

KÖK HÜCRE TOPLAMA

Doç. Dr. Mustafa ÇETİN

Primer olarak kemik iliği mikroçevresindeki uygun ortamlarda ve daha düşük oranda da periferik kan dolaşımında bulunan, kendi kendini yenileyebilme, farklı hücre dizilerine (eritropoietik, granuloipoietik, megakaryositik ve lenfositik) ve hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip hücrelere “kök hücre” adı verilmektedir. Geçmişte, transplantasyon için kök hücre kaynağı olarak kemik iliği yaygın olarak kullanılmakla birlikte, son yıllarda yapılan klinik çalışmalar doğrultusunda periferik kan ve göbük kordonunun da kök hücre kaynağı olarak etkin bir şekilde kullanılabilirdiği gösterilmiştir [1].

Günümüzde, periferik kan kök hücreleri (PKKH) hem otolog kök hücre transplantasyonu (OKHT) hem de allojeneik kök hücre transplantasyonu (AKHT) için neredeyse kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin yerini almıştır. Başlıca avantajları; (1)genel anestezi gerektirmemesi, ayaktan yapılabilmesi, daha az travmatik olması gibi uygulama kolaylıkları; (2) aferez öncesi transfüzyon gereksiniminin daha az olması, (3) nakil sonrası engraftmanın daha hızlı gerçekleşmesi, (4) trombosit suspansiyonu gereksiniminin daha az ve hastanede kalış süresinin daha kısa olmasıdır [2]. Engraftman kinetiğinin hızlı olması sadece periferik kandan kök hücre toplanmasına değil aynı zamanda toplama işlemi öncesi verici yada hastaya yapılan sitokinlere de bağlıdır [3]. Fakat, bu avantajları yanında, OKHT veya AKHT için kök hücre kaynağı olarak PKKH’in kullanılmasının, gerek aferez öncesi ve sonrası gerekse transplant süresi içinde hasta veya donörde sıkıntıya yol açabilecek bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar; toplama işleminin birkaç gün sürebilmesi, yeterli kök hücre miktarının belirlenebilmesi için akım sitometrik analiz ile kan bileşenlerinin değerlendirilmesi gereksinimi, her hasta veya vericiden yeterli hücre toplanamaması, sitokinlere veya aferez işlemine bağlı görülebilecek komplikasyonlar, dondurulmuş ürünün infüzyonu sırasında görülebilecek yan etkiler ve “graft versus host hastalığı” (GVHD) riskidir [4-6].

HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELERİN PERİFERİK KANA MOBİLİZASYONU

Hematopoietik sitokin kullanımının periferik kanda geçici olarak hematopoietik kök hücre (HKH) artışı (mobilizasyon) yaptığının bulunması ile transplantasyon için daha fazla sayıda PKKH toplanması mümkün olmuştur [7]. Sitokin ile mobilize edilmiş PKKH bileşenleri myeloid progenitör hücreler ile birlikte, engraftman kapasitesi yüksek olan daha fazla sayıda CD34 eksprese eden hücreleri (CD34⁺ hücreler) içerirler. Periferik kandan izole edilen CD34⁺ hücreler kemik iliğinden izole edilenlere göre biraz daha farklıdır [8]. Etkin bir mobilizasyon için bu hücrelerin sayısının artırılmasına ve bu hücrelerin kemik iliğinden serbest bırakılmasına gereksinim duyulmaktadır. Kemoterapi, sitokinler ve bazı kemokinler gibi farklı mobilizasyon ajanlarının farklı hedefler üzerine etki etseler dahi ortak bir mekanizmaları olduğu ileri sürülmektedir [9].

Bununla birlikte, engraftman kinetiğinin hızlı olmasını belirleyen en önemli faktörlerden biri, infüzyonla verilen CD34⁺ hücrelerin miktarıdır. Hücre sayısı artıktça engraftman süresinin kısaldığı gösterilmiştir[10,11]. Granulosit-koloni stimule edici faktör uygulananı granulosit engraftmanını hızlandırırken, az sayıda CD34⁺ hücre içeren ürünü alan hastalarda ise trombosit engraftmanını geciktirmektedir [12, 10].

Hastalar ve vericiler için çeşitli mobilizasyon şemaları geliştirilmiştir. Akut lösemilerde, hematopoietik sitokinlerin bulunmasından önce, kemik iliği hipoplazisi yapan ve induksiyon tedavisi olarak kullanılan kemoterapilerin, periferik kanda dolaşan HKH’leri geçici olarak artırdığı fark edilmiştir. Bu yaklaşım lösemili hastalarda veya çeşitli hematolojik malignitelerde PKKH elde etmek için çeşitli transplant programları tarafından kullanılmıştır. Juttner ve ark. [13] kemoterapi ile mobilize edilen PKKH’leri alan hastalarda ortanca 11 gün gibi hızlı engraftman olduğunu göstermişlerdir. Yine, aynı araştırmacılar düşük doz CFU-GM alan hastaların bir kısmında posttransplantasyon aplazinin uzadığını ve infüzyon sonrası 3-4. haftalarda kan sayımında sekonder bir düşüş olduğunu gözlemişlerdir [13]. Bununla birlikte, daha önceden yüksek dozlarda alkilleyici ajan veya radyoterapi alan, progresif hastalığı olan ve kemik iliği infiltrasyonu bulunan hastalarda ise kemoterapiye yanıtın iyi olmadığı ve transplantasyon için yeterli hücre toplanamadığı da bilinmektedir (14, 15]. Hematopoietik yapının toparlanma süreci (recovery) sırasında GM-CSF veya G-CSF kullanımı ile dolaşımdaki progenitör hücre düzeyinin tedavi öncesine göre yaklaşık 100 kat arttırıldığı bulunması ile, en etkili mobilizasyon rejimini bulmak amacıyla, hematopoietik sitokinlerin, sitokin kombinasyonlarının, kemoterapi+sitokinlerin, tek başına kemokin veya kemokin+sitokinlerin birlikte kullanıldığı çeşitli mobilizasyon rejimleri de denenmeye başlamıştır [16].

SİTOKİN MOBİLİZASYONU

1988 yılında, rekombinant sitokinlerden G-CSF ve GM-CSF’in kandaki progenitör ve olgun hücreleri arttırdığının bildirilmesinden sonra çeşitli sitokinler arasında CD34⁺ hücreleri mobilize etme yeteneği açısından karşılaştırmalı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Granulosit-koloni stimule edici faktör kullanımı, toksisitesi ve komplikasyonları

G-CSF diğer sitokinlere göre etkinliğinin daha fazla ve toksisitesinin daha az olması nedeniyle sık kullanılan sitokinlerden biridir. r-metHu-G-CSF (filgrastim) ve rHuG-CSF (lenograstim) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Genel olarak her iki formunda biyolojik aktivitelerinin hemen hemen aynıdır. Her ikisinin de 10 µg/kg/gün kullanılması durumunda 5. günde maksimum CD34⁺ hücre sayısı elde edilmektedir[17]. G-CSF ve GM-CSF mobilizasyonunun karşılaştırıldığı randomize bir çalışmada, 10 µg/kg/gün G-CSF uygulanan sağlıklı verici grubunda periferik kanda ortalama %0.99 CD34⁺ hücre bulunduğu, aynı dozda GM-CSF uygulanan grupta ise bu oranın %0.25 olduğu bildirilmiştir [18]. Aynı çalışmada, tedavi öncesi CD34⁺ hücre miktarı 1.6/µL iken, GM-CSF tedavisi ile 3/µL, G-CSF ile 61/µL olmuştur. Her iki grup tedavinin

beşinci gününde bir seans lökofereze alınmış ve G-CSF ile tedavi edilen vericilerden ortalama 119×10^6 CD34⁺ hücre toplanırken, GM-CSF uygulanan vericilerden ortalama 12.6×10^6 CD34⁺ hücre toplanmıştır. G-CSF sonrası maksimum CD34⁺ hücre düzeyinin 5. günde görüldüğü, 4 ve 6. günlerde bu düzeyin daha düşük olduğu ve daha sonraki günlerde ise beyaz küre artışına rağmen bu düzeyin hızla düştüğü bildirilmiştir [19, 20].

G-CSF tedavisi sonrası toplanan CD34⁺ hücre sayısı sitokin uygulaması öncesi periferik kandaki bu hücrelerin sayısı ile orantılıdır [21]. AKHT'nda 5 µg/kg/gün gibi düşük dozlar kullanılabilmesine rağmen [22], 10 µg/kg/gün G-CSF ile daha yüksek ortalama CD34⁺ hücre düzeyleri elde edilmesi doz-yanıt ilişkisi olduğunu göstermektedir. 10 µg/kg/gün G-CSF ile bir grup sağlıklı vericiden ortalama 4×10^8 CD34⁺ hücre toplanmaktadır [23]. Bu dozdaki G-CSF ve uygun aferez tekniği ile çoğu hastada bir işlem sonunda yeterli sayıda hücre toplanabilir. Günde iki doz G-CSF uygulanan hastalarda ürün miktarının fazla olmakla birlikte, günde iki kez ve iki kat yüksek dozda G-CSF uygulamasının ürün miktarını değiştirmemektedir [24, 25]. Ayrıca, daha önce birden fazla kemoterapi alan hastalarda ve yaşlılarda ürün miktarının daha az olmaktadır [26]. G-CSF uygulaması sonrası periferik kanda lenfositlerin arttığı bildirilmiş [27] ve fare deneylerinde G-CSF'ün bu hücrelerdeki sitokin yanıtını değiştirdiği [28], akut GVHH'nı azalttığı [29], bununla birlikte graft-versus-lösemi (GVL) etkisini artırdığı gözlenmiştir [30]. Allojeneik verici ve otolog transplant hastalarında G-CSF kullanımı sonrası benzer toksik etkiler görülmektedir. G-CSF uygulanan hemen hemen her bireyde iskelet ağrısı başta olmak üzere somatik yakınmalar gelişmektedir (Tablo1). Bu somatik yakınmalar genellikle tolere edilebilmekte ve çok az sayıda hasta veya vericide ilacın kesilmesine gereksinim duyulmaktadır. Vericiler için uzun dönem yaşam riski neredeyse yok denecek kadar azdır. Nadir görülen ciddi komplikasyonlar arasında dalak rüptürü [31], myokard infarktüsü (MI) ve serebrovasküler hastalık (SVH) bulunmaktadır [32]. Otolog transplant hastalarında, iki vericide görülen SVH ve MI gibi komplikasyonların görülmemesi nedeniyle, filgrastim koagülabileiteyi artırma özelliği ile bu komplikasyonlar arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır [33, 34]. Bunlar dışında, filgrastim otoimmün hastalıkları alevlendirmekte [35] ve oftalmolojik yan etkilere neden olmaktadır [36-38]. Yakın zamanda yayınlanan olgu sunumunda bir allojeneik kök hücre vericisinde aferezden 14 ay sonra akut myeloid lösemi (AML) geliştiği bildirilmiştir [39].

Diğer Hematopoietik Sitokinler

G-CSF'ün mobilizasyon potansiyelinin fark edilmesi ile birlikte, araştırmacılar tarafından diğer hematopoietik sitokinlerin mobilizasyon kapasiteleri de denenmeye başlamıştır. Bu amaçla, makrofaj-koloni stimule edici faktör [40], eritropoietin [41], interlökin-3 [42], PIXY-321 [43] ve kök hücre faktörü [44] denenmiş ve bu sitokinlerin ortalama 5-10 kat CD34⁺ hücre sağladığı bildirilmiştir.

Sitokin kombinasyonları

Sitokinlerin PKKH mobilizasyonunu nasıl yaptıklarına dair mekanizma net olarak bilinmemekle birlikte büyük

olasılıkla kök hücre proliferasyonunu ve bu hücrelerin kemik iliğinden salınımını artırdıkları ileri sürülmektedir. Bu nedenle çeşitli sitokinlerin kombine kullanımı ile sinerjistik etki edebilecekleri düşünülmüştür. Bu amaçla yukarıda adı geçen sitokinlerin kombinasyonları denenmiş ve bu konuda en iyi sonuç alınan kombinasyon tedavilerinden biri G-CSF+GM-CSF olmuştur [45, 46].

Kemoterapi+sitokin mobilizasyonu

Kemik iliği hipoplazisi yapan kemoterapilerin verilmesinden sonra hematopoietik yapının erken toparlanma döneminde CFU-GM miktarı artmaktadır [15]. Bu amaçla DAT [47], COMP, yüksek doz siklofosfamid [15], MIME [14], CAV [48], DCEP [49] ve siklofosfamid+etoposid [50] olmak üzere çeşitli kemoterapi rejimleri kullanılmaktadır. To ve ark. 4g/m² tek doz siklofosfamid rejimi ile CFU-GM sayısında 14 kat artış tesbit etmişlerdir [15]. Kemoterapi+sitokin hazırlama rejimi tek başına kemoterapiye göre daha iyi mobilizasyon sağlar [51]. Genel olarak G-CSF, GM-CSF'e oranla daha potent bir mobilizasyon ajanı olmakla birlikte, Alegre ve ark. [52] multiple myelom hastalarında 4 g/m² siklofosfamid+8 µg/kg/gün GM-CSF ile tek başına 10 µg/kg/gün G-CSF'ü karşılaştırmışlar ve kombine kemoterapi+GM-CSF ile mobilize edilen grupta CD34⁺ hücre sayısını daha fazla bulmuşlardır. Kemoterapi ile kombine edilen sitokin mobilizasyonunun daha etkin olduğuna dair diğer bir çalışmada siklofosfamid+G-CSF tek başına G-CSF ile karşılaştırılmış, bu çalışmada da kombine sitokin+kemoterapi grubunda CD34⁺ hücre sayısı daha fazla bulunmuştur [53]. Bununla birlikte, PKKH bileşenlerinin tümör hücreleri ile kontaminasyonu, engrafman kinetikleri, veya sağkalım açısından herhangi bir fark bulunamamıştır. Koc ve ark. tarafından yapılan randomize bir çalışmada yüksek doz siklofosfamid+G-CSF ile mobilize edilen grupta G-CSF+GM-CSF grubuna göre daha fazla progenitör hücre mobilizasyonu sağlandığı bildirilmiştir [54]. Bu çalışma tek başına sitokin ile yeterli mobilizasyon sağlanamayan hastalarda sitokin+kemoterapi kombinasyonunun öncelikli olarak kullanılması gerektiğini göstermektedir. Periferik kana kök hücre mobilizasyonunda kullanılan kemoterapi rejimlerinin seçimi mobilizasyon başarısını etkilemektedir. Tek başına siklofosfamid ile 61 hastada 395 aferez seansı sırasında hasta başına ortalama 4.0×10^7 hücre toplanırken, siklofosfamid+etoposid rejimi ile 33 hastada 218 toplama seansı ile ortalama 8.3×10^7 hücre toplanmıştır [55]. Siklofosfamid+Etoposid+G-CSF (6 µg/kg/gün) kullanılan 24 hastalık bir grupta ise bu sayı 122 seans sonunda ortalama 38.8×10^7 olmuştur. Buna benzer bir çalışmada, Demirer ve ark. meme kanserli hastalarda mobilizasyon için çeşitli kemoterapi rejimleri kullanmış ve en iyi sonucu siklofosfamid+paklitaksel+G-CSF ile almışlardır [56]. Bu rejimle aferezin ilk gününde 11.1×10^6 /kg CD34⁺ hücre toplanırken, hastaların %50'den fazlasında ilk aferez işlemi sonunda hedef hücre sayısına ulaşılmıştır.

Kemokinler

Kemokinler, lökosit migrasyonu ve fonksiyonunu etkileyen peptidlerdir. Yapılan çalışmalarda, mobilizasyon öncesi stromal hücre kaynaklı faktör 1 [57], GROβ [58] ve IL-8

gibi kemokinlerin uygulanması sonrası periferik kana kök hücre mobilizasyonunun arttığı gösterilmiştir [59]. Genel olarak, HKH sayısını değil toplanan kök hücre sayısını artırdıkları düşünülmektedir. Bu nedenle yeterli sayıda kök hücre toplanabilmesi için işlenecek kan hacminin azaltılması gerekmektedir.

MOBİLİZASYONU ZOR OLAN HASTALARDA UYGULANACAK STRATEJİLER

Çoğu hastada 20-30 litre kanın işlenmesi ile 1-3 aferez seansı sonunda hedef CD34⁺ hücre düzeyine ulaşmakla birlikte %5-30 hastada, sitokin kullanımına rağmen periferik kandaki düşük HKH düzeyi nedeni ile yeterli hücre toplanamamaktadır. Yetersiz mobilizasyona neden olan en önemli faktörler; yaş, kemik iliği tutulumu, daha önce aldığı kemo-radyoterapilerdir [60-63]. İlk seansta mobilizasyon yetersizliği olan hastaların yaklaşık %50'sinde ikinci mobilizasyonda hedef CD34⁺ hücre düzeyine ulaşılabilir [64]. Bu konuda bir yaklaşım, kemoterapinin 2-4 hafta kesilmesinin ardından yüksek doz (15 µg/kg günde iki kez) G-CSF uygulanması, ikinci bir yaklaşım ise sitokin kombinasyonudur. 1x10⁶ gibi düşük dozda CD34⁺ hücre toplanmasında ise engrafman gecikmesi göz önüne alınarak infüzyon yapılabilir [10]. Buna rağmen, bu uygulamanın yapıldığı hastalarda engrafman yetersizliği izlenmemektedir [65]. Otolog transplantasyon adayı olan hastalarda mobilizasyon yetersizliği yaşamamak için uygulanabilecek yöntemlerden biri de erken dönemde kök hücre toplamaktır.

ÜRÜN YETERLİLİĞİ TANIMI

Afereze ne zaman son verileceğini belirlemek için ürün yeterliliğinin tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemler arasında, kültür ortamında CFU-GM oluşumunun ölçülmesi ve CD34⁺ hücre sayılarının saptanması sayılabilir. Tek başına CD34⁺ hücre veya mononükleer hücre sayımları sağlıklı bir sonuç vermemektedir. Toplanan üründe ki CD34⁺ hücre sayısı; afereze başlandığı anda periferik kanda bulunan CD34⁺ hücre sayısı, işlenen kan hacmi ve aferez cihazının toplama etkinliği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Ayrıca, toplanan ürünün yeterliliğinin değerlendirilmesinde hedeflenen CD34⁺ hücre dozu da önem taşımaktadır. Myeloablatif tedavi rejimleri için daha yüksek sayıda CD34⁺ hücre sayısı hedeflenirken [10, 11], myeloablatif olmayan düşük dozlu tedavi rejimleri için daha az sayıda CD34⁺ hücre toplanması yeterli olabilmektedir [66].

Hazırlanan ürünün hematopoietik potansiyelinin değerlendirilmesinde, kök hücrelerin fonksiyon ve canlılıklarının gösterilmesinde kullanılan en etkili yöntem CFU-GM ölçümleridir. Hücreler yarı katı bir ortam içinde, büyüme faktörleri ile desteklenerek, kültür ortamında çoğaltılmakta ve iki haftalık süre sonunda çeşitli koloni oluşturan hücre toplulukları sayılmaktadır. Juttner ve ark. 6.3x10⁵/kg CFU-GM içeren ürünlerin kullanılması ile tüm hastalarda engrafmanın sağlandığını bildirirken [13], bazı çalışmalarda 2-5x10⁵/kg dozunun yeterli olduğu kabul edilmiştir [67]. Düşük CD34⁺ hücre dozlarında engrafman hızında değişiklikler yaşandığı, özellikle trombosit engrafmanının geciktiği bildirilmiştir. Fred Hutchinson Kanseri Merkezinde yapılan bir çalışmada, 5x10⁶/kg CD34⁺

hücre toplanmasının hızlı trombosit engrafmanı sağladığı tesbit edilmiştir [68]. CD34⁺ hücre miktarının 2x10⁶/kg'dan az olması HKH kaynağından bağımsız olarak transplant ilişkili mortaliteyi artırmaktadır [69].

AFEREZE BAŞLAMA ZAMANI

Otolog veya allojenik kök hücre transplantasyonu planlandığı zaman, mobilizasyonun hangi aşamasında afereze başlanacağı en önemli noktalardan biridir. CD34⁺ hücrelerin periferik kana en fazla geçtiği günü yakalamak ve o gün afereze başlamak gerekir. Bu amaçla, periferik kan CD34⁺ hücre düzeyi izlenmelidir. Yayımlanmış bir çok çalışmada aferez öncesi bakılan periferik kan CD34 pozitif hücre sayıları ile toplanan üründeki CD34⁺ hücre sayıları arasında iyi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [70, 71]. Kesin olmamakla birlikte, mobilizasyon rejiminin başlanmasından yaklaşık 8-13. günler arasında lökosit sayısı 1000/mm³ üzerine çıktığında, periferik kan CD34⁺ hücre düzeyleri >20/µl olduğu zaman yeterli ürün elde edilebileceği bildirilmektedir [72]. CD34⁺ hücre düzeyleri 10-20/µl olan hastalarda ise, bu düzey 20/µl üzerine çıktığı zaman işleme başlanır. Bir sonraki gün bakılan CD34⁺ hücre sayısı yine istenen düzeyde değilse yüksek hacimli aferez işlemi yapılarak, birkaç seansta toplama işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Ancak periferik kan CD34⁺ hücre sayısı 5/µl değerinin altında seyretmeye devam eden hastalarda, hücre sayısı ile ürün miktarı arasındaki korelasyonun bozulması nedeniyle yeterli ürün elde edilemeyeceği için toplam işlemi yapılamamaktadır. Kötü mobilizatör olarak kabul edilen bu hasta veya donörlerde alternatif yollar denemek gerekir [73].

Yalnızca donör aferezi için 77 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada maksimum 12 µg/kg/gün 5 doz G-CSF uygulamasını takiben donörlerin %94'ünde hedef CD34⁺ hücre düzeyine ulaşılarak tek bir seansta aferez yapılabildiği gösterilmiştir. Yine aynı hasta grubunda 4 doz G-CSF uygulamasının ardından ise donörlerin %64'ünde hedef CD34⁺ hücre düzeyine ulaşılabildiği bildirilmiş ve G-CSF tedavisinin 4 veya 5. gününde afereze başlanması önerilmiştir [74]. Yine, sağlıklı vericilerde G-CSF verilmesinin ardından CD34⁺ hücre kinetiğinde belirgin farklılıklar yaşanmadığından aferez öncesi periferik kan CD34⁺ hücre sayımları rutin olarak değil, eğer hastanın mobilizasyonunda sorun olacağı düşünülüyorsa veya tek bir aferez ile yeterli ürün toplanması hedeflenmiş ve kısa sürede CD34⁺ hücre sayımı yaparak afereze başlamak mümkün ise önerilmektedir [75].

AFEREZ TEKNOLOJİSİ

Aferez cihazlarının sağlıklı trombosit vericilerinde herhangi bir risk oluşturmaksızın yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Kök hücre aferezi işlemlerinde de, trombosit aferezinde olduğu gibi işlem için kullanılacak venöz giriş yerinin sağlanması, işlem sırasında damar dışında dolaşan kan hacminin kontrolü ve kullanılan solüsyonlar temel güvenlik konuları arasında sayılmaktadır. Sağlıklı vericiler için büyük oranda standardize edildiği için önemli sorun oluşturmayan bu noktalar, özellikle otolog kök hücre aferezi yapılacak hastalarda altta yatan hastalığın olumsuz etkileri nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Goldberg ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 554 periferik kan kök

hücre toplama işlemleri sırasında meydana gelen komplikasyonlar değerlendirilmiş, 75 hastanın 74'üne kateter takılması gerektiği, hastaların yarısında en az bir kez kateter tıkanması olduğu, %15 hastada hipokalsemi, %14 hastada hipotansiyon ve %16 hastada ise enfeksiyöz olay saptandığı bildirilmiştir. Bu nedenle, periferik kan kök hücre aferezinin çok iyi monitorizasyon koşulları olmadıkça en az kemik iliği toplama işlemi kadar risk taşıyabileceği göz önünde bulundurulmalıdır [76]. Aferez işleminde genel prensip; periferik kanın santrifüj edilmesi, hücrelerin yer çekiminin etkisiyle çökmesi, en altta kalan eritrosit tabakasının üzerinde lökosit tabakasının dedektör tarafından tesbiti ve ayrı bir torbaya toplanmasıdır. İşlem öncesinde, kanın santrifüj edilmek üzere toplandığı kabın hacmi ve ne miktarda kanın bu kaptan geçerek işlem göreceği belirlenmelidir. Hemodinamisi bozuk hastalarda, sistemin akışını sağlayacak kan hacminin donör için fazla gelebilmesi nedeniyle, daha önceden sistemin hatlarını başka kanla doldurmak yada daha küçük hacimde santrifüj kapları kullanmak gerekebilir. Ayrıca, işlem öncesi hemodinamiyi olumsuz etkilememek için hematokrit düzeyini düşük tutmamakta fayda vardır [77] Aferez cihazındaki bilgisayar programına, aferez işlemi yapılacak kişinin boyu, kilosu ve hematokrit düzeyleri girilerek, kişinin kan hacmi belirlenmelidir. İşlemden geçirilmesi gereken kan miktarı genellikle toplam kan hacminin iki katı kadardır [78]. Genel olarak aferez süresi, 40-80 ml/dk kan akımı hızı ile 10-12 lt kanın işlemden geçmesini sağlayacak şekilde yaklaşık 2-4 saat sürmektedir.

DAMAR YOLU VE KATETER SEÇİMİ

Mobilizasyon rejimi başlamadan önce aferez ekibi tarafından hastanın ve donörün damar yolları gözden geçirilmelidir. Uzun süre damar yolu kullanılması hatta pompa ile geri verilmesi durumu uzun süre dayanabilecek iyi bir damar yolu gereksinimine yol açmaktadır. Bu nedenle periferik kan otolog kök hücre aferez işleminde çok kullanılmaya nedeniyse sertleşmiş ve dayanıksız duruma gelmiş periferik damarlara sahip hastalarda aferez kateteri takılmalıdır. Ancak sağlıklı vericilerde buna nadiren gereksinim duyulmakta ve aferez işlemi yavaş da olsa sürdürülebilmektedir.

Periferik venlerin kullanılması enfeksiyon, hemoraji ve tromboz riskini azaltacaktır. Antekubital yerleşimli olan medial kubital, sefalik ve basilik venler hem alış hem de dönüş yolu olarak tercih edilir. Bu damarlara 16-18 G çelik ince duvarlı iğneler takılarak 120 ml/dk'ya varan akım hızları elde edebilir. Antekubital bölge değerlendirilirken dirsekten 8-10 cm yukarıya bir turnike bağlanır veya tansiyon aleti manşonu kullanılabilir. Dönüş yolu için antekubital venlerin yenilenecek işlemler adına saklanması adına, daha distal venler ve el sırtı kullanılabilir. Giriş yerleri arasında rotasyon yapılması skar ve tromboz oluşum riskini azaltır. Sıcak kompres ve el egzersizleri periferik venöz yolların gelişimine katkıda bulunur. Aferez işleminin olası sayı ve frekansının artması durumunda, işlem periferik damar yolundan sağlamak hastaları rahatsız edebileceği için genellikle santral venöz yola ihtiyaç duyulur. Santral venöz kateter, hickman kateter ve periferik damarlardan elde edilen akım hızları karşılaştırıldığında en yüksek akım hızı hickman kateter ile,

en düşük akım hızı ise periferik damarlardan yapılan aferez ile elde edilmiştir. Geçici ve yarı kalıcı (tünelli) olmak üzere başlıca iki tip kateter ile santral venöz yol sağlanabilir. Geçici santral venöz kateterler genellikle silikon, polivinilklorid veya poliüretan yapısında; geniş-çift lümenli veya daha dar-üç lümenlidir. Daha çok periferik damar yolu bulunamayan allojenik kök hücre donörlerinde kullanılırlar. Kök hücre toplama işleminin daha etkin yapılabilmesi için genellikle geniş ve iki lümenli olan kateterler daha çok tercih edilmektedir. Uzun süreli kullanım için takılan yarı kalıcı kateterler ise ameliyathanede veya girişimsel radyoloji ünitesinde cerrahi cut down ile tünel oluşturularak yerleştirilir. Tünelli olanlar mikrobiyal etkenlere karşı fiziksel bir bariyer görevi yapan antimikrobiyal kaf nedeniyle uzun süre kullanılabilir (6-12 ay). Biri çıkış biri giriş olmak üzere iki bölgesi vardır. Son yıllarda, çoğu merkez genellikle otolog kök hücre naklinde daha fazla olmak üzere, boyları daha uzun (28 cm), silikon oldukları için negatif basınç altında kollabe olmayan, ağız kısımları L şeklinde olduğu için resirkülasyon oranları daha düşük olan, kafalı ve Hickman benzeri hemaferaz kateterlerini (Quinton Raaf, Bard Hickman, Kimal, Medcomp vb) daha sık kullanmaktadır [79] Katetere bağlı en sık görülen komplikasyon tromboz olup, insidansı yaklaşık %1,8'dir [80]. Mobilizasyon işlemi sırasında GM-CSF kullanımı tromboz riskini artırmaktadır [81]. Özellikle, subklavyen vendeki tromboz olasılığı oldukça yüksektir [82]. Tıkanan kateterlerin açılmasında streptokinaz, urokinaz ve rekombinan doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) kullanılabilir.

AFEREZ CİHAZLARI

Periferik kandan kök hücreyi ayıran çok sayıda aferez cihazı bulunmaktadır. Sürekli ve sürekli olmayan akım cihazları şeklinde sınıflandırılabilirler. Sürekli olmayan akım cihazlarının en büyük dezavantajı tek girişi bulunmasıdır. Sürekli akım cihazlarında kanın geri dönüşünü sağlayan ikinci bir yol bulunmakla birlikte, kısa zaman içinde çok büyük hacimde kan işlenmektedir. Bazı cihazlar toplanan granülosit ve trombosit miktarını azaltarak, bu hücrelerin dondurma ve diğer laboratuvar işlemleri ile etkileşimini engellerler. Aferez işlemi sırasında hangi cihazın kullanılacağı merkezin gereksinimi ve tecrübesine göre değişmektedir.

YÜKSEK HACİMLİ LÖKOFEREZ İŞLEMLERİ

Her aferez cihazının kabaca sabit, tekrarlanabilir bir hücre toplama etkinliğinin bulunması nedeniyle, sabit bir işlem düşünüldüğü zaman toplanan CD34⁺ hücre sayısı ile direkt orantı göstermektedir. Daha fazla sayıda CD34⁺ hücre toplanması ya periferik kanda bulunan CD34⁺ hücre sayısının yada işlenen kan hacminin artırılması ile sağlanabilir. Bu işleme yüksek hacimli lökoferez (YHL) işlemi adı verilmektedir [83, 84]. YHL işlemi sırasında, 15-40 lt kan 6-8 saatlik sürede işlenebilmektedir. YHL'in başlıca avantajı, daha az sitokin kullanarak daha az sayıda aferez yapılması ve bu nedenle maliyetin azalmasıdır. Standart kök hücre aferezine göre teknik açıdan bir fark olmamakla birlikte, YHL işlemlerinde sürenin kısaltılabilmesi için daha yüksek akım hızları kullanılmaktadır. En önemli dezavantajları ise, işlem başına

düşen aferez süresinin uzaması, kullanılan sitrat veya diğer antikoagülanların dozlarında ki artış nedeniyle yan etki olasılığının artması, özellikle trombosit sayılarında belirgin düşüş, PTT uzaması ve elektrolit dengesizliğidir. Bununla birlikte, YHL daha az aferez ile yeterli kök hücre toplanması hedeflenen ve mobilizasyona yanıtı düşük olan hastalarda tercih edilmesi gereken bir yöntemdir [83]

ANTİKOAGÜLASYON VE SİTRAT TOKSİSİTESİ

Aferez işlemi sırasında ekstrakorporéal hacimde pıhtılaşmayı ve hücrelerin birbiri üzerine kümelenmesini önlemek amacıyla antikoagülanlar eklenir. Bunun için en sık sitrat antikoagülanları kullanılır. En büyük riski iyonize kalsiyum seviyesinin düşmesi ile karakterize sitrat toksisitesidir. Periferik kan kök hücre aferezi sırasında iyonize kalsiyum seviyesi aferez sonrası işlenen kan miktarı ve sitrat konsantrasyonu ile ilgili olarak %13.3 ile %35 oranında düşme gösterebilir. Hastaların yaklaşık %20'sinde belirti oluşturan hipokalsemi gözlenmektedir. Bununla birlikte çoğunda oral kalsiyum replasmanı yeterli olur. Hastaların ancak %1-2'sinde intravenöz kalsiyum replasmanı gerektiren ciddi hipokalsemi meydana gelmektedir. Türkiye'nin 1998 yılı verilerinin yayınlandığı bir makalede 525 kök hücre aferezi sırasında 82 yan etki gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bunlardan yaklaşık %20'si parestezidir ve semptomların çoğunun hafif düzeyde olduğu belirtilmektedir [85].

İyonize kalsiyum seviyesi 3 mg/dl düzeyinin üstünde olduğunda genellikle hipokalsemi semptomları gözlenmez. Kan kalsiyum düzeyi bir miktar düştüğünde parmak uçlarından başlayan parestezi, kas krampları, tremor, anksiyete, üşüme hissi, baş dönmesi gibi belirtiler oluşur [86]. Fizik incelemede, Chovestec (fasial sinirin zigomatik dalı üzerine vurulmasıyla yüzün perküsyon yapılan noktaya doğru seyirmesi) ve Trousseau (tansiyon aletinin sistolik kan basıncı üzerinde şişirilerek 3-5 dk beklenmesiyle parmaklarda ebe eli denilen parmak spazmının oluşması) belirtileri pozitifdir. Bu dönemde EKG'de QT mesafesinde uzama gözlenir. Daha ağır olgularda grand-mal epileptik nöbetler, tetani, laringospazm ve ciddi kardiyak aritmiler gelişir [86]. Sitrat infüzyon hızı 1 mg/kg/dk'nın altındaysa sağlıklı bir kişide bu bulgular gözlenmez veya çok hafif seyredir. Bu nedenle profilaktik kalsiyum replasmanı önerilmez.

Hipokalsemi belirtileri gözlenen olgularda; (1) İşlemin kan akım hızı düşürülebilir, (2) ACD oranı azaltılabilir, (3) Eğer replasman sıvısı olarak taze donmuş plazma (TDP) veriliyorsa bunun hızı azaltılabilir (4) ACD yerine ACD-heparin solusyonuna geçilebilir [87], (5) Hastaya oral olarak Ca^{+2} içeren sıvılar veya oral Ca^{+2} preparatı verilebilir. Eğer semptomlar ağır ve belirtilen yöntemlerle geçmiyorsa intravenöz Ca^{+2} replasmanı uygulanabilir. Bu durumda, dönüş sıvısı TDP veya kriyosüpernatant plazma içeriyorsa, replasmanın ayrı bir damar yolundan yapılmasına dikkat edilmelidir. Eğer replasman sıvısı albumin ise Ca^{+2} direkt olarak mayi içine verilebilir.

TÜMÖR HÜCRELERİNİN KONTAMİNASYONU

Farklı malign hastalıkları olan birçok hastada periferik kan kök hücre aferezi ile toplanan üründe tümör hücreleri ile kontaminasyon olabildiği PCR, akım sitometrisi, klonalite

analizleri gibi değişik yöntemler kullanılarak gösterilmiştir [88-91]. Genelde kemik iliğinden toplanan ürünler karıştırıldığı zaman periferik kan kök hücre aferezi ile toplanan üründe hem daha az sıklıkta hem de daha az sayıda tümör hücre kontaminasyonu olduğu bilinmektedir [88, 89]. Ancak periferik kandan elde edilen bu ürünler ile yapılan transplantasyonlar sonrasında daha az relaps oluşup oluşmadığı henüz netlik kazanmamıştır [92, 93]. Yapılan çalışmalarda sadece G-CSF ile veya G-CSF+kemoterapi ile yapılan mobilizasyonlarda toplanan üründe tümör hücre kontaminasyonu açısından farklılık bulunmamıştır [94]. Tümör hücre kontaminasyonunun azaltılması için, kök hücre işlemlerinin tedaviler sonrası tümör yükünün en aza indirildiği remisyon dönemlerinde yapılması önerilmektedir [95].

Sonuç olarak, aferez ile kök hücre toplanmasının genel prensipleri iyi belirlenmiş olmakla birlikte, sağlıklı donörlerdeki sitokin tedavisi ile kök hücre mobilizasyonu, kan bankası işlemlerinin kontrolü ve güvenliğiyle ilgili hala bazı tartışmalar devam etmektedir. Deneyimli bir aferez ekibi için, uygulanacak yöntemler, bu yöntemlere bağlı görülebilecek yan etkilerin iyi bilinmesi ve bu konuda donörlerin bilgilendirilmesi yapılacak işlemin kalitesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Tablo 1. G-CSF Uygulanan Normal Vericilerdeki Somatik Yakınma İnsidansı

Çalışma faktörleri	Anderlini ve ark.	Stroncek ve ark.	Bishop ve ark.
Verici sayısı	43	85	41
G-CSF dozu	6 µg/kg/gün	2-10 µg/kg/gün	5 µg/kg/gün
Semptom			
Halsizlik	%82	%86	%83
Baş ağrısı	%70	%28	%44
	%20	%14	-
Yorgunluk			
Ateş	-	-	%27
Titreme	-	-	%22
Bulantı	%10	%11	%22

Referanslar

1. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood Rev* 2004; 18: 167-179.
2. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, et al. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 2002; 100: 1525-1531.
3. Serody JS, Sparks SD, Lin Y, et al. Comparison of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)--mobilized peripheral blood progenitor cells and G-CSF--stimulated bone marrow as a source of stem cells in HLA-matched sibling transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 434-440.
4. Storek J, Gooley T, Siadak M, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1997; 90: 4705-4709.
5. Mohty M, Kuentz M, Michallet M, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood* 2002; 100: 3128-3134.
6. Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002; 100: 415-419.
7. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988; 1: 1194-1198.
8. Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, et al. Biological characterization of CD34+ cells mobilized into peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 Suppl 5: 47-50.
9. Papayannopoulou T. Hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. A continuing quest for etiologic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1999 ; 872: 187-97.
10. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *Clin Oncol* 1995; 13: 2547-2555.
11. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995; 86: 3961-3969.
12. Spitzer G, Adkins DR, Spencer V, Randomized study of growth factors post-peripheral-blood stem-cell transplant: neutrophil recovery is improved with modest clinical benefit. *J Clin Oncol* 1994; 12: 661-670.
13. Juttner CA, To LB, Ho JQ et al. Early lymphohemopoietic recovery after autografting using peripheral blood stem cells in acute non-lymphoblastic leukemia. *Transplant Proc* 1988; 20: 40-42.
14. Brice P, Marolleau JP, Dombret H, et al. A utologous peripheral blood stem cell transplantation after high dose therapy in patients with advanced lymphomas. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 337-342.
15. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, et al. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Ex Hematol* 1990; 18: 442-447.
16. Siena S, Bregni M, Brando B, 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: 1905-1914.
17. De Arriba F, Lozano ML, Ortuno F, et al. Prospective randomized study comparing the efficacy of bioequivalent doses of glycosylated and nonglycosylated rG-CSF for mobilizing peripheral blood progenitor cells. *Br J Haematol* 1997; 96: 418-420.
18. Lane TA, Law P, Maruyama M, et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1995; 85: 275-282.
19. Tjonnfjord GE, Steen R, Evensen SA, et al. Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1994; 84: 2795-2801.
20. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, et al. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 1995 ; 86: 4437-4445.
21. Brown RA, Adkins D, Goodnough LT, et al. Factors that influence the collection and engraftment of allogeneic peripheral-blood stem cells in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3067-3074.
22. Bishop MR, Tarantolo SR, Jackson JD, et al. Allogeneic-blood stem-cell collection following mobilization with low-dose granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Oncol* 1997; 15: 1601-1607.
23. Stroncek DF, Clay ME, Petzoldt ML, et al. Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. *Transfusion* 1996; 36: 601-610.
24. Waller CF, Bertz H, Wenger MK, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: efficacy and toxicity of a high-dose rhG-CSF regimen. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 279-283.
25. Anderlini P, Donato M, Lauppe MJ, 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: 770-772.
26. Anderlini P, Przepiorka D, Seong C, et al. Factors affecting mobilization of CD34+ cells in normal donors treated with filgrastim. *Transfusion* 1997; 37: 507-512.
27. Weaver CH, Longin K, Buckner CD, et al. Lymphocyte content in peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 411-415.
28. Pan L, Delmonte J Jr, Jalonen CK, et al. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor

- polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86: 4422-4429.
29. Zeng D, Dejbakhsh-Jones S, Strober S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor reduces the capacity of blood mononuclear cells to induce graft-versus-host disease: impact on blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1997; 90: 453-463.
30. Glass B, Uharek L, Zeis M, et al. Allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation in a murine model: evidence for an improved graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 1997; 90: 1694-1700.
31. Becker PS, Wagle M, Matous S, et al. Spontaneous splenic rupture following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): occurrence in an allogeneic donor of peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997; 3: 45-49.
32. Anderlini P, Korbling M, Dale D, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. *Blood* 1997; 90: 903-908.
33. Sohngen D, Wiene S, Siebler M, et al. Analysis of rhG-CSF-effects on platelets by in vitro bleeding test and transcranial Doppler ultrasound examination. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 1087-1090.
34. LeBlanc R, Roy J, Demers C, et al. A prospective study of G-CSF effects on hemostasis in allogeneic blood stem cell donors. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 991-996
35. Snowden JA, Biggs JC, Milliken ST, et al. A randomised, blinded, placebo-controlled, dose escalation study of the tolerability and efficacy of filgrastim for haemopoietic stem cell mobilisation in patients with severe active rheumatoid arthritis. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 1035-1041.
36. Parkkali T, Volin L, Siren MK, et al. Acute iritis induced by granulocyte colony-stimulating factor used for mobilization in a volunteer unrelated peripheral blood progenitor cell donor. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 433-434.
37. Salloum E, Stoessel KM, Cooper DL. Hyperleukocytosis and retinal hemorrhages after chemotherapy and Filgrastim administration for peripheral blood progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 835-837.
38. Esmaeli B, Ahmadi MA, Kim S, et al. Marginal keratitis associated with administration of filgrastim and sargramostim in a healthy peripheral blood progenitor cell donor. *Cornea* 2002; 21:621-622.
39. Makita K, Ohta K, Mugitani A, et al. Acute myelogenous leukemia in a donor after granulocyte colony-stimulating factor-primed peripheral blood stem cell harvest. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 661-665.
40. Eto T, Takamatsu Y, Harada M, et al. Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on the mobilization of peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 125-129.
41. Pettengell R, Woll PJ, Chang J, et al. Effects of erythropoietin on mobilisation of haemopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 125-130.
42. Geissler K, Valent P, Mayer P, et al. Recombinant human interleukin-3 expands the pool of circulating hematopoietic progenitor cells in primates--synergism with recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 75: 2305-2310.
43. Bishop MR, Jackson JD, O'Kane-Murphy B, et al. Phase I trial of recombinant fusion protein PIXY321 for mobilization of peripheral-blood cells. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2521-2526.
44. Moskowitz CH, Stiff P, Gordon MS, et al. Recombinant methionyl human stem cell factor and filgrastim for peripheral blood progenitor cell mobilization and transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients--results of a phase I/II trial. *Blood* 1997; 89: 3136-3147.
45. Winter JN, Lazarus HM, Rademaker A, et al. Phase I/II study of combined granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administration for the mobilization of hematopoietic progenitor cells. *J Clin Oncol* 1996; 14: 277-286.
46. Ho AD, Young D, Maruyama M, et al. Pluripotent and lineage-committed CD34+ subsets in leukapheresis products mobilized by G-CSF, GM-CSF vs. a combination of both. *Exp Hematol* 1996; 24: 1460-1468.
47. Cantin G, Marchand-Laroche D, et al. Blood-derived stem cell collection in acute nonlymphoblastic leukemia: predictive factors for a good yield. *Exp Hematol* 1989; 17: 991-996.
48. Femand JP, Levy Y, Gerota J, et al. Treatment of aggressive multiple myeloma by high-dose chemotherapy and total body irradiation followed by blood stem cells autologous graft. *Blood* 1989; 73: 20-23.
49. Lazzarino M, Corso A, Barbarano L, et al. DCEP (dexamethasone, cyclophosphamide, etoposide, and cisplatin) is an effective regimen for peripheral blood stem cell collection in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 835-839.
50. Mollee P, Pereira D, Nagy T, et al. Cyclophosphamide, etoposide and G-CSF to mobilize peripheral blood stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2002; 3: 273-278.
51. Demirer T, Buckner CD, Gooley T, et al. Factors influencing collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 937-941.
52. Alegre A, Tomas JF, Martinez-Chamorro C, et al. Comparison of peripheral blood progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma: high-dose cyclophosphamide plus GM-CSF vs G-CSF alone. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 211-217.
53. Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J, et al. Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation. *Blood* 2001; 98: 2059-2064.
54. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Randomized cross-over trial of progenitor-cell mobilization: high-dose cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus G-CSF. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1824-1830.
55. Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and

- without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1992; 1: 317-327.
56. Demirer T, Buckner CD, Storer B, et al. Effect of different chemotherapy regimens on peripheral-blood stem-cell collections in patients with breast cancer receiving granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 1997; 15: 684-690.
57. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; 3: 687-694.
58. King AG, Horowitz D, Dillon SB, et al. Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRObeta. *Blood* 2001; 97: 1534-1542.
59. Pruijt JF, van Kooyk Y, Figdor CG, et al. Anti-LFA-1 blocking antibodies prevent mobilization of hematopoietic progenitor cells induced by interleukin-8. *Blood* 1998; 91: 4099-4105.
60. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, et al. Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br J Haematol* 1994; 87: 825-831.
61. Haas R, Mohle R, Fruhauf S, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83(12): 3787-3794.
62. Tricot G, Jagannath S, Vesole D, et al. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood*. 1995; 85: 588-596.
63. Weaver CH, Schwartzberg LS, Birch R, et al. Collection of peripheral blood progenitor cells after the administration of cyclophosphamide, etoposide, and granulocyte-colony-stimulating factor: an analysis of 497 patients. *Transfusion* 1997; 37:896-903.
64. Fraipont V, Sautois B, Baudoux E, et al. Successful mobilization of peripheral blood HPCs with G-CSF alone in patients failing to achieve sufficient numbers of CD34+ cells and/or CFU-GM with chemotherapy and G-CSF. *Transfusion* 2000; 40: 339-347.
65. Weaver CH, Potz J, Redmond J, et al. Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19: 1103-1110.
66. Shen V, Woodbury C, Killen R, et al. Collection and use of peripheral blood stem cells in young children with refractory solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 197-204.
67. Bender JG, To LB, Williams S, et al. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1: 329-341.
68. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood*. 1993; 81: 3158-3163.
69. Singhal S, Powles R, Treleaven J, et al. A low CD34+ cell dose results in higher mortality and poorer survival after blood or marrow stem cell transplantation from HLA-identical siblings: should 2 x 10(6) CD34+ cells/kg be considered the minimum threshold? *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 489-496.
70. Schots R, Van Riet I, Damiaens S, The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 509-15.
71. Elliott C, Samson DM, Armitage S, et al. When to harvest peripheral-blood stem cells after mobilization therapy: prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood. *J Clin Oncol* 1996; 14: 970-973.
72. Krieger MS, Schiller G, Berenson JR, et al. Collection of peripheral blood progenitor cells (PBPC) based on a rising WBC and platelet count significantly increases the number of CD34+ cells. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 25-28.
73. Lökaferez. Ö. Aslan. Kan ve Kemik İliği Transplantasyon Kurs Kitabı, Çeşme, 2004.
74. Korbling M. Collection of allogeneic peripheral blood stem cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 41-55.
75. Anderlini P, Przepiorcka D, Huh Y, et al. Duration of filgrastim mobilization and apheresis yield of CD34+ progenitor cells and lymphoid subsets in normal donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol*. 1996; 93: 940-942.
76. Sutton DM, Nair RC, Rock G. Complications of plasma exchange. *Transfusion* 1989; 29: 124-127.
77. Kök Hücre Aferezi. S. Kalayoğlu-Beşışık. I. Hemaferez Atolye Çalışması Kurs Kitabı, İstanbul, 2002.
78. Schmitz N, Linch DC, Dreger P, et al. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 353-357.
79. Donör Aferezi ve Terapötik Aferezde Damar Yolu Sağlanması. M. Arat. I. Aferez Kongresi, Konuşma Özetleri Kitabı, İstanbul, 2003.
80. Alegre A, Requena MJ, Fernandez-Villalta MJ, et al. Quinton-Mahurkar catheter as short-term central venous access for PBSC collection: single-center experience of 370 aphereses in 110 patients. *Bone Marrow Transplant*. 1996 Nov;18(5):865-9.
81. Stephens LC, Haire WD, Schmit-Pokorny K, et al. Granulocyte macrophage colony stimulating factor: high incidence of apheresis catheter thrombosis during peripheral stem cell collection. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 51-54.
82. Haire WD, Lieberman RP, Lund GB, Translumbar inferior vena cava catheters: safety and efficacy in peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion* 1990; 30: 511-515.
83. Sohn SK, Kim JG, Chae YS, et al. Large-volume leukapheresis using femoral venous access for harvesting peripheral blood stem cells with the Fenwal CS 3000 Plus

- from normal healthy donors: predictors of CD34+ cell yield and collection efficiency. *J Clin Apheresis* 2003; 18: 10-15.
84. Desikan KR, Jagannath S, Siegel D, et al. Collection of more hematopoietic progenitor cells with large volume leukapheresis in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 501-508.
85. Ilhan O, Uskent N, Arslan O, et al. National survey of hemapheresis practice in Turkey (1998). *Transfus Sci* 2000; 22: 195-201.
86. Huestis DW. Risks and safety practices in hemapheresis procedures. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 273-278.
87. Gorlin JB, Humphreys D, Kent P, et al. Pediatric large volume peripheral blood progenitor cell collections from patients under 25 kg: a primer. *J Clin Apher* 1996; 11: 195-203.
88. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1993; 82: 2605-2610.
89. Moss TJ, Cairo M, Santana VM, et al. Clonogenicity of circulating neuroblastoma cells: implications regarding peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 1994; 83: 3085-3089.
90. Mariette X, Femand JP, Brouet JC. Myeloma cell contamination of peripheral blood stem cell grafts in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 47-50.
91. Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA, et al. Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortened relapse-free survival after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 337-342.
92. Sharp JG, Kessinger A, Mann S, et al. Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 1996; 14: 214-219.
93. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83: 636-640.
94. Passos-Coelho JL, Ross AA, et al. Similar breast cancer cell contamination of single-day peripheral-blood progenitor-cell collections obtained after priming with hematopoietic growth factor alone or after cyclophosphamide followed by growth factor. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2569-2575.
95. McCann JC, Kanteti R, Shilepsky B, Miller KB, Sweet M, Schenkein DP. High degree of occult tumor contamination in bone marrow and peripheral blood stem cells of patients undergoing autologous transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996; 2: 37-43.