeloid progenitörlere farklılaşmaktaydı [21]. Ancak yapılan son çalışmalarda, lenfoid ve myeloid öncüllerin ikisine birden farklılaşma potansiyeli olan ancak megakaryosit ve eritrositlere farklılaşamayan lenfo-miyeloid progenitör (LMPP) hücrenin keşfedilmesiyle hematopoezde bir karma model geliştirilmiştir [22].

MPP hücreler, LMPP ve eritro-miyeloid progenitörlere (EMP) farklılaştıktan sonra EMP'lerden eozinofil-bazofil, eritrositer ve megakaryositer seriler oluşurken, LMPP'nin granülosit-makrofaj progenitörler (GMP) ve geç-GMP hücrelerine farklılaşmasıyla nötrofil ve monositer seri, LMPP'nin multi-lenfoid progenitörler (MLP) ve ardından oluşan B-lenfoid progenitörlere (BLP) farklılaşmasıyla B-lenfositlerin oluştuğu gösterildi [3, 23].

Şekil 2.2. İnsan hematopoez modeli (revize 'composite model') ve CD34 alt grupları. Görgen ve arkadaşları 2013'ten uyarlanmıştır [24].



2.1.3.3. Hematopoetik Kök Hücre Kaynakları

1-Kemik iliği (Kİ): HKH'lerin asıl kaynağı olan kemik iliği 40 yıldan daha uzun süredir kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kemik iliğinden kök hücre elde edilmesi, çoklu aspirasyonlarla anestezi eşliğinde yapılan cerrahi bir prosedür gerektirir. İlikteki her 100.000 hücreden biri uzun dönem kan elemanı içerir, diğer hücreler; stromal progenitör hücreler, stromal hücreler, olgun ya da olgunlaşmakta olan beyaz ve kırmızı kan hücreleridir [25].

2-Periferik Kan: Çok uzun yıllardır dolaşımda az miktarda HKH olduğu bilinmekteydi. 1980 li yıllarda başlayan G-CSF uygulamalarıyla kemik iliğinden periferik kana CD34+ kök hücrelerin kan dolaşımına çıkması (mobilizasyon) sağlandı. Mobilize edici faktörlerle dolaşımdaki HKH'lerin yaklaşık 1000 kat arttığı görülmüştür. Mobilizasyon sonrası aferez yöntemi ile elde edilen ürünün yaklaşık %5 ile %20'si HKH içerir. Kolay elde edilmesi ve kök hücre yamanma (engrafman)

sürelerinin daha kısa olması nedeniyle günümüzde kök hücre naklinde genellikle büyüme faktörü ile mobilize edilmiş periferik kan kaynaklı HKH'ler kullanılmaktadır [26].

3-Kordon kanı: İçerdiği kök hücreler, kemik iliğine oranla sayıca az olmasına rağmen çoğalma potansiyelleri daha yüksektir. Tedavide ilk kez 1988 yılında Fanconi aplastik anemili bir çocukta kullanılmıştır. Tek bir kordon kanından elde edilen kök hücre miktarı ancak pediatrik grup için yeterli olup, günümüzde çoklu vericiden yapılan kordon kanı nakli ve laboratuvar ortamında kordon kanı kök hücrelerinin çoğaltılması ile erişkin hastalarda da kök hücre naklinde kullanılmaktadır. Nakil sonrası doku reddinin, sitomegalovirüs (CMV) gibi fetal seyredebilen viral enfeksiyonların daha az görülmesi, daha düşük oranlarda doku tipi uygunluğunda da başarılı olması, içerdiği kök hücrelerin daha sağlıklı ve genç olması, elde edilmesi ve saklanması kolay olması avantajları iken; az miktarda HKH içermesi, engrafmanın geç olması dezavantajları olarak gösterilebilir. [5, 27, 28]

2.1.3.4 Hematopoetik Kök Hücre Mikroçevresi

Hematopoetik kök hücrelerin hücre döngüsünün G0 evresinde sessiz olarak kalarak idamelerinin sağlanması, Kİ'den ayrılıp dolaşıma girmeleri (mobilizasyon), dolaşımdan Kİ'ne geri dönmeleri (homing), yerleşmeleri (yamanma=engrafman) ve adezyon, matürasyon, proliferasyon, farklılaşma gibi birçok fonksiyonları hematopoetik kök hücre mikroçevresinde sağlanmaktadır. Bu özel mikroçevreye 'niş' adı verilir [29].

Başlıca vasküler ve osteoblastik (endosteal) olmak üzere iki farklı niş bulunmaktadır. Endosteal niş kemik iliği stroma hücrelerinden köken alan mezenkimal kök hücreler (MKH), osteoblastlar, endotel hücreleri, fibroblastlar ve yağ hücrelerinden oluşur. N-cadherin pozitif özellikli osteoblastlar endosteal nişin ana komponentini oluşturmaktadır. Kalsiyumdan zengin ve hipoksik bu mikroçevre uzun-süreli HKH'ler için uygun ortam oluşturmaktadır. Endosteal nişler hematopoetik kök hücre rezervini oluştururlar ve HKH'lerin dış etkilere karşı korunaklı bir şekilde istirahat halinde kalmalarını sağlarlar [30]. Sinüzoidlerden zengin vasküler niş ise progenitör hücrelerin çoğalması ve olgun hematopoetik hücrelere farklılaşmaları için uygundur. Kök hücrelerin niş alanları arasındaki trafiği veya kemik iliğinden çıkıp farklı dokulara

migrasyonu, başta kemokinler olmak üzere farklı solubl moleküller, hücre-hücre matriks ilişkileriyle belirlenmektedir [31].

2.1.3.4.1 Hematopoietik Mikroçevrede Önemli Etkileşimler

Hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğinde tutulmasında, SDF-1alfa'nın (stromal derived faktör-1 alfa) veya diğer adıyla CXCL12'nin HKH üzerindeki reseptörü CXCR 4 'e bağlanması büyük önem taşır. SDF-1; CXCL12'den zengin retiküler hücreler (*CAR cells*), osteoblastlar ve nestin (+) MKH' ler tarafından sentezlenir. CXCL12-CXCR4 bağlantısı G-CSF aracılı mobilizasyonda önemlidir. G-CSF ile CXCL12'nin negatif modülasyonu sağlanır ve CXCR4'ün aktivasyonu engellenerek HKH'lerin G0'dan çıkıp, hücre siklusuna girmesiyle mobilizasyon sağlanır [32]. Endosteal nişte CXCL12-CXCR4 etkileşimi parathormon (PTH) veya parathormon ilişkili peptid (PTHrP) ile Jagged-1 bağımlı aktive olan *Notch* aktivasyonu yoluyla düzenlenir. Böylece HKH'lerin sessiz fazda kalması, hematopoez devamı ve hayatta kalmaları sağlanır. PTH'nın ayrıca *Notch* aktivasyonuyla HKH ekspansiyonuna ve engrafman üzerine olumlu etkileri mevcuttur [33, 34].

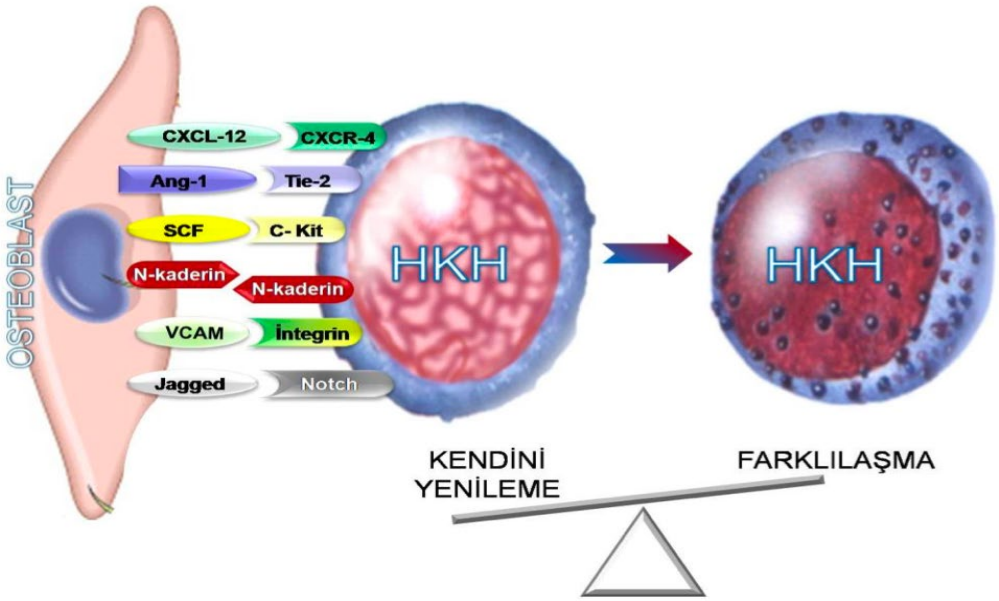
Yine osteoblastlar tarafından ifade edilen Angiopoietin-1 ile HKH üzerindeki reseptörü Tie-2 (angipoietin reseptör -2) etkileşimi adezyonda ve kemoterapi ilişkili hasardan korunmada oldukça önemlidir. Bir diğer adezyonda etkili molekül iğsi şeklinde n-kadherin eksprese eden CD45- osteoblastlar ile HKH'lerden ifade edilen N-kadherin etkileşimidir [35, 36].

Kök hücrelerin endosteal niş alanına yerleşmesi ve adezyonunda Angiopoetin-1 ve CXCL12-CXCR4 etkileşiminin yanı sıra integrin ve kadherin ailesine ait E-kadherin, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hyaluronik asit reseptörü olan CD44 gibi moleküller rol oynar. Ayrıca integrin ailesinden olan *very late antigen-4* (VLA-4); fibronektin ve osteoblast üzerindeki VCAM-1 ile bağlanır ve hücrenin apopitozunu engelleyerek istirahat halinde kalmasını sağlar. VLA-4 ayrıca hematopoetik büyüme faktörlerinin sentezinde de rol oynar [37-39].

Vasküler nişte yer alan sinüzoidal endotel hücreler ve mezenkimal kök hücreler VCAM-1 ve SCF (kök hücre faktörü) ifade ederler. VCAM-1 HKH reseptörü α4β1'e bağlanırken SCF, HKH yüzeyinde bulunan c-kit ile bağlanır [40].

Kemik ve kemik dışı bölgelerden salınan osteopontin (OPN), β1 integrin aracılığı ile HKH'lerin sessiz fazda kalmalarını ve endosteal bölgeye göç etmelerini sağlar. Bunun yanında OPN, HKH üzerinde bulunan CD44, α4 ve α5β1 reseptörlerine bağlanarak HKH sayısını negatif yönde etkiler.
Adezyonda görev alan α9β1/α4β1integrinlerine ait antikor kullanılmasının mobilizasyonu arttıracağı gösterilmiştir [41].

Şekil 2.3. Endosteal nişte osteoblastlar ile HKH'ler arasında homeostazı sağlayan iletişimler



HKH'lerin farklılaşması için, endosteal niş bölgesinden çıkıp sinüzoidden zengin vasküler/santral niş alanına migrasyonu; kemokin, sitokin ve büyüme faktörü seviyeleri ile belirlenmektedir. Vasküler nişteki sinüsler arasındaki ekstravasküler boşluklarda hematopoez gerçekleşir. Yine bu bölgede yüksek miktarda CXCL12 ifade eden CAR hücreleri, CD34+nestin ve Sca-1- adventisyal hücreler bulunur [42].

Hematopoetik progenitör hücrelerin vasküler nişe toplanması fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-4, FGF-4)'ne ve CXCL12'ye bağımlıdır. FGF-4;

hematopoetik hücreler üzerinde VLA-4 integrinini, endotelyal hücreler üzerinde ise VCAM-1 ekspresyonunu arttırır. Böylece hematopoetik hücrelerin (özellikle megakaryosit progenitörlerinin) vasküler nişe adezyonları ile yaşamlarını sürdürmeleri ve olgunlaşmaları sağlanır. Aynı zamanda vasküler nişte yüksek, osteoblastik nişte düşük olan FGF gradienti HKH veya progenitörlerin vasküler alana toplanmasında etkilidir. Kemik iliği endotel hücreleri de CXCL12, VCAM-1 ve selektinleri (e-selektin, p-selektin) eksprese ederek HKH'lerin mobilizasyonunda, dolaşımdan kemik iliğine dönmelerinde ve yerleşimlerinde rol alırlar [43-45].

2.2. HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİ

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) günümüzde pek çok hematolojik, immünolojik, metabolik hastalıkların ve malignitelerin küratif tedavisinde yer almaktadır (Tablo-1 de HKHN endikasyonları belirtilmiştir). HKHN donörden alınan HKH ve immün hücrelerin alıcıya transplantasyonu işlemidir [46].

Kanser tedavisinde HKHN 'nin asıl amacı yüksek doz kemoterapi ve/veya iyonize radyasyonla boşalan kemik iliğini, otolog veya allojenik hematopoetik kök hücrelerle yenileyerek, hematopoezi yeniden sağlamaktır (allojenik kök hücre naklinde immünolojik graft versus tümör etkisi de hedeflenmektedir) [47] . Kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı kullanılabilmektedir. HKHN, kök hücrelerin temin edildiği vericiye göre allojenik, otolog ve sinjenik olmak üzere 3 alt gruba ayrılır [48].

Allojenik HKHN: Sağlıklı bir akraba veya akraba dışı vericiden alınan kök hücrelerin farklı bir kişiye nakledilmesidir.
Otolog HKHN: Kişinin kendisinden alınan kök hücrelerin tekrar kendisine nakledilmesidir.
Sinjenik HKHN: Monozigotik ikiz kardeşten yapılan kök hücre naklidir.

Tablo 2.1. HKHN klinik uygulama alanları

Otolog HKHN	**Hematolojik Maligniteler** -MM -NHL -HL -AML (remisyonda) -ALL -KLL **Hematolojik Olmayan Maligniteler** -Nöroblastoma -Over kanseri -Germ hücreli tümörler -Ewing Sarkom **Diğer Hastalıklar** -Otoimmün hastalıklar -Amiloidoz
Allojenik HKHN	**Hematolojik maligniteler** -AML -ALL -KML -MDS -Miyeloproliferatif hastalıklar -NHL -HL -KLL -MM **Diğer hastalıklar** -Aplastik anemi -Paroksismal nokturnal hemoglobinüri -Fankoni anemisi -Blackfan Diamond Anemisi -Talasemi majör -Orak hücreli anemi -Ciddi kombine immün yetmezlik -Wiskott Aldrich sendromu -Doğumsal metabolizma hastalıkları

2.2.1 Hematopoetik Kök Hücre Nakli Tarihçesi

Kök hücre nakli ile ilgili ilk çalışmalar 1939-1940'lı yıllarda hayvan deneyleriyle başlamıştır. Bu dönemde kök hücre kaynağı olarak kemik iliği kullanılmaktaydı. Özellikle 2. Dünya Savaşı sonrası dönemde radyasyona bağlı kemik iliğinin baskılanmasının keşfi ile çalışmalar artmıştır. İnsanlarda 1957 yılında Thomas Ferebee tarafından yapılan ilk nakil denemesi başarısız sonuçlanmış olup ardından 1959 yılında identik ikizden yapılan ilk başarılı nakil bildirilmiştir [49]. Akraba dışı vericiden allojenik kemik iliği nakli ilk kez 1979 yılında Hansen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir.

Periferik kanda kök hücreler 1962'de ilk olarak farelerde, insanlarda ise 1972'de gösterildi [50, 51]. Aferez cihazlarının gelişmesi, periferik kanın kök hücre kaynağı olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır [52, 53]. Tarihte ilk olarak 1979 'da Goldman ve arkadaşlarının altı KML hastasında uyguladıkları otolog periferik kök hücre naklinde (OPKHN) başarılı sonuçlar rapor edilmiştir [54]. İlk allojenik periferik kök hücre nakli ise 1989 yılında bir akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastasında yapılmıştır [55]. Yapılan çalışmalarda başarılı allojenik periferik kök hücre nakli bildirimleriyle 1995'ten sonra kök hücre kaynağı olarak periferik kan yaygın olarak kullanılmaya başlandı ve günümüzde çoğu allojenik ve otolog kök hücre naklinde periferik kan kaynaklı kök hücreler kullanılmaktadır [47, 56].

Türkiye' de ilk allojenik kemik iliği nakli 1978'de Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Prof. Dr. Korkut Özerkan, ilk otolog kemik iliği nakli 1984 yılında Prof. Dr. Önder Berk ve ekibi tarafından Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde gerçekleşmiştir. Kök hücre kaynağı olarak periferik kanın kullanımı 1992 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Yetişkin Hematoloji Kök Hücre Nakli kliniğinde Hodgkin Dışı Lenfomalı bir hastaya ve ardından aynı klinikte başka bir hastaya ilk kez allojenik periferik kök hücre nakli yapılmıştır [57].

2.2.2. Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli

OHKHN hastanın kendisinden toplanan kök hücrelerin YDT sonrası hematopoetik yeniden yapılanma amacı ile hastaya geri verilmesi işlemidir. Otolog kök hücre destekli YDT hematolojik malignitelerden özellikle MM ve kemoterapiye duyarlı

nüks/dirençli Hodgkin ve NHL tedavisinde sağkalımı uzatan standart bir tedavi yöntemidir [1]. OHKHN ile kemoterapiye duyarlı malignitelerde yüksek doz tedavi için en önemli kısıtlayıcı faktör olan kemik iliği yetmezliği aşılarak, daha yoğun tedavilerin uygulanabilmesi sağlanmaktadır [58].

OHKHN birbirini takip eden 4 basamaktan oluşur:
1.basamak; kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin perifere mobilizasyonu ve aferez yöntemi ile veya doğrudan kemik iliğinden kök hücrelerin toplanması, işlenmesi ve saklanması
2.basamak; miyeloablatif kemoterapi ve/veya radyoterapinin uygulanması
3.basamak; işlenip dondurularak saklanmış olan ürünün hastaya infüzyonla verilmesi (otolog kök hücre nakli)
4.basamak; destek tedavisi, engrafman, taburculuk [59].

OHKHN 'de hematopoetik kök hücreler periferik kandan, kemik iliğinden veya kordon kanından elde edilebilmektedir [60]. Günümüzde HKH kaynağı olarak periferik kan kullanılması; hücrelerin daha kolay toplanması, daha çok CD34+ kök hücre elde edilmesi, nakil sonrasında engrafmanın daha hızlı gelişmesi nedeniyle en çok tercih edilen yöntemdir [61, 62]. Nakil için toplanmış ürün kanındaki CD34+ hücreler HKH göstergesi olarak kullanılmaktadır.

2.2.3. Mobilizasyon

Normal çevre kanında, periferik kandaki lökositlerin %0.05 'i civarında CD34+ hücre bulunmaktadır. Mobilizasyon CD34(+) hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğinden periferik kana iyatrojenik olarak geçişini sağlama işlemidir [63].

Mobilizasyon yöntemlerinde en sık iki rejim kullanılmaktadır. Bunlar tek başına G-CSF veya kemoterapi (KT) ile birlikte G-CSF tedavileridir [64]. Son yıllarda sitokinler ve kemoterapötik ilaçlar dışında hematopoetik öncü hücrelerin kök hücre nişiyle bağlantısını kesen küçük molekül inhibitörlerinin kullanımına başlanmış ve çalışma aşamasında olan rekombinant monoklonal antikorlarla mobilizasyon başarısı artmıştır [65].

2.2.3.1 Sitokin Aracılı Mobilizasyon:

Bu mobilizasyon yönteminde yalnızca sitokinler kullanılır. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı iki sitokin G-CSF ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) bulunmaktadır [66]. Genellikle önerilen ve en sık kullanılan sitokin G-CSF'dir. G-CSF'nin, HKH'lerin kemik iliği stromasına adezyonunda rol oynayan molekülleri nötrofil elastaz ve katepsin G gibi proteolitik enzimlerle yıkarak mobilizasyonu sağladığı gösterilmiştir [67]. Ayrıca SDF-1 mRNA ekspresyonunu baskılayarak SDF-1 seviyelerinde azalma ve osteoblastik aktivitenin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir [68]. Günümüzde Avrupa'da onaylı G-CSF sitokinleri; filgrastim ve lenograstimdir. Önerilen filgrastim kullanım şekli; 5-7 ardışık gün 10μg/kg/gün dozunda derialtı uygulamadır. Lenograstim için 4-6 ardışık günde 10μg/kg/gün dozunda derialtı uygulamadır. Yeterli hücreye ulaşılamadığında G-CSF'ye 1-2 gün daha devam edilebilir. Lökoforez işlemi bu rejimde genellikle 5. günde uygulanır [69].

Yapılan çalışmalarda G-CSF'nin günde iki kez verilmesinin daha etkili olduğuna dair net bir veri elde edilememiştir. Daha yüksek dozlarda kullanılmasıyla ilgili tartışmalı sonuçlar mevcut olup toksisite riskinin artacağı bildirilmiştir [70].

G-CSF'nin en sık yan etkileri kemik ağrısı, ateş, baş ağrısıyken, nadir olarak tromboz, splenik rüptür, otoimmün hastalıklarda alevlenmeler ve orak hücre krizi gibi yan etkiler de görülmektedir [71].

Kemoterapisiz mobilizasyonun avantajları arasında; daha düşük toksisite, öngörülebilir lökoforez zamanı, hastanede yatış gerektirmemesi ve düşük maliyet oranları gösterilebilir. Dezavantajları ise; KT+G-CSF ile mobilizasyona göre ürün kanında daha az CD34 + hücre bulunması ve mobilizasyon başarısının daha düşük olması yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [72].

2.2.3.2 Kemoterapi Aracılı Mobilizasyon

Tümör yükünün azaltılmak istendiği ve daha yüksek miktarda HKH ihtiyacı olan tüm hastalarda KT + G-CSF kombinasyonu ile mobilizasyon önerilmektedir. Günümüzde siklofosfamid mobilizasyonda 2–4 g/m^2 dozunda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kullanılacak KT ajanlarının altta yatan hastalığa karşı etkili ve mobilizasyonu kolaylaştırıcı olması gerekmektedir. Böylece hem sitoredüksiyon hem de mobilizasyon birlikte sağlanmış olur. Bu nedenle mobilizasyonda hastalığa özel çoklu kemoterapötik kullanımı da yaygındır [73].

Miyelosüpresif tedavi sonrası önerilen filgrastim dozu; 5 µg/kg/gün, lenograstim dozu ise; 150 µg/m^2 gündür. Daha yüksek dozda G-CSF kullanımını öneren raporlar mevcut ancak bu konuda yeterli randomize çalışma halen bulunmamaktadır [74]. Uygulanan protokollerin çoğunda G-CSF'ye, KT bitiminden sonra 1-5 gün içinde başlanılması ve lökoforez işlemi bitinceye kadar devam edilmesi önerilmektedir.

Kemoterapi aracılı mobilizasyonun avantajları; antitümöral etkinliği ve daha az sayıda aferez ile hedef CD34+ hücre sayısına ulaşılmasıdır [75]. Dezavantajları ise; toksisitede artış, hastanede yatış gerektirmesi, artan maliyet, mobilizasyonu zorlaştıran kemik iliği hasarı ve optimal lökoforez zamanını tayin etmek için günlük olarak dolaşımdaki CD34+ hücre miktarının ölçülmesi gerekmektedir [76].

G-CSF bazlı tedavilerde (tek başına veya KT ile kombine) yapılan çalışmalarda %10-30 arasında değişen mobilizasyon başarısızlığı gösterilmiştir [77]. Bu nedenle yeni tedavilere ihtiyaç duyulmuştur.

2.2.3.3 Plerixafor

Plerixafor (AMD3100), geri dönüşümlü CXCR4 antagonisti olup mobilizasyonu SDF-1 ile CXCR 4 etkileşimini selektif ve geri dönüşümlü olarak inhibe ederek sağlar [78]. MM ve NHL tanılı hastalarda yapılan çalışmalarda, G-CSF ile kombine kullanımının tek başına G-CSF ile mobilizasyondan daha başarılı olduğu gösterilmiştir [79]. Bu çalışmaların üzerine FDA ve Avrupa İlaç Kurumu (EMA) plerixaforun daha önce mobilizasyon yetersizliği olan vakalarda G-CSF ile kombine kullanımını onaylamıştır [80]. G-CSF + plerixafor kullanımında yapılan çalışmalarda HKH progenitörlerinde CD34+ CD38- öncül hücrelerin, B ve T lenfositlerin, dentritik hücrelerin ve NK hücrelerin daha fazla mobilize olduğu, böylece engrafmanın ve immün yeniden yapılanmanın tek başına G-CSF bazlı rejimlere kıyasla daha hızlı sağlandığı gösterilmiştir [81-85]. Plerixafor'un ilk mobilizasyonda kullanımı ise mobilizasyon

başarısızlığı önceden ön görülen hastalarda ‘preemptif kullanımı’önerilmektedir [86]. Ayrıca, mobilizasyon girişimi esnasında çevre kanında CD34+ hücre sayısı düşük veya ilk aferez esnasında verim düşük ise kurtarma amaçlı plerixafor eklenebilir.[86].

Önerilen plerixafor dozu 0.24 mg/ kg/gün derialtı uygulamadır. Uygulandıktan 4-9 saat sonra etkisi pik değere ulaştığı için planlanan aferezden 9-11 saat önce verilmesi önerilmektedir [87]. Sık görülen yan etkileri diyare, bulantı, kusma, enjeksiyon yerinde lokal reaksiyon, baş ağrısı, halsizlik ve uykusuzluktur.

2.2.3.4 Hematopoetik Kök Hücre Mobilizasyonunda Çalışmaları Devam Eden İlaçlar

Pegile filgrastim (Pegfilgrastim): Filgrastrim ile monometoxsipolietilen glikolün kovolent konjugatı G-CSF’nin yeni bir türü olan Pegile (Peg) G-CSF’dir. Filgrastimin plazma yarı ömrü 3-4 saat iken Peg-G-CSF’de 33 saattir [88]. FDA tarafından kemoterapi sonrası uzamış nötropenide kullanımı onaylıdır. Ancak mobilizasyon için onayı henüz bulunmamaktadır. Hasta vücut ağırlığından bağımsız tek doz olarak kullanılır. 2015 yılında yapılan bir meta analizde pegile filgrastimin G-CSF ile karşılaştırıldığında afereze daha erken başlama imkanı verdiği ve aferez süresini kısalttığı gösterilmiştir. Toplanan CD34+ hücre miktarı ve engrafman süreleri benzer görülmüştür [89]. Güvenli doz aralığının belirlenmesi ve maliyet etkinlik konularında daha çok randomize çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Sargramostim (GM-CSF): Yapılan çalışmalarda G-CSF' den daha etkisiz olduğu gösterilmiş olup, yeniden mobilizasyon rejimlerinde tek başına ya da kombine kullanımı önerilmektedir [90].

Ancestim (rekombinan SCF): Hematopoetik bir büyüme faktörü olan SCF, c-kit ligand olarak da bilinir. C-kit HKH’lerin yüzeyinde bulunan bir tirozin kinaz reseptörüdür ve SCF ile bağlanır. Ancestim rekombinan bir SCF molekülüdür. Mobilizasyona olan olumlu etkileri ve G-CSF ile sinerjistik etkisi gösterilmiştir. Faz III çalışmalarda ‘standart mobilizasyon’ planlanan hastalarda G-CSF ye üstünlüğü gösterilemediği için, yalnızca mobilizasyon yetmezliğinde kullanımı önerilir [91].

Diğer Deneysel Tedaviler: Plerixaforun mobilizasyon yetmezliğinde kullanımında elde edilen başarılı sonuçlarla, çalışmalar alternatif CXCR4 antagonistlerine yönelmiştir, bu alanda POL6326 ve BTK140 ajanlarının faz 1-2 klinik çalışmalarında ümit vaat eden sonuçlar bildirilmektedir [92]. HKH nişi ve rezervi ile ilgili bilgiler arttıkça paratiroid hormon gibi nişi düzenleyen ajanların kullanımı gündeme gelmektedir ve PTH ile erken evre çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmaya başlanmıştır [93]. Proteozoam inhibitörlerinden Bortezomib'in VLA-4/VCAM1 etkileşimini bozarak mobilizasyona etki ettiği ve G-CSF, KT ile sinerjistik etkisi faz 2 çalışmasında gösterilmiştir [94].

Ek olarak; sfingozin-1-fosfat agonistleri, Natalizumab ve diğer α4 integrin inhibitörleri ve β2 agonistlerin yanı sıra rekombinan insan eritopetini (EPO), rekombinan insan trombopoetini (TPO), rekombinan insan büyüme hormonu, TPO reseptör agonistleri, Gro-β analogları gibi tedaviler de henüz deneysel aşamalarda olsa da mobilizasyon tedavisinde ilerleyen yıllarda umut vaat etmektedirler [95, 96].

2.2.3.5 Toplanacak Hedef CD34 + Miktarı ve Lökoferez Zamanı

Mobilizasyon sonrasında mobilize olan kök hücreler lökoferez işlemiyle toplanmaktadır.

Sadece G-CSF'nin kullanıldığı mobilizasyon rejimlerinde aferez öncesi periferik kanda CD34+ hücre sayımı isteğe bağlıdır. KT ile mobilizasyonda ise KT bitiminden sonra günlük lökosit ve trombosit ölçümlerine başlanılması ve lökositler 1000/μL' ye yükseldiğinde periferik kanda CD34+ hücre sayımına başlanılması önerilmektedir. Dolaşımdaki CD34+ hücre sayısı ≥ 20/μL' yi geçtiğinde ise afereze başlanmalıdır [97].

Toplanması hedeflenen hücre miktarı altta yatan hastalığa bağlı olarak değişebilmektedir. Ardışık transplantasyon ihtiyacı olan hastalarda bir transplant için önerilen en az CD34 + hücre miktarı >2x10^6/kg hücredir. Ancak nakilden sonra hematopoetik toparlanmanın daha hızlı olması için birçok merkezde 4-5 x 10^6/kg CD34(+) hücre hedeflenmektedir [69, 98]. Engrafman süresi verilen CD34(+) hücre sayısıyla ve tedavi başarısıyla ilişkilidir. Bu açıdan CD34 + kök hücre mobilizasyonu,

nakil öncesi tedaviye yanıtı belirleyen en önemli faktördür ve yetersiz mobilizasyon tedavi başarısını etkilemektedir.

Yüksek hacimli aferez (total kan volümünün 4-5 katı) ile daha etkili sonuçlar alındığı gösterilmiştir [99]. Özellikle yetersiz mobilizasyon riski yüksek olan ve toplanacak hedef CD34 + hücre miktarı fazla olan hastalarda yüksek hacimli aferez önerilmektedir. Ancak işlemde kullanılan DMSO oranlarındaki artış kardiyak yan etki riskini de arttırması nedeniyle tüm hastalar için uygun değildir. Bir aferez seansının 5 saati geçmemesi önerilmekte ve 4 aferezden fazlası önerilmemektedir [100].

2.2.3.6 Mobilizasyon Yetersizliği ve Yönetimi

Mobilizasyon yetersizliği; 3 ardışık aferezde 2 x10^6/kg CD34 hücre miktarına ulaşılamaması veya periferik CD34 + hücre sayısının 10-20/μL'nin altında olması olarak tanımlanır. Mobilizasyon yetersizliği kanıtlanmış ve olası (risk faktörlerinin olduğu) olmak üzere 2 gruba ayrılır [101].

Kanıtlanmış mobilizasyon yetersizliği periferik CD34+ hücre sayısına göre; sınırda mobilizasyon yetersizliği (CD34 + hücre sayısı 11-19 /μL), rölatif mobilizasyon yetersizliği (CD34 + hücre sayısı 6-10/μL) mutlak mobilizasyon yetersizliği (CD34 + hücre sayısı 0-5 /μL) olmak üzere alt gruplara ayrılır [102].

Bir hastada aferez sırasında periferik kanda ≥20 /μL CD34 + hücre varsa, toplama işlemine başlanmalıdır. 15-20/μL CD34+ hücresi olan hastada mobilizasyon yetersizliği için risk faktörü yok ve ikiden fazla transplant planlanmadıysa yeterli hücre toplanabileceği belirtilmektedir. Eğer CD34 + hücre sayısı 10/μL altında ise mobilizasyon yetersizliğini önlemek için plerixafor kurtarma tedavisi verilir (önerilen doz 0.24 mg/kg/gün). CD34 + hücre sayısı 10-20/μL saptandığı 'gri zon' olarak tanımlanan grupta ise plerixafor kararı altta yatan hastalığa ve hastanın daha önce aldığı tedavilere göre verilir. Yine eğer ilk aferezde hedef CD34+ hücre sayısının üçte birine ulaşılamadıysa plerixafor kullanımı önerilmektedir [103].

Tablo 2.2. Mobilizasyon yetersizliği için risk faktörleri, Mothy M. ve ark. 2014'ten uyarlanmıştır [97].

Mobilizasyon Yetersizliği İçin Risk Faktörleri
1- İleri yaş (60 yaş>)
2- İleri evre hastalık
3- Daha önce aldığı tedavi sayısının fazla olması (KT ve /veya RT)
4- Fludarabin, melfelan, lenalidomid ile tedavi öyküsü (tartışmalı)
5- Aferez öncesi periferik CD34+ hücre sayısının düşük olması
6- Mobilizasyon öncesi düşük trombosit düzeyleri (tartışmalı)

Tablo-2'de bahsedilen risk faktörlerinden bir veya daha fazlasına sahip hastalarda, plerixafor ''preemptif'' kullanımı düşünülmelidir. Genel olarak mobilizasyon başarısızlığı için en güçlü prediktif faktörün aferez öncesi bakılan periferik kandaki CD34 + hücre sayısı olduğu kabul edilmektedir [104].

Mobilizasyon işleminin başarısız sonuçlanması durumunda (3 günlük toplanan CD34(+) hücre sayısı $<2 \times 10^6$/kg) genellikle yeniden mobilizasyon öncesi en az 4 hafta bekleme süresi gerekmektedir. 4 hafta beklendikten sonra yeniden toplama denenebilir. Bu durumda yeniden mobilizasyon için önerilen tedavi seçenekleri şunlardır:

A) Önceki mobilizasyonda kullanılan G-CSF dozunun arttırılması

B) İlk mobilizasyonda yalnızca sitokin kullanıldı ise KT+G-CSF ile yeniden mobilizasyon yapılması

C) Kemoterapi almışsa kemoterapötik dozunun veya rejiminin değiştirilmesi

D) Plerixafor + G-CSF (KT' de eşlik edebilir) kullanılması

E) SCF + G-CSF (KT de eşlik edebilir) kullanılması

F) Yüksek hacimli aferez yapılması

Bu yöntemler ile başarılı sağlanamadıysa veya aferez yapma imkanı olmadığında kemik iliğinden HKH toplanması önerilmektedir [105]

Tüm yöntemlere rağmen başarısız mobilizasyon olan hastalarda ise yukarıda bahsedilen deneysel aşamada olan yeni ajanların kullanımı düşünülebilir.

2.2.4 Engrafman

Hazırlık rejimi sonrası gelişen aplazi sonrasında, hematopoetik hücrelerin hastanın kemik iliğine yerleşerek kan elemanlarını desteksiz şekilde üretmeye başlaması ve devam ettirmesine engrafman adı verilmektedir. Başarılı bir HKHN'nin gerçek göstergesi engrafman ve hematopoetik düzelmedir. Nötrofil engrafmanı; Parçalı nötrofil sayısının G-CSF ihtiyacı olmaksızın ardışık 3 gün >500hücre/ul olduğu ilk gün veya >1000 hücre/ul olduğu ilk gün, trombosit engrafmanı; 7 gün trombosit desteği olmadan trombosit sayısının ardışık 3 gün >20000 hücre/ul veya >50 000 hücre/ul olduğu ilk gündür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmanın Yapıldığı Yer ve Genel Akış

Ocak 2018- Haziran 2019 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (AÜTF) Hematoloji Bilim Dalında MM ve Lenfoma tanılarıyla izlenen OPKHN yapılması planlanan 27 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. 18 yaşın üzerinde, MM ve lenfoma tanıları nedeniyle OPKHN planlanan çalışmayı kabul eden hastalar seçilmiştir. Aydınlatılmış onam formunu imzalayan katılımcılar araştırmaya dahil edilmiştir.

OPKHN yapılacak 27 hastada kök hücre mobilizasyonu sağlanması amacıyla 3 farklı mobilizasyon rejimi uygulandı. Yalnız G-CSF, GCSF+KT ve Plerixaforun kullanıldığı rejimler olmak üzere hastalar 3 grupta incelendi. G-CSF grubuna 9 hasta, G-CSF+KT grubuna 9 hasta ve plerixafor grubuna 9 hasta dahil edildi.

Hastaların çevresel kan CD34 sayımı >20 / µl olduğunda, aferez seansına başlanmıştır (10-20 µl arası değerlerde hasta özelinde değerlendirme yapılarak işleme alınmıştır). Mobilizasyon işleminde ardışık 3 gün aferez ile toplanan CD34+ hücre sayısı >2x10^6/kg olanlar başarılı mobilizasyon olarak kabul edilip çalışmaya dahil edilmiştir. Yalnız G-CSF grubunda uygulamanın 4-5. gününde, KT+GCSF grubunda 8-10. günlerde, Plerixafor alan grupta ise plerixafor uygulandıktan yaklaşık 9 saat sonra aferez işlemlerine başlandı.

OPKHN amacıyla toplanmış periferik kan kök hücre ürünü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni-Sina Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Laboratuvarı'nda 3 lazer 12 renk kapasiteli akım sitometri cihazı ve donanımı kullanılarak multiparemetrik akım sitometri yöntemi ile CD34 ve alt tiplerine (7-AAD kullanılarak tespit edilen canlı CD34+ hücrelerde CD45/ CD45RA/ CD133/ CD10/ CD19/ CD3/CD38/ CD7/ CD33) bakıldı. CD34 ve alt grupları ile mobilizasyon rejimleri arasındaki ilişki 3 grupta değerlendirildi. OPKHN'nin yapıldığı hastalarda ise nakil sonrasında trombosit ve nötrofil engrafman süreleri takip edilerek CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisi değerlendirildi.

Engrafmanın değerlendirilmesinde; nötrofil engrafmanı; nakil sonrası tam kan sayımında mutlak nötrofil sayısının desteksiz ardışık 3 gün boyunca >500 hücre/ul olduğu ilk gün, trombosit engrafmanı; trombosit sayısının ardışık 3 gün boyunca desteksiz>20.000 hücre/ul olduğu ilk gün olarak tanımlandı.

Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 22.02.2017 tarihli ve 03-108-17 karar numarasıyla araştırma onayı alınmıştır. Çalışma için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nden destek alınmıştır.

3.2. Kullanılan Yöntem ve Teknikler

3.2.1. Aferez Toplama İşlemi

Aferez toplama işlemi, otomatik akım kan hücre ayrıştırıcılarıyla yapıldı (Spectra Optia Apheresis System). 18G antekubital ven kateteri ya da santral venöz kateter damar yolu olarak kullanıldı; 300-350 ml aferez ürünü yaklaşık olarak total kan volümünün 2,5 katı kanın işlenmesi sonrası elde edildi. Toplama hızı, 50-60 ml kan/dk ve süre 216-252 dk idi. Toplama işlemi 1,2 veya 3 ardışık günde gerçekleştirildi. Amaç, en az $2x10^6$/kg CD34 (+) hücre elde etmekti. Alınan ürün DMSO toksisitesini azaltmak amacıyla santrifüj edildikten sonra, DMSO-plazma solüsyonu aferez ürünlerine konuldu ve sıvı nitrojende -196°C'de kriyoprezerve edildi. Reinfüzyon öncesi kök hücre ürünleri 37 °C su banyosunda hasta başında eritildi ve hızlıca hastaya infüze edildi.

3.2.2. Akım Sitometri Yöntemi

Aferez kan ürün örneği, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) antikuagülanı ile pıhtı içermeden en az 0.5ml volümünde en geç 24 saat içinde hematoloji bilim dalı laboratuvarına ulaştırıldıktan sonra aşağıdaki malzemeler ve cihazlar kullanılarak işleme alındı.

3.2.2.1. Gerekli Malzemeler

- İlgili antikorlar (CD45-Krome Orange, CD45RA-FITC, CD34-PC5, CD133-APC, CD38-APC-Alexa Fluor 750, CD7-APC Alexa Fluor 700, CD10 PB, CD19 KRO, 7AAD, CD33-RPE, CD3-Pacific Blue)
- *Optilyse* (kullanıma hazır hücre lizis solusyonu)

- *Sheath fluid* (kullanıma hazır tampon solusyonu)
- Otomatik ayarlanabilir pipetler (1-1000µl)
- Falcon çalışma tüpleri (5ml.)
- Pipet uçları
- Laboratuvar saati
- Karanlık dolap (raf, kutu vb.)
- Kurutma kağıtları

3.2.2.2. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (100-5000 rpm ayarlanabilir)
- Akan hücre ölçer cihazları (Navios (3 LASER 12 RENK))
- Vorteks (Karıştırıcı)

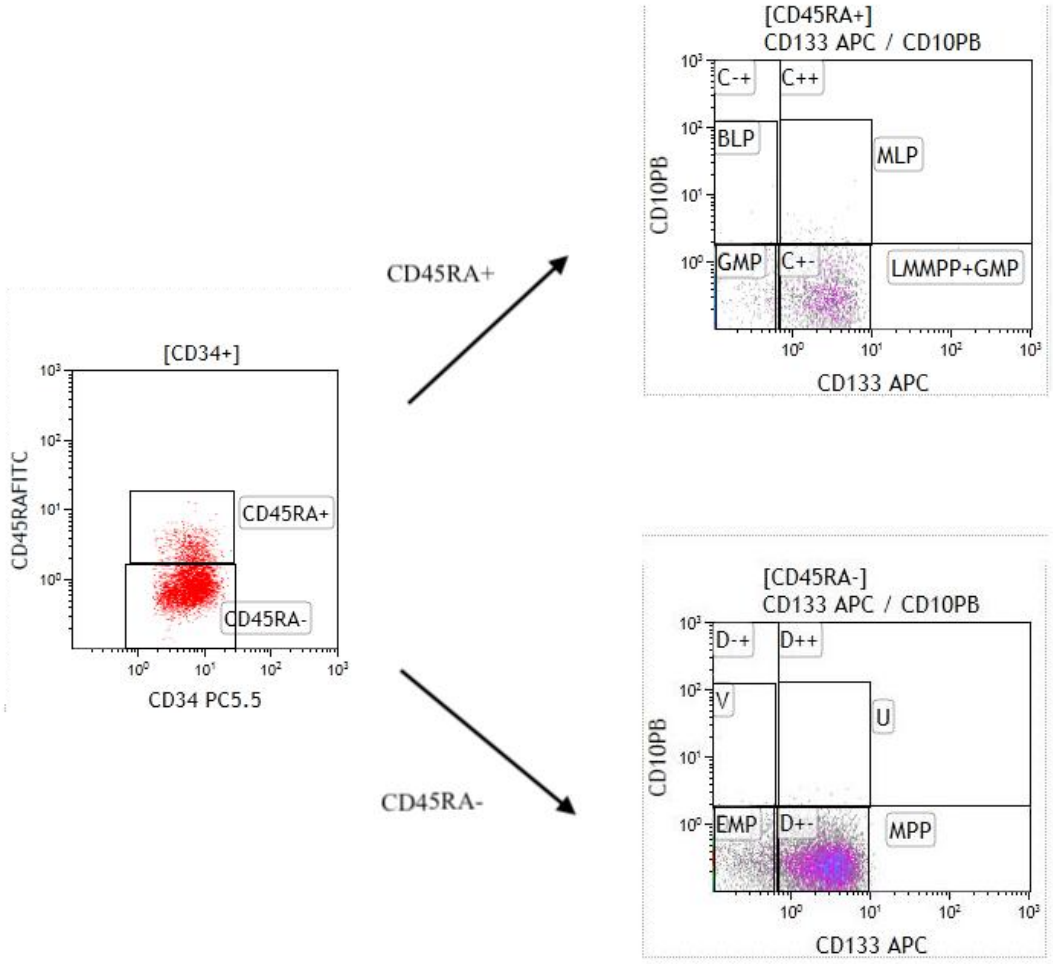
3.2.2.3. Çalışmanın Kurulması

Çalışma tüpleri hazırlandıktan sonra aşağıdaki basamaklar uygulandı;

- Çalışma tüplerine hastanın bilgileri, kurulacak panel ve kullanılacak antikorlar yazıldı. (Her hasta için farklı renk kalem kullanıldı.)
- Antikorlar çalışma tüplerinin en dibine koyulacak şekilde yerleştirilerek dağıtıldı.
- Çalışılacak örnekler tüpün (çeperine ve yerleştirilmiş antikorlara değmeden) en dibine koyularak dağıtıldı. (Hedeflenen her tüpe en az~ $1*10^6$ hücre dağıtılmasıydı.) Sonrasında vorteks cihazında karıştırıldı.
- Antikor ve örnek eklenmiş çalışma tüpleri 15 dk. karanlıkta (oda ısısında) bekletildi.
- Çalışma tüplerine 500µl *optilyse* ilave edildi (amaç olgun eritrositlerin parçalanmasını sağlamaktı) ve vortekslendi.
- Karanlıkta (oda ısısında) 10 dk. bekletildi.
- Yıkama için çalışma tüplerine 500µl *Sheath fluid* ilave edilip, vortekslendi.
- Karanlıkta (oda ısısında) 10 dk. bekletildi.
- Çalışma tüpleri 1070 rpm (250g) da 5 dk santrifüj edildi.
- Tüpler tek hamlede ters döndürülerek (hücre kaybı olmadan) süpernatant atıldı.
- Çalışma tüplerine 1500µl *Sheath fluid* ilave edildi.
- Çalışma tüpleri 1070 rpma' da 5 dk santrifüj edildi.

- Tüpler tek hamlede ters döndürülerek (hücre kaybı olmadan) süpernatant atıldı.
- Çalışma tüplerine 500µl *Sheath fluid* ilave edildi.
- Akım sitometri cihazına ait karuzer (dairesel tüp taşıma tablasına) örnekler okunmak üzere dizildi ve en geç 4 saat içinde veri toplama işlemi tamamlandı (tüm çalışmalarda veriler aynı gün toplandı).

Şekil 3.1. Akım Sitometri Yöntemi



1 milyon hücrede artefakt ayırımı için yapışık hücreler atıldı. CD45 side scatter (SS) da kontrol için lenfosit kapılaması (gate) yapıldı. CD45-CD34 kadran (dot plot) içinde CD34+ parlak hücreler seçildi. Ardından CD34 +/parlak CD45 dim+ hücreler seçildi. Bu hücrelerde CD133 / CD45RA bakıldı. CD133+CD45RA+ hücreler seçildi.

CD34+CD45RA+CD133+ hücrelerde CD10 / CD38 bakıldı. CD10-CD38+ olanlar GMP, CD10-CD38 zayıf + olanlar LMPP, CD10+ CD38+ olanlar MLP olarak tanımlandı.

CD34+CD45dim+ hücrelerde CD133 / CD45RA bakıldı. Bunlar arasında CD133-CD45RA+ hücreler seçildi. Bu hücrelerde CD10 / CD38 bakıldı. CD10- CD38+ olanlar Geç GMP, CD10+CD38+ hücreler BLP olarak tanımlandı.

CD45+ CD34 dim + hücrelerde CD133/ CD45 RA kadrana kondu. CD133+ CD45- hücreler seçildikten sonra CD133 zayıf + hücreler EMP, CD133+ hücreler MPP olarak tanımlandı.

3.2.3. İstatistiksel Yöntemler

Örneklem büyüklüğü için *G power* programı kullanılmış olup, %50 bilinmezlik prevalansı ve en az %80 power'a ulaşılması hedeflenerek en az 24 kişiye ulaşılması hedeflenmiş ve 27 kişiye ulaşılmıştır. İstatistiksel değerlendirme Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 23.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/ Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Verilerin tamamının non-parametrik olarak dağıldığı değerlendirildi. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve maksimum-minimum değerleri (ortanca± min-maks) kullanılarak verildi. Ortanca değeri sıfır saptanan değişkenlerde ortalama ± standart sapma) değerleri de verildi. Normal dağılıma uymadığı saptanan 2 grubun karşılaştırılmasında bağımsız değişkenler için Mann Whitney U testi, 2'den fazla grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi uygulandı ve anlamlı sonuçlar post hoc test olarak Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile 2'li gruplar olarak analiz edildi. Normal dağılmayan sayısal değişkenler arasındaki korelasyon ise Spearman testi ile değerlendirildi. Korelasyon katsayısının 0-0,25 arasında olması zayıf, 0,26-0,50 arasında olması orta, 0,51-0,75 arasında olması güçlü ve 0,76-1,00 arasında olması çok güçlü korelasyon olarak kabul edildi. Sonuçlar %95 güven aralığında, istatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi.

3.3. Hastalar

Çalışmaya Ocak 2018- Haziran 2019 tarihleri arasında AÜTF Hematoloji Bilim Dalı'nda takipli 14'ü (%51,9) kadın ve 13'ü (%48,1) erkek olmak üzere toplam 27 hasta dahil edilmiştir. Hastaların yaş ortancası 53 yıl (dağılım aralığı: 26-68 yıl), vücut ağırlığı ortanca değeri 76 kg (dağılım Aralığı: 52-125 kg) idi. Hastaların 8'inin (%25,9) tanısı lenfoma iken, 19'unun (%70,4) tanısı MM'dir. Hasta özellikleri Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Hasta Özellikleri

	n	(%)*	Toplam n
Cinsiyet			
Kadın	14	51,9	27
Erkek	13	48,1	
Tanı			
Lenfoma	8	25,9	27
Multipl Miyelom	19	70,4	
Lenfoma Alt Tipi			
HL	3	37,5	8
NHL	5	62,5	
Multipl Miyelom Tanı Alt Tipi			
IgA Kappa	2	10,5	19
IgA Lambda	1	5,3	
IgG Kappa	10	52,6	
IgG Lambda	1	5,3	
Kappa hafif zincir	5	26,3	
Lenfoma Evresi			
Erken Evre	2	25	8
İleri Evre	6	75	
Multipl Miyelom Hastalık Evresi			
ISS1	6	31,6	19
ISS2	7	36,8	
ISS3	6	31,6	
Radyoterapi Öyküsü			
Var	4	14,8	27
Yok	23	85,2	
Lenalidomid Kullanımı			
Var	9	33,3	27
Yok	18	66,7	

*Sütun Yüzdesi; n: Hasta sayısı;NHL: Non-Hodgkin Lenfoma; HL: Hodgkin Lenfoma; Ig: İmmünglobulin; ISS :Uluslararası skorlama sistemi;

4. BULGULAR

Her üç yöntemle en az bir transplantasyon için yeterli kök hücre toplanan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. İşlem öncesi pCD34 düzeyleri uygun olan hastalarda aferez sayım işlemine başlandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların ortanca aferez sayısı 2 (dağılım aralığı:1-3) idi. Toplanan kan ürünü özellikleri incelendiğinde; pCD34 düzeyi GCSF grubunda ortanca değeri 88 µl (dağılım aralığı:34-343 µl), KT+G-CSF grubunda 42 µl (dağılım aralığı 21-84 µl), Plerixafor grubunda ise ortanca değer 36 µl (11-139 µl) idi. G-CSF grubu ile Plerixafor grupları arasında istatiksel anlamlı fark görüldü (p=0,027*). Toplam CD34/µl düzeyi; GCSF grubunda ortanca değeri 1877 µl (dağılım aralığı:668-3320 µl), KT+G-CSF grubunda 1472 µl (dağılım aralığı 783-2309µl), Plerixafor grubunda ise ortanca değer 910 µl (dağılım aralığı: 442-1475 µl) idi. G-CSF ve Plerixafor grupları arasında istatistiksel fark saptandı (p=0,015*) Toplanan kök hücre ürünlerinin diğer özellikleri ve tedavi gruplarına göre karşılaştırılması Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Toplanan Kök Hücre Ürünü Özelliklerinin Tedavi Gruplarına Göre Karşılaştırılması

Ürün Özelliği	Tedavi Grubu	n	Miktar	p
pCD34 medyan (min-maks),				
	G-CSF	9	88/µl (34-343)	
	KT+G-CSF	9	42/µl (21-84)	**0,027****
	Plerixafor	9	36/µl (11-139)	
Aferez Sayısı medyan (min-maks),				
	G-CSF	9	1 (1-3)	
	KT+G-CSF	9	2 (1-3)	0,28*
	Plerixafor	9	2 (1-2)	
Toplam Volüm medyan (min-maks),				
	G-CSF	9	600/µl (420-1540)	
	KT+G-CSF	9	1010/µl (445-1825)	0,653*
	Plerixafor	9	780/µl (390-1175)	
Toplam CD34/ µl medyan (min-maks),				
	G-CSF	9	1877/µl (668-3320)	
	KT+G-CSF	9	1472/µl (783-2309)	**0,015****
	Plerixafor	9	910/µl (442-1475)	

*Kruskall Wallis Testi uygulanmıştır. ** Bonferroni düzeltmesi ile Mann Whitney U Testi uygulanmıştır. n: Hasta sayısı; G-CSF: Granülosit koloni sitimule edici faktör; KT: Kemoterapi ; pCD34:periferik CD34;

Aferez işleminden sonra akım sitometri yöntemiyle CD34 ve alt grupları analiz edildi. Mobilizasyon rejim tiplerine göre CD34/µl (mutlak) değerleri; G-CSF grubu ortancası 1056µl (dağılım aralığı:116,75-2731,32 µl), KT+G-CSF grubu ortancası 850,04µl (dağılım aralığı:357,86-1818,70 µl) ve Plerixafor grubu ortancası 471,58 µl (168,84-1357,38 µl) idi. 3 grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,254). Hastaların mobilizasyon gruplarına göre CD34 alt tiplerinin karşılaştırılmaları Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. CD34 ve Alt Gruplarının Mobilizasyon Yöntemine Göre Karşılaştırılması

Hücre Tipi	Tedavi Grubu	n	Kan Ürünü Düzeyi	p*
Total CD34/ µl medyan (min-maks) / ort±SD ,				
	G-CSF	9	1056,73/µl (116,75-2731,32) / 1180,6±264,6	
	KT+G-CSF	9	850,04/µl (357,86-1818,70) / 933,4±163,5	0,254
	Plerixafor	9	471,58/µl (168,84-1357,38) / 666,2±145,8	
Total MPP/ µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	535,89/µl (0-935,41) / 488,4±105,5	
	KT+G-CSF	9	395,85/µl (0-1256,82) / 458,1±122,4	0,555
	Plerixafor	9	224,98/µl (0-864,52) / 325,89±105,9	
Total LMPP/ µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	48,70/µl (0-116,93) / 50,5±14,9	
	KT+G-CSF	9	18,91/µl (0-40,48) / 21,2±4,35	0,346
	Plerixafor	9	21,10/µl (9,96-,63,70) / 28,7±6,4	
Total EMP / µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	154,98/µl (0-285,99) / 122,18±36,78	
	KT+G-CSF	9	70,68/µl (0-228,85) / 88,55±27,5	0,287
	Plerixafor	9	50,06/µl (0-144,09) / 48,1±14,86	
Total GMP/ µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	97,41/µl (11,68-694,42) / 182,1±72,7	
	KT+G-CSF	9	132,38/µl (29,82-450,98) / 173,4±43,5	0,588
	Plerixafor	9	81,81/µl (33,38-410,37) / 126±38	
Total geç GMP/ µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	0/µl (0-779,33) / 218,4±100,6	
	KT+G-CSF	9	0/µl (0-36,35) / 11,65±5,83	0,359
	Plerixafor	9	33,37/µl (0-86,45) / 30,83±10,88	
Total MLP/ µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	0/µl (0-73,06) / 18,5±9,5	
	KT+G-CSF	9	0/µl (0-45,52) / 8,35±5,1	0,717
	Plerixafor	9	0/µl (0-95,56) / 19±10,4	
Total BLP/ µl medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	0/µl (0-10,36) / 1,15±1,15	
	KT+G-CSF	9	0/µl (0-0) / 0	0,368
	Plerixafor	9	0/µl (0-0) / 0	

*Kruskall Wallis Testi uygulanmıştır. n: Hasta sayısı; G-CSF: Granülosit koloni stimule edici faktör; KT: Kemoterapi ; SD: standart sapma ; Ort: Ortalama

Hastaların mobilizasyon gruplarına göre akım sitometride canlı lökositler içindeki CD34+ hücre oranları karşılaştırıldığında G-CSF grubu ortanca değeri %0,76 (dağılım aralığı: %0,10-%1,68) ve KT+G-CSF grubu ortanca değeri %0,72 (dağılım aralığı: %0,2-%2,80) ve Plerixafor grubu ortanca değeri %0,25 (dağılım aralığı: %0,9-%0,97) idi. 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,275). CD34+ hücreler içinde alt grupların % değerleri 3 grup arasında karşılaştırıldı, istatiksel fark görülmedi. Bu veriler Tablo 4.3'te sunulmuştur.

Tablo 4.3. Mobilizasyon Gruplarına Göre CD34+ Hücrelerde Alt Tiplerin Karşılaştırılması

Hücre Tipi	Tedavi Grubu	n	Kan Ürünü Yüzdesi	p*
BK/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD				
	G-CSF	9	%0,76 (0,10-1,68) / %0,74±0,17	
	KT+G-CSF	9	%0,72 (0,20-2,80) / %0,86±0,26	0,275
	Plerixafor	9	%0,25 (0,9-0,97) / %0,42±0,1	
MPP/ CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%50 (0-59,52) / %41,2±6,86	
	KT+G-CSF	9	%46,03 (0-70,18) / %43,9±7	0,798
	Plerixafor	9	%46,5 (0-,70) / %37,92±9,3	
LMPP/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%2,38 (0-10,67) / %3,67±1,1	
	KT+G-CSF	9	%2,24 (0-4,76) / %2,4±0,52	0,302
	Plerixafor	9	%4,54 (1,16-18,18) / %6,55±1,96	
EMP/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%10 (0-28) / %10,69±3,2	
	KT+G-CSF	9	%10 (0-20,63) / %9,59±2,65	0,662
	Plerixafor	9	%7,40 (0-15,79) / %6,9±1,9	
GMP/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%10,81 (4,76-51,54) / %14,4±4,7	
	KT+G-CSF	9	%21,87 (8,33-25,25) / %17,8±2,3	0,128
	Plerixafor	9	%18,18 (10,53-37,50) / %19,3±2,9	
Geç GMP/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%0 (0-51,61) / %12,9±6,3	
	KT+G-CSF	9	%0 (0-3,51) / %0,97±0,49	0,339
	Plerixafor	9	%3,48 (0-13,64) / %4,39±1,69	
MLP/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%0 (0-48,84) / %1,26±0,67	
	KT+G-CSF	9	%0 (0-11,76) / %1,86±1,3	0,826
	Plerixafor	9	%0 (0-27,27) / %4,2±2,94	
BLP/CD34% medyan (min-maks) / ort±SD,				
	G-CSF	9	%0 (0-0,77) / %0,08±0,08	
	KT+G-CSF	9	%0 (0-0) / %0	0,368
	Plerixafor	9	%0 (0-0) / %0	

*Kruskall Wallis Testi uygulanmıştır. n: Hasta sayısı ; SD: standart sapma ;BK: Beyaz Küre; KT:Kemoterapi ; Ort: Ortalama

4.1. Mobilizasyon Rejimlerinin Engraftman Kinetiklerine Etkisi

Çalışmaya dahil edilen hastaların toplamda 22'sine (%81,5) OPKHN yapılmıştır. Planlanan OPKHN 5 (%18,5) hastada yapılamamıştır. Bu 5 hastadan 2'si nakil yapılamadan ex olmuştur,1 hasta başarılı toplama sonrasında polikinlik takiplerine gelmediğinden nakil olamamış, 2 hastada ise planlanan nakil henüz gerçekleşmemiştir. OPKHN yapılan hastaların tedavi gruplarına göre dağılımı Tablo 4.4'te sunulmaktadır.

Tablo 4.4. OPKHN Yapılan Hastaların Tedavi Gruplarına Göre Dağılımı

	n	(%)*	Toplam n
G-CSF	7	31,8	
KT+G-CSF	8	36,4	22
Plerixafor	7	31,8	

*Sütun Yüzdesi; n: Hasta sayısı; G-CSF: Granülosit koloni sitimüle edici faktör; KT: Kemoterapi;

Hastaların OPKHN'de verilen CD34+hücrex10^6/kg ve CD34 alt grubu x10^6/kg değerleri 3 tedavi grubunda karşılaştırıldı. Verilen CD34+hücre x10^6/kg değerleri; GCSF grubu ortancası 5,45 x10^6/kg (dağılım aralığı: 3,89- 8,37 x10^6/kg), KT - GCSF grubu ortancası 5,24 x10^6/kg (dağılım aralığı: 4,32 - 7,49) ve Plerixafor grubunun ortancası ise 4,4 x10^6/kg (dağılım aralığı: 3,59 -6,20 x10^6/kg) idi. 3grup arasında istatiksel fark bulunmadı (p=0,193). CD34 ve alt tiplerinin OPKHN 'de verilen hücre x10^6/kg değerleri mobilizasyon gruplarına göre karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel fark yoktur. Bu veriler Tablo 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.5. Mobilizasyon Gruplarına Göre Verilen Kök hücre Alt Tiplerinin Karşılaştırılması

Hücre Tipi	Tedavi Grubu	n	Kan Ürünü Düzeyi	p*
Verilen CD34 medyan (min-maks) / ort±SD				
	G-CSF	7	5,45 x10⁶/kg (3,89-8,37) / 5,81±0,6	
	KT+G-CSF	8	5,24 x10⁶/kg (4,32-7,49) / 5,39±0,36	0,193
	Plerixafor	7	4,4 x10⁶/kg (3,59-6,20) / 4,68±0,32	
Verilen MPP medyan (min-maks)/ort±SD				
	G-CSF	7	2,98 x10⁶/kg (0,46-5,19) / 3,19±0,59	
	KT+G-CSF	8	2,48 x10⁶ /kg (0-9,45) / 3,25±1	0,782
	Plerixafor	7	4,52 x10⁶ /kg (0-5,74) / 3,57±0,91	
Verilen LMPP medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	0,22 x10⁶ /kg (0-0,65) / 0,11±0,06	
	KT+G-CSF	8	0,14/ x10⁶ kg (0-0,27) / 0,08±0,05	0,306
	Plerixafor	7	0,14 x10⁶ /kg (0,12-0,44) / 0,15±0,9	
Verilen GMP medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	0,49 x10⁶ /kg (0,09-4,17) / 1,05±0,53	
	KT+G-CSF	8	0,93 x10⁶ /kg (0,34-3,39) / 1,42±0,4	0,457
	Plerixafor	7	0,93 x10⁶ /kg (0,43-3,73) / 1,29±0,4	
Verilen EMP medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	0,76 x10⁶ /kg (0,06-1,74) / 0,79±0,27	
	KT+G-CSF	8	0,55 x10⁶ /kg (0-1,88) / 0,7±0,25	0,766
	Plerixafor	7	0,5 x10⁶ /kg (0-0,94) / 0,43±0,12	
Verilen Late GMP medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	0 x10⁶/kg (0-3,66) / 1±0,59	
	KT+G-CSF	8	0 x10⁶/kg (0-0,35) / 0,07±0,05	0,274
	Plerixafor	7	0,37 x10⁶ /kg (0-0,56) / 0,15±0,09	
Verilen MLP medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	0 x10⁶/kg (0-0,37) / 0,11±0,6	
	KT+G-CSF	8	0 x10⁶/kg (0-0,44) / 0,08±0,05	0,914
	Plerixafor	7	0 x10⁶/kg (0-0,66) / 0,15±0,09	
Verilen BLP medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	0 x10⁶/kg (0-0,06) / 0,009±0,009	
	KT+G-CSF	8	0 x10⁶/kg (0-0) / 0	0,343
	Plerixafor	7	0 x10⁶/kg (0-0) / 0	

*Kruskall Wallis Testi uygulanmıştır. n: Hasta sayısı; G-CSF: Granülosit koloni stimule edici faktör; KT: Kemoterapi; Ort: Ortalama; SD : Standart Sapma

Hastaların mobilizasyon rejim tiplerine göre engrafiman süreleri değerlendirildi. Nötrofil engraftman günü; G-CSF grubu ortanca değeri 11 gün (dağılım aralığı: 9-12 gün), KT+G-CSF grubu ortanca değeri 11 gün (dağılım aralığı:11-22 gün) ve Plerixafor grubunun ortanca değeri 12 gün (dağılım aralığı:10-18 gün) olup aralarında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p=0,178). Engraftman günlerinin mobilizasyon gruplarına göre karşılaştırılması Tablo 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Mobilizasyon Gruplarına Göre Nötrofil ve Trombosit Engraftman Günlerinin Karşılaştırması

Engraftman Hücre Tipi	Tedavi Grubu	n	Gün	p*
Nötrofil 500 medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	11 (9-12) / 10,7±0,35	
	KT+G-CSF	8	11 (11-22)/ 12,87±1,35	0,178
	Plerixafor	7	12 (10-18)/ 12,42±0,99	
Trombosit 20 medyan (min-maks),				
	G-CSF	7	14 (11-15)/13,14±0,59	
	KT+G-CSF	8	11 (10-41)/16,87±4,05	0,619
	Plerixafor	7	13 (8-18)/13±1,15	

*Kruskall Wallis Testi uygulanmıştır. n: Hasta sayısı Ort: Ortalama; SD: Standart Sapma; KT: Kemoterapi G-CSF: Granülosit koloni stimule edici faktör;

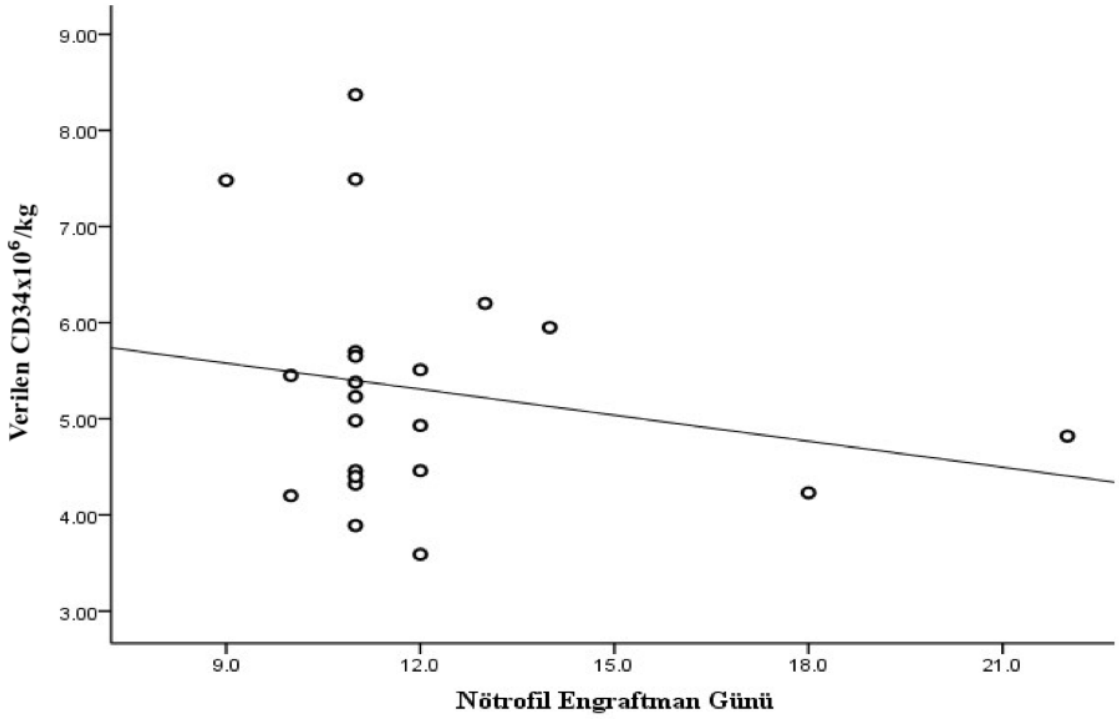
OPKHN yapılan toplam 22 hastada, nötrofil engraftman günü ile verilen CD34 x10^6/kg, verilen MPP x10^6/kg, verilen LMPP x10^6/kg, verilen GMP x10^6/kg ve verilen geç GMP x10^6/kg hücre düzeyleri arasındaki korelasyon incelendiğinde; nötrofil engraftman günü ile karşılaştırılan parametreler arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Bu veriler Tablo 4.7'de sunulmuştur. Nötrofil engraftman günü ile; verilen CD34 x10^6/kg hücre düzeyi korelasyon grafiği Şekil 4.1'de, verilen MPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu Şekil 4.2'de, verilen LMPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu Şekil 4.3'de, verilen GMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyon grafiği Şekil 4.4'te ve verilen Geç GMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyon grafiği Şekil 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.7. Verilen CD34 ve Alt Gruplarının Nötrofil Engrafmanı İle İlişkisi

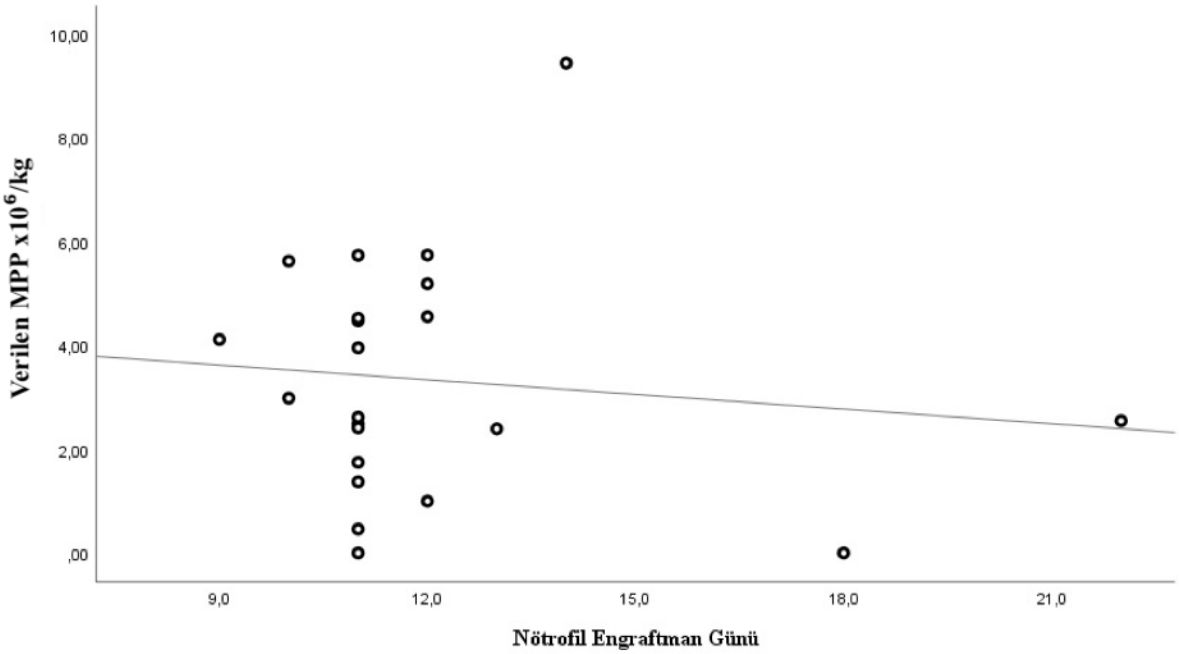
	Verilen Kök Hücre Alt Tipi				
Engraftman Günü	**Verilen CD34 x10⁶/kg N=22**	**Verilen MPP x10⁶/kg N=22**	**Verilen LMPP x10⁶/kg N=22**	**Verilen GMP x10⁶/kg N=22**	**Verilen Geç GMP x10⁶/kg N=22**
Nötrofil 500	R=-0,120	R=-0,044	R=-0,098	R=-0,174	R=-0,300
	p=0,596	p=0,847	p=0,666	p=0,439	p=0,176

*Spearman Korelasyon Testi Uygulanmıştır. n: Hasta sayısı. R: Korelasyon katsayısı; Kg: Kilogram;

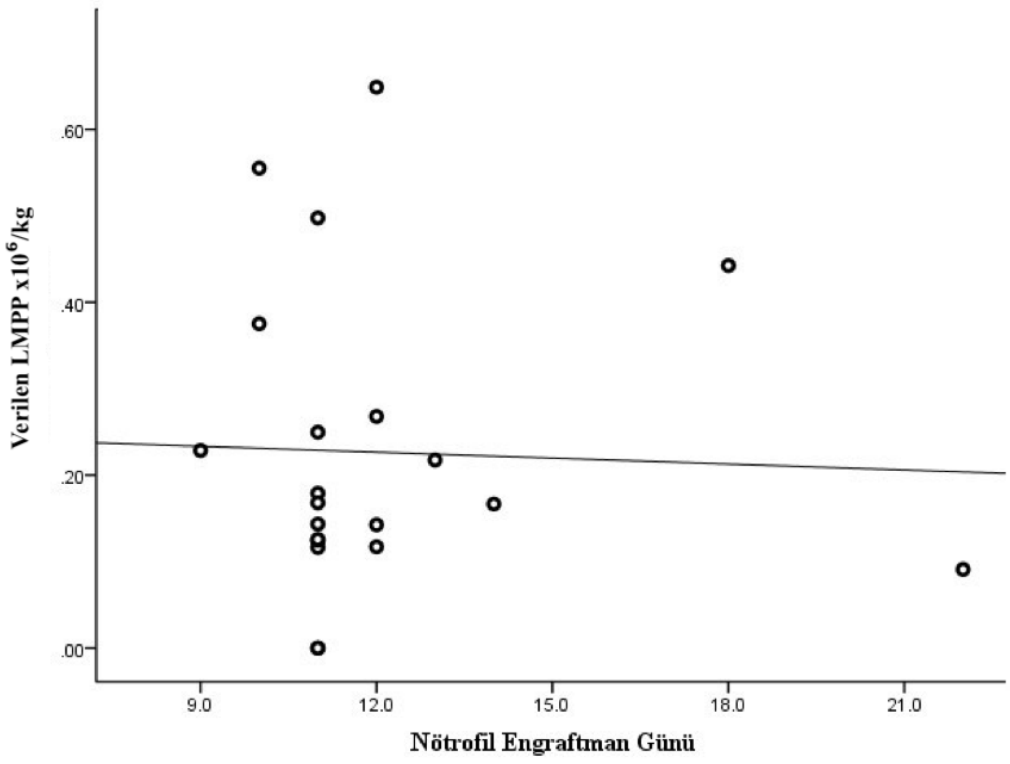
Şekil 4.1. Nötrofil engraftman günü ile verilen CD34x10⁶/kg hücre düzeyi korelasyonu



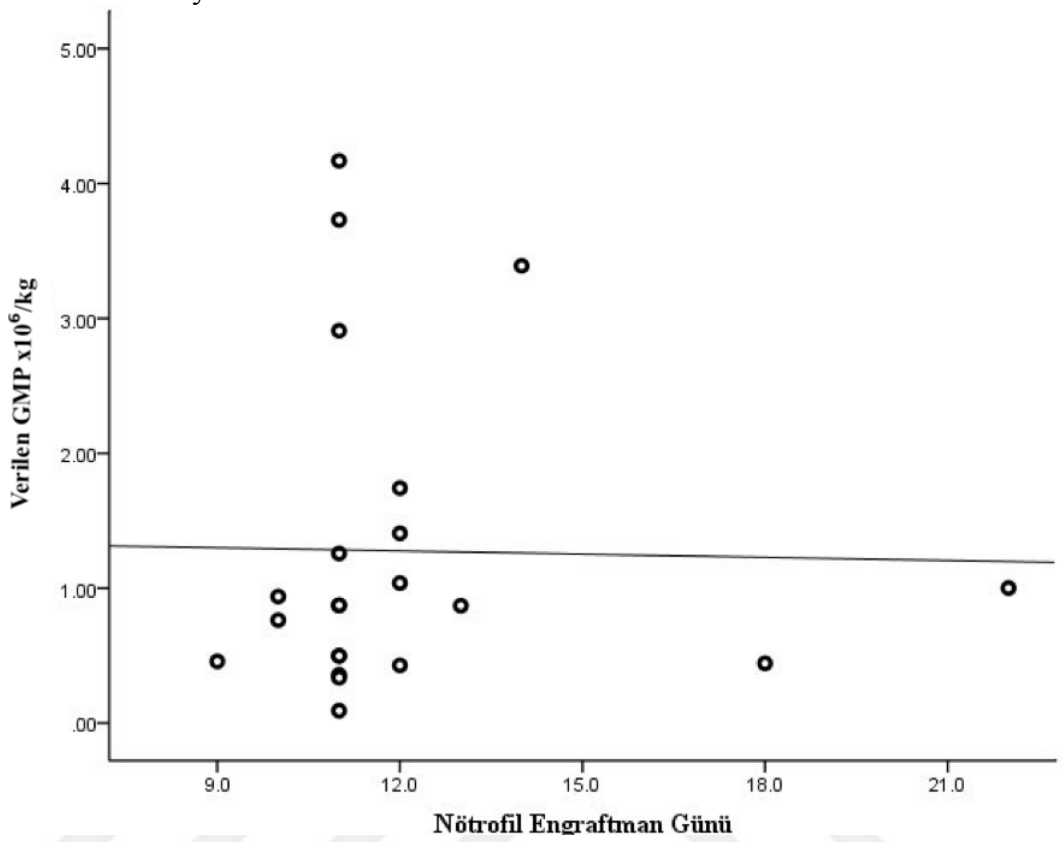
Şekil 4.2. Nötrofil engraftman günü ile verilen MPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu



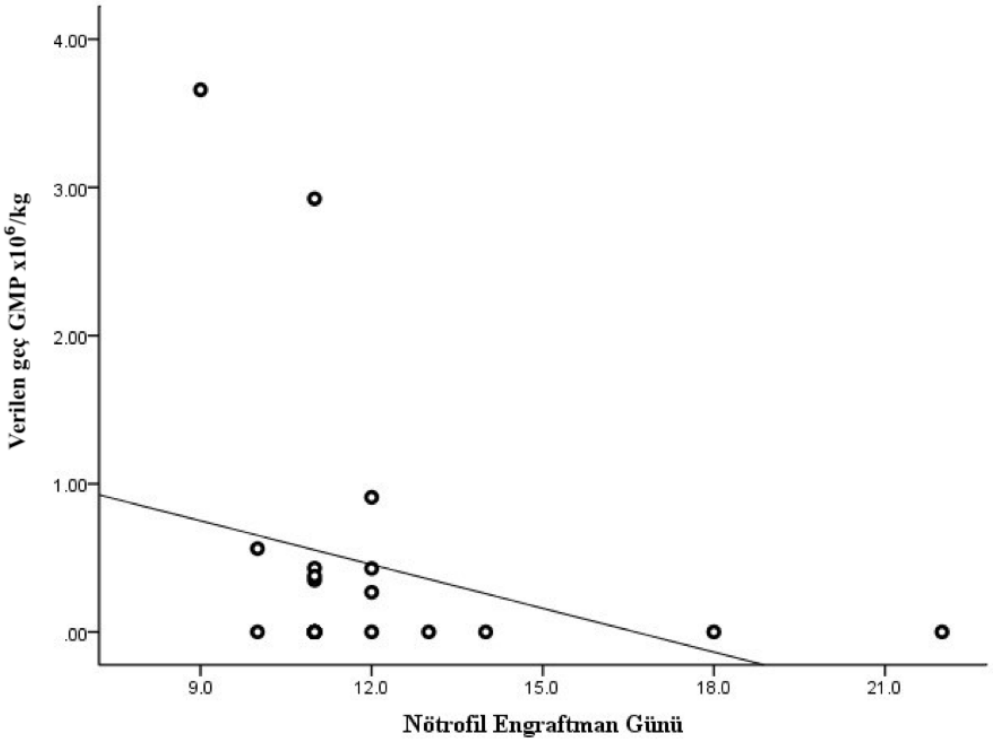
Şekil 4.3. Nötrofil engraftman günü ile verilen LMPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu



Şekil 4.4. Nötrofil engraftman günü ile verilen GMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu



Şekil 4.5. Nötrofil engraftman günü ile verilen geç GMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu



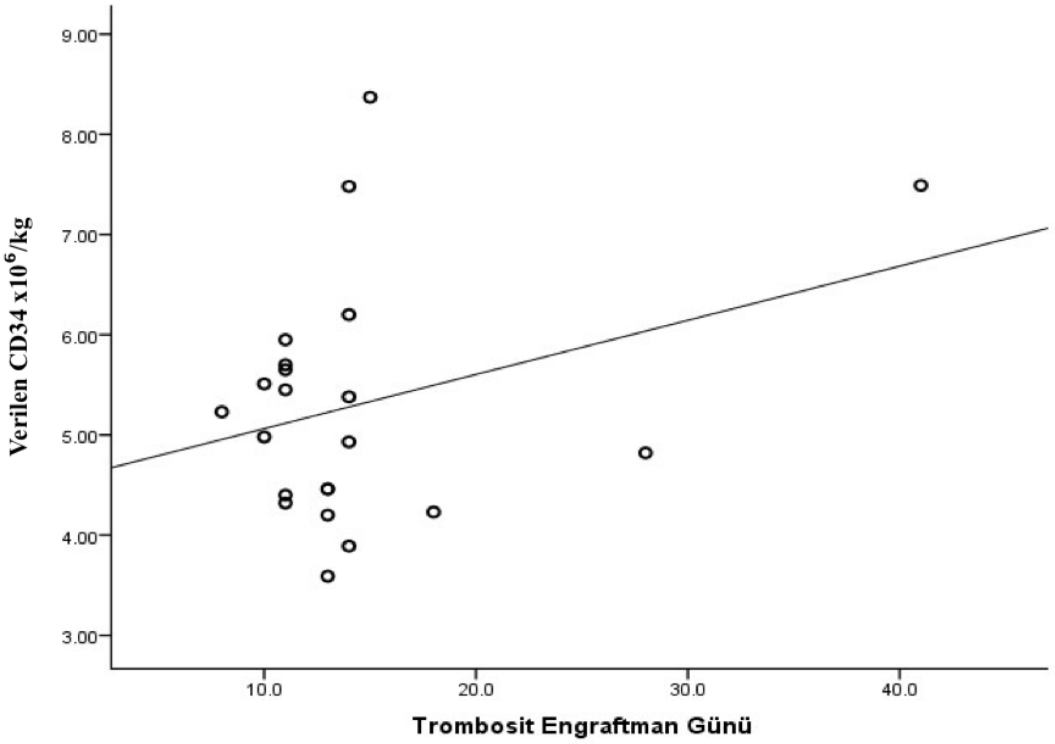
OPKHN yapılan 22 hastada, trombosit engraftman günü ile verilen CD34 x10^6/kg hücre düzeyi, verilen MPPx10^6/kg hücre düzeyi ve verilen EMPx10^6/kg hücre düzeyleri arasındaki korelasyon incelendiğinde; trombosit engraftman günü ile karşılaştırılan parametreler arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. Bulgular Tablo 4.8'de, trombosit engrafmanı günü ile; verilen CD34 x10^6/kg hücre düzeyi korelasyon grafiği Şekil 4.6'da, verilen MPP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyon grafiği Şekil 4.7'de, verilen EMP x10^6/kg hücre düzeyi korelasyon grafiği ise Şekil 4.8'de sunulmuştur.

Tablo 4.8. Verilen CD34 ve Alt Gruplarının Trombosit Engraftmanı İle İlişkisi

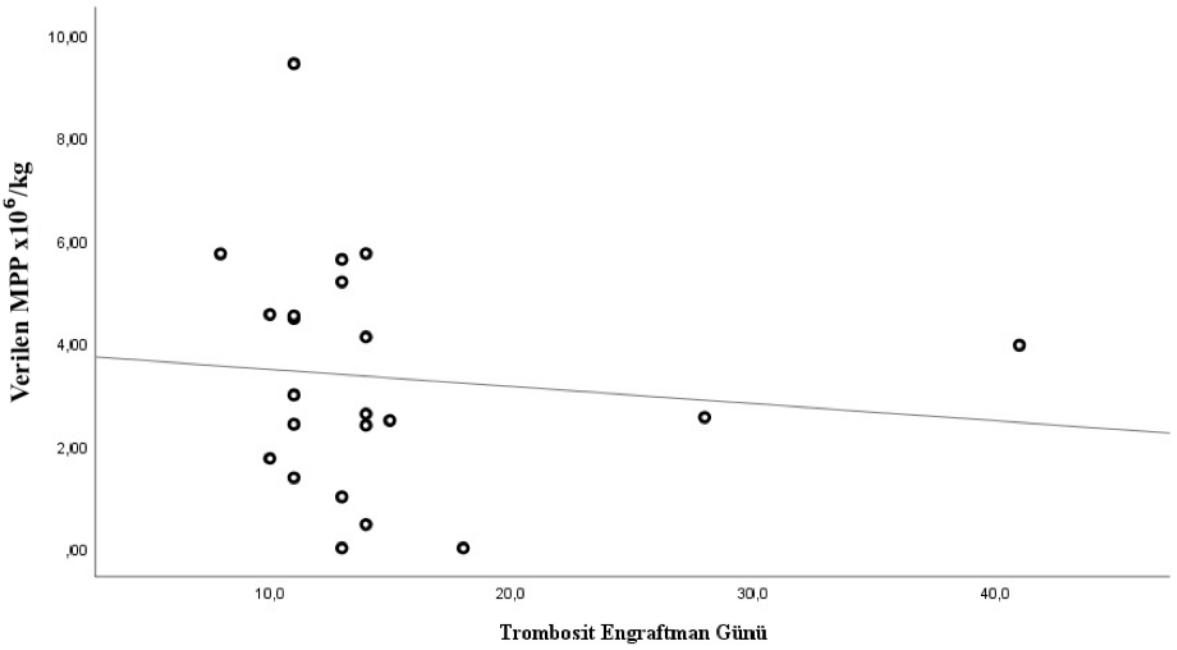
	Verilen Kan Ürünü		
Engraftman Günü	**Verilen CD 34 x10^6/kg N=22**	**Verilen MPP x10^6/kg N=22**	**Verilen EMP x10^6/kg N=22**
Trombosit 20	R=0,061	R=-0,280	R=-0,229
	p=0,787	p=0,207	p=0,306

*Spearman Korelasyon Testi Uygulanmıştır. n: Hasta sayısı. R: Korelasyon katsayısı

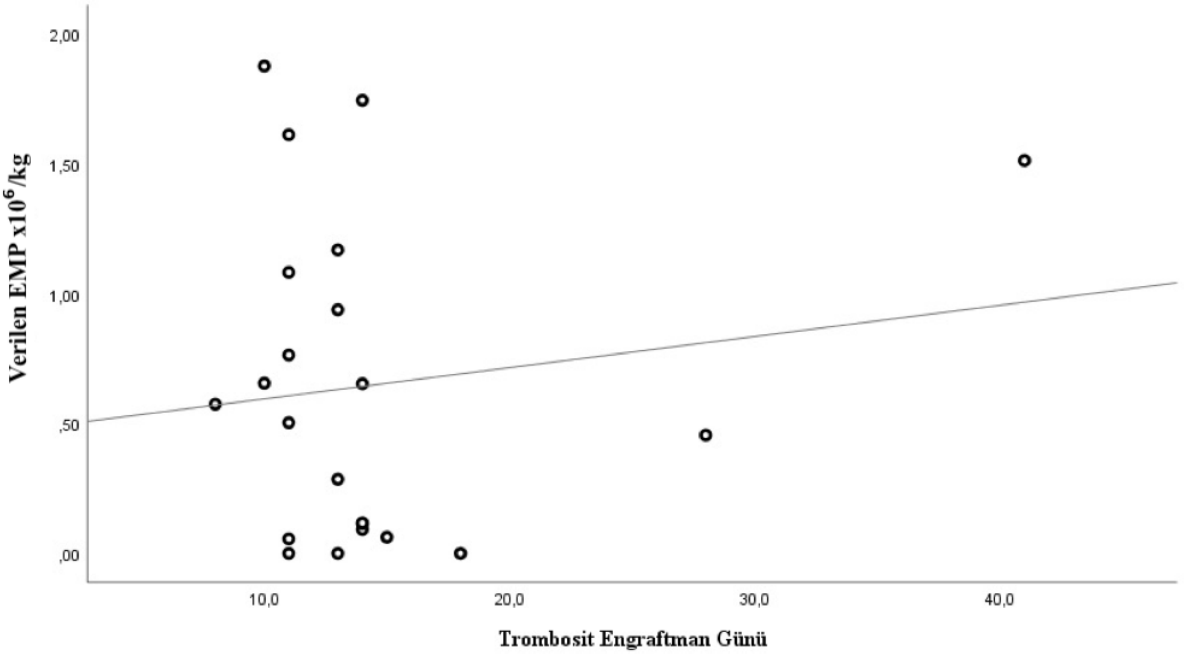
Şekil 4.6. Trombosit engraftman günü ile verilen CD34 x10^6/kg hücre düzeyi korelasyonu



Şekil 4.7. Trombosit engraftman günü ile verilen MPP x10⁶/kg hücre düzeyi korelasyonu



Şekil 4.8. Trombosit engraftman günü ile verilen EMP x10⁶/kg hücre düzeyi korelasyonu



TARTIŞMA

Literatürde daha önce yapılan az sayıda çalışmada, farklı mobilizasyon rejimleriyle mobilize edilen CD34 alt grupları tanımlanmıştır [84, 112]. Fruehauf ve arkadaşları MM ve NHL hastalarında G (G-CSF) stimülasyonuna kıyasla GP (G-CSF+Plerixafor) sonrasında CD34+CD38- progenitör hücrelerin daha yüksek olduğunu göstermiştir [84]. CD34+ hücreler üzerindeki zayıf CD38 ekspresyonunun, CD34 farklılaşmasının erken aşaması ile korele olduğu uzun yıllardır bilindiği için, araştırmacılar, plerixaforun tek başına G-CSF kullanımına kıyasla daha primitif progenitörleri harekete geçirdiği sonucuna varmıştır [106]. Daha sonra Taubert ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile MM hastalarında Plerixafor grubunda CD34+CD38– primitif hücre grubunun daha fazla oluştuğu sonucu desteklenmiştir [107]. Ancak bu çalışmalarının hiç birinde kapılama (gating) yöntemleri tanımlanmamıştır ("CD38dim", "CD38 düşük" veya "CD38 negatif" olması). Görgen ve arkadaşlarının 2013'te yaptığı çalışmalarda hematopoez modeli revize edildi [3]. Ardından 2016 'da Dmytrus ve arkadaşları yeni hematopoez modelinde tanımlanan yüzey işaretleyicilerini kullanarak, 3 farklı kök hücre kaynağında (periferik kan, donör kemik iliği ve kemik iliği nakli sonrası 1. yıl kemik iliği) CD34 alt gruplarını karşılaştırdılar [4]. Biz de çalışmamızda bu verilere dayanarak çok renkli tek platformlu akım sitometri yöntemi ile 7 farklı CD34 alt grubunu analiz ettik. MM ve lenfoma tanılı toplam 27 hastada 3 farklı mobilizasyon yönteminin (yalnız G-CSF, G-CSF+KT, Plerixafor grupları) CD34 alt gruplarına etkisini değerlendirdik. Ve ardından OPKHN gerçekleştirilen 22 hastada, analiz edilen CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisini inceledik.

Dmytrus ve arkadaşlarının yaptığı 3 farklı kök hücre kaynağında CD34 alt grup analizinde, periferik kan kök hücre kaynağı grubunda daha matür CD34 alt gruplarının (geç GMP, MLP, BLP) anlamlı olarak düşük saptandığı, daha primitif olan MPP alt grubunun ve ek olarak EMP 'nin ise daha yüksek olduğu görüldü [4]. Mobilize edilmiş periferik kan kaynaklı kök hücre ürünlerinde yaptığımız çalışmamızda da matür CD34 (geç GMP, MLP, BLP) alt gruplarının ortanca değerleri bu sonuçları destekler nitelikte oldukça düşük saptandığı görüldü. Bu sonuçlar doğrultusunda daha primitif alt grupların mobilizasyonda stimülasyona daha iyi yanıt verdiği söylenebilir. Yine Fristch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada B lenfosit prekürsörlerinin periferik kök

hücre kaynağı grubunda oldukça az, miyeloid progenitörlerin ise daha yüksek saptandığı gösterilmişti [108]. Çalışmamızda da en az saptanan alt tipler BLP (sadece 1 hastada) ve MLP olup bu sonuç literatür verilerini desteklemektedir.

Çalışmamızda, 3 farklı mobilizasyon yöntemi ile CD34 alt grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda plerixaforun daha primitif hücreleri artırdığına dair veriler kabul görse de 2017 'de Worel ve arkadaşlarının yaptığı, çalışmamızla benzer dizayn da olan araştırmada GCSF±KT(G) ve Plerixafor (GP) gruplarında CD34 alt grupları karşılaştırıldığında, GP grubunda daha matür alt grupların artış gösterdiği saptandı. Çalışmada primitif MPP alt grubu ve EMP, G grubunda anlamlı yüksek iken halen MPP gibi CD133 ifade eden eden ancak CD45RA + hücre grubu olan 'LMPP' nin (B-lenfosit ve nötrofil – monosit öncülü) ise rölatif değeri GP grubunda anlamlı yüksek iken, mutlak LMPP değerleri 2 grup arasında benzer görüldü. Daha matür gruplar (MLP / BLP) çok düşük oranda saptanmakla birlikte GP grubunda anlamlı yüksek saptandı [109]. Çalışmamızda MPP ve EMP'nin yalnız G-CSF grubunda, LMPP rölatif değerinin ve Geç GMP'nin Plerixafor grubunda Worel ve ark.larının çalışmasındaki [109] gibi yüksek olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). MLP ve BLP alt grupları analizimizde benzer şekilde çok nadir görüldü (ortanca değerleri:0). Sonuçlara bakıldığında gruplar arasında benzer dağılım görülse de çalışmamızda 3 grup arasında istatistiksel fark görülmedi. Vaka sayımızın daha az olması bu sonuca neden olabilir ancak sonuçların gelecekte daha homojen ve büyük vaka gruplarıyla yapılacak çalışmaların analizleriyle desteklenmesi gerekmektedir.

Genel olarak kabul gören görüş; OPKHN'de bir transplantasyon için en az $2 x10^6$/kg CD34 + hücre, optimum $5x10^6$/kg CD34+ hücre toplanmasıdır. Daha önce yapılan çalışmalara dayanarak verilen yüksek CD34+hücre düzeyleri; hematopoetik toparlanma (özellikle trombosit engrafmanı), uzun sağkalım, düşük bakım maliyetleri ile ilişkili bulunmuştur [110-112]. Yine literatürde bu verilerle tutarsız görülen 2011'de Stiff ve arkadaşlarının yaptığı G-CSF veya G-CSF + Plerixafor ile mobilize olan MM/NHL hasta grubunda verilen CD34+ (gruplar: 2-4x 10^6/kg, 4-6x10^6/kg ve 6> x10^6/kg) hücre miktarı ile nötrofil ve trombosit engrafman günleri arasında anlamlı fark saptanmamış ancak uzun dönem trombosit düzeylerinde korelasyon

görülmüştür. Çalışmamızda verilen CD34 hücre miktarı ile (G-CSF ortanca: 5,45, KT-GCSF ortanca:5,24 plerixafor ortanca:4.4 x10^6/kg) nötrofil ve trombosit engrafmanları arasında anlamlı korelasyon görülmedi. Bu sonuç ön planda; genel popülasyona verilen CD34 + hücre miktarının optimum düzeyde ve benzer dağılıma sahip olmasına bağlandı.

Desikan ve arkadaşlarının 44 MM tanılı hastada yaptığı çalışmada GCSF+ KT ve yalnız G-CSF ile mobilize gruplar arasında engrafman kinetiğinde anlamlı fark saptanmamıştı [113]. Yine Varmavua ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KT+GCSF ve Plerixafor grupları arasında çalışmamızı destekler nitelikte nötrofil ve trombosit engrafman kinetiklerinde anlamlı fark saptanmamış [114]. Alexander ve arkadaşlarının 2011 de yaptığı G- CSF, G-CSF + P, G-CSF/GM-CSF+KT grupları arasında verilen CD34+/kg hücre sayısında anlamlı farklılık saptanmadan, G+P grubunda nötrofil engrafman günü daha geç (ortanca nötrofil engrafmanı G+P:13 gün / diğer:12 gün $p<0,05$) trombosit engrafmanında gruplar arası anlamlı farklılık görülmemiştir [115]. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalarda engrafman kinetiğine etki eden çoklu faktörler nedeniyle farklı sonuçlar olmakla birlikte; çalışmamızda 3 farklı mobilizasyon grubunda nötrofil ve engrafman kinetiğinde anlamlı farklılık saptanmadı (yalnız G-CSF/ GCSF+ KT: nötrofil engrafman günü ortancası:11, plerixafor:12 gün $p=0,178$ / trombosit engrafman günü ortancası G-CSF: 14 G-CSF+KT:11 Plerixafor:13 gün $p=0,619$).

Literatürde daha önce birçok çalışmada kemik iliği nakline kıyasla, periferik kan kök hücre infüzyonu ile daha hızlı engrafman gerçekleştiği gösterilmiştir [116, 117]. Dymutrus ve arkadaşları; periferik kan kök hücre greftinde daha primitif CD34 alt gruplarının (MPP ve LMPP) ve EMP'nin (eritrosit – megakaryosit öncülü) ön planda olması nedeniyle daha hızlı engrafmanın sağlandığını öne sürdüler [4]. Ancak çalışmamızda mobilizasyon yöntemlerinden bağımsız olarak daha önce tanımlanan nötrofil öncülü CD34 alt grupları (MPP, LMPP, GMP, geç GMP) ile nötrofil engrafman günü arasında ilişki gözlenmedi. Yine daha önce tanımlanan megakaryosit öncülleri (MPP, EMP) ile trombosit engrafman günü arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Literatürde CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisini inceleyen çok az çalışma mevcuttur. Çalışmamız yeni tanımlanmış olan hematopoez

modelindeki CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisini inceleyen ilk çalışmadır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda farklı mobilizasyon yöntemleri ile alt grup analizleri yapılmıştır. Ancak çalışmamızda literatürden farklı olarak mobilizasyon yönteminden bağımsız olarak, CD34 alt gruplarının engrafman ile ilişkisi değerlendirildi.

Roug AS ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada G-CSF+P grubunda G grubuna kıyasla CD34+CD38- primitif hücre grubu daha yüksek oranda saptanmış olmasına rağmen nötrofil engrafman günü 2 grup arasında benzer ancak trombosit engrafmanı G grubunda daha hızlı gerçekleşmiştir. Bu sonuç G grubunda yüksek saptanan ALDH+ (parlak) hücre ile korele görülmüştür [118]. Çalışmamızda ALDH+ hücre analizi yapılmamıştır. Gelecekte yapılan çalışmalarda analizlere dahil edilmesi faydalı olacaktır.

Varmavua ve arkadaşlarının yaptığı 22 MM tanılı hastada plerixafor grubunda G-CSF+KT grubu ile karşılaştırıldığında daha primitif hücrelerin (CD34+ CD133+CD38–) fazla olduğu gözlendi. Ayrıca NK hücreleri (CD3- CD16/CD56+) ve T hücre ve alt tipleri (CD3+ /CD3+CD4+/ CD3+CD8+) daha yüksek saptandı. Çalışmada nötrofil ve trombosit engrafman zamanı iki grupta da çalışmamız sonucunu destekler nitelikte benzer olup, 6.ay lökosit ve nötrofil düzeyleri plerixafor grubunda daha yüksek görüldü [119]. Çalışmamızda hastaların nakil sonrası uzun dönem takipleri ve NK, T lenfosit alt grup analizleri yapılmadı, gelecekte yapılacak çalışmaların sonuçlarıyla CD34 alt gruplarının uzun dönem takiplerle hematolojik ve immünolojik iyileşmeye katkısı desteklenmelidir.

Kamel AM ve arkadaşları; periferik allojenik kök hücre nakli yapılan vakalarda CD34 alt gruplarının engrafman analizinde sperman testi sonrası anlamlı fark çıkan gruplarda ROC analizi (receiver operator characteristic curve) yaparak prediktif eşik değerler saptamışlardır [120]. Çalışmamızda alt gruplarla engrafman kinetiğinde anlamlı ilişki saptanmadığı için ROC analizi yapılmamıştır.

Çalışmamızın önemli kısıtlayıcı özellikleri; hasta grubunun heterojen olması ve vaka sayısının az olmasıdır. Bu sonuçlar gelecekte yapılacak daha büyük vaka gruplarıyla doğrulanmalıdır. Çalışmamızda sadece mobilizasyon başarısızılığı ya da yetersizliği olan hastalarda plerixafor uygulanmış olup iyi mobilizer hasta grubunda plerixafor etkisi değerlendirilememiştir. Bu nedenle, sonuçlarımızda diğer iki gruba kıyasla Plerixafor grubunda MPP, EMP'nin daha düşük, daha matür 'geç GMP' CD34 alt grubunun daha yüksek saptandığı görülse de bulgularımız yetersiz kemik iliği rezervi veya işlevi nedeniyle etkilenmiş olabilir ve istatiksel anlamlı fark çıkmamış olabilir. Aynı nedenle engrafman kinetiğinin de etkilenmiş olabileceği düşünüldü.

Ek olarak, greft kompozisyonu ile greftleme arasındaki olası ilişki tam olarak değerlendirilememektedir, çünkü bir kısım hasta iki veya üç aferez ile toplanmış greft almasına rağmen hastaların çoğunda ilk greft ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası greft analizi yapılmamıştır ve hasta grupları arasında nakil süresi farklılık gösterdiği için greft içeriğinde ki CD34 alt gruplarında farklılık oluşabileceğinden gelecekte yapılacak çalışmalarda, hastaya verilen tüm greftleri temsil eden numunelerin kriyoprezervasyon sonrası analizi ile birlikte saklama süreleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi ile sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR

OPKHN amacıyla mobilizasyon sonrasında aferez ile toplanan kan ürününde, akım sitometri yöntemi ile CD34+ hücrelerin kantitatif sayılmasında günümüzde rutin olarak 7-AAD, CD45 ve CD34 kullanılmaktadır [121]. Literatürde greft kalitesini etkilediği düşünülen farklı CD34 alt grupları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Biz de çalışmamızda 2013'te Görgen ve arkadaşlarının geliştirdiği yeni hematopoez modelinde tanımlanan CD34 alt gruplarını (MPP, LMPP, EMP, GMP, geç GMP, MLP, BLP) akım sitometride rutin protokolden farklı olarak 12 renkli tek platformda analiz ettik. MM ve Lenfoma tanılı toplam 27 hastada 3 farklı mobilizasyon rejimi (G-CSF / KT+G-CSF / Plerixafor grupları) CD34 alt gruplarına etkisi değerlendirildi. Alt grup analizinde hem mutlak değerler hem de CD34 + hücrelerde alt grup yüzdeleri (rölatif değerler) mobilizasyon rejimlerine göre karşılaştırıldı. İstatiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Takipte OPKHN yapılan toplam 22 hastada nötrofil öncülü olan MPP, LMPP, GMP, geç GMP alt gruplarının verilen hücre $x10^6$/kg düzeyleri ile nötrofil engrafman günü arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. Megakaryosit öncülleri; MPP ve EMP alt gruplarının verilen hücre $x10^6$/kg düzeyleri ile trombosit engrafman günü arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Ve her iki engrafman kinetiği ile verilen CD34 $x10^6$/kg hücre dozu arasında bir ilişki görülmedi. Ayrıca üç mobilizasyon rejimi ile CD34 ve alt grupların verilen hücre $x10^6$/kg değerlerinde anlamlı fark yok iken, nötrofil ve trombosit engrafman günleri arasında istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).

Çalışmada ek olarak bakılan analizlerde; Aferez seans sayısı tüm hastalarda ortanca değeri 2 idi. Periferik CD34 düzeyi G-CSF grubunda (ortanca:88 µl), Plerixafor (ortanca: 36 µl) grubuna göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0,027$). Toplanmış kan ürünlerinde CD34/µl değeri G-CSF grubunda (ortanca: 1877 µl), Plerixafor grubuna göre (ortanca:910 µl) daha yüksek saptandı ($p=0.015$).

Günümüzde kök hücre greft içeriğindeki CD34 alt grupları ve etki eden faktörler hala belirsizdir, farklı CD34 alt gruplarının hematopoetik ve immün iyileşme üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Daha önceki çalışmalar sonucunda greft kalitesini en iyi gösterdiği kabul edilen ve halen kanıtlanmış tek değer CD34+ hücre dozudur.

Bu sonuçlar ışığında OPKHN için aferez ile toplanmış mobilize kan ürününde, akım sitometride CD34 alt gruplarına rutin olarak bakılmasının maliyet etkin olmadığını düşünüyoruz (Çalışmamızda bakılan alt grupların yaklaşık olarak hasta başına düşen maliyeti 250$ civarıdır). Ancak sonuçların daha büyük ve homojen hasta popülasyonlarıyla gelecekte yapılacak prospektif randomize çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Kök Hücre Ürünündeki CD34+ Hücre Alt Grupları ve Engrafman İle İlişkisi

Giriş ve Amaç: Günümüzde mobilizasyon sonrası aferez ile toplanmış periferik kan ürününde akım sitometri yöntemi ile CD34+ hücrelerin kantitatif sayımında 7-AAD, CD45 ve CD34 kullanılmaktadır [2]. Çalışmamızda, 2013'te Görgen ve arkadaşlarının geliştirdiği yeni hematopoez modelinde tanımlanan CD34 alt gruplarını (MPP, LMPP, EMP, GMP, geç GMP, MLP, BLP) rutin protokolden farklı olarak, akım sitometride 12 renkli tek platformda analiz ettik. Bu çalışmanın amacı 3 farklı mobilizasyon rejiminin (G-CSF / KT+G-CSF / Plerixafor) CD34 alt gruplarına etkisini ve CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya OPKHN yapılması planlanan MM ve lenfoma tanılı toplam 27 hasta dahil edildi. Kök hücre mobilizasyonun sağlanması amacıyla üç farklı mobilizasyon yöntemi uygulanan hastalar, G-CSF, GCSF+KT ve Plerixafor olmak üzere 3 gruba ayrıldı. G-CSF grubuna 9 hasta, G-CSF+ KT grubuna 9 hasta ve Plerixafor grubuna 9 hasta dahil edildi. Mobilizasyon sonrasında aferez yöntemiyle toplanmış kan ürününde akım sitometri ile 7-AAD, CD34 ve alt gruplarına (CD45/ CD45RA/ CD133/ CD10/ CD19/ CD38/ CD7/ CD33/ CD3) bakıldı. Üç farklı mobilizasyon yönteminin CD34 alt gruplarına etkisi değerlendirildi. Takipte OPKHN'nin yapıldığı toplam 22 hastada ise nakil sonrasında trombosit ve nötrofil engrafman süreleri takip edilerek, CD34 alt gruplarının engrafman kinetiğine etkisi değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmamıza 14'ü (%51,9) kadın ve 13'ü (%48,1) erkek olmak üzere toplam 27 hasta dahil edildi. Hastaların yaş ortancası 53 yıl (dağılım aralığı: 26-68 yıl), vücut ağırlığı ortanca değeri 76 kg (dağılım aralığı: 52-125 kg) idi. Hastaların 8'inin (%25,9) tanısı lenfoma iken, 19'unun (%70,4) tanısı MM'dir. Hastaların ortanca aferez sayısı 2 (dağılım aralığı:1-3) idi. Aferez işlemi öncesi pCD34 düzeyi, GCSF grubunda (ortanca: 88µl), Plerixafor grubundan (ortanca: 36 µl) daha yüksek saptandı (p=0.027). 3 farklı mobilizasyon grubu ile CD34 alt gruplarının mutlak ve rölatif değerleri (CD34+hücrelerdeki alt grup %'si) arasında istatistiksel fark saptanmadı

(p>0,05). Çalışmaya dahil edilen hastaların 22'sine (%81,5) OPKHN yapıldı. Üç farklı mobilizasyon yöntemi ile nötrofil ve trombosit engrafman günü arasında anlamlı fark görülmedi (p=0,178 / p=0,619). MPP, LMPP, GMP, geç GMP alt gruplarının verilen hücre düzeyleri (hücre x10^6/kg) ile nötrofil engrafmanı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. MPP ve EMP alt gruplarının verilen hücre düzeyleri (hücre x10^6/kg) ile trombosit engrafmanı arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Verilen CD34 x10^6/kg hücre dozu ile her iki engrafman kinetiği arasında bir ilişki görülmedi.

Tartışma ve Sonuç:

Çalışmamızda üç farklı mobilizasyon yöntemi (G-CSF, GCSF+KT ve Plerixafor) ile CD34 alt grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Takipte OPKHN yapılan 22 hastada CD34 alt gruplarının nötrofil ve trombosit engrafman kinetiğine etkisi değerlendirildi, anlamlı ilişki saptanmadı. Çalışmamızda bakılan alt grupların yaklaşık olarak hasta başına düşen maliyeti 250$ civarıdır. Sonuç olarak, transplantasyonda kullanılacak olan kök hücre greftlerinde CD34 alt gruplarının rutin analizlere dahil edilmesini maliyet etkin olmadığını düşünüyoruz. Ancak sonuçların daha büyük ve homojen hasta popülasyonlarıyla gelecekte yapılacak prospektif randomize çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: kök hücre, otolog kök hücre nakli, CD34 alt grupları, mobilizasyon, engrafman

SUMMARY

CD34 + Cell Subsets in Stem Cell Products and Their Relationship with Engraftment Kinetics

Introduction and Objectives: Currently, 7-AAD, CD45 and CD34 are used in quantitative counting of CD34 + cells by flow cytometry in peripheral blood product collected by apheresis after mobilization [2]. In our study, we analyzed CD34 subgroups (MPP, LMPP, EMP, GMP, late GMP, MLP, BLP) defined in the new hematopoiesis model developed by Görgen et al. The aim of this study is to evaluate the effect of three different mobilization regimes (G-CSF / KT + G-CSF / Plerixafor) on CD34 subgroups and the effect of CD34 subgroups on engraftment kinetics.

Materials and Methods: A total of 27 patients with MM and lymphoma who were planned to undergo autologous peripheral stem cell transplantation (APSCT) were included in the study. Patients were divided into three groups as G-CSF, G-CSF plus chemotherapy (+CT) and Plerixafor. 9 patients in the G-CSF group, 9 patients in the G-CSF + CT group and 9 patients in the Plerixafor group were included. After mobilization, 7-AAD, CD34 and its subgroups (CD45 / CD45RA / CD133 / CD10 / CD19 / CD38 / CD7 / CD33 / CD3) were analyzed by flow cytometry in blood product collected by apheresis method. The effect of three different mobilization regimens on CD34 subgroups were evaluated. The engraftment kinetics for platelet and neutrophil were monitored in 22 patients who underwent APSCT and the effect of CD34 subgroups on engraftment kinetics was evaluated.

Results: A total of 27 patients, 14 females (51.9%) and 13 males (48.1%) were included in the study. The median age of the patients was 53 years (range: 26 to 68 years) and the median body weight was 76 kg (range: 52 to 125 kg). While 8 patients (25.9%) were diagnosed as lymphoma, 19 patients (70.4%) were diagnosed as MM. The median number of apheresis cycles was 2 (range: 1-3). Prior to stem cell collection, median pCD34 count was higher in G-CSF group (median: 88µl) than Plerixafor group (median: 36 ortl) ($p = 0.027$). No statistically significant difference was found between the absolute and relative values of CD34 + subgroups (in % of CD34 + cells) ($p > 0.05$). The cost per patient of the subgroups examined in our study

is around 250$. In our study cohort, 22 out of 27 patients (81.5%) underwent APSCT. There were no significant differences between neutrophil and platelet engraftment days as three different mobilization regimens ($p = 0.178$ and $p = 0.619$, respectively). There was no statistically significant relationship between neutrophil engraftment and cell levels of MPP, LMPP, GMP, late GMP subgroups. No significant correlation was found between the given cell levels and platelet engraftment of MPP and EMP subgroups. There was no correlation between the given CD34 $x10^6$ /kg cell dose and both engraftment kinetics.

Discussion and Conclusion: In our study, there were no significant differences between CD34 subgroups as three different mobilization methods (G-CSF, GCSF + CT and Plerixafor). When we evaluated the effects of CD34 subgroups on neutrophil and platelet engraftment kinetics in 22 patients who underwent APSCT, no significant relationship was found. In conclusion, it is not cost effective to analyze CD34 subgroups in used stem cell grafts for the transplantation. However, our results need to be supported by future prospective randomized studies with larger and homogeneous patient populations.

Key words: stem cell, stem cell transplantation, CD34 subgroups, mobilization, engraftment

KAYNAKÇA

1. Moskowitz, A.J., et al., *Pretransplantation functional imaging predicts outcome following autologous stem cell transplantation for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma*. Blood, 2010. **116**(23): p. 4934-7.
2. Olivero, S., et al., *CD34+ cell enumeration in peripheral blood and apheresis samples, using two laboratory diagnostic kits or an institutional protocol*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(4): p. 387-94.
3. Gorgens, A., et al., *Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages*. Cell Rep, 2013. **3**(5): p. 1539-52.
4. Dmytrus, J., et al., *Multi-color immune-phenotyping of CD34 subsets reveals unexpected differences between various stem cell sources*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(8): p. 1093-100.
5. ÇAKAR, A.N., *Kök Hücre Tanımı, Tipleri ve Etik Boyut*. Turkiye Klinikleri J Plast Surg-Special Topics, 2015. **4**(3): p. 1-6.
6. Ateş, U., *Kök hücreyi tanıyalım*. FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 2016. **1**(1): p. 19-28.
7. Martin-Rendon, E. and S.M. Watt, *Stem cell plasticity*. Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 877-91.
8. A, B. and F. CY, *Human embryonic stem cells, in Trends in Stem CellBiology and Technology*. Springer, 2009: p. 1-17.
9. H, H. and H. M, *Tissue engineered Scaffolds for stem cells and regenerative medicine*. Springer, 2009. **367**: p. 87.
10. Sobhani, A., et al., *Multipotent Stem Cell and Current Application*. Acta Medica Iranica, 2017. **55**.
11. *Kök Hücre Araştırmalarında Güncel Kavramlar*. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, 2004. **7**.
12. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
13. Chotinantakul, K. and W. Leeanansaksiri, *Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways*. Bone Marrow Res, 2012. **2012**: p. 270425.
14. Govindan, R., et al., *Molecular interactions in stem cell homing and bone marrow transplantation therapy*. International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences, 2012. **3**(4): p. 210-213.
15. Huang, X., S. Cho, and G.J. Spangrude, *Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal*. Cell Death Differ, 2007. **14**(11): p. 1851-9.
16. Kaushansky, K., *Lineage-specific hematopoietic growth factors*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2034-45.
17. Junker, U., et al., *Hematopoietic Potential and Retroviral Transduction of CD34⁺Thy-1⁺ Peripheral Blood Stem Cells From Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus Type-1–Infected Individuals Mobilized With Granulocyte Colony-Stimulating Factor*. Blood, 1997. **89**(12): p. 4299-4306.

18. Storms, R.W., et al., *Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34.* Blood, 2005. **106**(1): p. 95-102.

19. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.* Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.

20. Bryder, D., D.J. Rossi, and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell.* Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 338-46.

21. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.* Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.

22. Giebel, B. and M. Punzel, *Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells.* Biol Chem, 2008. **389**(7): p. 813-24.

23. Gorgens, A., et al., *New relationships of human hematopoietic lineages facilitate detection of multipotent hematopoietic stem and progenitor cells.* Cell Cycle, 2013. **12**(22): p. 3478-82.

24. Dmytrus, J., et al., *Multi-color immune-phenotyping of CD34 subsets reveals unexpected differences between various stem cell sources.* Bone Marrow Transplantation, 2016. **51**: p. 1093.

25. R, K. and S. LR, *Hematopoietic stem cells.* In Stem cells: scientific progress and future research directions, 2001: p. 43-58.

26. Siena, S., et al., *Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* Blood, 1989. **74**(6): p. 1905-14.

27. Broxmeyer, H.E., et al., *Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3828-32.

28. Barker, J.N. and J.E. Wagner, *Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(7): p. 526-32.

29. Li, L. and T. Xie, *Stem cell niche: structure and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 605-31.

30. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.* Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.

31. Çetinkaya, U. and E. Kilic, *Hematopoetik kök hücre ve mikroçevre ilişkisi.* Hematolog, 2014. **4**: p. 2.

32. Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.* Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.

33. Xie, J., et al., *Notch signaling regulates CXCR4 expression and the migration of mesenchymal stem cells.* Cell Immunol, 2013. **281**(1): p. 68-75.

34. Mancini, S.J., et al., *Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation.* Blood, 2005. **105**(6): p. 2340-2.

35. Suda, T., F. Arai, and S. Shimmura, *Regulation of stem cells in the niche*. Cornea, 2005. **24**(8 Suppl): p. S12-s17.

36. Arai, F., A. Hirao, and T. Suda, *Regulation of hematopoietic stem cells by the niche.* Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(2): p. 75-9.

37. Lévesque, J.P., et al., *Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins*. The Journal of experimental medicine, 1995. **181**(5): p. 1805-1815.

38. Chen, S., M. Lewallen, and T. Xie, *Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation.* Development, 2013. **140**(2): p. 255-65.

39. Heazlewood, S.Y., et al., *Analyzing hematopoietic stem cell homing, lodgment, and engraftment to better understand the bone marrow niche.* Ann N Y Acad Sci, 2014. **1310**: p. 119-28.

40. Khodadi, E., et al., *Role of stem cell factor in the placental niche.* Cell Tissue Res, 2016. **366**(3): p. 523-531.

41. Nilsson, S.K., et al., *Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells.* Blood, 2005. **106**(4): p. 1232-9.

42. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches.* Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.

43. Yoon, C.H., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells (EPC).* Korean Circ, 2004. **34**: p. 304–313.

44. Maher, P.A., *Modulation of the epidermal growth factor receptor by basic fibroblast growth factor.* J Cell Physiol, 1993. **154**(2): p. 350-8.

45. de Haan, G., et al., *In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1.* Dev Cell, 2003. **4**(2): p. 241-51.

46. Q, B. and C. R, *Abeloff's Clinical Oncology*. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2014. 485-492.e2.

47. Arslan, O. and R. Moog, *Mobilization of peripheral blood stem cells.* Transfus Apher Sci, 2007. **37**(2): p. 179-85.

48. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.

49. Thomas, E.D., et al., *Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man.* J Clin Invest, 1959. **38**: p. 1709-16.

50. Goodman, J.W. and G.S. Hodgson, *Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice.* Blood, 1962. **19**: p. 702-14.

51. McCredie, K.B., E.M. Hersh, and E.J. Freireich, *Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man.* Science, 1971. **171**(3968): p. 293-4.

52. Weiner, R.S., C.M. Richman, and R.A. Yankee, *Semicontinuous flow centrifugation for the pheresis of immunocompetent cells and stem cells.* Blood, 1977. **49**(3): p. 391-7.

53. Gillespie, T.W. and C.D. Hillyer, *Peripheral blood progenitor cells for marrow reconstitution: mobilization and collection strategies.* Transfusion, 1996. **36**(7): p. 611-24.

54. Goldman, J.M., et al., *Cryopreserved peripheral blood cells functioning as autografts in patients with chronic granulocytic leukaemia in transformation.* Br Med J, 1979. **1**(6174): p. 1310-3.

55. Kessinger, A., et al., *Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia*. Bone Marrow Transplant, 1989. **4**(6): p. 643-6.

56. Bensinger, W.I., et al., *Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor.* Stem Cells, 1996. **14**(1): p. 90-105.

57. Tanyeli, A., et al., ArşivKaynakTaramaDergisi, 2014. **23**(1): p. 1-7.

58. Sheridan, W.P., et al., *Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy*. Lancet, 1992. **339**(8794): p. 640-4.

59. *Kök Hücre Biyolojisi ve Uygulama Alanları* Türk Hematoloji Derneği Hematolog 2014. **4**(2): p. 238-380.

60. Anderlini, P. and M. Korbling, *The use of mobilized peripheral blood stem cells from normal donors for allografting.* Stem Cells, 1997. **15**(1): p. 9-17.

61. Fu, S. and J. Liesveld, *Mobilization of hematopoietic stem cells.* Blood Rev, 2000. **14**(4): p. 205-18.

62. ÇAĞIRGAN, S., Turkiye Klinikleri J Int Med Sci, 2005. **1**(19): p. 64-70.

63. Gandhi, M.K., et al., *The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(1): p. 9-13.

64. Sheppard, D., et al., *Systematic review of randomized controlled trials of hematopoietic stem cell mobilization strategies for autologous transplantation for hematologic malignancies.* Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(8): p. 1191-203.

65. DiPersio, J.F., et al., *Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5720-6.

66. Hsu, Y.M. and M.M. Cushing, *Autologous Stem Cell Mobilization and Collection.* Hematol Oncol Clin North Am, 2016. **30**(3): p. 573-89.

67. Damon, L.E. and L.E. Damon, *Mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood.* Expert Rev Hematol, 2009. **2**(6): p. 717-33.

68. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 687-94.

69. Giralt, S., et al., *Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(3): p. 295-308.

70. Anderlini, P., et al., *A comparative study of once-daily versus twice-daily filgrastim administration for the mobilization and collection of CD34+ peripheral blood progenitor cells in normal donors.* Br J Haematol, 2000. **109**(4): p. 770-2.

71. Cashen, A.F., H.M. Lazarus, and S.M. Devine, *Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF?* Bone Marrow Transplant, 2007. **39**(10): p. 577-88.

72. Carreras, E., et al., *The EBMT Handbook*. 2019.

73. Kriegsmann, K., et al., *Orchestration of Chemomobilization and G-CSF Administration for Successful Hematopoietic Stem Cell Collection*. Biol Blood Marrow Transplant, 2018. **24**(6): p. 1281-1288.

74. Romeo, A., et al., *Standard- versus high-dose lenograstim in adults with hematologic malignancies for peripheral blood progenitor cell mobilization.* Transfusion, 2010. **50**(11): p. 2432-46.

75. Sung, A.D., et al., *Outcomes and costs of autologous stem cell mobilization with chemotherapy plus G-CSF vs G-CSF alone.* Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(11): p. 1444-9.

76. Tuchman, S.A., et al., *Cyclophosphamide-based hematopoietic stem cell mobilization before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma.* J Clin Apher, 2015. **30**(3): p. 176-82.

77. Pavone, V., et al., *Poor mobilization is an independent prognostic factor in patients with malignant lymphomas treated by peripheral blood stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(8): p. 719-24.

78. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist.* J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1307-18.

79. DiPersio, J.F., et al., *Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(28): p. 4767-73.

80. Brave, M., et al., *FDA review summary: Mozobil in combination with granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous transplantation.* Oncology, 2010. **78**(3-4): p. 282-8.

81. Gazitt, Y., et al., *Improved mobilization of peripheral blood CD34+ cells and dendritic cells by AMD3100 plus granulocyte-colony-stimulating factor in non-Hodgkin's lymphoma patients.* Stem Cells Dev, 2007. **16**(4): p. 657-66.

82. Devine, S.M., et al., *Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction.* Blood, 2008. **112**(4): p. 990-8.

83. Donahue, R.E., et al., *Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures.* Blood, 2009. **114**(12): p. 2530-41.

84. Fruehauf, S., et al., *A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study.* Cytotherapy, 2009. **11**(8): p. 992-1001.

85. Varmavuo, V., et al., *Blood graft lymphocyte subsets after plerixafor injection in non-Hodgkin's lymphoma patients mobilizing poorly with chemotherapy plus granulocyte-colony-stimulating factor.* Transfusion, 2012. **52**(8): p. 1785-91.

86. To, L.B., J.P. Levesque, and K.E. Herbert, *How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly.* Blood, 2011. **118**(17): p. 4530-40.

87. Harvey, R.D., et al., *Temporal changes in plerixafor administration and hematopoietic stem cell mobilization efficacy: results of a prospective clinical trial in multiple myeloma.* Biol Blood Marrow Transplant, 2013. **19**(9): p. 1393-5.

88. Ilhan O, A.E., Topcuoglu P.et al. and *Myeloma ve Lenfoma olgularında periferik kök hücre toparlanması yetersizliğinde ikincil yaklaşımlar ne kadar etkin?* Turk J Hematol, 2006. **23**: p. 62.

89. Kim, M.G., et al., *Pegfilgrastim vs filgrastim in PBSC mobilization for autologous hematopoietic SCT: a systematic review and meta-analysis*. Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(4): p. 523-30.

90. Arora, M., et al., *Randomized comparison of granulocyte colony-stimulating factor versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus intensive chemotherapy for peripheral blood stem cell mobilization and autologous transplantation in multiple myeloma*. Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(6): p. 395-404.

91. Herbert, K.E., et al., *The role of ancestim (recombinant human stem-cell factor, rhSCF) in hematopoietic stem cell mobilization and hematopoietic reconstitution.* Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(1): p. 113-25.

92. Angelopoulou, M.K., et al., *New insights in the mobilization of hematopoietic stem cells in lymphoma and multiple myeloma patients*. BioMed research international, 2014. **2014**: p. 835138-835138.

93. Brunner, S., et al., *Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow.* Exp Hematol, 2008. **36**(9): p. 1157-66.

94. Ghobadi, A., et al., *Bortezomib is a rapid mobilizer of hematopoietic stem cells in mice via modulation of the VCAM-1/VLA-4 axis*. Blood, 2014. **124**(17): p. 2752-2754.

95. Fukuda, S., et al., *The chemokine GRObeta mobilizes early hematopoietic stem cells characterized by enhanced homing and engraftment.* Blood, 2007. **110**(3): p. 860-9.

96. Jing, D., et al., *CD49d blockade by natalizumab in patients with multiple sclerosis affects steady-state hematopoiesis and mobilizes progenitors with a distinct phenotype and function*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(10): p. 1489-96.

97. Mohty, M., et al., *Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(7): p. 865-72.

98. Stiff, P.J., et al., *Transplanted CD34(+) cell dose is associated with long-term platelet count recovery following autologous peripheral blood stem cell transplant in patients with non-Hodgkin lymphoma or multiple myeloma*. Biol Blood Marrow Transplant, 2011. **17**(8): p. 1146-53.

99. Abrahamsen, J.F., et al., *Large-volume leukapheresis yields more viable CD34+ cells and colony-forming units than normal-volume leukapheresis, especially in patients who mobilize low numbers of CD34+ cells.* Transfusion, 2005. **45**(2): p. 248-53.

100. Donmez, A., et al., *Clinical side effects during peripheral blood progenitor cell infusion*. Transfus Apher Sci, 2007. **36**(1): p. 95-101.

101. Olivieri, A., et al., *Proposed definition of 'poor mobilizer' in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(3): p. 342-51.

102. Wuchter, P., et al., *Poor mobilization of hematopoietic stem cells-definitions, incidence, risk factors, and impact on outcome of autologous transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2010. **16**(4): p. 490-9.

103. Cheng, J., et al., *Plerixafor is effective given either preemptively or as a rescue strategy in poor stem cell mobilizing patients with multiple myeloma*. Transfusion, 2015. **55**(2): p. 275-83.

104. Sancho, J.M., et al., *Predictive factors for poor peripheral blood stem cell mobilization and peak CD34(+) cell count to guide pre-emptive or immediate rescue mobilization*. Cytotherapy, 2012. **14**(7): p. 823-9.

105. Namdaroglu, S., S. Korkmaz, and F. Altuntas, *Management of mobilization failure in 2017*. Transfus Apher Sci, 2017. **56**(6): p. 836-844.

106. Terstappen, L.W., et al., *Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells*. Blood, 1991. **77**(6): p. 1218-27.

107. Taubert, I., et al., *Characterization of hematopoietic stem cell subsets from patients with multiple myeloma after mobilization with plerixafor*. Cytotherapy, 2011. **13**(4): p. 459-66.

108. Fritsch, G., et al., *The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood*. Bone Marrow Transplant, 1996. **17**(2): p. 169-78.

109. Worel, N., et al., *Influence of plerixafor on the mobilization of CD34+ cell subpopulations and lymphocyte subtypes*. Transfusion, 2017. **57**(9): p. 2206-2215.

110. Duggan, P.R., et al., *Predictive factors for long-term engraftment of autologous blood stem cells*. Bone Marrow Transplant, 2000. **26**(12): p. 1299-304.

111. Schwella, N., et al., *Impact of preleukapheresis cell counts on collection results and correlation of progenitor-cell dose with engraftment after high-dose chemotherapy in patients with germ cell cancer*. Journal of Clinical Oncology, 1996. **14**(4): p. 1114-1121.

112. Siena, S., et al., *Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy*. J Clin Oncol, 2000. **18**(6): p. 1360-77.

113. Desikan, K.R., et al., *Comparable engraftment kinetics following peripheral-blood stem-cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma*. J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1547-53.

114. Varmavuo, V., et al., *Blood graft composition after plerixafor injection in patients with NHL*. Eur J Haematol, 2012. **89**(2): p. 128-35.

115. Alexander, E.T., et al., *Beyond CD34+ cell dose: impact of method of peripheral blood hematopoietic stem cell mobilization (granulocyte-colony-stimulating factor [G-CSF], G-CSF plus plerixafor, or cyclophosphamide G-CSF/granulocyte-macrophage [GM]-CSF) on number of colony-forming unit-GM, engraftment, and Day +100 hematopoietic graft function*. Transfusion, 2011. **51**(9): p. 1995-2000.

116. Fan, Z.P., et al., *[Comparison of clinical outcomes between unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation for leukemia]*. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2006. **27**(8): p. 525-8.

117. Meisel, R., et al., *Similar survival following HLA-identical sibling transplantation for standard indication in children with haematologic malignancies: a single center comparison of mobilized peripheral blood stem cell with bone marrow transplantation*. Klin Padiatr, 2005. **217**(3): p. 135-41.

118. Roug, A.S., et al., *Unraveling stem cell and progenitor subsets in autologous grafts according to methods of mobilization: implications for prediction of hematopoietic recovery*. Cytotherapy, 2014. **16**(3): p. 392-401.

119. Varmavuo, V., et al., *CD34+ cell subclasses and lymphocyte subsets in blood grafts collected after various mobilization methods in myeloma patients*. Transfusion, 2013. **53**(5): p. 1024-32.

120. Kamel, A.M., et al., *Impact of CD34 subsets on engraftment kinetics in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2005. **35**(2): p. 129-36.

121. Keeney, M., et al., *Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering.* Cytometry, 1998. **34**(2): p. 61-70.