TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ALLOJENİK PERİFERİK KAN KAYNAKLI KÖK HÜCRE VERİCİLERİNDE REKOMBİNAN İNSAN GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖRÜN GENOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Dr. Hasan Fatih ÇAKMAKLI

ÇOCUK HEMATOLOJİ VE ONKOLOJİ BİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Talia İLERİ

Ankara
2013

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ALLOJENİK PERİFERİK KAN KAYNAKLI KÖK HÜCRE VERİCİLERİNDE REKOMBİNAN İNSAN GRANÜLOSİT KOLONİ STİMÜLE EDİCİ FAKTÖRÜN GENOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Dr. Hasan Fatih ÇAKMAKLI

ÇOCUK HEMATOLOJİ VE ONKOLOJİ BİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Talia İLERİ

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından 12B3330022 proje numarası ile desteklenmiştir.

Ankara
2013

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Hasan Fatih Çakmaklı	**Tarih:** 21 / 06 / 2013
Anabilim/Bilim Dalı	: Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Doç. Dr. Talia İleri	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: Allojenik Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre Vericilerinde Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktörün (rhG-CSF) Genotoksisite Üzerine Etkisi			
Tezin Niteliği:	☐ Ana Dal Uzmanlık Tezi	**X** Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	**X**1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

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

X Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

oy birliği ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

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

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Zümrüt Uysal

Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Mehmet Ertem

Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Talia İleri

Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve yan dal uzmanlık eğitimime önemli katkıları bulunan, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Talia İleri'ye;

Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı'nda eğitimime başladığım ilk günden itibaren samimi yaklaşımlarıyla bende aidiyet duygusu oluşturan, kendilerinden uzmanlık alanımıza, mesleğe ve hayata dair çok değerli bilgiler edindiğim ve pek çok konuda desteklerini aldığım saygıdeğer hocalarım Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Zümrüt Uysal, Prof. Dr. Mehmet Ertem ve Doç. Dr. Elif Ünal İnce'ye;

Genç hekimlere karşı her zaman sevgi dolu ve eğitim öncelikli davranışları nedeniyle, seçimlerimizle ilgili özgür karar almamızı destekleyen Prof. Dr. Gülsan Yavuz başta olmak üzere Prof. Dr. Emel Ünal, Prof. Dr. Nurdan Taçyıldız ve Doç. Dr. Handan Dinçaslan'a;

Üyesi olmaktan gurur duyduğum Ankara Üniversitesi Çocuk Hasalıkları Ana Bilim Dalı'nın tüm öğretim üyeleri, asistanları ve personeline;

Tez çalışmamın laboratuar çalışmalarının büyük kısmını tek başına üstlenen ve mesai dışında da yoğun emek veren Biyolog Dr. Hafize Gökçe'ye ve yardımlarından dolayı Uzman Biyolog Ceyda Gürman'a;

Bu tez çalışmasının planlanmasında ve yürütülmesinde önemli katkısı olan Adli Tıp Enstitüsü'nden Doç. Dr. Zeliha Kayaaltı ve Uzman Biyolog Esma Söylemez'e;

Kemik iliği vericilerinden oluşan ve toplanmasında oldukça zorlandığımız çalışma grubunun oluşturulmasına katkıda bulunan Gülhane Tıp Akademisi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bölümü'nden Uzm. Dr. İbrahim Eker'e ve Ankara ÜTF Erişkin Hematoloji ve Çocuk İmmünoloji Bölümlerine ve Hacettepe ÜTF Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bölümü'ne;

Tez çalışmamın istatistik değerlendirmelerini gerçekleştiren arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Murat Akyıldız'a;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez sürecim boyunca da hep yanımda olan ve yardımını esirgemeyen sevgili eşim Uzm. Dr. Gül Yalçın Çakmaklı'ya ve canım aileme;

Teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin gerçekleşmesinde Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu tarafından 12B3330022 proje numarası ile desteğinin büyük katkısı olmuştur.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ i
KABUL VE ONAY ii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER VE KISALTMALAR vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
TABLOLAR DİZİNİ viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör 3
2.1.1 Hematopoez ve Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör 3
2.1.2 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör ve Tipleri 5
2.1.3 Doğal ve Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktörün Etkileri 6
2.1.4 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Klinik Uygulamaları 9
2.1.5 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Yan Etkileri 10
2.2 Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu (HKHT) 12
2.2.1 Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonunun Tarihçesi 13
2.2.2 Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonunda Kök Hücre Kaynakları 14
2.2.3 Kök Hücrelerin Kemik İliğinden Mobilizasyonu 16
2.2.4 Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre Transplantasyonunu 18
2.2.5 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Kanser Gelişimi ile İlişkisi 20
2.2.6 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Genotoksisite Üzerine Etkileri 22
2.3 Genotoksisite 25
2.3.1 Mikronükleus Testi 25

2.3.2.Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) 28
2.3.3 Comet Testi 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. Gereç 32
3.1.1 Çalışma ve Kontrol Grubu 32
3.1.2 Çalışma Deseni 33
3.2 Yöntemler 34
3.2.1 Mikronükleus Testi ve Nükleer Bölünme İndeksi 34
3.2.2 Comet Testi 36
3.2.3 İstatistiksel yöntem 38
4. BULGULAR 39
4.1 Tanımlayıcı veriler 39
4.2 Laboratuvar Testlerinin Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi 40
4.3 Çalışma Grubunda Mikronükleus Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması 41
4.4 Çalışma Grubunda Nükleer Bölünme İndeksi Sonuçlarının Karşılaştırılması 42
4.5 Çalışma Grubunda Comet Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması 44
4.7 Çalışma Grubunda CD34 Sayısını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi 47
4.8 Çalışma Grubunda Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktörün Tam Kan Sayımı Parametreleri Üzerine Etkisi 49
5. TARTIŞMA 53
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 59
ÖZET 61
SUMMARY 63
7. KAYNAKLAR 65

SİMGELER VE KISALTMALAR

A-HKHT	**:**	Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
AML	**:**	Akut Miyeloid Lösemi
APK-HKHV	**:**	Allojenik Periferik Kan Kaynaklı Hematopoetik Kök Hücre Vericileri
APK-KHHT	**:**	Allojenik Periferik Kan Kaynaklı Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
CD	**:**	*Cluster of differantiation*
CIBMTR	**:**	*The Center for International Blood & Marrow Transplant Research*
EBMT	**:**	Avrupa Kan ve Kemik İliği Transplantasyon Grubu (*European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation*)
G-CSF	**:**	Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*)
GVHH	**:**	Graft Versus Host Hastalığı
Hb	**:**	Hemoglobin
HLA	**:**	İnsan Lökosit antijenleri (*Human Leucocyte Antigens)*
HKHT	**:**	Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
IL	**:**	İnterlökin
MCV	**:**	*Mean Corpuscular Volume*
MDS	**:**	Miyelodisplastik Sendrom
MN	**:**	Mikronükleus
MNT	**:**	Mikronükleus Testi
NBİ	**:**	Nükleer Bölünme İndeksi
PK-HKHT	**:**	Periferik Kan Kaynaklı Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
rhG-CSF	**:**	Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
SKY	**:**	Spektral Karyotyping Analysis
TMN	**:**	Total Mikronükleus Sayısı
TNF- α	**:**	*Tumor Necrosis Factor- α*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. Hemotopoetik sistemin önemli hücrelerinin farklılaşma yolları ve hematopoeze pozitif yönde etki eden faktörlerin şematik gösterilmesi 4
Şekil 2.2. Şematik(A) ve fotografik (B) MN oluşum ve görünümü. 26
Şekil 2.3: MN oluşumunun değişik mekanizmaları 27
Şekil 2.4. Comet yöntemi ile farklı derecelerde hasarlanmış lenfositlerin gümüş nitrat boyası ile görünümü 30
Şekil 3.1. NBİ hesaplanmasında kullanılan alanlardan biri 36
Şekil 3.2. BAB Bs Otomatik Analiz Sistemi 37
Şekil 4.1. Çalışmamızda elde ettiğimiz mikronükleus görüntüleri: sırasıyla bir (A), iki (B) ve üç (C) mikronüsleuslu binükleer hücreler 41
Şekil 4.2. Çalışma grubunda TMN değerlerinin karşılaştırılması 42
Şekil 4.3. Çalışma grubundan bir vericinin NBİ incelemeleri.....43
Şekil 4.4. Çalışma grubunda NBİ sonuçlarının karşılaştırılması.....43
Şekil 4.5. Comet testinde farklı düzeylerde DNA hasarı bulunan lenfositlerin floresan mikroskopta görünümleri (A-E). 44
Şekil 4.6. Çalışma grubunda Olive'in kuyruk momenti sonuçlarının karşılaştırılması.....45
Şekil 4.7. Çalışma grubunda periferik kanda CD34 sayısı ile 0. gün beyaz küre sayıları arasındaki ilişki 48

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. Fransa'da sağlıklı vericilere rhG-CSF verilemesine engel oluşturan kontrendikasyonlar (4) 11

Tablo 4.1. Kontrol grubu ile çalışma grubunun bazal değerlerinin genotoksisite inceleme sonuçları açısından karşılaştırılması 46

Tablo 4.2. Çalışma ve kontrol grubunun genotoksisite inceleme sonuçları.....47

Tablo 4.3. Cinsiyete ve rhG-CSF türüne göre CD34 sayılarının karşılaştırılması 48

Tablo 4.4. rhG-CSF'in tam kan sayımı parametrelerinin ortalamaları üzerine olan etkisi.....50

Tablo 4.5. Çalışma grubuna ait tanımlayıcı bilgiler, genotoksisite incelemeleri ve CD34 sayım sonuçları.....51

Tablo 4.6. Kontrol grubuna ait tanımlayıcı bilgiler ve genotoksisite incelemeleri ve CD34 sayım sonuçları.....52

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*, G-CSF) granülopoezin ana düzenleyicisidir. Nötrofilik serinin çoğalmasını, olgunlaşmasını ve yaşamını olumlu etkiler. Bu özellikleri nedeniyle başta malin hastalıklarda olmak üzere, nötropeni ve buna bağlı komplikasyonları azaltmak amacı ile faydalı olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla rekombinan olarak insan granülosit koloni stimüle edici faktörü (rhG-CSF) üretilmiştir. rhG-CSF bu hasta gruplarında uzun yıllardır başarıyla kullanılmaktadır. Günümüzde rhG-CSF'in sıkça kullanıldığı bir diğer alan ise hematopoetik kök hücre naklidir. Burada amaç rhG-CSF ile hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğinden periferik kana mobilizasyonunun sağlanmasıdır (1). Dünyada yılda 50.000'den fazla hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) yapılmaktadır Otolog HKHT'lerin % 99'unda, allojenik HKHT'lerin % 72'sinde rhG-CSF kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunun sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (2, 3). rhG-CSF'in kısa dönem yan etkileri genellikle iyi tolere edilebilmekle birlikte uzun dönemli etkileri ile ilgili belirsizlikler bulunmaktadır. rhG-CSF'in özellikle akut miyeloid lösemi (AML) ve miyelodisplastik sendrom (MDS) gelişimine yol açabileceği şüphesi nedeniyle, malinite sıklığını arttırdığı ile ilgili çekinceler ortaya çıkmıştır Bu konuda yapılmış birçok klinik ve preklinik çalışmaya rağmen malin dönüşüme neden olup olmadığı günümüzde halen netleştirilememiştir (4). Bu durum özellikle sağlıklı ve gönüllü olan allojenik periferik kan kaynaklı kök hücre vericilerinde (APK-HKHV) büyük önem taşımaktadır. Uzun dönem etkileri net olmayan bir ilacın hem akraba dışı vericilerde, hem de bir yakınında malinite gelişmiş akraba içi sağlıklı vericilerde kullanımı etik tartışmaları gündeme getirmiştir (5).

Bu çalışmamızda birincil amacımız, kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonu için rhG-CSF verilen sağlıklı periferik kök hücre vericileri gelişebilecek olası genotoksik etkileri değerlendirilmekti. Bu amaçla çalışmaya katılan bireylerin kan örneklerinden elde edilen lenfositler prospektif olarak Mikronukleus (MN), nükleer bölünme indeksi (NBİ) ve Comet testleri ile incelendi. Sağlıklı vericilerden rhG-CSF verilmeden önce, 5 günlük rhG-CSF uygulamasından

sonra-aferez işleminden hemen önce ve kök hücre toplanmasından 1 ay sonra kan örnekleri alınarak belirtilen incelemeler yapıldı. İkincil amacımıza yönelik olarak ise rhG-CSF'in, tam kan parametreleri ve CD34 sayıları üzerine etkilerini değerlendirdik. Bu çalışmanın sonuçlarının, günümüzde sıkça kullanılan ve yeni kullanım alanları ile ilgili araştırmaların devam etmekte olduğu rhG-CSF'in olası genotoksik etkileriyle ilgili literatüre katkıda bulunacağı ve daha sonra yapılabilecek çalışmalara da yön vereceği düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör

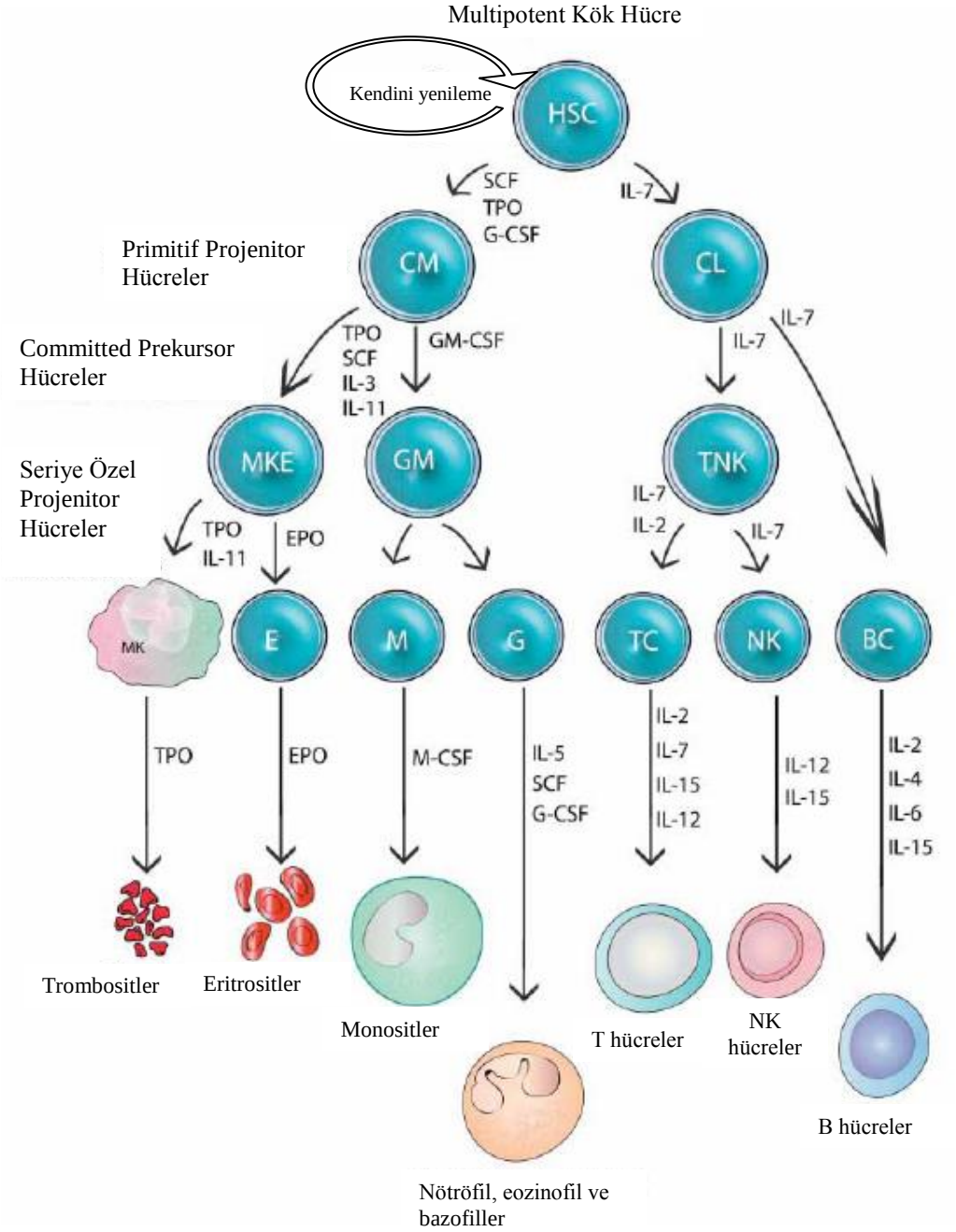
2.1.1 Hematopoez ve Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör

Hematopoetik hücrelerin üretimi, hematopoetik sitokinlerin sıkı kontrolü altındadır (Şekil 2.1). Hematopoetik öncül hücreler hematopoetik farklılaşmanın ilerleyen aşamalarında farklı sitokinlerin etkileriyle farklı olgun hematopoetik hücrelere dönüşür. Hematopoetik büyüme faktörleri kalabalık bir sitokin ailesidir. Hematopoetik hücrelerin yaşamını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederler. Bu faktörlerin anlaşılması ve son 30 yılda klinik kullanıma girmesi ile birçok hematolojik hastalıkla ilgili önemli gelişmeler yaşanmıştır. En önemlileri arasında G-CSF, Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör, Eritropoetin, İnterleukin (IL) 3, Trombopoetin, Stem Cell Faktörü sayılabilir (6).

Nötrofiller enfeksiyona karşı organizmanın en önemli savunma araçlarından biridir. Diğer hematopoetik hücreler gibi nötrofillerin çoğalması, farklılaşması ve olgunlaşması da sitokinlerce yakından kontrol edilmektedir. Miyeloid büyüme faktörleri, bir veya daha çok miyeloid hücre serisinin çoğalmasını ve sonuçta nötrofillere farklılaşmasını uyaran glikoproteinlerdir. En önemlileri arasında stem cell faktör, interleukin-3, Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör, IL-6 ve G-CSF sayılabilir (7).

Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör 19-20 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. CSF3 (Colony Stimulatin Factor-3) geni tarafından kodlanır. İlk kez sıçan myelomonositik lösemi hücre serisi ile yapılan çalışmalar sırasında tariflenmiş (8), ve 1983 yılında saflaştırılarak G-CSF ismi verilmiştir (9). Organizmada neredeyse tüm dokuların G-CSF üretme kapasitesi vardır ancak genelde enflamatuar uyarılara ikincil olarak üretilir. Endotelyal hücreler, monositler, makrofajlar, ilik stroması ve fibroblastlardan salgılanır. TNF-α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-1 ve IL-6 gibi aktive monositlerce üretilen sitokinler G-CSF üretimini uyarırlar. Normal şartlarda insan vücudunda ölçülemeyen veya çok düşük seviyelerdedir (1). Enfeksiyon benzeri fizyolojik uyarılar salgılanmasını ortalama 30 katına kadar arttırır. Yaş ve cinsiyete göre serum düzeyi belirgin olarak değişmez (10). Ayrıca

gram-negatif bakterilerin, makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından fark edilmesi ile IL-23 üretilir ve IL-23 de T hücreleri tarafından IL-17 üretimini uyarır. IL-17, G-CSF üretimi için güçlü bir tetikleyicidir (11).



Şekil 2.1. Hemotopoetik sistemin önemli hücrelerinin farklılaşma yolları ve hematopoeze pozitif yönde etki eden faktörlerin şematik gösterilmesi (6).
(CM-common miyeloid hücre, CL- common lenfoid hücre, MKE-megakaryosit eritroid, GM-granülosit makrofaj, TNK- T ve Natural Killer hücreler, MK-Megakaryosit, E-Eritroid, M-Makrofaj, G-granülosit, TC-T hücresi, NK-Natural killer hücre, BC-B hücresi, TPO-Trombopoetin, IL-İnterleukin)

Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör etkinliğini sadece yüksek afiniteli G-CSF reseptörü üzerinden gösterir. G-CSF reseptörü pluripotent ve "myeloid committed progenitor" hücrelerin üzerinde bulunduğu gibi daha fazla farklılaşmış miyeloid hücrelerde, miyeloblasttan nötrofillere kadar bulunur (1). Reseptör sayısı hücre olgunlaştıkça artar ve özellikle nötrofillerde maksimum sayıya ulaşır (12). Miyeloid hücreler dışında aktive T lenfositlerde (13), trombosit, damar endoteli, plasenta (14), nöron ve glial (15) hücrelerde de gösterilmiştir (16). JAK tirozin kinaz ve STAT transkripsiyon faktörleri üzerinden aktivasyon sonrası etkinliğini gösterir (1, 7). Ağır konjenitel nötropeninin nadir bir tipinde de G-CSF reseptörünün ekstrasellüler kısmında defektler tanımlanmıştır (17).

2.1.2 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör ve Tipleri

Birçok büyüme faktörü rekombinan yollarla üretilebilmektedir. 1980'li yılların hemen başında tanımlanan G-CSF, 1986 yılında şaflaştırılmış ve moleküler yöntemlerle klonlanmıştır (18, 19).

Glikolizasyonunda ve/veya protein sıralamasında değişkenlik olan birçok farklı rhG-CSF ürünü günümüzde klinik kullanımdadır. En sık kullanılan formları, rekombinan DNA teknolojisi kullanılarak E. Coli'nin bakteriyel ekspresyon sistemi aracılığı ile üretilmiş olan filgrastim ve aynı şekilde Çin hamster over hücrelerinde üretilmiş olan lenograstimdir (20). Günümüzde bu iki ajanın klinik kullanımda benzer klinik etkinliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Filgrastim hem Avrupa'da hem de ABD'de, lenograstim ise sadece Avrupa'da onaylıdır (21).

Filgrastim, doğal G-CSF'den farklı olarak glikolize değildir ve ek olarak N-terminalinde metiyonin taşır. 175 aminoasit içerir. Ortalama eliminasyon yarı ömrü 3,5 saaattir. Yarı ömrünü uzatmak amacıyla N-terminal metiyonin parçası, 20 kD'luk monometoksipolietilen ile konjuge edilerek üretilen Pegfilgrastim'in renal klerensi bu şekilde azaltılmıştır. Pegfilgrastim esas olarak granülositler aracılığıyla atılır. Kanser hastalarında yarı ömrü 15-80 saat arasındadır. Pegfilgrastim birçok endikasyon için henüz onaylanmamıştır (20, 21).

Lenograstim ise doğal proteinde olduğu gibi glikolize edilmiş ve ürün stabilitesi arttırılmıştır. 174 aminoasitten oluşur. Glikolizasyon sonucu lenograstimin

in vitro sıcaklık, Ph ve proteazlar ile yıkım açısından gösterilmiş avantajları olmasına karşın sitokinin insan vücudundaki yarı ömrü benzerdir (20).

Günümüzde bu ajanların biyobenzerleri birçok firma tarafından üretilmektedir ve birçok ülkede kullanıma girmiştir. Kısa ve uzun süreli yan etkileri ile ilgili yeterli bilgi yoktur. Genelde orijinal moleküllerle benzer endikasyonlarla kullanıldıkları söylenebilir (22).

2.1.3 Doğal ve Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktörün Etkileri

Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör esas olarak nötrofil ve öncülleri üzerinde etki gösterir. Kök hücreden başlayarak olgun nötrofile kadar çoğalma ve farklılaşmanın uyarılmasında ve fonksiyonların gerçekleştirilmesinde rol oynar. Nötrofillerde apoptozu baskılar. Kök hücreler dahil miyeloid serinin tüm hücrelerinin yaşam süresini uzatır. Nötrofillerin kemik iliğinden salıverilmesini uyarır. Sekretuar vezikülleri harekete geçirir, özel ve azurofilik granüllerin içeriklerini salıvermelerine neden olur. Nötrofillerin fagositik ve sitotoksik etkilerini arttırır. Granulosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktör'den farklı olarak monosit, makrofaj, lenfosit ve eozinofiller üzerinde etkinliği çok sınırlıdır (5, 7, 23).

Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün granülositer seri dışı hematopoetik seri hücreleri üzerine de etkileri tespit edilmiştir. Bazı monosit alt gruplarında G-CSF reseptörü olduğuna dair destekleyici bilgiler vardır. Yapılan çalışmalarda 5 günlük rh-GCF uygulaması sonucu monosit sayısının, periferik kanda ortalama 3 kat arttığı, monositlerin aktive olduğu ve daha fazla IL-10 ürettikleri gösterilmiştir. IL-10 aracılığı ile alloreaktivitenin baskılandığı düşünülmektedir (24, 25).

Eozinofillerde de rhG-CSF uygulaması ile sayı, adezyon özelliği ve granül protein mobilizasyonunda artış olduğu gösterilmiştir. (26, 27).

Trombositler üzerinde de G-CSF reseptörleri bulunmaktadır. rhG-CSF'in ADP ilişkili trombosit agregasyonunu arttırdığı gösterilmiştir ancak tekrarlayan deneylerde aynı sonuç elde edilememiş hatta aksini bildiren çalışmalar yayınlanmıştır (16). Bu nedenle, rhG-CSF'in trombosit fonksiyonları üzerine

etkisiyle ilgili net bir bilgi vermek mümkün değildir. rhG-CSF'in ayrıca koagülasyon sistemi üzerinde geçici protrombotik etkisi olduğuna, D-dimer, Faktör VIII ve von Willebrand Faktör gibi endotelyal belirteçleri de arttırabildiğine dair yayınlar vardır (7, 28). rhG-CSF'in son yıllarda rejeneratif tıpta başarılı bir şekilde kullanımı, miyokard enfarktüsü sonrası kullanımının denenmesini sağlamıştır. Ancak koroner arter hastalığında miyokard enfarktüsü riskini arttırdığını bildiren yayınlar da olması nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır, bu bildirimler de protrombotik etkiyi arttırdığı lehine yorumlanabilir (29).

Trombosit sayısının sağlıklı APK-HKHV'de rhG-CSF uygulamasıyla birlikte azalmaya başladığı ve bu azalmanın 10-20 gün devam ettiği bildirilmiştir (30). 1999 yılında LeBlanc ve ark tarafından sağlıklı vericilerde yapılan prospektif bir çalışmada, rhG-CSF'in hemostaz üzerine etkileri incelenmiştir. 22 vericinin örnekleri incelenmiş ve trombosit sayısında bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (31). Lindemann ve ark tarafından, 1989 yılında yapılan bir yayında ise, yakın dönemde kemoterapi almamış olan ve değişken dozlarda rhG-CSF verilen 18 kanser hastasının ortalama trombosit sayılarının yaklaşık 10. güne kadar progresif olarak azaldığı ve rhG-CSF'in devamına rağmen yaklaşık 20. günde normale döndüğü bildirilmiştir (32). Ağır konjenital nötropeni nedeniyle uzun süre rhG-CSF alan hastaların incelendiği başka bir çalışmada ise, tüm hastalarda trombosit sayılarında bazale göre hafif düşüş gözlenmiş ancak bu durumun rhG-CSF öncesi tekrarlayan enfeksiyonlara bağlı trombositoz nedeniyle bazal değerlerin yüksek olmasına bağlı olduğu öne sürülmüştür. Ek olarak % 5 hastada izlem sırasında trombositlerin trombositopeni sınırının altına düştüğü, rhG-CSF doz modifikasyonu ile düzeldiği bildirilmiştir (33). Trombosit değerlerindeki düşmenin bir sebebinin de rölatif hipersplenizm ve aferez işlemleri olduğu düşünülmektedir. Ancak 2009 yılında bildirilen bir vaka raporunda, rhG-CSF kullanımı ile trombosit sayılarının aferez başlanmadan önce düşmeye başladığı ve bu dönemde hastanın dalak boyutunda da bir değişiklik olmadığı belirtilmiş ve bu düşüşün doğrudan rhG-CSF'in etkisine bağlı olduğu öne sürülmüştür (34). Sonuç olarak rhG-CSF'in trombosit sayı ve fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri farklı çalışmalarda gösterilmiş olup nedeni konusunda görüş birliğine varılamamıştır.

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün lenfositler üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Dinlenme fazında bulunan T-lenfositlerin üzerinde G-CSF reseptörü bulunmaz. Ancak sağlıklı kök hücre vericilerinde olduğu gibi, rhG-CSF'in 72 saat kesintisiz uyarısı sonucu T lenfositlerde G-CSF reseptörü gen ekspresyonunun uyarıldığı gösterilmiştir (13). Tam tersine, lenfositler üzerinde G-CSF reseptörlerinin gösterilemediği bazı çalışmalar da bulunmaktadır (35). Sağlıklı APK-HKHV'de lenfosit sayısının rhG-CSF uygulaması sonrasında kök hücre toplanmasından önce bazale göre yaklaşık 3 kat arttığı ancak zaman içinde azalarak 10. günden 1. yıla kadar bu kez bazalden daha düşük seyrettiği bildirilmiştir (30). Lenfositlerdeki bu değişikliklerin sadece sayısal olmadığı, özellikle T lenfositlerin fonksiyonlarında da değişiklikler olabileceği in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Th1 fenotipine değil, Th2 fenotipine doğru yönlenme olur (36). Ayrıca monositlerdeki artışa bağlı IL-10'daki artışa ikincil T hücre yanıtlılığı azalabilir, alloantijenlerle uyarılan çoğalma yanıtında azalma olur (24). Başka bir çalışmada ise, rhG-CSF'in düzenleyici dentritik hücrelerin üretilmesini uyararak T hücre gelişimini ve fonksiyonunu etkilediği gösterilmiştir (1, 37). Rutella ve ark. tarafından 2000 yılında yapılmış bir çalışmada rhG-CSF'in lenfositlerde mitokondriyal fonksiyon ve DNA üzerinde hümoral aracılı bozukluğa neden olarak hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe ettiği gösterilmiştir (38).

Sağlıklı APK-HKHV'de rhG-CSF'in hematopoetik hücreler üzerine etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. rhG-CSF'in (filgrastim 10 mg/kg/gün) sağlıklı vericilerde tam kan parametreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 60 sağlıklı vericiye 5 gün boyunca rhG-CSF verilmiş ve 6. gün aferez ile kök hücre toplanmıştır. Bazal trombosit sayısı -5. günde 261000/mm^3 iken 0. günde 159000/mm^3'e gerilemiş ve en düşük olduğu 146000/mm^3 değerine 10. günde düşmüş, 16. günde ilaç öncesi düzeyine yükselmiş ve 20. günde eski seviyesinin üzerine (333 000/mm^3) yükselmiştir. Beyaz küre sayısı, ilk yükselme sonrası tedavi öncesi düzeyine 13. günde, nötrofil sayısı ise 10. günde düşmüş; 20. günde hem beyaz küre hem de nötrofil sayısı bu kez tedavi öncesi değerlerinin de altında bulunmuştur. Hemoglobin (Hb) değerleri de 20. günde tedavi öncesi düzeyin altında saptanmıştır (39).

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün (lenograstim 7,5 mg/kg/gün) 3928 akraba dışı sağlıklı vericide, tam kan parametreleri üzerine etkilerinin uzun süreli olarak incelendiği başka bir çalışmada da benzer değişiklikler izlenmiştir. Beyaz küre -5. günde 6280/mm^3 iken, rhG-CSF ile 0. günde 41740/mm^3'e yükselmiştir. Nötrofil sayısı ortalama 8,2 kat artarken, diğer beyaz küre alt grupları da değişik oranlarda artış göstermiştir (lenfositler 2,28 kat, monositler 10,0 kat). Beyaz kürenin 1. ayda (5100/mm^3) -5. günden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Daha ileri dönemlerde ise (6. ay, 1, 2, 3. ve 4. yıl), beyaz küre sayısının 1. ay değerinden daha yüksek olduğu fakat ilaç öncesi değerlerine hiçbir zaman ulaşamadığı bildirilmiştir. Lenfosit sayısı (-5. gün 1780, 30. gün 1480/mm^3, 6. ay 1640/mm^3) ise 1. yıla kadar düşük kalmış, 2-5 yıl sonra ise hafif miktarda artmıştır. Trombosit sayısındaki düşme (245000/mm^3'den 224000/mm^3'e) toplanma işleminden yaklaşık 30 gün sonraya kadar (235000/mm3) devam etmiştir. Ancak 6. ayda aferez öncesi değerlerine ulaşmıştır. Hb'de ise hafif ancak istatiksel olarak anlamlı bir azalma izlenmiştir. Beyaz küredeki uzun süren bazal değerlere göre hafif düşüklüğün kök hücrelerin yerine yavaş gelmesine mi, G-CSF reseptörlerinin "down-regülasyonu"na mı veya sitokin bağlantılarındaki diğer bozukluklara mı bağlı olduğu net değildir. Vericilerde ortaya çıkabilecek olası işlem öncesi strese ikincil lökositoz da aslında bu değerlerin normale gelememesinin bir nedeni olabilir. Lenfosit sayıları da benzer şekilde düşük kalmış ve ancak 1. yıldan sonra normal değerlerine ulaşmıştır. Trombosit sayılarındaki düşüklük ise megakaryopoezin baskılanması ile açıklanabilir (30).

2.1.4 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Klinik Uygulamaları

1988 yılından beri klinik kullanımda olan rhG-CSF'in birçok kullanım alanı vardır ve her geçen gün yeni kullanım alanları eklenmektedir. Günümüzde rhG-CSF klinikte iki temel etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi, granülopoezin ana düzenleyicisi olarak nötrofilik serinin çoğalmasını, olgunlaşmasını sağlaması ve nötrofillerin yaşamını olumlu etkilemesidir. Diğeri ise

hematopoetik öncül hücrelerin kemik iliğinden periferik kana mobilizasyonunu sağlamasıdır (6).

Günümüzde rhG-CSF kullanımı ile konjenital ve kazanılmış nötropenide granülosit sayısı arttırılabilmekte, malin hastalıklarda kemoterapi daha yüksek dozlara çıkılabilmekte ve sonuçta hematopoetik iyileşmeyi hızlandırması sayesinde hastanede yatış süresinde ve hematolojik ve hematolojik olmayan komplikasyonlarda belirgin azalma elde edilebilmektedir (5, 40). HKHT sonrası kullanımı ile nötrofil toplarlanma süresini kısaltmakta ve enfeksiyöz komplikasyonları azaltmaktadır. Ayrıca kronik ağır nötropenilerde (konjenitel, siklik veya idiopatik), nötropeniye ikincil ateş, enfeksiyon veya ağızda yaralar gibi yan etkileri engellediği ve yaşam süresini belirgin olarak uzattığı gösterilmişitir (41). Rejeneratif tıpta, hasarlanmış organlarda tamir edici özelliği olduğuyla ilgili tartışmalı yayınlar da vardır. Örneğin nöroprotektif etkileri olduğu, nöronal dokuda apoptozu engellediği, kemik iliği kök hücrelerinin beyne mobilizasyonu ile nöroplastisiteyi arttırdığı bildirilmektedir. Amiyotrofik lateral skleroz ve inme hastalarında klinik uygulamalarıyla ilgili tartışmalı yayınlar mevcuttur (42). Yine rejeneratif tıp uygulaması olarak, koroner arter hastalığı (29) ve kalp yetmezliği gibi alanlarda da uygulamalarıyla ilgili çalışmalar devam etmektedir (7).

Periferik kana kök hücre mobilizasyonu ve kullanım alanları ilerleyen bölümlerde açıklanmıştır.

2.1.5 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Yan Etkileri

Sağlıklı bireylerde hematopoetik sistem üzerine yaygın etkileri olan bir ilacın kullanılması, olası yan etkileri gündeme getirmiştir. İnsanlarda enfeksiyon sırasında endojen G-CSF düzeyi ortalama 30 kat artar, ancak eksojen yollarla rhG-CSF (1x300 µgr, filgrastim) verilmesiyle serumdaki G-CSF düzeyi enfeksiyon sırasında görülen değerlerin ortalama 50 kat üzerine yükselir ve enjeksiyon öncesi duruma gerilemesi yaklaşık 48 saati alır (43, 44). Bu nedenle bir büyüme faktörüne fizyolojik dozların üzerinde maruz kalmanın getireceği yan etkilerle ilgili endişeler bulunmaktadır.

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün kısa dönem yan etkileri genellikle iyi tolere edilebilir. En sık görülen yan etkiler, hafif olanlardır; kemik ağrıları, baş ağrısı, yorgunluk, bulantı, ateş ve hafif alerjik reaksiyonlar bunlar arasındadır. Vericilerde dalak hacmi ortalama % 10 büyüyebilir (45, 46). Nadir görülen ancak ciddi olan yan etkiler arasında ise spontan dalak rüptürü (47), anafilaktik şok (48), arteriyel tromboz (49), glomerülonefrit (50), erişkin tip respiratuar distres sendromu, rabdomiyoliz (51), kapiller kaçak sendromu (52), Sweet sendromu (53), ölümcül oraklaşma krizi (54), katetere bağlı pnömo-hemotoraks, trombositopeni ve hemoglobinde düşüş (39) sayılabilir. Farklı grupların verilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, 1400 gönüllü verici geriye dönük incelenmiş, rhG-CSF uygulaması sonrası, bir kısmı kateter uygulaması ile ilgili olmak üzere, ciddi yan etki oranının % 1,1 olduğu bildirilmiştir (55). Katetere bağlı yan etkilerin ciddiyeti ve sıklığı göz önünde bulundurularak Fransa'da herhangi bir yaştaki tüm akraba dışı vericilere ve 18 yaşın altındaki aile içi vericilere santral venöz kateter takılması yasaklanmıştır. Gösterilmiş olan bu yan etkiler nedeniyle Fransa'da sağlıklı vericilere rhG-CSF uygulaması ile ilgili kesin kontrendikasyonlar belirlenmiştir (Tablo 2.1) (4).

Tablo 2.1. Fransa'da sağlıklı vericilere rhG-CSF verilemesine engel oluşturan kontrendikasyonlar (4)

<18 veya >51 yaşında olmak
Gebelik veya emzirme
Neoplazi öyküsü
Splenomegali
Otoimmün hastalıklar
Kalıtsal trombofililer, kalp krizi, koroner arter embolisi, hipertansiyon
Antikoagülan tedavi alıyor olmak
Ağır alerjik reaksiyon

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör uygulamasının uzun dönemli yan etkileri konusunda ise belirsizlikler vardır. Birçok benin ve malin hastalıkta kullanılmakta olan rhG-CSF'in, bazı hasta gruplarında AML ve MDS

gelişimine neden olduğu şüphesi bulunduğundan, malignite sıklığının arttırıyor olabileceği yönünde çekinceler ortaya çıkmıştır. Bu durum özellikle gönüllü ve sağlıklı APK-HKHV'lerde büyük önem taşımaktadır. Uzun dönem etkileri net olmayan bir ilacın hem akraba dışı vericilerde, hem de bir yakınında malinite gelişmiş olan akraba içi sağlıklı vericilerde kullanımı etik tartışmaları gündeme getirmiştir (5).

2.2 Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu (HKHT)

HKHT, yüksek riskli hematolojik malinitelerin ve diğer hayatı tehdit eden hematolojik ve genetik hastalıkların tedavisinde uygulanan küratif bir tedavi yöntemidir. Günümüzde birçok hastalık için standart tedavi yaklaşımının içine girmiştir ve gün geçtikçe daha çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanımı gündeme gelmektedir.

Verilen dokunun alıcı ile ilişkisi temelinde transplantasyonlar iki ana gruba ayrılabilir.

1) Otolog HKHT: Bu tip tranplantasyonda hastanın kendisinden daha önce toplanarak saklanmış olan hematopoetik kök hücreleri kendisine verilir. Yapılan işlemde, öncelikle kemik iliğine çok yüksek doz kemoterapi ile malinitenin ortadan kaldırılması hedeflenir. Hastanın kendisinden daha önce toplanmış olan kök hücreler (kemik iliği veya periferik kan kaynaklı olabilir) kemoterapi ile kemik iliği ablasyonu sağlandıktan sonra hastanın kemik iliği hücrelerinin tekrar çalışmasını sağlamak üzere hastaya tekrar geri verilir. Benin hastalıklarda ise hastanın zaten bozuk olan kemik iliğinin tekrar verilmesinin faydasının olmaması nedeniyle uygun bir tedavi seçeneği değildir. Malin hastalıklarda ise tümör kontaminasyonu, daha önceki kemoterapi süreçleriyle kök hücrelerin hasarlanması ve allojenik immün yanıtın olmaması nedeniyle etkinliği sınırlıdır. Günümüzde özellikle solid tümörlerde ve lenfomalarda kullanılmaktadır (56).

2) Allogenik HKHT: Hastanın kendisinin dışında farklı bireylerden (akraba olan veya olmayan) elde edilen hematopoetik kök hücreler hastaya verilir. Yapılan işlemde hastanın sağlıklı çalışmayan kemik iliği olarak ortadan kaldırılarak yerine vericinin kemik iliği verilir ve çalışır hale gelmesi hedeflenir. Benin hastalıklarda

hedef bozuk çalışan kemik iliğinin yerine, farklı bir bireyden alınan kemik iliği hücrelerinin geçmesi ve çalışır hale gelmesi sayesinde hastalık bulgularının ortadan kalkmasıdır. Malin hastalıklarda ise, verilecek yüksek doz kemoterapinin yanında verilen kemik iliği kaynaklı immün yanıtın da malinitenin ortadan kalkmasına etkili olduğu bilinmektedir. Benin ve malin hematolojik hastalıklar için giderek artan sıklıkta uygulanmaktadır (56, 57).

Günümüzde dünya çapında yılda 50.000'den fazla HKHT yapılmaktadır ve bunun % 47'sini allojenik nakiller oluşturnaktadır (2). Avrupa Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Grubu (*European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation*) (EBMT) verilerine göre, Avrupa'da 2011 yılında 32075 HKHT yapılmıştır, bunların % 58'i otolog (18605) % 42'si allojeniktir (13470) (3).

2.2.1 Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonunun Tarihçesi

Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu (A-HKHT) ile ilgili başarıya ulaşmış ilk çalışmalar 1955 ve 1956 yıllarında yapılmıştır. Bu çalışmalarda ölümcül dozda radyasyona maruz bırakılan lösemili farelere, sağlıklı farelerden hazırlanmış hematopoetik hücrelerin verilmesiyle hastalıklarının düzeldiği gösterilmiştir. Bu iyileşmede, yüksek dozda radyasyonun yanısıra verilen hücrelerin alıcıda oluşturduğu sağlıklı bağışıklık sisteminin de etkisi olduğu bildirilmiştir (58, 59).

İnsanlarda ilk nakil, hasta bireyin ikiz kardeşinden yapılmış ve 1959 yılında Thomas ve ark tarafından bildirilmiştir ancak hasta kısa süre sonra kaybedilmiştir (60). Mathe ilk başarılı A-HKHT vakasını 1965 yılında bildirmiş ancak hasta graft versus host hastalığı (GVHH) sonrası suçiçeği enfeksiyonu nedeniyle kaybedilmiştir (61). İlk uzun süreli sağkalım, 1968-1969 yıllarında konjenital immün yetmezlikler nedeniyle yapılan A-HKHT'ler sonrası elde edilmiştir (62, 63). Bortin ve arkadaşları tarafından 1970 yılında yapılan bir derlemede, 1958-1968 arasında bildirilen 203 naklin sounuçlarını değerlendirilmiş ve sadece 3 hastanın yaşamakta olduğu saptanması üzerine nakil süreci duraklama dönemine girmiştir (64). Zaman içerisinde HLA doku grubu sistemlerinin bulunması(65) ile alıcı-verici arasında HLA doku uyumununun önemi anlaşılmış, bu durumun nakil başarısında ve komplikasyon

gelişimini önlemede etkili olduğu anlaşılmıştır. Doku tipi tam uyumlu kardeşlerin verici olarak seçilmesiyle rejeksiyon ve GVHH riski belirgin olarak azalmış, izleyen yıllarda hazırlama rejimi ve GVHH profilaksisindeki gelişmeler (siklosporin, metotreksat) sayesinde aile içi nakillerdeki başarı hızla ilerleme göstermiştir. Viral, fungal ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı yeni ilaçların bulunması ve hasta bakım şartlarının düzelmesi sonucu aile içi nakillerde günümüzdeki başarı düzeyine ulaşılmıştır. Aile içi vericilerle yapılan nakillerdeki başarı sonucu akraba dışı nakil için girişimler başlamış, ilk akraba dışı nakil 1979 yılında gerçekleştirilmiştir(66). Doku tiplendirmesinin yüksek çözünürlükte uygulanabilmesi ile akraba dışı nakillerin başarısı artmıştır. Günümüzde tüm dünyadaki doku bankalarında 18 milyonun üzerinde akraba dışı gönüllü vericiye ait kayıt bulunmaktadır. Takip eden yıllarda G-CSF ile periferik kana kök hücre mobilizasyonunun sağlanabilmesi ve aferez tekniğindeki gelişmeler sonucu APK-HKHT hızla uygulamaya girmiştir ve günümüzde akraba dışı nakillerin çoğunda tercih edilen metod olmuştur (3). Kordon kanı ise kök hücre kaynağı olarak ilk kez 1989 yılında Gluckman tarafından kullanılmıştır. Günümüzde alternatif vericilerin kullanılabilmesi, dünya çapında geniş akraba dışı ve kordon doku bankaları, GVHH profilaksisi ve hazırlama rejimleriyle ilgili yeniliklerle, HKHT güncel ve etkili bir tedavi seçeneğidir (56, 67).

2.2.2 Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonunda Kök Hücre Kaynakları

Allojenik HKHT için üç farklı kök hücre kaynağı kullanılabilir(68).

1) Kemik iliği kaynaklı kök hücre: Genel veya bölgesel anestezi ile hematopoetik kök hücreler posterior iliak krest'lerden direkt olarak tekrarlayan aspirasyonlar ile elde edilir.

2) Periferik kan kaynaklı kök hücre: Periferik kanda kök hücre miktarı çok düşük olması nedeniyle kök hücrelerin aferez yöntemi ile periferik kana mobilizasyonu gereklidir. Bu amaçla en sık kullanılan ilaç rhG-CSF olup, 4-6 altuı gün arasında, 10 mg/kg/gün dozunda uygulama sonrası (Mobilizasyon) kök hücreler aferez yöntemi ile toplanırlar.

3) Kordon kanı kaynaklı kök hücre: Doğum sırasında kordon kanındaki kanın direkt olarak toplanması ile elde edilir.

1981 yılına kadar hem otolog hem de allojenik nakillerde kök hücre kaynağı olarak sadece kemik iliği kullanılmaktaydı. Ardından büyüme faktörlerinin, özellikle rhG-CSF'in kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreleri mobilize ederek periferik kana çıkarttığının gösterilmesiyle ve aferez yöntemiyle bu hücrelerin kolaylıkla toplanabilmesi sonucu, günümüzde transplantasyonlarda periferik kan en sık kullanılan kök hücre kaynağı olmuştur. İlk yıllarda otolog amaçlı kullanılmış iken 1990'lı yıllar sonrası allojenik nakillerde de kullanılmıştır. Kordon kanı ise ilk olarak 1998 yılında Gluckman tarafından kullanılmıştır. Hazır ve hızlı kullanıma olanak sağlaması nedeniyle klinikteki önemi giderek artmaktadır (69).

Avrupa 2011 transplantasyon verileri değerlendirildiğinde, otolog transplantların sadece % 1'i kemik iliği kaynaklı iken, % 99'u periferik kan kaynaklıdır. A-HKHT'lerin ise % 72'sinde kök hücre kaynağı olarak periferik kan, % 22'sinde kemik iliği ve % 6'sında kordon kanı kullanılmıştır (3). Yaş gruplarına göre kullanılan kök hücre kaynakları değişmektedir. Örneğin *The Center for International Blood & Marrow Transplant Research* (CIBMTR) verilerine göre 20 yaş altı, 2006-2011 yılları arasında yapılan akraba ve akraba dışı A-HKHT'lerin arasında kök hücre kaynağı % 54'ünde kemik iliği, % 24'ünde kordon kanı iken sadece % 22'sinde periferik kandır (2). Ülkemizdeki 2010 yılına kadar çocuk hastalarda uygulanan sadece akraba A-HKHT verilerine göre hastaların % 52'sinde kemik iliği, % 46'sında periferik kan, % 2'sinde ise kordon kanı kök hücre kaynağı olarak kullanılmıştır (70).

Son yıllarda gündeme gelen yeni bir kök hücre kaynağı ise rhG-CSF ile uyarılmış kemik iliği kaynaklılı HKHT'dur. rhG-CSF uygulamasıyla özellikle kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin daha verimli elde edilebildiğinin anlaşılmasıyla klinik kullanıma girmiştir. Kemik iliğinden kök hücre toplanmadan önce vericilere 3-4 gün rhG-CSF uygulanır. Küçük boyutlu çalışmalarda APK-HKHT ile karşılaştırıldığında nötrofil engraftmanın benzer şekilde erken, ancak trombosit engarftmanının ise daha geç olduğu gösterilmiştir. Yaşam beklentisi, akut ve kronik GVHH açısından bir üstünlüğü olmadığını gösteren yayınların(71) yanında özellikle kronik GVHH'ı ve tedaviye bağlı mortaliteyi arttırdığı lehine yayınlar da vardır (72, 73).

Tercih edilecek kök hücre kaynağını belirlemede ilk belirleyici vericinin güvenliği olmalıdır. Bunun dışında vericinin yaşı, cinsiyeti, periferik damarlarının afereze uygunluğu, alıcının primer hastalığının malin veya benin olması, alıcı-verici arasında kan grubu farklılığı, kök hücreler üzerinde ek işlemlerin uygulanıp uygulanmayacağı gibi çok farklı faktörlere göre değerlendirmeler yapılır. Bu doğrultuda, günümüzde benin hastalıklarda uygulanacak nakillerde daha çok kemik iliği kaynaklı kök hücre tercih edilirken, özellikle ileri evre malin hastalığa sahip erişkinlerde ve akraba dışı nakillerde periferik kan kaynaklı kök hücreler tercih edilebilmektedir.

2.2.3 Kök Hücrelerin Kemik İliğinden Mobilizasyonu

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör günümüzde APK-HKHT işleminde kemik iliğinden kök hücre mobilizasyonunu sağlamak için en sık kullanılan ilaçtır. rhG-CSF'in bu özelliğinin saptanması tamamen tesadüfen olmuştur (74). Mobilizasyon, kök hücreler üzerine doğrudan etki ile olmamaktadır. rhG-CSF etkisiyle kemik iliğindeki olgun nötrofiller sayıca artar ve aktive olurlar. Aktivasyon sonucu matriks metaloproteinazların salgılanması artar ve normal şartlarda kök hücrelerin kemik iliğinde tutulmasını sağlayan kritik adezyon molekülleri ve kemoatraktan reseptörler yıkılır ve kemik iliği mikroçevresinin de etkilenmesi sonucunda kök hücrelerin perifere mobilizasyonu sağlanır (75, 76).

Kök hücre olarak adlandırılan CD34+ hücreler kemik iliğinde tüm çekirdekli hücrelerin ortalama % 1'ini oluşturmaktayken, periferik kanda bu oran % 0,5'dir. Dört-yedi gün rhG-CSF uygulaması sonucu öncül hücreler periferik kanda 20-30 kat artmaktadır. Grigg ve ark tarafından 1995 yılında yapılmış Filgrastim ile periferik kana kök hücre mobilizasyonunun incelendiği bir çalışmada maksimum CD34 mobilizasyonunun 4-6. günlerde sağlandığı, maksimum "Granülosit-makrofaj koloni forming" hücre sayısının ise 5. günde elde edildiği izlenmiştir. CD34 sayısında cinsiyet ve yaşa göre belirgin bir farklılık görülmemiştir. 5 günlük 10 µg/kg/gün rhG-CSF sonrası beyaz küre sayısı 48.000/mm^3'e, periferik kan CD34 sayısı ortalama 54,222/mm^3'e ulaşmıştır. CD34 sayısı bazal değere göre ortalama 22 kat artmıştır (8-105 kat arası). Maksimum CD34 sayısı, 10 µg/kg/gün rhG-CSF dozu

ile (3-5 μg/kg/gün dozlarıyla karşılaştırıldığında) elde edilmektedir (77). CD34'lerin periferik kandan, kemik iliğine göre daha yüksek rakamlarda toplanabilmesi, toplama kolaylığı ve kemik iliği engraftman süresinin kısa olması sayesinde bu yöntem klinikte sıklıkla tercih edilir hale gelmiştir (4, 78).

Periferik kan kaynaklı olarak toplanan örneklerde kök hücre içeriğini belirleyen etkenlerin değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle yaş, vücut ağırlığı, cinsiyet, kullanılan rhG-CSF türünün CD34 sayısı üzerinde etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Bazı çalışmalarda ileri yaşın [>55 yaş, (49), >38 yaş (79)] kök hücre verimini düşürdüğünü bildirse de aksini söyleyen yayınlar da vardır. Bazı gruplar vericinin vücut ağırlığının ve periferik kan beyaz küre sayısının ana belirleyicilerden olduğunu bildirmişler, ayrıca daha yüksek G-CSF dozunun ve ikiye bölünmüş dozun daha iyi mobilizasyon sağladığını belirtmişlerdir (80). 2006 yılında Ings ve ark, 400 sağlıklı vericiden standart teknik ve aferez yöntemiyle toplanan periferik kan kaynaklı kök hücrelerin özelliklerini belirlemek için geriye dönük olarak kendi verilerini incelemişler. Aile içi vericilerde filgrastim, akraba dışı vericilerde ise lenograstim kök hücre mobilizasyonu amacıyla uygulanmış. Her iki ilaç da, 4 gün boyunca 10 μg/kg/gün dozundan uygulanmış. Yaş arttıkça özellikle 55 yaştan sonra elde edilen ürünün CD34 içeriğinin azaldığı görülmüş ancak bu yaşın altında belirgin fark gözlenmemiştir. Ayrıca 78 kg altındaki bireylerden elde edilen kök hücre içeriğinin belirgin olarak azaldığı görülmüş. Kullanılan rhG-CSF türüne göre (Lenograstim veya filgrastim), elde edilen nihai ürünün CD34 içeriği açısından belirgin fark gözlenmemiştir. "Granülosit-makrofaj koloni-forming unit" hücre sayısı açısından ise lenograstim alan grubun belirgin olarak üstün olduğu saptanmıştır (81).

Kök hücre mobilizasyonu için son yıllarda geliştirilen yeni ilaçlar bulunmaktadır. Bunlarda en önemlisi pleriksafordur. SDF1/CXCR4 aksının kompetetif inhibitörü olan bu ajan, CD34 + öncüllerinin kemik iliği mikroçevresine bağlanmasını engeller. Pleriksafor enjeksiyonundan 9 saat sonra CD34 periferik kanda yeterli düzeylere ulaşır, 24-48 saat içinde nakil yapılabilir (82). Klinik uygulamaya yeni girmektedir. Fransa'da sadece, multipl miyelom ve Hodgkin dışı lenfomalarda otolog transplantasyon amacıyla kullanımı onaylıdır. Sağlıklı bireylerde diğer mobilizasyon yöntemleriyle yeterli kök hücre mobilize edilemeyen vakalarda rhG-CSF ile birlikte veya tek başına kullanımı bildirilmiştir, ayrıca kısa

sürede kök hücre mobilizasyonu sağlaması nedeniyle acil durumlarda da kullanılmıştır (83, 84). Pleriksafor ile elde edilen kök hücreler T hücrelerden zengindir bu nedenle GVHH riskini arttırdığı düşünülmektedir. Engraftman süreleri rhG-CSF ile mobilize edilmiş periferik kan transplantaları gibi kemik iliğine göre daha kısadır. Kullanıma girdiğinden beri geçen kısa zaman içinde bildirilen gastrointestinal hazımsızlık, baş ağrısı, enjeksiyon bölgesinde ağrı gibi erken dönem yan etkileri genelde iyi tolere edilir. Uzun dönem yan etkileriyle ilgili ise henüz yeterli veri yoktur (4).

2.2.4 Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre Transplantasyonunu

İlk periferik kan kaynaklı A-HKHT 1989 yılında gerçekleştirilmiştir, fakat rhG-CSF öncesi dönemde olunması ve vericinin periferik kan ile kök hücre vermeyi istemesi nedeniyle kök hücre toplama işlemi 9 seans sürmüştür (85). İlk rhG-CSF ile mobilize edilmiş periferik kan kaynaklı A-HKHT ise 1993 yılında gerçekleştirilmiştir. Akut lenfoblastik lösemi hastasına, genel anestezi için kontrendikasyonu olan bir vericiden periferik kan kaynaklı HKHT uygulanmıştır (86). Ürünlerin yüksek miktarda T hücresi taşıması nedeniyle GVHH hastalığı sıklığının çok artmasından korkulmuştur. Ancak izleyen yıllarda rhG-CSF'in günlük klinik kullanıma girmesi, aferez tekniğinin ilerlemesi ve yaygınlaşmasıyla ve bu yöntemle daha hızlı engraftmanın sağlanabilmesi sayesinde APK-HKHT her geçen gün daha yüksek oranlarda yapılır olmuştur. GVHH sıklığında artış görülmüş ancak bu artış beklendiği kadar yüksek olamamıştır. Bu yöntemin diğer avantajları arasında kemik iliğine göre daha yüksek sayıda CD34 veriminin elde edilebilmesi, graft yetmezliğinin daha az görülmesi ve özellikle erişkinlerde toplama kolaylığı (genel anestezi gerektirmemesi) sayılabilir.

Geçtiğimiz yıllar içinde, APK-HKHT, allojenik transplantasyonlar içinde en sık kullanılan yöntem olmuştur. EBMT raporlarına göre APK-HKHT 1996 yılında 4400 A-HKHT'nin % 30'unu oluşturmaktayken, 2011 yılında 14549 A-HKHT'nin % 72'sini oluşturmuştur. APK-HKHT'nin hem sayısal hem de oransal olarak hızlı artmasında, haploidentik ve akraba dışı vericilerden yapılan nakillerde ve düşük

yoğunluklu rejimlerle yapılan nakillerde tercih edilen yöntem olması rol oynamaktadır (3, 70, 72).

Periferik kan kaynaklı HKHT'nun olumsuz yönleri de bulunmaktadır. Özellikle kronik GVHH riskinin kemik iliği kaynaklı nakillere göre yüksek olduğu bilinmektedir. Akut GVHH ile ilgili tartışmalı veriler olmakla birlikte riskin arttığını bildiren birçok yayın vardır. Ancak genel bilgiler kemik iliği ve periferik kan kaynaklı kök hücre transplantlarında hayatta kalımın belirgin farklılık göstermediği yönündedir. Periferik kan kaynaklı kök hücre ve kemik iliği kaynaklı kök hücre naklinin, akraba dışı vericilerde karşılaştırıldığı güncel bir yayında, graft yetmezliği sırasıyla % 3 ve % 9; kronik GVHH ise % 53 ve % 41 oranlarında saptanmış ve anlamlı farklılık göstermiştir. Ancak kullanılan yöntemin toplam sağkalıma etkisi olmadığı bildirilmiştir (87).

Periferik kan kaynaklı HKHT'nun olumsuz yönlerinden biri de yüksek doz büyüme faktörü maruziyetidir. Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün kök hücre mobilizasyonu için kullanılmasına bağlı olarak özellikle erken dönemde pek çok yan etki bildirilmiştir. Uzun dönem yan etkileri ile ilgili ciddi endişeler vardır (Bakınız bölüm 2.1.5 ve 2.2.6).

Periferik kan kaynaklı HKHT'nun bir diğer dezavantajı da kök hücre toplanmasında kullanılan aferez işlemi için, özellikle çocuklarda ve kadınlarda damar yolunun aferez için genellikle yetersiz olması nedeniyle, kateter gerekebilmesidir. Katetere bağlı morbidite ve mortalite işleme bağlı önemli bir risk oluşturmaktadır (88). Bu nedenle Fransa'da herhangi bir yaştaki tüm akraba dışı vericilere ve 18 yaşın altındaki aile içi vericilere santral venöz kateter takılması yasaklanmıştır (4).

Hangi kaynağın seçileceği sorusunun yanıtı hastanın tanısı ve hastalığının evresi, vericinin yaşı, vericinin damar yapısının uygunluk durumu, özellikle akraba dışı vericilerde vericinin kendi seçimi gibi faktörlere göre belirlenir. Akkiz aplastik anemi ve diğer kemik iliği yetmezliklerinde ve benin hastalıklarda ilk tercih edilecek yöntem kemik iliği kaynaklı HKHT olmalıdır. Graft versus lösemi etkisinin APK-HKHT'de yüksek olmasından dolayı ileri yüksek riskli malinitelerde hayatta kalım üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir. Bu nedenle yüksek riskli malin hastalıklarda ise periferik kan kaynaklı HKHT öncelikle seçilecek yöntem olabilir. (89-91).

2.2.5 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Kanser Gelişimi ile İlişkisi

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün kullanımına bağlı uzun dönemde gelişen yan etkiler, özellikle benin ve malin hematolojik hastalıklarda araştırma ve merak konusu olmuştur. En sık kullanım alanlarından biri "ağır konjenital nötropeni" diğer adıyla "Kostman Sendromu" olup, doğumsal bir granülopoez bozukluğudur. Bu hastalıkta ağır nötropeniye bağlı gelişen ciddi enfeksiyonlar hastaların erken dönemde (% 50 <2 yaş) kaybedilmesine neden olmaktaydı. rhG-CSF'in klinik kullanıma girmesi sonrasında bu hastalarda enfeksiyon sıklığında belirgin azalma ve yaşam süresinde uzama sağlanmıştır. Ancak bu kez yüksek oranda myelodisplastik sendrom (MDS)/ Akut miyeloid lösemi (AML) gelişme riski ortaya çıkmıştır. rhG-CSF tedavisi ile 15 yıllık izlem sonucu kümülatif olarak sepsis kaynaklı % 10 ve MDS-AML nedenli % 22 oranında ölüm bildirilmiştir (92). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, hastaya verilen rhG-CSF dozu ile AML/MDS gelişim riski arasında anlamlı ilişki bulunmaktadır. Hasta grubunu alt gruplarına ayırdıklarında; >8 mcg/kg/gün rhG-CSF almasına rağmen, total nötrofil sayısı <2188/mm^3 seyreden hastaların AML/MDS geliştirme veya sepsisten ölüm riski düşük riskli gruba göre daha yüksek olduğu görülmüş (Yüksek riskli grupta 15. yılda sepsisten ölüm riski % 18, MDS/AML riski % 34 bulunmuş). Yüksek dozda rhG-CSF (>8 mcg/kg/gün) alan hastalarda, düşük doz alanlara göre AML/MDS gelişme riski 2-3 kat artmıştır Lösemiye dönüşüm riski yüksek olmakla birlikte, bu oran diğer kalıtımsal kemik iliği yetmezlikleri (örn. Fanconi Aplatik anemisi, Diskeratozis konjenita gibi) için belirlenen oranlarla benzer olarak değerlendirilmiştir (92, 93). Ancak yine de yüksek doz rhG-CSF alanlardaki yüksek lösemi dönüşüm riski bu ilacın diğer alanlarda da kullanmıyla ilgili soru işaretlerini devam ettirmektedir.

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün sık kullanıldığı bir hastalık grubu da Ağır aplastik anemidir. Bu hastalarda immünsüpresif tedavi olarak diğer ilaçlarla birlikte rhG-CSF'in uzun dönem kullanımı yer almaktadır. Ağır aplastik anemisi olan 840 hastalık bir grupta, immunsüpresan tedavi ile birlikte rhG-CSF alan ve almayan hastalar

karşılaştırıldığında, alan hasta grubunda AML/MDS insidansı % 10,9 iken, almayan grupta % 5,8 olarak bulunmuştur (94). Japonya'da yapılan bir çalışmada ise aplastik anemi tanısıyla rhG-CSF uygulanan hasta grubunda AML/MDS riskinin ve monozomi 7/7q- insidansının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Monozomi 7 ile seyreden MDS hastalarının CD34+ hücreleri incelendiğinde G-CSF reseptör izoform IV mRNA ekspresyonunda artış olduğu ve in vitro rhG-CSF uygulaması ile monozomi 7 hücrelerinin arttığı gösterilmiştir. Bu veriler ışığında rhG-CSF'in farmakolojik dozlarda normal hücrelerde malin transformasyona neden olmaktan çok, daha önce varolan monozomi 7 hücrelerini arttırdığı düşünülmüştür (95, 96).

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör en sık kullanıldığı hasta grubu malin hastalıklardır. Bu hastalarda da relaps ve/veya sekonder malin hastalıklara neden olduğu ile ilgili endişeler vardır. AML tanısıyla takip edilen çocuk ve ergenler arasında, rhG-CSF alımına bağlı etkilerin incelendiği geniş kapsamlı bir çalışmada özellikle G-CSF reseptör izoform IV'ü yüksek oranda taşıyan bireylerde 5 yıllık kümülatif AML relaps oranının % 50, düşük oranda izoform IV taşıyan grubta ise % 14 olduğu saptanmıştır. rhG-CSF almayanlarda ise izoform IV taşınmasının relaps oranını tek başına arttırmadığı gösterilmiştir (97).

Akut lenfoblastik lösemi, lenfoma, meme kanseri gibi malinitelerde de rhG-CSF kullanımı ile AML/MDS riskinde artış bildirilmiştir. Fakat bu etkinin rhG-CSF'in doğrudan karsinojenik etkisine mi yoksa bu grup hastalarda daha yüksek dozda kullanılan kemoterapötiklere mi bağlı olduğunun net olmadığı belirtilmektedir (98, 99).

Günümüzde yapılan tüm çalışmalar ışığında, rhG-CSF'in, nötrofillerin sayısal ve fonksiyonel bozukluğu olan hastalarda hayatı tehdit eden tablolarda faydasının potansiyel risklerinden daha fazla olduğu söylenebilir. Fakat sağlıklı kök hücre vericilerinde durum biraz daha karmaşıktır. Kardeşinde lösemi olan bireylerin lösemi olma riski zaten 2-5 kat artmıştır (100). Gönüllü ve tamamen sağlıklı olan allojenik periferik kan kaynaklı kök hücre vericilerinde rhG-CSF kullanımına bağlı AML/MDS gelişim riskini araştıran çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiş olup günümüzde bu bireyler için risk olmadığı kabul görmüştür. Ancak bu alan halen araştırma ve merak konusudur.

Bennett ve ark. tarafından, aile içi vericiden APK-HKHT yapılan 200 hastanın vericilerinin ikisinde, 4 ve 5 yıl sonra AML geliştiği bildirilmiştir (101). Makita ve ark tarafından da APK-HKHT'den 14 ay sonra bir vericide AML gelişimi bildirilmiştir (102). Ancak bu malinitelerin G-CSF'e bağlı olup olmadığı net olarak ortaya konulamamıştır. Bu belirsizliği gidermek amacıyla incelenen klinik serilerde bir ilişki bildirilmemiştir (103, 104). Holig ve ark. aynı merkezden 3928 akraba dışı vericiyi 5 yıl süreyle izlemiş ve normal populasyondan farklı bir lösemi riski saptamamıştır (30). ABD Ulusal ilik verici programı verileri Confer ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu grupta kanser insidansında artış saptanmamış ve vericilerin hiçbirinde lösemi ve lenfoma gelişmemiştir (105). Ancak bu serilerde lösemi olan hastaların takipten düşme ihtimali, malinite oluşumu için izlemlerin genelde kısa olması ve yeterli sayıda vericinin toplanmamış olması yapılabilecek çıkarımları kısıtlamaktadır. Hasenclever ve ark. toplumda AML insidansının az olması ve sekonder AML vakalarının geç ortaya çıkması nedeniyle, AML insidansında 10 katlık bir artışı gösterebilmek için bile 2000 hastanın 10 yıllık verilerinin bilinmesi gerektiğini bildirmişlerdir (106). Halen bu konuda yeterice uzun ve geniş klinik bir çalışma yapılamamıştır.

2.2.6 Rekombinan İnsan Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör'ün Genotoksisite Üzerine Etkileri

Genotoksisite, kimyasal, fiziksel veya biyolojik maddelerin genetik materyalde oluşturduğu hasardır. Birçok ilacın genotoksisite üzerine etkileri vardır. rhG-CSF'in genotoksisite üzerine etkilerini inceleyen laboratuvar destekli çalışmalar da yapılmıştır. Kaplinsky ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada kök hücre mobilizasyonu amacıyla verilmiş rhG-CSF'in (5-10 mcg/kg/doz, 3-5 gün), sağlıklı vericilerde beyaz kan hücreleri üzerine morfolojik ve genotipik etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda periferik kanda farklılaşmış miyeloid hücrelerin % 0,6'sında tetraploidi tespit edilmiş ve bu hücrelerin dev nötrofil veya binukleuslu metamiyelosit yapısında olduğu, CD34+ hücrelerin ise tamamının diploid yapıda olduğu bildirilmiştir. Sayısal kromozomal değişikliklerin olması rhG-CSF'in uzun dönemli güvenilirliği ile ilgili şüpheye neden olmuş fakat tetraploidi saptanan

hücrelerin düşük yüzdede gözlenmeleri ve CD34+ hücrelerin diploid yapıda olmaları nedeniyle, lösemik dönüşüm potansiyeli olan öncül hücrelerde değişiklik olmadığı öne sürülmüştür (107).

Shapira ve ark. ise 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada, gönüllü periferik kan kaynaklı kök hücre vericilerinde 5 günlük rhG-CSF tedavisi sonrasında onkogenezin temel bir basamağı olan DNA destabilizasyon derecesini değerlendirmiştir. Hücre başına düşen DNA seviyelerinin değişmediği, DNA sentezinin 5. günde yaklaşık iki katına çıktıktan sonra birinci ve ikinci aylarda normal düzeyine döndüğü saptanmıştır. Çalışma sonucunda kısa süreli ve geriye dönüşümlü etkiler görülmesi nedeniyle vericilerde kısa süreli uygulamanın güvenli olduğu yorumuna ulaşılmıştır (108).

2004 yılında Nagler ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da, rhG-CSF'in sağlıklı vericilerde epigenetik ve genetik değişikliklere neden olup olmadığı araştırılmıştır. Hematolojik malinitelerde allelik replikasyonun planlanmış sırasının bozulduğu, TP53, RB1, CMYC, HER2 ve AML1 genlerinde gösterilmiş olduğu gibi allele özgün senkronize replikasyonun bozulduğu ve bu durumun kanser gelişimine özgül bir durum olduğu bildirilmiştir. Kanser ilişkili asenkronize replikasyon geri dönüşümlü bir epigenetik fenomendir ve DNA metilasyonunu inhibe eden 5-azasitidin gibi ilaçlarla geri döndürülebilir. Bu çalışmada rhG-CSF uygulamasının allelik replikasyonun düzenini bozup bozmadığı ve anöploidiye neden olup olmadığı incelenmiştir. Çalışmaya sağlıklı vericilerin yanı sıra sağlıklı kontrol grubu ve çeşitli hematolojik maliniteleri olan hastalar da dahil edilmiştir. Sonuçta rhG-CSF ile kök hücre mobilizasyonu sonrasında sağlıklı vericilerde TP53 ve AML1 genlerinin replikasyon zamanlamalarında hematolojik malinitelerdekine benzer değişiklikler saptanmıştır (109). Aynı çalışmada, FİSH ile moleküler sitogenetik incelemeler de yapılmış ve vericilerde rhG-CSF uygulaması sonrasında lösemi hastalarında olduğu gibi allelik replikasyon düzeninde senkronizasyon kaybı ve 17. kromozomu tutan anöploidi saptanmıştır. Etkilerin kalıcılığına bakıldığında, allelik replikasyon düzeninde senkronizasyon kaybının geçici, anöploidinin ise kalıcı olduğu görülmüştür (109).

2005 yılında Hernandez ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise, sağlıklı vericilerde gen ekspresyon profilleri incelenmiş, örnekler 9 vericiden, 0. ve 5.günde;

3 vericiden 2. ve 6. aylarda toplanmıştır. 5. günde 0. gün ile karşılaştırıldığında 761 gende farklılık görülmüştür. Genlerin 374'ünün ekspresyon seviyesinde artış, 387'sinde azalma saptanırken, 2. ve 6. aylarda alınan örneklerde gen ekspresyonlarında artış veya azalma saptanmamıştır. Gözlenen tüm etkilerin 2. ve 6. aylarda normale dönmesi nedeniyle rhG-CSF'in sağlıklı vericilerde uzun dönemde güvenli olabileceği yorumu yapılmıştır (110).

Marmier-Savet ve ark. rhG-CSF'in sağlıklı bireylerdeki etkilerini değerlendirmek için 24 sağlıklı APK-HKHV'yi bir yıl boyunca takip etmişlerdir. FİSH yönteminin kullanıldığı çalışmanın sonucunda rhG-CSF uygulamasıyla kromozom 8 ve 17'de anöploidinin 4,5-4,3 kat arttığı ve 3-6. aylarda halen yüksek miktarda olmaya devam ettiği saptanmıştır. Ancak CD34 hücreler incelendiğinde, kontrol grubuna göre anöploidide artış saptanmamıştır (111).

Olnes ve ark. tarafından 2011 yılında yayınlanan retrospektif bir çalışmada ağır aplastik anemi ve ağır konjenital nötropeni hastalarında rhG-CSF verilmesinin monozomi 7 ilişkili MDS ve AML sıklığını arttırdığı bildirilmiştir (94, 112). Granülosit vericilerinde ve APK-HKHV'lerde monozomi 7 ve trizomi 8 anöploidisinin araştırıldığı bir çalışmada, 38 granülosit vericisinde ve 35 APK-HKHV'de FISH ve spektral karyotyping analysis (SKY) yöntemileriyle yapılan incelemeler sonucunda kromozom 7 ve 8 bozukluğu veya anöploidi saptanmamıştır (113).

Hirsch ve ark. tarafından 2011'de yayınlanan bir araştırmada, rhG-CSF kullanımı sonrası MDS ve AML gelişen hastalarda en sık bildirilen klonal kromozomal anormalliğin monozomi 7 olması nedeniyle, APK-HKHV'de, rhG-CSF kullanımı öncesi ve sonrası 5-7. gün, 2., 6., 12. aylarda kromozom 7 (üç farklı lokusta), 8, 9, 17, 21, 22 FISH yöntemiyle anöploidi açısından incelenmiştir. Sırasıyla kromozom 7'de CEP7, ELN, SD7S486, kromozom 8'de RUNX1T1, kromozom 9'da ABL1, kromozom 17'de CEN17, kromozom 21'de RUNX1 ve kromozom 22'de BCR lokuslarını incelenmiş, ayrıca kromozom 15 ve 17 için replikasyon zamanlaması araştırılmıştır (114). Kısa dönemli rhG-CSF'in sağlıklı APK-HKHV'de anöploidi sıklığını arttırmadığı ve replikasyon kinetiklerinde değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, gönüllü APK-HKHV'de rhG-CSF'in güvenle kullanılabileceği görüşünü desteklemiştir.

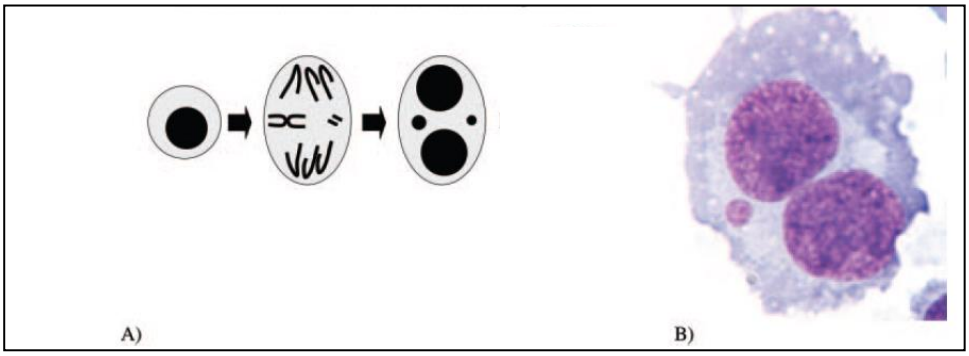
2.3 Genotoksisite

Genotoksisite, kimyasal, fiziksel veya biyolojik maddelerin genetik materyalde oluşturduğu hasardır. Genotoksisite ile karsinojenisite arasındaki ilişki kesin olarak gösterilmiştir. Genotoksik hasarın, kanser gelişiminde en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle genotoksisite araştırmaları karsinojenlerin belirlenmesinde önem taşır. Günümüzde genotoksisite incelemelerinde, farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok genotoksisite testi vardır. Bizim çalışmamızda, 'International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use' sınıflamasında yer alan iki test; Mikronükleus ve Comet testleri, kullanılmıştır (115). rhG-CSF kullanılarak periferik kök hücreleri mobilize edilen sağlıklı APK-HKHV'de bu yöntemler kullanılarak daha önce yapılmış bir çalışma yoktur. Daha hassas ve güvenilir yeni teknikler bu alandaki kuşkuları ortadan kaldırmaya yönelik umut verici çalışmalara aracı olmaktadır.

2.3.1 Mikronükleus Testi

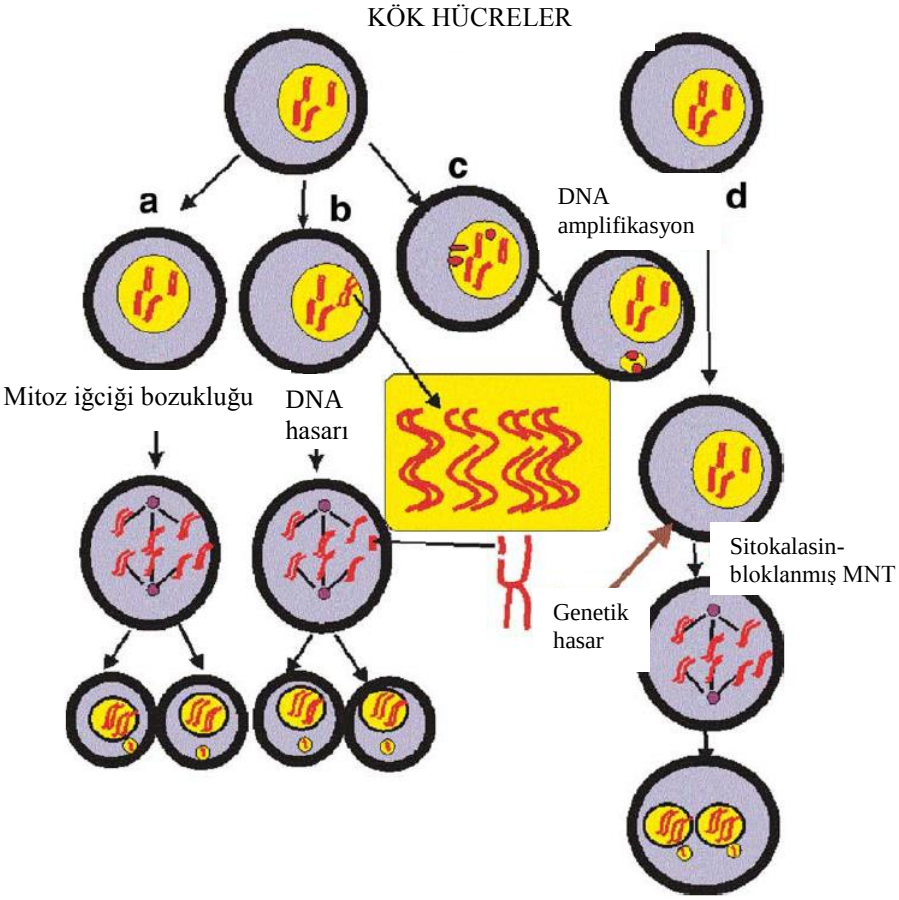
Mikronukleuslar (MN) sitoplazma içinde yer alan küçük, küresel, nükleus dışı kromozom-kromatid kalıntılarıdır. Işık mikroskopisi ile bile görülebilirler (116). Çevrelerinde çekirdek zarı vardır ve çekirdekten tamamen ayrılmış olarak görülürler. Bölünmekte olan hücrelerde (mayoz veya mitoz sırasında), asenterik kromozom/kromatid parçacıkları veya tüm kromozom/kromatid halinde anafaz sırasında geride kalan ve telofaz sırasında kardeş nukleusa dahil olmayan kalıntılardır (Şekil 2.2). Hematolojide "Howell-Jolly cisimleri" olarak bilinen oluşumlar da aslında bir çeşit MN oluşumudur (117). Mitozdaki bir hücrede MN iki temel mekanizma ile oluşur: a) kromozomal kırılma b) mitoz aparatının disfonksiyonu. Mikronülkeuslar spontan olarak sağlıklı bireylerde veya çevresel kirleticiler, ilaçlar, serbest radikallere gibi değişik ajanlara maruz kalma sonucunda, kemoterapi, radyasyon, kronik enflamasyon ve maliniteler sonrası oluşabilir. Eğer DNA zincirinde bir kırılma olduysa bu durum hücre bölünmesine kadar morfolojik olarak anlaşılmayabilir. Mikronükleuslar değerlendirileceği hücrelerin, birinci

mitozlarını geçirmeleri, ikinci bölünmeye başlamamaları gerekmektedir. Lenfosit kültüründe, bölünen hücrelerde sitoplazmik bölünme Sitokalasin-B gibi ajanlarla engellenir fakat nükleer bölünme devam ederse MN'ler ışık mikroskobu ile görülebilir (Şekil 2.2). MN'lerin skorlaması genetik hasarı, kanser riskini, genomik instabiliteyi değerlendirmek için kullanılabilir. Bu prensibe dayanarak yapılan teste Sitokinesis-bloklanmış MN testi denir ve bu çalışmada Mikronükleus Testi (MNT) olarak adlandırılacaktır (Şekil 2.3)(118).



Şekil 2.2. Şematik(A) ve fotografik (B) MN oluşum ve görünümü (119).

Mikronukleus oluşumu ve ilgili mekanizmalar şematik olarak Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: MN oluşumunun değişik mekanizmaları (116)

a) Mitotik iğ kusurunda, tüm kromozom kardeş hücrelerin birinde kalır ve MN oluşur b) DNA birçok farklı nedene bağlı kırılır ve kromozom parçaları MN oluşturur

c) Ekstrakromozomal DNA sıklıkla amplifiye olur ve zar ile çevrilir; MN oluşur.

d) Sitokinez-Bloklanmış MNT tanımlanmıştır. Genotoksik hasara bağlı hasarlanmış kromozomal DNA. Hücreler kültüre edilir ve hücre bölünmesi bloklanır. MN oluşur ve yaymada görülebilir durumdadır.

Periferik kan lenfositlerinde MN frekansının saptanması, insanlarda kromozomal hasarın ve genom instabilitesinin tespitinde sıkça kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Testin düşük maliyeti ve yüksek güvenilirliği nedeniyle genotoksik ajanlara bağlı in vivo ve in vitro genom hasarının tespitinde tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (120). Mikronükleus oluşumu her zaman genetik hasar ile birlikte değildir. Fiziksel hasar sonucu da oluşabilir. Bir hücrede MN görülmesi onun patolojik olduğu anlamına gelmez ancak yüksek MN skoru genetik hasarı gösterebilir. Mikronükleus oluşumunun tetiklenmesi ve kanser oluşumu arasındaki ilişki çok sayıda klinik öncesi ve klinik araştırma ile gösterilmiştir. Genotoksik MN

frekansını arttıran ajanlar (örn, ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi) ve karsinojenite arasındaki ilişki daha önce ispatlanmıştır (121-123). Mikronükleus testi ile kanser ilişkisini inceleyen prospektif çalışmalar da yapılmıştır. Bonassi ve ark. tarafından 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada 10 farklı ülkeden 6718 sağlıklı birey 20 farklı laboratuvarda, 1980 ve 2002 yılları arasında MNT ile taranmış, prospektif olarak kanser insidansı ve mortaliteye yönelik takip edilmiştir (119). Sonuç olarak MN frekansı orta ve yüksek 1/3'lük kısımda bulunan bireylerde, alt 1/3'lük kısımda bulunan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek prospektif kanser riski tespit edilmiştir. Bu veriler, Murgia ve ark. tarafından 2008 yılında yayınlanan bir çalışmada da desteklenmiştir. İtalya Pisa'da yaşayan hastalıksız 1650 bireyin, 1991-1993 yılları arasında periferik lenfosit örneklerinde MNT değerlendirilmiş, 2005 yılında tekrar değerlendirildiklerinde 111 ölümün 52'sinin kanserden olduğu tespit edilmiş. 49 kanser vakasının ve 101 uyumlu kontrolün MN frekansı çalışıldığında kanser grubunda MN sıklığının 4,7±3,4 MN/1000 binukleuslu hücre iken, kontrol grubunda 1,5±1,7 MN/1000 binukleuslu hücre şeklinde, istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışma ile periferik kan lenfositlerinde MN frekans değerlendirilmesinin kanserden ölüm riskinin güçlü bir yordayıcısı olduğu ortaya konmuştur (124).

2.3.2.Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)

Sitokinez-bloklanmış MNT sırasında sitokalasin-B eklenerek sitoplazmik bölünme engellediği andan itibaren nükleer bölünme devam eder ve bazı hücreler iki çekirdekli olarak kalmasına rağmen bir grup hücre de bölünmesini devam ettirir. İşte bu dönemde elde edilmiş preparatlarda, hücreleri çekirdek sayılarına göre sınıflandırılarak yapılan skorlamaya nükleer bölünme indeksi (NBİ) denir. Bu testte daha fazla kromozom hasarı olan hücrelerin daha az bölünecekleri mantığından hareket edilmiştir (125). Olabilecek en düşük NBİ değeri 1'dir. Sitokinez-blok periyodu süresince bölünme başarısız olur ve hücrelerin tamamı mononükleer kalırsa NBİ değeri 1'dir. Eğer tüm hücreler ilk bölünmelerini tamamlarsa tüm hücreler iki nükleuslu olacaktır; o durumda elde edilecek NBİ 2'dir. Eğer bazı çekirdekler bölünmelerini devam ettirirlerse, NBİ 2'den büyük olabilir (126). Beşyüz iki

çekirdekli hücre sayar iken, tek, üç, ve 4 nükleuslu hücreleri skorlanmasıyla elde edilir.

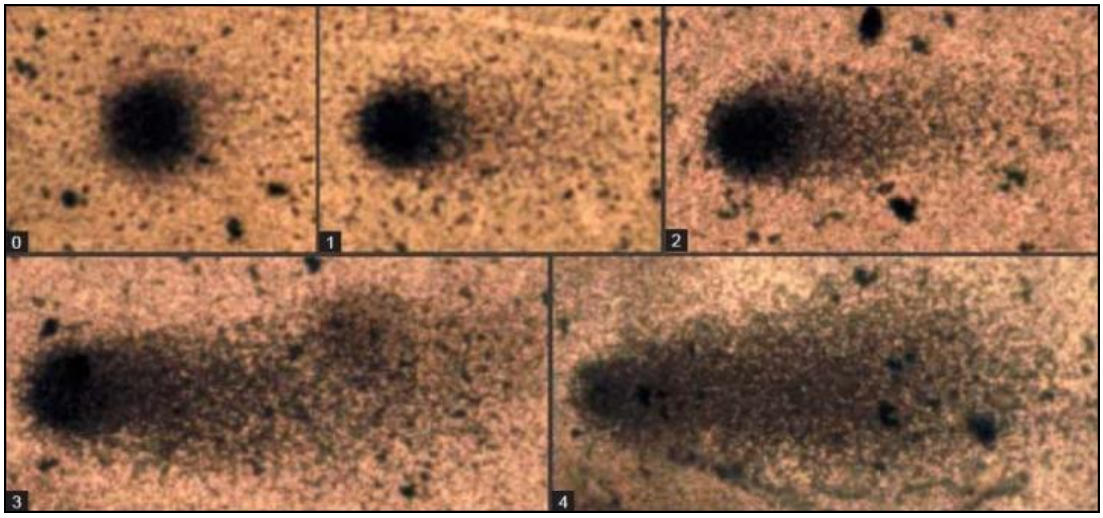
NBİ, hücre çoğalmasını gösteren bir belirteçtir. Genel sitotoksisteyi değerlendirirken kullanılan parametrelerden biridir. İki çekirdekli hücrelerin oranı lenfosit mitojen yanıtının, immün fonksiyonunun ve çalışılan birçok ajanın sitostatik yanıtının göstergesi olabilir (127).

Akciğer kanseri olanlarda NBİ'nin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (1,52-2,08, $p<0,001$) (128). İonescu ve ark. 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında, kolonoskopik incelemeleri normal olan veya polip veya kolorektal kanser saptanan bireyleri, NBİ değerleri açısından karşılaştırmışlar ve normal olanlarda NBİ:1,73 iken patolojik olanlarda 1,57 olduğunu saptamışlar ($p=0,013$) ve NBİ'nin kolorektal kanser taramalarında kullanılabilecek bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir (129).

2.3.3 Comet Testi

Comet testi (*Comet assay, single cell gel electrophoresis technique*) tüm ökaryatik hücrelerde, DNA hasarının ve tamirinin değerlendirmesinde sık olarak kullanılan hızlı ve kantitatif bir yöntemdir. 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilmiştir (130). Günümüzde Comet testinin farklı yöntemleri vardır. Singh ve ark tarafından gerçekleştirilmiş, Alkali Comet testi yönteminde, pH>13 olarak uygulanan güçlü lizis şartları sayesinde proteinlerin % 95'i yok edilebilir ve bu yöntem günümüzde en sık olarak kullanılan yöntemdir (131, 132). Farklı hücre tiplerine uygulanabilir, en sık olarak lenfositlere uygulanır. Comet testinin temeli, hasarlanmış DNA'nın negatif yüklü kırık uçlarının elektroforetik alanda pozitif yüklü uca, çekirdeğin dışına doğru hareketlenmesi sonucu oluşan görüntünün analizine dayanır. Bu analiz, floresan mikroskop altında gözle veya bilgisayar destekli olarak yapılabilir. Çekirdekten dışarı doğru uzayan hasarlanmış DNA, kuyruklu yıldıza benzer bir görünüm oluşturur. Kuyruklu yıldızın başını hasarlanmamış, kuyruk kesimini ise hasarlanmış DNA oluşturur Zaten bu kuyruklu yıldız görünümü nedeniyle, test İngilizce'de kuyruklu yıldız anlamına gelen 'comet' olarak

adlandırılmıştır (133). Hücreler kuyruk ve baş kısmının uzunluğu, yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi parametrelere göre puanlandırılır. Diğer genotoksisite teslerine göre, düşük düzeydeki DNA hasarını göstermede daha üstündür. Daha az sayıda hücreye uygulanabilmektedir. Hızlı, pahalı olmayan ve basit bir tekniktir. Bu özellikleri nedeni ile yeni kimyasalların ve ilaçların genotoksisite açısından güvenirliğini test etmede standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin tek tek incelenebilmesi de bir diğer avantajı olarak sayılabilir. İn vivo ve in vitro uygulanabilir. Bu yöntemle, klasik yöntemle saptanabilen DNA'da oluşmuş çift zincir kırıkları dışında, tek zincir kırıkları, inkomplet eksizyon tamir bölgeleri, çapraz bağlar ve alkali ortamda açığa çıkan hasarlar saptanabilir (132, 134).



Şekil 2.4. Comet yöntemi ile farklı derecelerde hasarlanmış lenfositlerin gümüş nitrat boyası ile görünümü (135)

Comet testi genotoksisiteyi belirlemede sıklıkla kullanılsa bile, literatürde kanser gelişimini yordadığına dair kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Santos ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, sağlıklı bireyler ile henüz tedavi almamış meme kanseri hastaları karşılaştırıldığında, comet testi ile belirlenen 'kuyruk yoğunluğunun' meme kanseri grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (136).

Küçük miktarlardaki DNA hasarlarında kuyruk uzunluğu en çok bilgi veren yöntemdir, fakat hasar arttıkça doygunluğa ulaşır ve yeterliliği azalır. % DNA kuyruk ise hasarı en hassas olarak gösteren belirteçtir. DNA kırık frekansı ile doğru orantılı olarak artar. Kuyruk momenti ise hem kuyruk uzunluğunu hem de kuyruk yoğunluğunu tek bir değişken halinde gösterir, ilk uygulayan bilim adamının ismiyle Olive'in kuyruk momenti olarak adlandırılır (137). Günümüzde en çok önerilen belirteçlerin % DNA kuyruk ve Olive'in kuyruk momenti olduğu söylenebilir (133, 138).

Fruchtman ve ark. tarafından yapılan bir yayında, miyeloproliferatif hastalıklar nedeniyle hidroksiüre alan hastalarda, lösemi riskinde artış olduğu saptanmıştır (139). Bu saptama üzerine hematolojik hastalıklarda sık kullanılan bir sitotoksik ajan olan hidroksiürenin insan periferik lenfositleri üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan güncel bir çalışmada, 28 orak hücreli anemi hastasında alkali Comet testi ile DNA hasarı incelenmiştir. Hidroksiüre alan grupta, kontrol grubuna göre hasar indeksi istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca daha yüksek doz hidroksiüre alanlarda DNA hasarı daha yüksek bulunmuştur (140).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1 Çalışma ve Kontrol Grubu

Çalışmamızda kök hücre mobilizasyonu amacıyla kullanılan rhG-CSF'in sağlıklı APK-HKHV üzerindeki genotoksik etkilerinin incelenmesi planlandı. Bu amaçla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulunun 28.05.210 tarihli, 09-281-12 nolu kararıyla, onay alındı.

Çalışmaya dahil olma kriterlerine göre, çalışma ve kontrol grubu için gönüllüler çalışmaya dahil edildi ve çalışmaya katılım ile ilgili onamları alındı, bilgilendirilmiş olur formu tüm deneklere imzalatıldı. Çocuk vericilerin ebeveynlerinden bilgilendirmiş onam alındı.

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

- Çalışma grubu için:
  Doku grubu uygun allojenik periferik kan kaynaklı kök hücre vericisi olmak
  6-65 yaş arasında olmak
  Gönüllü olmak
  Bilgilendirilmiş onam formunu onaylamış olmak
- Kontrol grubu için:
  Verici grubu ile benzer yaş grubunda olmak
  Gönüllü olmak
  18-60 yaş arasında olmak
  Bilgilendirilmiş onam formunu onaylamış olmak
  Herhangi bir kronik hastalığının olmaması
  Yakın zamanda ilaç kullanmamış olmak
  Sigara içmiyor olmak
  Aktif enfeksiyon veya hastalığının olmaması olarak belirlendi.

3.1.2 Çalışma Deseni

Çalışma grubuna alınan sağlıklı aile içi vericiler için yaş, vücut ağırlığı, doğum tarihi, hasta ile yakınlığı, sigara kullanımı, kullandığı ilaçlar, periferik kana kök hücre mobilizasyonu için kullanılan ilaç, ilaç dozu, uygulama şeması, hastanın hastalığı değişkenleri kaydedildi. Çalışma grubuna, kök hücre toplama işlemi öncesinde, APK-HKHT kuralları gereği, rhG-CSF 10 µg/kg/gün, 5 ardışık gün subkutan olarak uygulandı. 5. günün sabahında saat 06'da son doz rhG-CSF (10 µg/kg) verildikten sonra saat 09'da kök hücreler aferez yöntemiyle toplandı.

Sağlıklı APK-HKHV'lerinde rhG-CSF'in genotoksisite üzerine etkilerinin incelemesi için sağlıklı vericilerden 3 farklı zamanda kan örneği alındı. Kan örneklerinden ayrıca tam kan sayımı da çalışıldı.

Genotoksisite incelemesi için;

1) rhG-CSF verilmeden önce *(-5. gün):*
2) Beş günlük rhG-CSF uygulamasının 5. günü-aferez ile kök hücre toplama işlemi öncesinde *(0. gün)*:
3) Kök hücre toplanmasından 1 ay sonrasında *(30.gün)*:

Birinci ay örnekleri, vericilerin kontrole zamanında gelememesi nedeniyle genel olarak planlanan zamandan daha geç alınabildi.

Bu alınan örneklerden genotoksisisite incelemesine yönelik Comet ve MNT'nin yanı sıra tam kan sayımı çalışıldı. MNT Ankara Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Comet testi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Bilimler Enstitüsü Genetik Toksikoloji Laboratuvarı'nda çalışıldı.

Tüm çalışmaların laboratuvar aşmaları kör olarak gerçekleştirildi.

Ayrıca ikincil amaçlar olarak rhG-CSF'in, tam kan parametreleri ve CD34 sayıları üzerine etkileri değerlendirilmesi amacıyla çalışma ve kontrol grubundan alınan tüm örneklerle birlikte tam kan sayımı çalışıldı. Ayrıca A-HKHT yapılan merkezlerde, CD34 sayımı yapılmış ise sonuçları kaydedildi.

Kontrol grubunda ise, gerekli şartları sağlayan bireylerin yaş, vücut ağırlığı, doğum tarihi kaydedildi. Genotoksisite incelemesi ve tam kan sayımı için bir kez örnek alındı. Kontrol grubuna çalışmaya dahil olmaları nedeniyle herhangi bir ilaç uygulanmadı. Yapılan genotoksisite incelemelerinin rutin testler olmaması nedeniyle

testlerin tutarlılığını test etmek amacıyla, 9 vericiden birer hafta ara ile iki kez örnek alınarak genotoksisite incelemeleri yapıldı.

Çalışmanın örnek alımı ve laboratuar çalışmaları, Mayıs 2012-Haziran 2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi. İlk aşamada Ankara Üniversitesi Erişkin Hematoloji ve Çocuk Hematoloji ve Onkoloji bilim dalında APK-HKHT uygulanacak hastaların sağlıklı vericilerinin dahil edilmesi planlanmıştı. Ancak çalışmanın devamında yeterli vaka sayısının elde edilememesi nedeniyle, Hacettepe Üniversitesi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalları, Ankara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Bilim Dalı'ndan aynı şartları sağlayan vericiler de çalışmaya dahil edildi.

Çalışma grubuna toplam 36, kontrol grubuna 16 birey alındı. Çalışma grubuna alınan 36 bireyin 26'sının genotoksisite için gerekli olan 3 örneklemesi tamamlanabildi. Geri kalan 10 birey ise 1. ay incelemesi için belirlenen zamanda örnek veremedi ve bu bireyler genotoksisite incelemelerine dahil edilmedi.

3.2 Yöntemler

Mikronukleus ve Comet testleri için sarf malzemeleri Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu (Proje No: 12B3330022) desteği ile temin edildi. Temel incelemeler için ilgili laboratuvarlarda bulunan kurulu altyapı kullanıldı. Tüm laboratuvar çalışmaları kör olarak gerçekleştirildi.

3.2.1 Mikronükleus Testi ve Nükleer Bölünme İndeksi

Hücre kültürlerinin hazırlanması için, alınan kanlar taze olarak steril şartlarda kromozom medyumuna (Chromosome Medium B) ekildi. Daha sonra tüpler 37°C'de etüve (72 saat) kaldırıldı. Aynı zamanda pozitif kontrol olarak mitomisin C ekimi de yapıldı. 44. saatte sitokinezi durdurmak için Sitokalazin-B eklendi. Kültür süresi bitiminde tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, üstte kalan sıvı (süpernatan) atıldı. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml'lik kısım iyice karıştırılarak, hücreler kalan sıvı içerisinde homojen olarak dağıtıldı. Sonra bu tüplere, 0.075M KCI hipotonik solüsyonundan, otomatik karıştırıcıda damla damla

(5’er ml) ilave edilerek 30-60 saniye karışmaları sağlandı. Tüpler 37°C’deki etüvde 30 dakika hipotonik solüsyonla muamele edildi. Süre sonunda tüpler 10 dakika 1000 rpm’de santrifüj edilerek ve süpernatan atıldıktan sonra, önceden buzdolabında soğutulan 3:1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatiften 5’er ml yavaş yavaş ve otomatik karıştırıcıda karıştırarak ilave edildi. Fiksatifle yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Son fiksatif işleminin sonunda dipte 0,5-0,7 ml kalacak şekilde süpernatan atıldı. Bu aşamadan sonra preparat hazırlama işlemine geçildi. Son süpernatan atıldıktan sonra dipte kalan sıvı içerisindeki hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Bu süspansiyon daha önceden 1N HNO3’te temizlenmiş ve etil alkolde buzdolabında bekletilen nemlendirilmiş lamlar üzerine 15–20 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla damlatılarak yayılmaları sağlandı. Hazırlanan bu preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Her bir uygulama için hazırlanan preparatlar MN oluşumlarının tespiti için homojen olarak boyanmaya alındı. Bunun için preparatlar kuruduktan sonra % 5’lik Giemsa’da 15–20 dakika boyandı. Kuruyan preparatlara DPX damlatılıp lamelle kapatılarak preparatlar daimi hale getirilerek ve mikroskobik incelemeye alındı. Bu preparatlarda toplam olarak 500 hücrede NBİ ve 1000 binükleat hücrede MN frekansları değerlendirildi (118). MNT Ankara Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Laboratuvarı’nda yapıldı.

Bu incelemeler sırasında her bir vericiden hazırlanan preparatlardan 1000 tane iki-nükleuslu (binükleer) hücre incelendi ve MN içerenler sayıldı.

“Total Mikronükleus Sayısı (TMN): **(**1X 1MN) +(2X 2MN)+3X (3+4MN)/1000” formülü kullanıldı.

Aynı preperatlardan, 500 tane hücre sayılarak ve bir, iki, üç ve dört nukleuslu olanların sayıları saptandıktan sonra, NBİ, (*Nuclear Division Index*) hesaplandı (127) (Şekil 3.1).

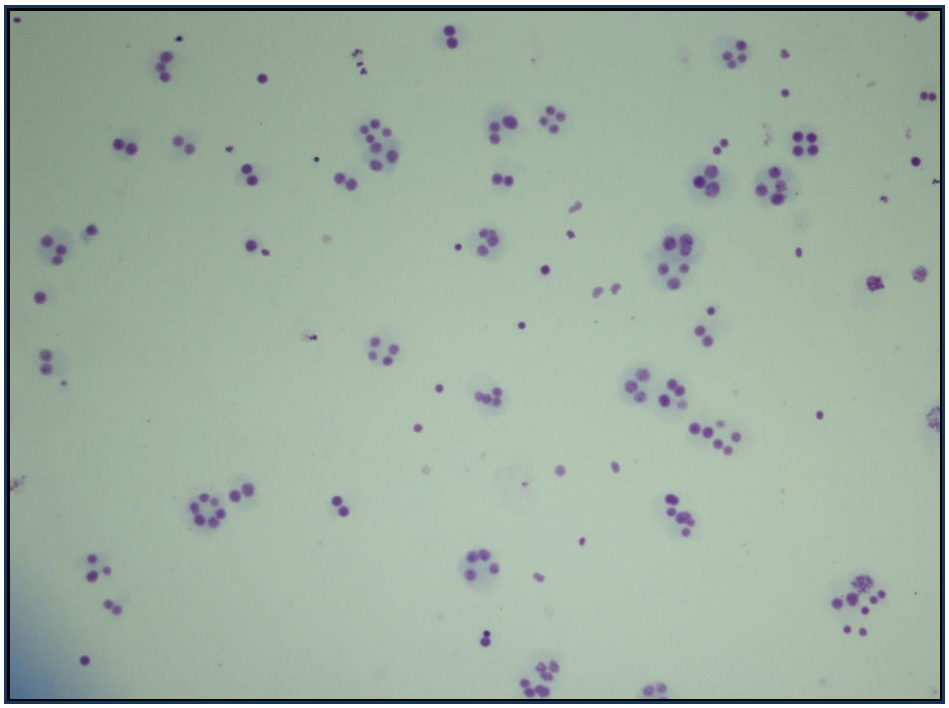
Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

NBİ=[(1xN1)+(2xN2)+(3xN3)+(4xN4)] / s

N1: 1 nukleuslu hücre sayısı *N3*: 3 nukleuslu hücre sayısı

N2: 2 nukleuslu hücre sayısı *N4*: 4 nukleuslu hücre sayısı

s: Toplam hücre sayısı

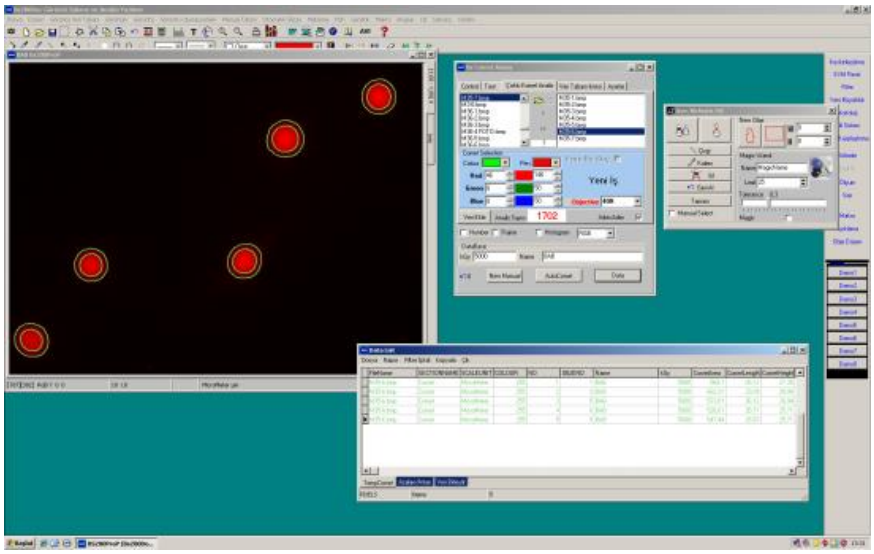


Şekil 3.1. NBİ hesaplanmasında kullanılan alanlardan biri

3.2.2 Comet Testi

Comet çalışması için örnekler, lenfositler ayrıştırıldıktan sonra -80º C ‘de saklandı. Literatürde dondurma işleminin uygun olduğu ve sonuçlar üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (133). Her örnek belirli bir süre dondurulmuş olarak saklandıktan sonra incelemeye alındı. Çalışmada öncelikle DNA hasarını belirlemek üzere yöntem standardizasyonu yapıldı. Lamlar % 65’ lik HMA ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutuldu. Dondurulmuş örnekler oda ısısında çözüldü. Hücreler % 0.55’lik LMA ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanıp kurutulmuş lama yayılıp, lamelle kapatıldı ve buz üzerinde agar katılaşıncaya kadar bekletildi. Bu arada stok *lysis* çözeltisinden (2,5 NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10) günlük taze *lysis* çözeltisi (% 10 DMSO, % 1 TritonX-100) hazırlandı ve +4 ^{o}C’ye kaldırıldı. Lamların üzerindeki lameller kenarından çekilerek hazırlanan lysis çözeltisine konuldu, 1 saat 20 dakika +4^{o}C’de bekletildi. Soğuk elektroforez çözeltisi (300mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) tankın içine doldurulduu ve *lysis* çöeltisinden çıkarılan lamlar tanka aktarıldı. Lamlar bu çözelti içinde DNA çift sarmalının açılması amacıyla 20 dakika bekletildi. Daha sonra elektroforez tankı 25 V ve 300

mA'da 20 dakika çalıştırıldı. Böylece sağlanan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etmesi sağlandı. Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan lamlar, oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla nötralizasyon tamponuyla 3 kez 5'er dakika yıkandı. Fiksasyon işlemi için lamlar sırasıyla % 50'lik, % 75'lik ve % 100'lük alkollerde 5'er dakika yıkanıp kurumaya bırakıldı. Bu işlem sonrasında her preparat, floresan renk vermesi için 60 µl etidyum bromür çözeltisi (20 µl/ml) ile boyandı. Lamlar boyandıktan sonra her birey için hazırlanan preparattan yaklaşık 15 bölge taranarak rastgele seçilen 50 lenfosit hücresi, Olympus BX50 floresan mikroskopta incelendi. Sonuçlar 5 parametreye göre; Comet uzunluğu (*Comet length*), kuyruk uzunluğu (*tail length),* tail moment(*kuyruk momenti*), % DNA kuyruk (*% DNA tail*) ve Olive'in kuyruk momenti (*Olive Tail Moment*), değerlendirildi. Değerlendirme BAB Bs otomatik analiz sistemi ile yapıldı (Şekil 3.2). Comet testi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Bilimler Enstitüsü Genetik Toksikoloji Laboratuvarı'nda çalışıldı.



Şekil 3.2. BAB Bs Otomatik Analiz Sistemi

3.2.3 İstatistiksel yöntem

Tüm istatistiksel analizler SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS INC, Chicago, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen test sonuçları (MNT, Comet) aynı deneklerden elde edilen tekrarlayan ölçümler olması nedeniyle, tekrarlı ölçümler için varyans analizi yöntemi kullanıldı. Kontrol grubunun farklı anlarda alınan örnek sonuçlarının karşılaştırılmasında ise bağımlı gruplar T testi kullanıldı. Kontrol grubu ile çalışma grubunun sonuçları, bağımsız gruplar T testi ile karşılaştırıldı. Değişkenler arası ilişkinin değerlendirilmesinde, korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılık Pearson testi ile hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı tüm testler için $p<0,05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Tanımlayıcı veriler

Tez çalışmamız kapsamında, genotoksisite incelemesi için sağlıklı periferik kan kaynaklı kök hücre vericisi olan toplam 36 bireyden 3 farklı zamanda kan örnekleri alındı:

1-) rhG-CSF verilmeden önce *(-5. gün):* 36 hastadan örnek alındı.

2-) Beş günlük rhG-CSF uygulamasının 5. günü-aferez ile kök hücre toplama işlemi öncesinde *(0. gün)*: 34 hastadan örnek alındı. İki hastadan kan alınmadan aferez işlemi başlatılmış olduğundan örnekler alınamadı.

3) Kök hücre toplanmasından 1 ay sonra *(30. gün)*: Vericilerin 26'sından üçüncü incelemeler için örnek alınabildi. Hastalar 1. ay kontrolüne zamanında başvurmadıkları için alınabilen örnekler, ortalama 1,4 ay (min-maks: 1- 4,27 ay) sonra alındı. Otuzuncu gün için belirlenen tarihte kan vermeye gelmeyen hastaların tümüne telefon ile ulaşıldı. İki kişi kök hücre verdiği hasta erken dönemde kaybedildiği için kontrole gelmeyeceğini bildirdi. Kalan 6 bireyden 2'si kontrol kanı vermek istememeleri nedeniyle çalışmadan çıkmak istediklerini bildirdi. Dört verici ise şehir dışında yaşadıkları için kontrole gelemeyeceklerini belirterek çalışmadan ayrıldılar. HKHT yapılan merkezlerin hiçbirinde vericiler rutin olarak kontrole çağırılmamaktaydı.

Sonuç olarak, genotoksisite incelemelerinden Comet testi, verileri tam olan 26 bireyin sonuçalrına göre değerlendirildi. MNT ise teknik sorunlar nedeniyle 2 vericide sonuçlandırılamadı ve 24 bireyin sonuçlarına göre değerlendirildi. Vericilerden genotoksisite incelemelerinin yanı sıra tam kan sayımı için de eş zamanlı örnek alındı. rhG-CSF'in tam kan parametreleri üzerine etkileri 26 verici üzerinden değerlendirildi. Periferik CD34 sayımları ile ilgili bilgiler kök hücre toplayan merkezlerin kayıtlarından elde edildi. Toplam 34 vericinin CD34 sayımına ulaşıldı.

Çalışma grubuna alınan vericilerin 19'u Ankara Üniveristesi Tıp Fakültesi Erişkin Hematoloji, 4'ü Ankara Üniveristesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve

Onkoloji, 3'ü Ankara Üniveristesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji, 7'si Gülhane Askeri Tıp Akademisi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji ve 3'ü de Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bölümleri'nde takip edilmekte olan hastaların yakınlarıydı.

Genotoksisite incelemelerinin yapıldığı çalışma grubundaki 26 vericinin nakil yapılan yakınlarının 5'i benin hastalıklar (1 talasemi majör, 1 Fanconi aplastik anemisi, 2 ağır kombine immün yetmezlik, 1 ağır aplastik anemi), 21'i ise malin hastalıklar (11 AML, 4 akut lenfoblastik lösemi, 2 Hodgkin dışı lenfoma, 2 plazmositom, 2 MDS) nedeniyle takip altındaydı.

Kök hücre mobilize edici ajan olarak 28 vericiye filgrastim, 8 vericiye ise lenograstim verildi. Tüm vericilere rhG-CSF 10 µg/kg/gün dozunda subkutan uygulandı. Beş günlük tedavi sonrasında 5. günün sabahında saat 06'da son doz rhG-CSF uygulaması sonrasında kök hücre toplama işlemi aferez yöntemiyle gerçekleştirildi. Aferez işlemi öncesi 34 vericinin (27 filgrastim, 7 lenograstim) periferik kandan CD34 sayımı, ilgili merkez tarafından gerçekleştirildi. İki vericinin CD34 sayısı ilgili merkez tarafından çalışılmaması nedeniyle kaydedilemedi.

Kontrol grubuna 16 birey dahil edildi. Dokuz bireyden birer hafta ara ile iki kez, diğer 7 bireyden ise bir kez kan örnekleri alındı. Bütün örnekler Comet testi, MNT ve tam kan sayımı açısından değerlendirildi.

Çalışma ve kontol gruplarının yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları benzerdi. Çalışma grubuna 36 verici [yaş ortalaması 32,3 (8-66), E/K:18/18] alınmıştı. Çalışma grubu yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımları üç farklı zamanda örnekleri alınabilmiş olan 26 hasta açısından bakıldığında da (yaş ortalaması: 32,7 ve E/K: 13/13) kontrol grubuyla [sayı 16, yaş ortalaması 33,8 (18-51), E/K:8/8] benzerdi ($p>0,05$).

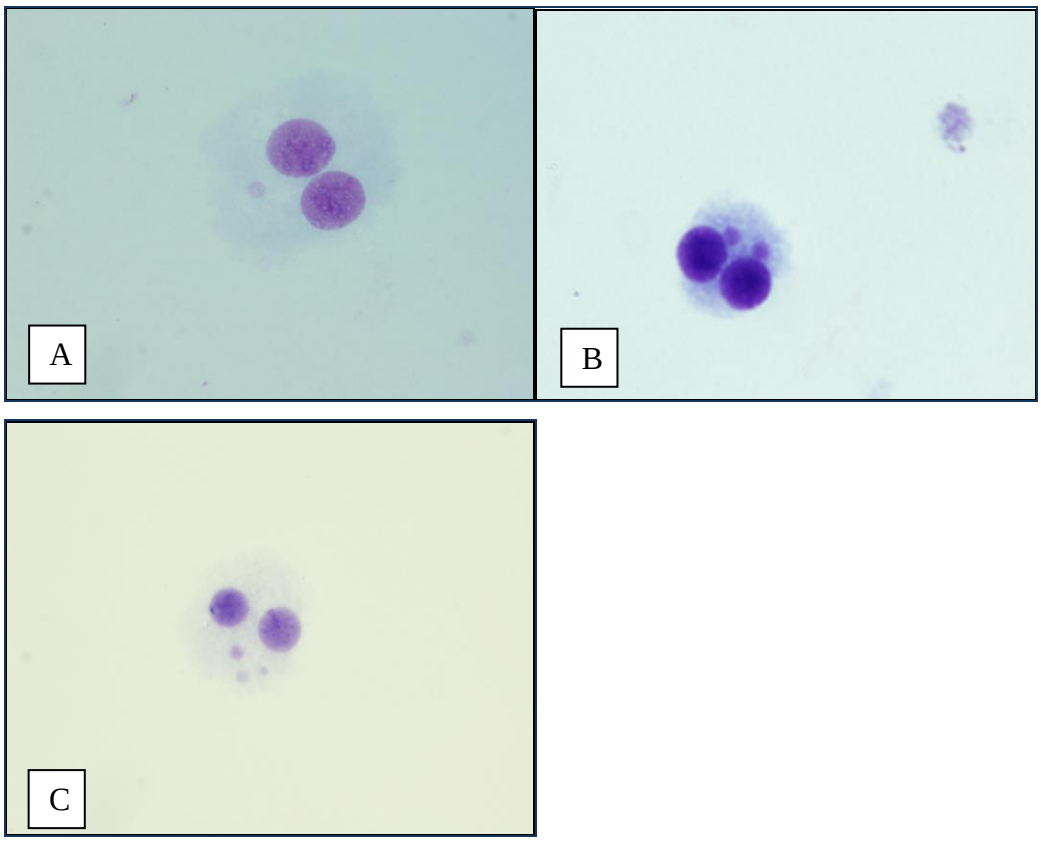
4.2 Laboratuvar Testlerinin Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi

Mikronükleus ve Comet testlerinin tutarlılığının incelenmesi amacıyla, kontrol grubundaki 9 bireyden birer hafta ara ile alınan örnek sonuçları bağımlı gruplar T testi ile incelendiğinde ölçümler arasında istatistiksel anlamlı fark

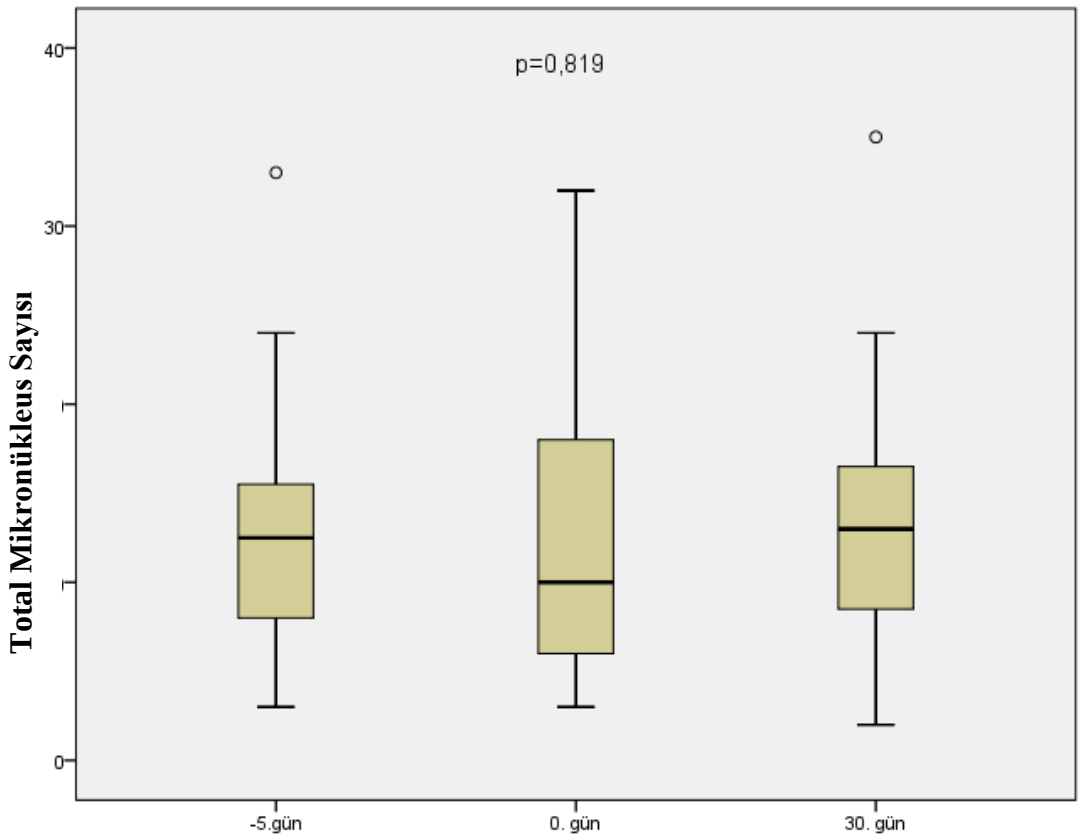
bulunmadı (p>0,05). Bu sonuç ile MN ve Comet testlerinin teknik olarak güvenilir olduğu görüldü.

4.3 Çalışma Grubunda Mikronükleus Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Mikronukleus testi, verici grubu kök hücre mobilizasyonuna yönelik rhG-CSF almadan önce (-5. gün), 5 günlük uygulama sonrası-kök hücre toplanmadan önce (0.gün) ve en az 1 ay sonrasında (30.gün) 24 bireyden alınan örneklerde değerlendirildi (Şekil 4.1). TMN açısından üç ölçüm arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,819) (Şekil 4.2).



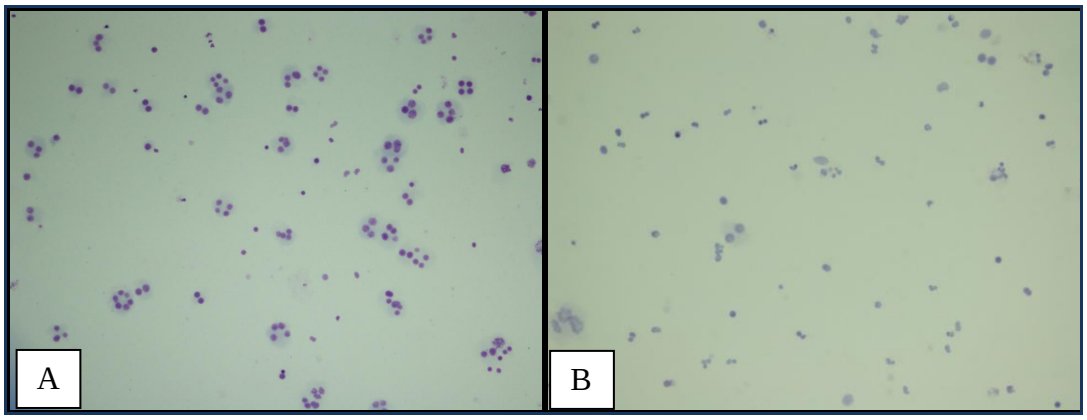
Şekil 4.1. Çalışmamızda elde ettiğimiz mikronükleus görüntüleri: sırasıyla bir (A), iki (B) ve üç (C) mikronüsleuslu binükleer hücreler



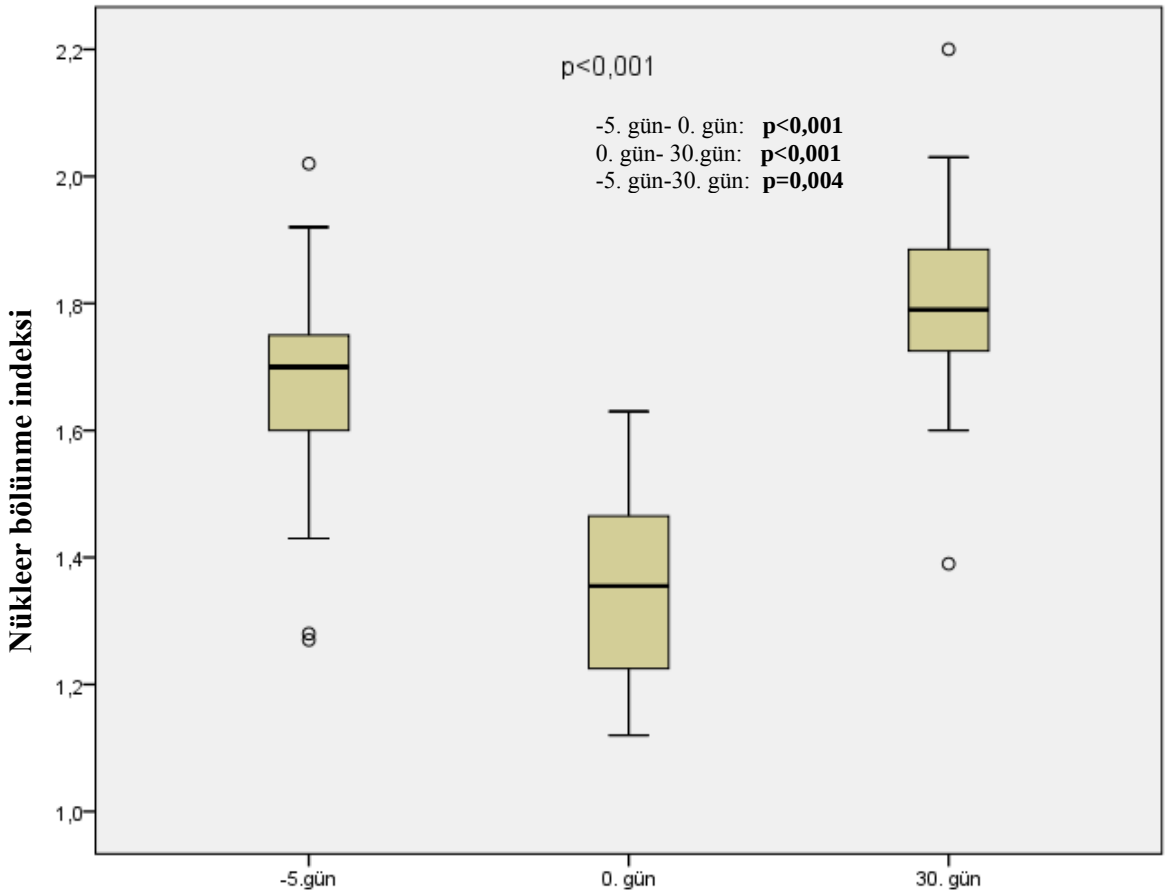
Şekil 4.2. Çalışma grubunda TMN değerlerinin karşılaştırılması

4.4 Çalışma Grubunda Nükleer Bölünme İndeksi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Nükleer bölünme indeksi, verici grubundan 24 bireyde, kök hücre mobilizasyonuna yönelik rhG-CSF almadan önce (-5. gün), 5 günlük uygulama sonrası-kök hücre toplanmadan önce (0. gün) ve en az 1 ay sonrasında (30. gün) alınan örneklerde değerlendirildi (Şekil 4.3). NBİ'nin ilaç uygulaması sonrasında öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,001$), takiben 1. ay kontrolünde istatistiksel olarak anlamlı şekilde eski değerlerinin üzerine çıktığı görüldü ($p=0.004$) (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3. Çalışma grubundan bir vericinin NBİ incelemeleri: A) rhG-CSF verilmeden önceki incelemede normal uyarılmış bölünmekte olan hücreler, B) rhG-CSF'in 5. gününde NBİ'de bazale göre gözle görülür biçimde azalmanın gözlendiği hücreler

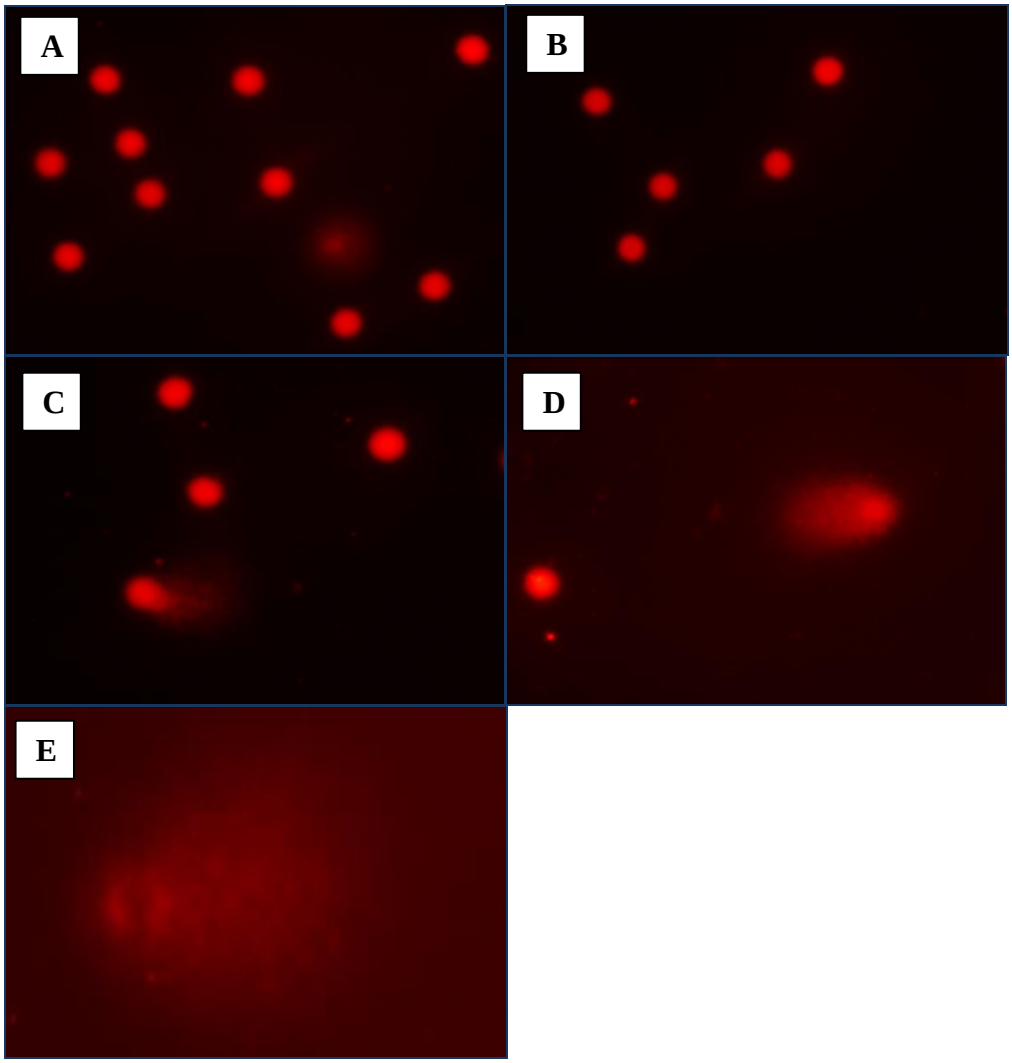


Şekil 4.4. Çalışma grubunda NBİ sonuçlarının karşılaştırılması

4.5 Çalışma Grubunda Comet Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

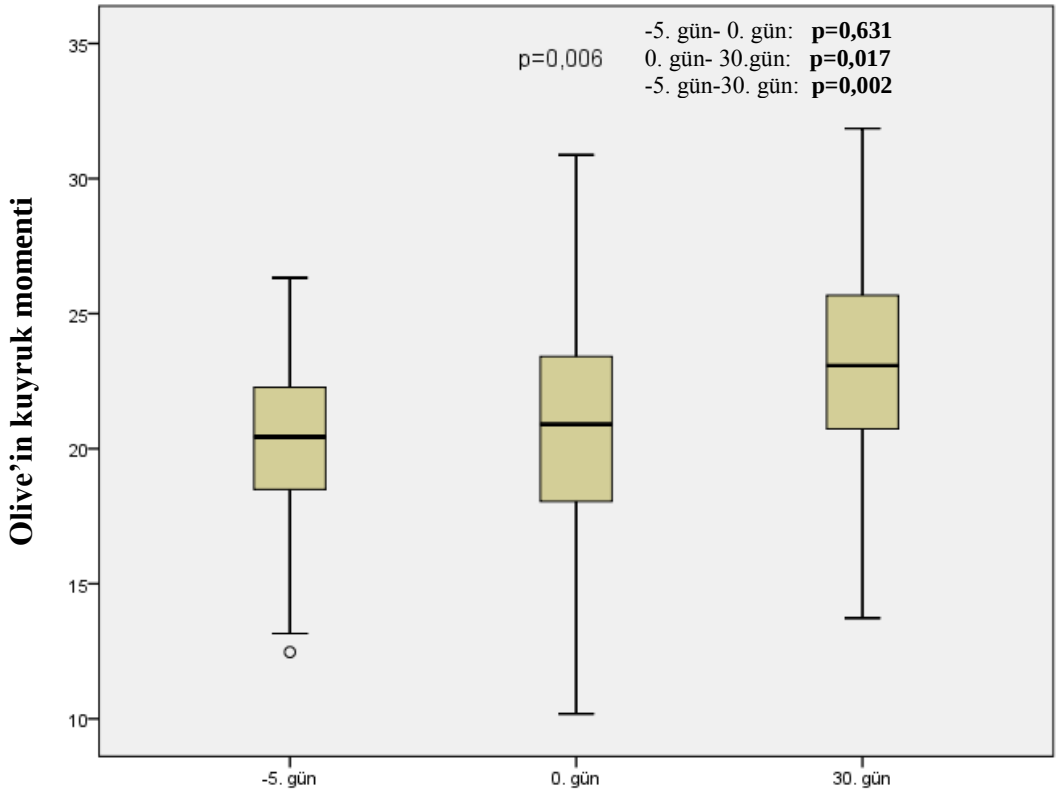
Comet testi verici grubunda 26 bireyden, kök hücre mobilizasyonuna yönelik rhG-CSF almadan önce (-5. gün), 5 günlük uygulama sonrası-kök hücre toplanmadan önce (0. gün) ve en az 1 ay sonrasında (30. gün) alınan örneklerde incelendi. Sonuçlar 5 parametreye göre (Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, % DNA kuyruk, kuyruk momenti ve Olive'in kuyruk momenti) değerlendirildi.

Çalışmamızda elde edilen görüntülerin farklı düzeylerde DNA hasarı bulunan lenfosit örnekleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.5) (A-E).



Şekil 4.5. Comet testinde farklı düzeylerde DNA hasarı bulunan lenfositlerin floresan mikroskopta görünümleri (A-E).

Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, DNA kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri açısından üç farklı dönemde alınmış olan örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (p>0,05). Olive'in kuyruk momenti değerlerinde ise -5. gün ile 0. gün arasında anlamlı fark saptanmazken (p=0,631), -5. gün ve 30. gün (p=0,002) ile 0. gün ve 30. gün (p=0,017) arasında anlamlı bir artış saptandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Çalışma grubunda Olive'in kuyruk momenti sonuçlarının karşılaştırılması

Sigara kullanımının genotoksisite üzerine olan etkisi verici grubunda araştırıldığında, sigara kullananlar ve kullanmayanlar arasında MN, NBİ ve Comet test sonuçları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p>0,05).

4.6 Kontrol Grubunun Comet ve Mikronükleus Test Sonuçlarının Çalışma Grubunun Bazal Değerleriyle Karşılaştırılması

Total mikronukleus değerleri açısından çalışma grubunun bazal ölçüm sonuçları (-5.gün), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ortalamalarının daha yüksek olduğu gözlendi (çalışma grubunda 13,08 iken kontrol grubunda 9,19) ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,059) (Tablo 4.1). NBİ değerleri açısından ise çalışma grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,45) (Tablo 4.1).

Comet incelemelerinde ise tüm parametreler açısından kontrol grubu ortalama değerlerinin çalışma grubunun bazal değerlerinin ortalamasından istatistiksel anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kontrol grubu ile çalışma grubunun bazal değerlerinin genotoksisite inceleme sonuçları açısından karşılaştırılması

		Verici			Kontrol			p
		Sayı	Ort±SS	Min-maks	Sayı	Ort±SS	Min-maks	
TMN		24	13,08±7,0	3,0-33,0	16	9,19±4,82	4,0-20,0	0,059
NBİ		24	1,68±0,18	1,27-2,02	16	1,73±0,2	1,43-2,13	0,45
Comet	**Comet uzunluğu**	26	26,43±4,37	20,19-30,39	16	31,82±3,27	28,4-39,56	**<0,001**
	Kuyruk uzunluğu	26	7,06±2,43	3,03-14,24	16	9,30±1,41	6,83-12,63	**0,002**
	% DNA kuyruk	26	72,20±10,9	48,1-88,82	16	78,65±4,98	67,82-84,72	**0,013**
	Kuyruk momenti	26	5,50±2,39	1,58-12,17	16	7,45±1,41	4,66-10,51	**0,005**
	Olive'in kuyruk momenti	26	19,99±3,80	12,47-26,33	16	24,95±1,07	19,85-32,91	**<0,001**

Çalışma ve kontrol grubuna ait genotoksisite incelemelerine ait ortalama, standart sapma, minumum ve maksimum değerler tablo halinde verilmiştir (Tablo 4.2).

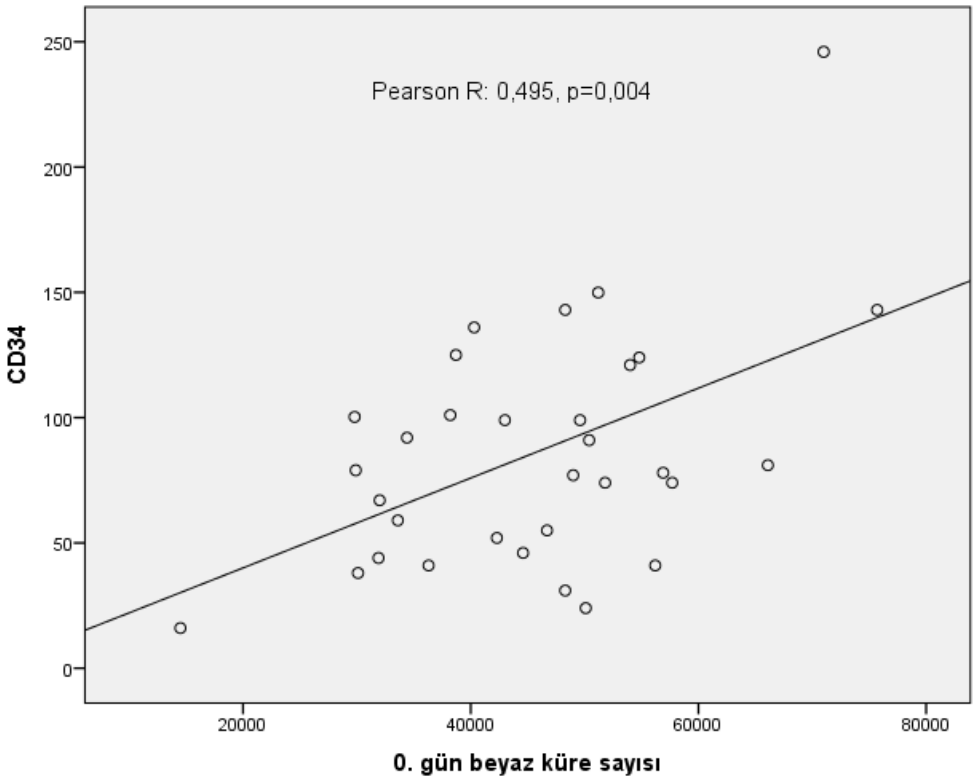
Tablo 4.2. Çalışma ve kontrol grubunun genotoksisite inceleme sonuçları

		Verici				Kontrol		
		s	**Gün**	**Ort±SS**	**Min-maks**	**s**	**Ort±SS**	**Min-maks**
TMN		24	-5	13,08±7,0	3,0-33,0	16	9,19±4,82	4,0-20,0
			0	12,31±6,94	3,0-32,0			
			30	13,3±7,75	2,0-35,0			
NBİ		24	-5	1,68±0,18	1,27-2,02	16	1,73±0,2	1,43-2,13
			0	1,35±0,16	1,12-1,70			
			30	1,81±0,16	1,39-2,20			
Comet	**Comet uzunluğu**	26	-5	26,43±4,37	20,19-30,39	16	31,82±3,27	28,4-39,56
			0	26,60±4,51	19,30-35,85			
			30	27,63±5,96	11,09-36,40			
	Kuyruk uzunluğu	26	-5	7,06±2,43	3,03-14,24	16	9,30±1,41	6,83-12,63
			0	6,73±1,60	3,86-10,20			
			30	7,51±2,22	2,65-12,56			
	% DNA kuyruk	26	-5	72,20±10,9	48,1-88,82	16	78,65±4,98	67,82-84,72
			0	70,77±5,76	58,23-79,77			
			30	73,75±7,80	53,29-87,41			
	Kuyruk momenti	26	-5	5,50±2,39	1,58-12,17	16	7,45±1,41	4,66-10,51
			0	5,03±1,42	2,47-8,08			
			30	5,90±2,13	1,91-11,16			
	Olive'in kuyruk momenti	26	-5	19,99±3,80	12,47-26,33	16	24,95±1,07	19,85-32,91
			0	20,39±5,33	10,18-30,88			
			30	23,21±4,12	13,73-35,85			

4.7 Çalışma Grubunda CD34 Sayısını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi

Çalışma grubunda 34 bireyin, kök hücre toplama işleminden önce (5 günlük rhG-CSF kullanılması sonrasında, 0. gün) periferik kandan bakılan CD34 sayısının ortalama 86,6 ± 46,0 /µl (16-246/µL) olduğu görüldü. CD34 sayısının, yaş, vücut ağırlığı, cinsiyet, 0. gün (5 günlük rhG-CSF tedavisi sonrası) beyaz küre değerleri ve kullanılan rhG-CSF'in türüyle (filgrastim veya lenograstim) olan ilişkisi değerlendirildiğinde, CD34 sayısının sadece 0. gün beyaz küre sayısıyla istatistiksel

olarak anlamlı, orta düzeyde ve pozitif yönde ilişkisi olduğu görüldü (Pearson R: 0,495, p=0,004) (Şekil 4.7). CD34 ortalamalarının cinsiyete ve rhG-CSF türüne göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği izlendi (Tablo 4.3).



Şekil 4.7. Çalışma grubunda periferik kanda CD34 sayısı ile 0. gün beyaz küre sayıları arasındaki ilişki

Tablo 4.3. Cinsiyete ve rhG-CSF türüne göre CD34 sayılarının karşılaştırılması

	Cinsiyet			**rhG-CSF**		
	Kadın (n:17)	Erkek (n:17)	p	Filgrastim (n:27)	Lenograstim (s:7)	p
CD34 µL (ort±SD)	78,42±44,0	94,8±47,8	0,306	85,1±45,9	91,5±48,9	0,736

Çalışma ve kontrol grubunun tanımlayıcı bilgileri ve genotoksisite inceleneleri sonuçları Tablo 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

4.8 Çalışma Grubunda Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktörün Tam Kan Sayımı Parametreleri Üzerine Etkisi

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün tam kan sayımı parametreleri üzerine olan etkisi tablo 4.4'de özetlenmiştir. 1. ay takip laboratuvar incelemeleri tam olan 26 vericinin tam kan sayımları ve beyaz küre alt gruplarındaki (otomatik sayım cihazları verilerine göre) değişim değerlendirildiğinde:

1) rhG-CSF'in beyaz küre ve beyaz küre alt grupları için tam kan sayımı cihazlarıyla yapılmış sayımlarında, beyaz küre sayısının 0. günde -5.güne göre istatistiksel anlamlı şekilde yükseldiği ($p<0,001$), takiben 1. ay ölçümlerinde normal aralığa döndüğü ancak bazal değerlere göre istatistiksel anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü ($p=0,043$).
2) Beyaz küre alt gruplarına bakıldığında nötrofil sayımının 0. günde bazale göre istatistiksel anlamlı şekilde yükseldiği ($p<0,001$) ve 1. ay takibinde eski düzeyine döndüğü görüldü.
3) Lenfosit sayısının benzer şekilde 0. günde bazale göre anlamlı şekilde yükseldiği ($p<0,001$) ve 1. ay takibinde bazalin de altına düştüğü ve bu düşüşün istatistiksel anlamlılık gösterdiği izlendi ($p=0,005$).
4) Monosit sayısının da benzer şekilde 0. günde bazale göre istatistiksel anlamlı olarak yükseldiği ($p=0,002$) ve 1. ay takibinde eski seviyesine döndüğü izlendi.
5) Eozinofil sayısının da aynı şekilde rhG-CSF tedavisini takiben 0. günde bazale göre istatistiksel anlamlı olarak yükselerek ($p<0,001$), 1. ayda eski seviyesine döndüğü görüldü.
6) Bazofil sayısının da 0. günde bazale göre anlamlı yükselme gösterdiği ($p=0,047$) ve 1. ay takibinde eski düzeylerine döndüğü saptandı.
7) Trombosit sayılarında, rhG-CSF tedavisinin 5. günü olan 0. günde bazale göre istatistiksel anlamlı bir düşme olduğu ancak 1. ay kontrolünde tekrar eski değerine ulaştığı görüldü ($p=0.007$). MPV değerlerinde de aynı dönemde anlamlı düşüş izlendiği ($p=0,032$), ancak 1. ay kontrollerinde eski değerlerine yükselmediği saptandı ($p=0,49$).

8) Hemoglobin düzeylerinde zaman içinde istatistiksel anlamlı değişim saptanmadı.

Tablo 4.4. rhG-CSF'in tam kan sayımı parametrelerinin ortalamaları üzerine olan etkisi

	-5. gün (n=26)	0. gün (n=26)	1. ay (n=26)	p
BK (mm^3)	5340	46807	4580	***-5-0. gün:*** **<0,001** ***-5-30.gün:*** **0,043** ***0-30.gün:*** **<0,001**
Nötrofil(mm^3)	4396	33024	4013	***-5-0. gün:*** **<0,001** *-5-30.gün:* 0,380 ***0-30.gün:*** **<0,001**
Lenfosit(mm^3)	2465	3760	1937	***-5-0. gün:*** **<0,001** ***-5-30.gün:*****0,005** ***0-30.gün:*** **<0,001**
Monosit(mm^3)	440	9197	451	*-5-0. gün:* 0,002 *-5-30.gün:* 0,781 *0-30.gün:* 0,002
Eozinofil(mm^3)	155	464	126	***-5-0. gün:*** **<0,001** *-5-30.gün:* 0,102 ***0-30.gün:*** **<0,001**
Bazofil(mm^3)	44	216	42	***-5-0. Gün:*** **0,047** *-5-30.gün:* 0,908 *0-30.gün:* 0,056
Trombosit(mm^3)	251	221	249	***-5-0. gün:*** **0,007** *-5-30.gün:* 0,746 ***0-30.gün:*** **0,008**
MPV (fl)	8,8	8,2	8,3	***-5-0. gün:*** **0,032** ***-5-30.gün:*** **0,049** *0-30.gün:* 0,659
Hemoglobin(gr/dL)	14,1	13,9	13,8	0,414

Tablo 4.5. Çalışma grubuna ait tanımlayıcı bilgiler, genotoksisite incelemeleri ve CD34 sayım sonuçları

							-5. Gün							0. gün							30. gün						
N	C	Y	CD34	VA	F/L	Si	TMN	NBİ	CU	KU	%DNAK	KM	OKM	TMN	NBİ	CU	KU	%DNAK	KM	OKM	TMN	NBİ	CU	KU	%DNAK	KM	OKM
1	K	24	81	53	F	H			31,10	7,86	68,79	5,88	20,27			32,85	7,47	67,45	5,30	23,43			27,40	7,41	75,02	5,68	17,83
2	E	19	92	87	F	H			21,54	4,80	65,59	3,46	16,41			23,08	4,04	54,24	2,43	13,34							
3	K	12	143	43	L	H			28,66	7,96	83,12	7,96	21,65			23,10	6,47	77,96	5,20	19,60							
4	K	43	125	97	F	H			22,81	4,39	57,28	2,87	16,43			30,42	8,93	72,47	7,13	16,81							
5	K	30	116	67	F	H			26,34	6,44	71,76	4,77	23,06														
6	K	30	38	62	F	H			30,83	6,08	59,68	3,89	21,92			20,55	5,47	76,04	4,32	15,56							
7	E	36	46	66	L	H			34,90	8,03	62,51	5,79	21,84			38,90	10,59	75,51	8,41	27,25							
8	E	24	82	85	F	E			31,73	8,60	76,10	6,58	25,64			21,59	6,88	82,25	5,79	19,82							
9	E	66	91	99	F	H			23,25	5,36	72,02	5,63	22,04			25,82	6,74	75,01	6,04	22,15							
10	E	30	74	92	F	H			28,35	7,46	75,81	5,73	24,60			27,39	10,11	88,30	9,07	21,16							
11	E	52	41	84	F	E	15	1,63	27,09	6,01	68,39	4,24	23,17	10	1,38	30,02	7,66	70,91	5,66	27,94	13	1,81	28,30	7,36	73,66	5,54	24,09
12	K	24	136	61	L	H	3	1,52	29,02	9,30	83,39	7,90	25,27	6	1,46	26,17	7,34	77,05	5,82	18,50	2	1,94	11,09	2,65	70,83	1,91	26,94
13	E	44	77	88	F	H	15	1,75	23,67	6,33	75,64	4,81	18,29	19	1,21	22,07	5,54	67,30	4,00	12,13	14	1,81	30,15	8,97	78,40	7,23	22,76
14	K	50	16	65	L	H	15	1,81	32,14	9,77	82,41	8,13	22,30	13	1,70	28,16	7,37	74,69	5,64	23,18			12,34	3,34	75,77	2,56	31,85
15	K	44	150	80	L	H	9	1,72	24,18	5,31	67,45	3,68	22,24	4	1,20	27,52	5,48	64,22	3,58	21,96	5	1,60	20,81	5,88	73,91	4,58	23,08
16	E	23	143	67	F	H			28,30	9,80	88,82	8,76	19,72	16	1,15	26,50	7,59	79,77	6,13	23,54			25,05	6,62	75,26	5,05	19,08
17	K	25	100	80	L	H	24	1,87	25,37	7,02	80,66	5,95	21,37	10	1,49	31,09	7,83	72,42	5,81	27,88	14	1,75	31,68	10,43	84,58	8,90	27,29
18	K	18	55	79	F	H	9	1,88	25,73	6,38	69,88	4,63	20,90	10	1,40	22,89	5,95	72,98	4,54	16,68	14	2,03	28,08	7,10	72,28	5,32	25,28
19	K	18	24	50	F	E	4	1,92	27,12	8,92	78,92	7,43	20,44	11	1,26	21,76	5,91	77,42	4,67	18,42	4	1,99	29,26	9,01	82,27	7,54	22,17
20	K	49	67	78	L	H	15	1,68	27,70	8,53	80,77	7,19	20,53	18	1,42	27,07	7,24	76,56	5,67	24,73	24	1,77	33,79	10,58	79,42	8,60	23,71
21	E	28	79	78	F	H	23	1,43	21,48	3,16	48,43	1,72	13,23	18	1,36	22,45	4,93	65,99	3,41	17,68	15	1,85	36,40	5,62	53,29	3,22	21,44
22	E	50	99	74	F	H	15	1,70	21,72	5,91	75,67	4,57	16,38	10	1,27	24,03	5,33	65,56	3,59	20,90	11	1,71	29,25	6,96	68,26	4,96	26,71
23	K	30			F	H	7	1,75	29,80	7,43	73,29	5,54	26,02	3	1,31	35,70	10,13	76,37	8,06	25,85	2	1,65	25,59	7,19	77,96	5,73	20,15
24	E	21	74	77	L	E	18	1,71	22,32	6,55	72,37	5,63	23,16	11	1,47	26,80	7,08	69,04	5,14	10,18	15	1,90	29,94	6,86	62,39	4,67	16,96
25	E	39	121	65	F	H	6	1,75	23,73	3,75	48,14	2,12	13,16	10	1,35	25,43	5,94	67,50	4,25	19,21	35	1,86	24,62	5,61	63,47	3,99	13,73
26	K	26	59	40	F	H	11	1,60	20,19	3,03	49,28	1,58	12,47	4	1,60	19,30	3,86	59,58	2,47	11,78	20	1,64	26,00	6,58	66,17	4,97	20,22
27	E	48	78	70	F	H	12	1,88	26,53	7,93	79,65	6,45	17,57	19	1,29	21,86	5,05	69,65	3,62	14,36	13	1,85	34,62	12,56	87,41	11,16	24,97
28	K	45	52	83	F	H	18	1,65	39,39	14,24	83,30	12,17	22,32	6	1,52	35,30	10,20	78,28	8,08	30,88	24	1,76	36,23	10,22	77,24	8,17	30,56
29	E	36	124	83	F	H	5	1,66	26,19	6,27	68,38	4,59	21,34	6	1,37	35,85	9,11	64,58	6,82	20,69	11	1,72	29,34	7,47	66,46	5,57	25,63
30	E	20	44	61	F	H	3	1,59	23,17	5,15	66,17	3,64	19,59	16	1,12	26,67	6,99	69,91	5,38	20,72	18	1,39	26,34	6,83	74,37	5,67	21,52
31	E	25	101	99	F	H	11	1,74	34,37	7,17	61,97	4,84	20,24	18	1,63	29,97	7,01	66,76	5,05	23,14	11	2,00	27,18	7,08	74,85	5,40	24,10
32	E	23	246	78	F	E	33	1,27	25,15	5,92	63,52	4,35	18,69	20	1,12	19,53	4,15	58,23	2,77	11,47	6	1,75	25,77	7,54	76,74	6,25	16,64
33	E	25		83	F	H	16	2,02	25,96	7,03	74,55	5,41	21,39	4	1,17	24,15	6,11	75,50	4,67	21,19	22	2,20	28,04	8,80	80,29	7,16	21,35
34	K	8	41	32	F	H	15	1,28	31,31	10,69	78,06	8,88	26,33	6	1,24	28,02	7,83	73,96	6,07	20,58	11	1,87	31,31	10,69	78,06	8,88	26,33
35	K	12	99	49	F	H	12	1,70	21,34	5,60	77,88	4,40	13,46	20	1,50	27,11	7,35	76,23	5,70	23,24	8	1,77	25,64	7,82	81,35	6,47	21,25
36	K	66	31	63	F	H	13	1,60	24,34	6,37	80,37	4,56	20,37	32	1,19	26,12	5,88	69,65	4,16	23,39	9	1,73	31,54	5,99	62,82	3,81	25,72

Kısaltmalar: N:sayı, C: cinsiyet, E: erkek, K: Kadın, CD34: CD 34 sayımı (µ/L), VA: vücut ağırlığı (kg), F: Filgrastim, L: Lenograstim, TMN: total mikronükleus sayısı, NBİ: nükleer bölünme indeksi, CU: Comet uzunluğu, KU: kuyruk uzunluğu, %DNAK: % DNA kuyruk, KM: kuyruk momenti, OKM: Olive'in kuyruk momenti

Tablo 4.6. Kontrol grubuna ait tanımlayıcı bilgiler ve genotoksisite incelemeleri ve CD34 sayım sonuçları

				Kontrol Grubu Örnek 1							Kontrol Grubu Örnek 2						
N	C	Y	VA	TMN	NBİ	CU	KU	%DNAK	KM	OKM	TMN	NBİ	CU	KU	%DNAK	KM	OKM
1	K	51	86	5	1,59	31,12	8,44	71,45	6,28	21,84	4	1,79					
2	E	23	74	4	1,64	31,55	8,70	75,07	6,77	24,18	2	1,72	30,77	8,77	80,13	7,07	22,47
3	K	25	60	5	1,68	31,23	6,83	67,02	4,66	22,60	5	1,62					
4	E	42	69	10	1,63	29,70	8,37	77,18	6,46	22,25	5	1,62	28,62	9,21	84,37	7,87	24,19
5	K	48	65	20	2,13	31,57	8,44	74,80	6,40	23,96							
6	E	18	68	9	1,74	31,82	9,57	80,37	7,86	23,60	8	1,78	27,50	8,16	81,33	6,69	22,55
7	E	30	74	5	1,61	39,56	12,63	81,71	10,51	30,91	5	1,58	29,29	9,24	81,74	7,68	20,22
8	K	29	80	16	1,87	32,24	10,30	83,64	8,73	28,89							
9	E	33	91	9	1,92	28,61	8,31	80,47	6,80	19,92	7	1,78	25,43	6,69	75,81	5,14	19,71
10	E	40	68	7	1,66	29,76	8,35	76,75	6,56	19,85	8	1,43	36,66	11,80	83,54	9,95	29,87
11	K	24	57	4	1,75	36,84	10,43	75,34	8,00	32,91	7	1,62	26,99	8,36	82,76	7,00	21,92
12	K	45	46	8	1,43	32,05	10,76	84,72	9,24	29,03	9	1,67	25,93	7,55	78,05	6,05	21,76
13	K	34	62	13	1,48	28,60	9,04	84,25	7,33	20,04	12	1,56					
14	K	37	60	16	2,08	29,07	8,75	81,85	7,27	25,03							
15	E	28	75	6	1,84	36,96	11,05	81,21	9,00	31,16	8	1,71	34,62	11,49	85,00	9,82	28,32
16	E	32	80	10	1,62	28,49	8,85	82,58	7,41	23,00	8	1,53	30,08	9,84	83,53	8,34	24,86

Kısaltmalar: N:sayı, C: cinsiyet, E: erkek, K: Kadın, VA: vücut ağırlığı (kg), TMN: total mikronükleus sayısı, NBİ: nükleer bölünme indeksi, CU: Comet uzunluğu, KU: kuyruk uzunluğu, %DNAK: % DNA kuyruk, KM: kuyruk momenti, OKM: Olive'in kuyruk momenti

5. TARTIŞMA

Dünyada yılda 50.000'den fazla HKHT yapılmaktadır. Otolog HKHT'lerin % 99'unda, allojenik HKHT'lerin % 72'sinde rhG-CSF kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (2, 3). Bu amaçla kısa süreli olarak kullanımı erken dönemde genelde önemli sorunlara neden olmaz. Ancak uzun dönemde oluşabilecek yan etkileri ili ilgili ciddi endişeler vardır. Özellikle malin hastalık (AML, MDS gibi) riskini arttırabileceği yönünde yaygın çekinceler bulunmaktadır (4, 5, 68). Bu çalışmada, bahsedilen belirsizliklerden yola çıkarak, sağlıklı aile içi vericilere A-HKHT sırasında kök hücre mobilizasyonu amacıyla uygulanan rhG-CSF'in olası genotoksik etkilerinin incelenmesi planlandı. Bu amaçla, rhG-CSF ile A-HKHT için kök hücre mobilizasyonu yapılan vericilerin periferik kan lenfositleri, aynı vericiden 3 farklı zamanda örnekler toplanarak (rhG-CSF öncesi, rhG-CSF uygulamaları sonrası-aferez öncesi ve ilaç sonrası 30. günde) genotoksite değerlendirmesi için MN ve Comet testleri ile incelendi.

Genotoksisiteyi değerlendirmeye yönelik yapılan MN ve Comet testlerinin standart uygulamalar olmaması nedeniyle güvenilirliklerinin araştırılması amacıyla kontrol grubundaki 9 bireyden birer hafta arayla alınan iki örnekten elde edilen sonuçlar kaşılaştırıldı ve anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Bu sonuç testlerin güvenilir olduğu yönünde yorumlandı.

Çalışmamızın birinci sorusu olan, rhG-CSF'in vericilerde genotoksik bir etkiye neden olup olmadığına yönelik yapılan MNT'de ilacın uygulaması öncesinde bir kez ve sonrası iki farklı zamanda yapılan ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,819$). Bu sonuç MNT ile saptanabilen genotoksik bir etki olmadığı şeklinde yorumlandı.

Nükleer Bölünme İndeksi'nin, 5 günlük rhG-CSF uygulaması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0,001$) ve takiben 1. ayda eski değerlerinin üzerine çıktığı görüldü ($p=0,004$). Hücre çoğalmasının belirteci olan NBİ'nin sitotoksik etki ile azalması beklenir. Literatürde NBİ'nin akciğer kanseri olan hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğu (128), kolonda patolojik polip saptanan veya kolon kanseri olan hastalarda kolonoskopisi normal olan bireylere göre düşük olduğu (129) bildirilmiştir. Verici grubumuzun NBİ sonuçları,

rhG-CSF'in erken dönemde lenfositler üzerinde bölünmeyi engelleyici bir etkisinin olduğu ancak bu etkinin kısa sürdüğü ve 1. ayda ortadan kalkarak kompanzatuar tarzda artış gösterdiği şeklinde yorumlandı. Bölünmeyi engelleyici etki genotoksisitenin bir göstergesi olabilir ancak 1. ayda ortadan kalkıyor olması geri dönüşlülük lehinedir. Rutella ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada, rhG-CSF'in lenfositler üzerinde hücre siklusunun ilerlemesini engelleyici etkisi gösterilmiştir (38). Bizim NBİ sonuçlarımız da bu bulguyla paralellik göstermekle birlikte ek olarak bu etkinin 1. ayda geri dönüşlü olduğu gösterilmiştir.

Comet testi DNA hasarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan, yeni tanımlanan ilaç ve kimyasalların organizmalar üzerindeki olası genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla başvurulan bir yöntemdir (133, 134). Ancak bildiğimiz kadarıyla kök hücre mobilizasyonu amacıyla sağlıklı bireylere kısa süreyle verilen rhG-CSF'in genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla bugüne kadar ilk defa kullanılmıştır.

Güncel bilgilere göre, Comet testinin genotoksisiteyi en iyi yordayan parametrelerinin % DNA kuyruk ve Olive'in kuyruk momenti olduğu bilinmektedir (133, 138). Bizim çalışmamızda, Comet testi parametrelerinden, Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, % DNA kuyruk ve kuyruk momenti değerlerinin üç farklı ölçüm arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık göstermediği izlendi ($p>0,05$). Kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunu tek bir değişken halinde gösteren ve bu nedenle genotoksik hasarı daha hassas bir şekilde gösteren Olive'in kuyruk momenti değerlerinde ise, 1. ay takibinde bazale ve tedavinin 5. gününe göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,017$). Genotoksik hasarın erken dönemde olmayıp 1. ay örneğinde ortaya çıkmış olması dikkat çekicidir.

Comet ve MN teslerinin ilaçların en düşük genotoksik dozunu belirlemeye yönelik kullanıldıkları bir çalışmada, MNT'nin düşük düzeyde genotoksik hasar potansiyelini belirlemede daha etkin olduğu, ancak hangi ajanların mutajen olduğunun saptanmasında iki yöntemin aynı sensitiviteye sahip olduğu görülmüştür (141). Bizim çalışmamızda ise MNT ile herhangi bir genotoksik etki saptanmazken, Comet testi parametrelerinden DNA hasarını saptamada en hassas olanlardan Olive'in kuyruk momenti ile 1. ay takibinde istatistiksel anlamlı bir etki gösterilmiştir.

Yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı ve sedanter yaşam tarzının genotoksisite üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir (142). Biz de bu çalışmamızda aynı bireylerde zaman içinde ortaya çıkan değişimleri inceleyerek bireyler arası ve çevresel faktörlere bağlı farklılıkların genotoksisite üzerine etkilerini en aza indirebildiğimizi düşünüyoruz.

Sigara bilinen bir genotoksik ajandır (142, 143). Sigara kullanımının genotoksisite üzerine olan etkisi çalışma grubunda araştırıldığında, sigara kullananlar ve kullanmayanlar arasında TMN, NBİ ve Comet test sonuçları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Çalışma grubunda sigara içen az sayıda (5) vericinin bulunması bu sonuca neden olmuş olabilir.

Bu tez çalışması için çalışma grubunun toplanması yaklaşık 16 ayda tamamlanabildi. Laboratuvar incelemeleri için örneklerin en geç 2 saat içinde taze olarak laboratuvara ulaştırılma zorunluluğu, kemik iliği vericilerinin bir kısmının Ankara dışında oturuyor olması ve belirlenen tarihte gelememesi nedeniyle özellikle 1. ay örneklerinin toplanmasında zorlanıldı. Ayrıca erişkin hastalar arasında A-HKHT sonrası erken dönemde kayıpların yaşanması nedeniyle bu hastaların yakınları olan vericiler 1.ay takip örneklerini veremedi. Sonuç olarak çalışmaya dahil edilmiş olan 36 vericinin sadece 26'sı çalışmayı tamamlayabildi. Bir ay sonra alınması planlanan örnekler ortalama 1,4 ay (min-maks:1-4,27 ay) sonra alınabildi.

Uzun dönem yan etkileri ile ilgili belirsizlikler olan rhG-CSF, dünyada her yıl onbinlerce sağlıklı akraba veya akraba dışı kök hücre vericisine uygulanmaktadır (2). Tüm vericilerin işlemin yan etkileri hakkında bilgilendirilmesi ve yan etkiler açısından takibi gerekmektedir. Örneğin Fransa'da gönüllü vericilerden rhG-CSF uygulaması ile kök hücre bağışı alımıyla ilgili net kontrendikasyonlar belirlenmiştir. Onsekiz yaş altı ve 51 yaş üzerinde bireylere kök hücre mobilizasyonu için rhG-CSF verilmesi kontrendikedir. Aferez işlemi için kateter takılması ise tüm akraba dışı vericilerde ve 18 yaşın altındaki akraba içi vericilerde yasaklanmıştır. Ayrıca rhG-CSF'in geç dönem etkilerinin anlaşılabilmesi için tüm vericilerin uzun süre takibi ve takip verilerinin uluslararası gruplarca toplanması önerilmektedir. Fransa'da bu vericiler 10 yıllık sağlık sigortası güvencesi altına alınmakta ve 10 yıl boyunca takipleri planlanmaktadır (4).

Bizim bu çalışmayı yaparken karşılaştığımız temel sorun sağlıklı vericilerin işlem sonrası yakın ve ileri dönem takiplere gelmemeleriydi. Ülkemizde sağlıklı vericilerin takipleriyle ilgili standart bir protokol bulunmamaktadır. Bu konuda gerekli değerlendirmeler yapılmalı ve akraba veya akraba dışı olma durumuna göre ilgili takip planları belirlenmelidir. Ülkemizde akraba dışı vericiler için oluşturulmuş olan doku bankalarında son dönemde hızlı büyüme kaydedilmesi, yakın dönemde akraba dışı vericilerden kök hücre toplanmasının daha sık gündeme geleceğinin göstergesidir. Bu vericilerin sağlık sigortası kapsamına alınmalarıyla ilgili girişimlerde bulunulmalıdır. Takip verilerinin kaydedildiği ulusal bir veri tabanı oluşturulmalı veya uluslararası veri tabanlarına kaydı sağlanmalıdır.

Çalışma sonuçları arasında yorumlamakta en zorlandığımız bulgu ise, genotoksisite göstergesi olan Comet testinde kontrol grubunda, çalışma grubunun rhG-CSF uygulanmadan önceki değerleri ile karşılaştırıldığında, tüm parametrelerde istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek değerlerin saptanması oldu. Bu sonuç bizim beklentimizin tam zıddı yönde olmuştur. Hematolojik maliniteleri olan hastaların birinci derece akrabalarından oluşan çalışma grubunda, genotoksik hasarın kontrollerden daha yüksek olması beklenebilirdi. Ayrıca çalışma grubundan 5 birey genotoksik etkileri gösterilmiş bir madde olan sigara kullanmaktayken, kontrol grubunda sigara kullanan yoktu. Bu durum da çalışma grubunda genotoksik etkinin kontrollerden daha yüksek olması yönündeki beklentimizin nedenlerinden biriydi. Sonuç olarak, Comet testi ile saptanan genotoksik hasarın, tamamıyla sağlıklı olduğu bilinen bireylerden oluşan kontrol grubumuzda çalışma grubuna göre daha yüksek olmasının nedenini açıklayamadık.

Çalışma grubunun bazal ölçümleri ile kontrol grubunun sonuçlarının karşılaştırılmasında ek olarak total mikronükleus değerlerinin çalışma grubunda daha yüksek olduğu (çalışma grubunda 13,08 iken kontol grubunda 9,19) ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi (p=0,059).

Çalışmamızda incelediğimiz ikinci konu ise rhG-CSF'in periferik kandaki CD34 sayısı üzerine olan etkileri oldu. Bu bağlamda, CD34 sayısının vericinin yaşı, vücut ağırlığı, cinsiyeti ve kullanılan rhG-CSF'in etken maddesiyle ilişkili olmadığı gösterildi. Ancak bu konuda literatürde tartışmalı veriler bulunmaktadır (77, 81). Özellikle ileri yaş (>55) ve kadın cinsiyetin CD34 verimini düşürdüğü ve genç

erkeklerin kök hücre vericisi olmak için en iyi adaylar olduğu düşünülmektedir (144, 145). Bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak, literatürde filgrastim ve lenograstim arasında CD34 mobilizasyonu açısından fark olmadığı bildirilmiştir (21). CD34 sayısının sadece 5 günlük rhG-CSF uygulaması sonrasında bakılan beyaz küre sayısıyla istatistiksel olarak anlamlı, orta düzeyde ve pozitif yönde korelasyon gösterdiği izlendi (Pearson R: 0,495, p=0,004) ve yine literatürdeki sonuçlarla uyumlu olarak değerlendirildi (80).

Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör'ün tam kan sayımı üzerine olan etkileri incelendiğinde, beyaz küre sayısının 0. günde -5.güne göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği (p<0,001), takiben 1. ay ölçümlerinde normal aralığa döndüğü ancak bazal değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü (p=0,043). Bu sonuç literatürle uyumlu bulunmuştur (39). Holig ve ark.'nın 3928 akraba dışı vericide yaptıkları incelemede, beyaz küre sayımının rhG-CSF uygulaması sonrası 1. ayda bazalden anlamlı şekilde daha düşük olduğu, 4 yıllık takipte kısmen yükseldiği ancak hiçbir zaman bazal değerlere ulaşamadığı görülmüştür. Beyaz küredeki bazal değerlere göre hafif düşüklüğün uzun süre devam etmesinin, kök hücrelerin yerine yavaş gelmesine mi, G-CSF reseptörlerinin "down-regülasyonu"na mı veya sitokin bağlantılarındaki diğer bozukluklara mı bağlı olduğu net değildir. Vericilerde, olası işlem öncesi strese ikincil lökositoz da aslında bu değerlerin normale gelememesinin bir nedeni olabilir (30).

Bu tez çalışmasında beyaz küre alt gruplarının sayısı otomatik kan sayımı cihazı ile değerlendirildi. Çalışmamızın bir kısıtlılığı beyaz küre formüllerinin periferik kan yaymalarıyla değerlendirilmemiş olmasıdır. Otomatik kan sayımı cihazlarının hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre hücre tiplendirmesi yaptığı düşünülürse, kemik iliğinden immatür hücrelerin perifere çıkmasını tetikleyen rhG-CSF'in bu cihazla yapılan beyaz küre alt grup tiplendirmesinin güvenilirliğini azaltacağı aşikardır. Bu nedenle aşağıda verilen beyaz küre alt gruplarına ait sonuçların bu bilgiler ışığında daha temkinli olarak yorumlanması uygundur.

Nötrofil, monosit, bazofil ve eozinofil sayılarının rhG-CSF uygulamasıyla 5. günde bazale göre istatistiksel anlamlı şekilde arttığı ve 1. ay takibinde eski

değerlerine düştüğü görüldü (Tablo 4.5). Holig ve ark. tarafından yapılan çalışmada yine bu çalışma ile uyumlu sonuçlar bildirilmiştir (30).

Lenfosit sayılarında ise ilaç uygulaması sonrası bazale göre istatistiksel anlamlı artış olduğu ancak 1. ay takibinde lenfosit sayısının istatistiksel anlamlı şekilde bazal değerlerin de altına düştüğü görüldü. Bu bulgular literatür ile uyumludur, Holig ve ark. lenfosit sayısındaki düşüklüğün 1 yıl kadar devam ettikten sonra normal değerlerine döndüğünü belirtilmiştir (30).

Trombosit sayılarında rhG-CSF tedavisinin 5. günü olan 0. günde bazale göre istatistiksel anlamlı bir düşme olduğu ancak 1. ay kontrolünde tekrar eski değerine ulaştığı görüldü ($p=0.007$). Benzer bir düşme-yükselme paterni MPV değerlerinde de gözlendi. rhG-CSF'in trombosit fonksiyonları üzerine etkisiyle ilgili yapılmış geniş ölçekli çalışmalarda trombosit sayılarında düşme bildirilmiştir (30, 39). Bu düşüklüğün olası sebeplerinden biri kök hücrenin miyeloid seriye yönlenmesine ikincil trombosit üretiminin kısmi baskılanmasıdır. İkincisi ise aferez işlemi sırasında trombositlerin tüketilmesidir. Ancak aferez öncesi yapılan kan sayımlarında da trombosit sayılarındaki düşüşün başladığı görülmektedir. Bir diğer olası nedenin ise G-CSF'e bağlı dalak boyutunun büyümesine ikincil hipersplenizm olduğu söylenebilir (39).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1) Allojenik periferik kan kaynaklı hematopoetik kök hücre vericilerinde rhG-CSF'in lenfositler üzerinde genotoksik bir etkiye neden olup olmadığına yönelik, aile içi vericiler üzerinde yapılan bu tez çalışmasında, bireylerin bazal örnekleri, 5 gün rhG-CSF aldıktan sonraki ve 1. ay kontrolünde elde edilen örnekler ile karşılaştırıldı. Mikronükleus ve Comet incelemelerinden Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, % DNA kuyruk ve kuyruk momenti sonucunda ilaca bağlı genotoksik etki lehine bulgu saptanmadı.
2) Comet testinin % DNA kuyruk ile birlikte genotoksisiteyi en iyi yordadığı bildirilen Olive'in kuyruk momenti değerlerinde ise 1. ay takibinde bazale ve tedavinin 5. gününe göre istatistiksel anlamlı olarak artış saptandı. Bu sonuç ise genotoksik etki lehine değerlendirildi.
3) Bir diğer genotoksisite belirteci olan nükleer bölünme indeksinin ise 5 günlük rhG-CSF uygulaması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ve takiben 1. ayda eski değerlerinin üzerine çıktığı görüldü.
4) Comet testi sonuçları kontrol grubunda şaşırtıcı olarak verici grubunun bazal değerlerine göre istatistiksel anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. Bu bulgunun nedeni aydınlatılamadı. Çalışma grubunun bazal ölçümleri ile kontrol grubunun sonuçlarının karşılaştırılmasında ek olarak total mikronükleus değerlerinin daha yüksek olduğu (çalışma grubunda 13,08 iken kontol grubunda 9,19) ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Genotoksisteyi değerlendiren bu iki testin aynı gruplar için zıt yönde sonuçlar vermesi konusunda yorum yapılamadı.
5) Periferik kandaki CD34 sayısının diğer değişkenler arasından sadece 5 günlük rhG-CSF uygulaması sonrasında bakılan beyaz küre sayısıyla istatistiksel olarak anlamlı, orta düzeyde ve pozitif yönde korelasyon gösterdiği, vericinin yaşı, vücut ağırlığı, cinsiyeti ve kullanılan rhG-CSF'in etken maddesiyle ise ilişkili olmadığı izlendi.

6) Nötrofil, monosit, bazofil ve eozinofil sayılarının rhG-CSF uygulamasıyla 5. günde bazale göre istatistiksel anlamlı şekilde arttığı ve 1. ay takibinde eski değerlerine düştüğü görüldü.
7) Lenfosit sayılarında ise ilaç uygulaması sonrası bazale göre istatistiksel anlamlı artış olduğu ancak 1. ay takibinde istatistiksel anlamlı şekilde bazal değerlerin de altına düştüğü görüldü.
8) Trombosit sayılarında rhG-CSF tedavisinin 5. günü olan 0. günde bazale göre istatistiksel anlamlı bir düşme olduğu ancak 1. ay kontrolünde tekrar eski değerine ulaştığı görüldü.
9) Çalışma grubunun takibine devam edilerek 1. yıl örneklerinde genotoksisite incelemelerinin tekrarlanması ve rhG-CSF'in daha geç etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.
10) Bu çalışma sonucunda rhG-CSF'in genotoksisite üzerine olan etkisiyle ilgili net bir çıkarım yapılamamıştır. Bundan sonra bu konuda yapılacak çalışmaların, CD34+ kök hücreler gibi daha homojen hücre gruplarında yapılmasının bu belirsizliği ortadan kaldırabileceği düşüncesindeyiz.
11) Ülkemizde sağlıklı allojenik kök hücre vericilerinin takipleriyle ilgili standart protokollerin oluşturulması gerekmektedir. Ayrıca akraba dışı doku bankalarının bu vericilerin sağlık sigortası kapsamına alınmalarıyla ilgili girişimde bulunulması gerekmektedir. Ayrıca takip verilerinin kaydedildiği ulusal bir veri tabanı oluşturulmalı veya uluslar arası veri tabanlarına kaydı sağlanmalıdır.

ÖZET

Allojenik Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre Vericilerinde Rekombinan İnsan Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktörün (rhG-CSF) Genotoksisite Üzerine Etkisi

Dünyada yılda 50.000'den fazla hematopoetik kök hücre nakli (HKHT) yapılmaktadır. Otolog HKHT'lerin % 99'unda, allojenik HKHT'lerin % 72'sinde rhG-CSF, kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. rhG-CSF'in kısa dönem yan etkileri genellikle iyi tolere edilebilir. Uzun dönemli etkileri ile ilgili ise belirsizlikler bulunmaktadır. Uzun yıllardır rhG-CSF'in malinite sıklığını arttırdığı ile ilgili çekinceler vardır. Bu konuda yapılmış birçok klinik ve preklinik çalışmaya rağmen malin dönüşüme neden olup olmadığı günümüzde halen netleştirilememiştir. Bu durumun netleşmesi özellikle sağlıklı ve gönüllü olan allojenik periferik kan kaynaklı kök hücre vericileri (APK-HKHV) için büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, HKHT amacıyla rhG-CSF uygulanan APK-HKHV'lerde Mikronükleus ve Comet testleri kullanılarak ve prospektif olarak genotoksisite incelemeler yapıldı. APK-HKHV olarak 36 kişi, kontrol grubu olarak 16 cinsiyet-yaş uyumlu sağlıklı birey çalışmaya alındı. Vericiden rhG-CSF verilmeden önce, 5 günlük rhG-CSF verildikten sonra ve kök hücre toplanmasından 1 ay sonra kan örnekleri alınarak incelendi. Genotoksisite incelemelerine ek olarak periferik kanda CD34+ sayısı ve tam kan sayımı incelemeleri yapıldı. Genotoksisite testi ve tam kan sayımı sonuçları 26 vericide, CD34 sayımı üzerine etkili faktörler 34 vericide değerlendirildi.

Mikronükleus ve Comet incelemelerinden Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, % DNA kuyruk ve kuyruk momenti sonucunda ilaca bağlı genotoksik etki lehine bulgu saptanmadı; Olive'in kuyruk momenti değerlerinde ise 1. ay takibinde bazale ve tedavinin 5. gününe göre istatistiksel anlamlı olarak artış saptandı ($p=0,002$ ve $p=0,017$). Nükleer bölünme indeksinin, 5 günlük rhG-CSF uygulaması sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0,001$) ve takiben 1. ayda eski değerlerinin üzerine çıktığı görüldü ($p=0,004$). Comet testi sonuçları kontrol grubunda verici grubunun bazal değerlerine göre istatistiksel anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. Total mikronükleus değerlerinin ise çalışma grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,059$). Periferik kandaki CD34 sayısının diğer değişkenler arasından sadece 5 günlük rhG-CSF uygulaması sonrasında bakılan beyaz küre sayısıyla istatistiksel olarak anlamlı, orta düzeyde ve pozitif yönde korelasyon gösterdiği izlendi (Pearson R:0,495, $p=0,004$). Trombosit, nötrofil, monosit, bazofil ve eozinofil sayılarının rhG-CSF uygulamasıyla 5. günde bazale göre istatistiksel anlamlı şekilde arttığı ve 1. ay takibinde eski değerlerine düştüğü görüldü. Lenfosit sayılarının ise ilaç uygulaması sonrası artışı takiben 1. ay takibinde istatistiksel anlamlı şekilde bazal değerlerin de altına düştüğü görüldü.

Genotoksisite değerlendirmesinde kullanmış olduğumuz 3 ana incelemenin ikisinde (NBİ ve Olive'in kuyruk momenti) rhG-CSF'e bağlı genotoksik etki saptandı. Olguların izleminde NBİ değerlendirmesi ile 1. ayda bazal değerlere geri dönme elde edilebilmesine karşın, Olive'nin kuyruk momenti incelemesinde esas etkinin 1. ayda başladığı gözlendi. Mikronukleus testinde ise genotoksisite tespit edilemedi. Sonuç olarak elde edilen verilerde genotoksik etki geliştiğini destekleyici yönde sonuçlara ulaşılmakla birlikte bu çıkarım, uygulanan testler, hasarın gelişme zamanı ve hasarın devam süresi açısından homojenlik göstermemektedir. Bu konuda daha uzun süreyi kapsayan ve CD34 gibi daha homojen hücre gruplarında yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Allojenik Periferik Kan Kaynaklı Kök Hücre Nakli, Comet testi, Genotoksisite, Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör, Mikronukleus Testi

SUMMARY

The Effect of Recombinant Human Granulocyte Colony Stiumlating Factor (rhG-CSF) on Genotoxicity in Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplant Donors

Annually >50.000 hematopoietic stem cell transplantations (HSCT) are performed in the world. In 99 % of autologous HSCTs and 72 % of allogeneic HSCTs, rhG-CSF is used to mobilize stem cells to peripheral blood. Short-term side effects of rhG-CSF are generally well-tolerated but long term effects are not clear. For many years there have been some drawbacks that rhG-CSF may increase the frequency of malignancy. Despite a number of preclinical and clinical studies performed to clarify this subject, there is no exact conclusion either it leads to malignant transformation or not. It is important to reach a precision especially for healthy and volunteer donors of PBSCT.

In this study, PBSCT donors who had been receiving rhG-CSF were prospectively evaluated for genotoxicity by using Micronucleus and Comet tests. 36 PBSCT donors and 16 age and sex matched controls were included. Blood samples were collected from donors just before starting rhG-CSF, after using rhG-CSF for 5 days and 1 month after stem cell collection procedure. In addition to genotoxicity research, peripheral blood CD34 cell count and hemograms were performed. Genotoxicity test results and hemograms were analyzed in 26 subjects whose data was complete and CD34 cell count was evaluated in 34 subjects who were available in the beginning of the study.

In Micronucleus and Comet tests, Comet length, tail length, % DNA tail and tail moment showed no difference in time, on the other hand Olive tail moment was found to be increased significantly at 1st month evaluation when compared to both basal and 5th day values ($p=0.002$ and $p=0.017$). Nuclear division index (NDI) was found to be decreased significantly following 5-day application of rhG-CSF ($p<0.001$) and at 1st month control it was found to exceed older values ($p=0.004$). Comet test results (mean) of the control group were significantly higher than the results of the donor group. On the contrary, total micronucleus counts were higher in the donor group than the control group but this difference was not significant statistically ($p=0,059$). Peripheral blood CD34 cell count showed moderate and statistically significant, positive correlation only with white blood cell count following 5-day rhG-CSF treatment (Pearson R:0,495, $p=0,004$). Platelet, neutrophil, monocyte, basophil end eosinophil cell counts in the hemograms showed significant increase following 5-day rhG-CSF treatment and dropped back to their original counts at 1st month control. Lymphocyte counts which had increased significantly following rhG-CSF treatment dropped again significantly even under its original count.

We have detected genotoxic effect due to rhG-CSF utilisation in two of three tests (NDI and Olive tail moment) we have performed. Although NDI values dropped back to its normal interval at 1st month control, Olive tail moment test

detected actual genotoxic effect at 1st month evaluation. On the other hand, micronucleus test did not show any significant change. In conclusion, however our results supported genotoxic effect due to rhG-CSF, they were not homogeneous in regard to the tests performed and the actual time point and the duration of this effect. Future studies that will select more homogeneous cell groups like CD34 stem cells and in which follow-up time will be longer are needed.

Keywords: Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation, Comet test, Genotoxicity, Granulocyte Colony Stiumlating Factor, Micronucleus test

7. KAYNAKLAR

1. Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! Growth Factors. 2005;23(1):33-41. Epub 2005/07/16.

2. Pasquini MC WZ. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides. 2012.

3. Passweg JR, Baldomero H, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011. Bone Marrow Transplant. 2013. Epub 2013/04/16.

4. Moalic V. Mobilization and collection of peripheral blood stem cells in healthy donors: risks, adverse events and follow-up. Pathologie-biologie. 2013;61(2):70-4. Epub 2012/12/04.

5. Avalos BR, Lazaryan A, Copelan EA. Can G-CSF Cause Leukemia in Hematopoietic Stem Cell Donors? Biol Blood Marrow Transplant. 2011. Epub 2011/07/13.

6. Wadhwa M, Thorpe R. Haematopoietic growth factors and their therapeutic use. Thrombosis and haemostasis. 2008;99(5):863-73. Epub 2008/05/02.

7. Anderlini P, Champlin RE. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. Blood. 2008;111(4):1767-72. Epub 2007/12/07.

8. Burgess AW, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. International journal of cancer Journal international du cancer. 1980;26(5):647-54. Epub 1980/11/15.

9. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. The Journal of biological chemistry. 1983;258(14):9017-23. Epub 1983/07/25.

10. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. Blood. 1990;76(10):1962-4. Epub 1990/11/15.

11. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection. J Immunol. 2003;170(9):4432-6. Epub 2003/04/23.

12. Avalos BR. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. Blood. 1996;88(3):761-77. Epub 1996/08/01.

13. Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Konecke C, Hansen W, et al. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. Blood. 2003;102(2):734-9. Epub 2003/04/05.

14. Nicola NA, Begley CG, Metcalf D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. Nature. 1985;314(6012):625-8. Epub 1985/04/18.

15. Kirsch F, Kruger C, Schneider A. The receptor for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is expressed in radial glia during development of the nervous system. BMC developmental biology. 2008;8:32. Epub 2008/03/29.

16. Shimoda K, Okamura S, Harada N, Kondo S, Okamura T, Niho Y. Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. The Journal of clinical investigation. 1993;91(4):1310-3. Epub 1993/04/01.

17. Druhan LJ, Ai J, Massullo P, Kindwall-Keller T, Ranalli MA, Avalos BR. Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with severe congenital neutropenia. Blood. 2005;105(2):584-91. Epub 2004/09/09.

18. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. Nature. 1986;319(6052):415-8. Epub 1986/01/05.

19. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. Science. 1986;232(4746):61-5. Epub 1986/04/04.

20. Hoglund M. Glycosylated and non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF)--what is the difference? Med Oncol. 1998;15(4):229-33. Epub 1999/02/10.

21. Sourgens H, Lefrere F. A systematic review of available clinical evidence - filgrastim compared with lenograstim. International journal of clinical pharmacology and therapeutics. 2011;49(8):510-8. Epub 2011/07/26.

22. Shaw BE, Confer DL, Hwang WY, Pamphilon DH, Pulsipher MA. Concerns about the use of biosimilar granulocyte colony-stimulating factors for the mobilization of stem cells in normal donors: position of the World Marrow Donor Association. Haematologica. 2011;96(7):942-7. Epub 2011/07/02.

23. Anderlini P. Effects and safety of granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. Current opinion in hematology. 2009;16(1):35-40. Epub 2008/12/06.

24. Mielcarek M, Graf L, Johnson G, Torok-Storb B. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation. Blood. 1998;92(1):215-22. Epub 1998/06/25.

25. Fraser AR, Cook G, Franklin IM, Templeton JG, Campbell M, Holyoake TL, et al. Immature monocytes from G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell collections carry surface-bound IL-10 and have the potential to modulate alloreactivity. Journal of leukocyte biology. 2006;80(4):862-9. Epub 2006/08/10.

26. Karawajczyk M, Hoglund M, Ericsson J, Venge P. Administration of G-CSF to healthy subjects: the effects on eosinophil counts and mobilization of eosinophil granule proteins. British journal of haematology. 1997;96(2):259-65. Epub 1997/02/01.

27. Hakansson L, Hoglund M, Jonsson UB, Torsteinsdottir I, Xu X, Venge P. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil and eosinophil adhesion. British journal of haematology. 1997;98(3):603-11. Epub 1997/10/23.

28. Topcuoglu P, Arat M, Dalva K, Ozcan M. Administration of granulocyte-colony-stimulating factor for allogeneic hematopoietic cell collection may induce the tissue factor-dependent pathway in healthy donors. Bone Marrow Transplant. 2004;33(2):171-6. Epub 2003/12/03.

29. Hill JM, Syed MA, Arai AE, Powell TM, Paul JD, Zalos G, et al. Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. Journal of the American College of Cardiology. 2005;46(9):1643-8. Epub 2005/11/01.

30. Holig K, Kramer M, Kroschinsky F, Bornhauser M, Mengling T, Schmidt AH, et al. Safety and efficacy of hematopoietic stem cell collection from mobilized peripheral blood in unrelated volunteers: 12 years of single-center experience in 3928 donors. Blood. 2009;114(18):3757-63. Epub 2009/08/12.

31. LeBlanc R, Roy J, Demers C, Vu L, Cantin G. A prospective study of G-CSF effects on hemostasis in allogeneic blood stem cell donors. Bone Marrow Transplant. 1999;23(10):991-6. Epub 1999/06/18.

32. Lindemann A, Herrmann F, Oster W, Haffner G, Meyenburg W, Souza LM, et al. Hematologic effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignancy. Blood. 1989;74(8):2644-51. Epub 1989/12/01.

33. Cottle TE, Fier CJ, Donadieu J, Kinsey SE. Risk and benefit of treatment of severe chronic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. Seminars in hematology. 2002;39(2):134-40. Epub 2002/04/17.

34. Minelli O, Falzetti F, Di Ianni M, Onorato M, Plebani S, Silvani C, et al. G-CSF-induced thrombocytopenia in a healthy donor. Bone Marrow Transplant. 2009;43(3):263-4. Epub 2008/09/30.

35. Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. Blood. 2000;95(1):270-6. Epub 1999/12/23.

36. Pan L, Delmonte J, Jr., Jalonen CK, Ferrara JL. 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(12):4422-9. Epub 1995/12/15.

37. Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, Mariotti A, Capoluongo E, Contemi AM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha. European journal of immunology. 2004;34(5):1291-302. Epub 2004/04/29.

38. Rutella S, Rumi C, Pierelli L, Morosetti R, Sica S, Bonanno G, et al. Granulocyte colony-stimulating factor perturbs lymphocyte mitochondrial function and inhibits cell cycle progression. Experimental hematology. 2000;28(6):612-25. Epub 2000/07/06.

39. Stroncek DF, Clay ME, Smith J, Ilstrup S, Oldham F, McCullough J. Changes in blood counts after the administration of granulocyte-colony-stimulating factor and the collection of peripheral blood stem cells from healthy donors. Transfusion. 1996;36(7):596-600. Epub 1996/07/01.

40. Özkan A. Büyüme Faktörleri. In: Anak SS, editor. Pediatrik Hematoloji. 1. ed. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2011. p. 973-81.

41. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. Orphanet journal of rare diseases. 2011;6:26. Epub 2011/05/21.

42. Klocke R, Kuhlmann MT, Scobioala S, Schabitz WR, Nikol S. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications. Current medicinal chemistry. 2008;15(10):968-77. Epub 2008/04/09.

43. de Haas M, Kerst JM, van der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. Blood. 1994;84(11):3885-94. Epub 1994/12/01.

44. Hernandez-Bernal F, Garcia-Garcia I, Gonzalez-Delgado CA, Valenzuela-Silva C, Soto-Hernandez R, Duconge J, et al. Bioequivalence of two recombinant granulocyte colony-stimulating factor formulations in healthy male volunteers. Biopharmaceutics & drug disposition. 2005;26(4):151-9. Epub 2005/03/31.

45. Stroncek D, Shawker T, Follmann D, Leitman SF. G-CSF-induced spleen size changes in peripheral blood progenitor cell donors. Transfusion. 2003;43(5):609-13. Epub 2003/04/19.

46. Platzbecker U, Prange-Krex G, Bornhauser M, Koch R, Soucek S, Aikele P, et al. Spleen enlargement in healthy donors during G-CSF mobilization of PBPCs. Transfusion. 2001;41(2):184-9. Epub 2001/03/10.

47. Balaguer H, Galmes A, Ventayol G, Bargay J, Besalduch J. Splenic rupture after granulocyte-colony-stimulating factor mobilization in a peripheral blood progenitor cell donor. Transfusion. 2004;44(8):1260-1. Epub 2004/07/22.

48. Tulpule S, Shaw BE, Makoni P, Little AM, Madrigal JA, Goldman JM. Severe allergic reaction with anaphylaxis to G-CSF (lenograstim) in a healthy donor. Bone Marrow Transplant. 2009;44(2):129-30. Epub 2009/01/20.

49. Anderlini P, Donato M, Chan KW, Huh YO, Gee AP, Lauppe MJ, et al. Allogeneic blood progenitor cell collection in normal donors after mobilization with filgrastim: the M.D. Anderson Cancer Center experience. Transfusion. 1999;39(6):555-60. Epub 1999/06/23.

50. Nasilowska-Adamska B, Perkowska-Ptasinska A, Tomaszewska A, Serwacka A, Marianska B. Acute glomerulonephritis in a donor as a side effect of allogeneic peripheral blood stem cell mobilization with granulocyte colony-stimulating factor. International journal of hematology. 2010;92(5):765-8. Epub 2010/12/02.

51. Schanz J, Wolf C, Koehler M, Maas JH, Meyer M, Neumeyer H, et al. Rhabdomyolysis in allogeneic peripheral blood stem cell donors. Vox sanguinis. 2004;86(4):263-5. Epub 2004/05/18.

52. de Azevedo AM, Goldberg Tabak D. Life-threatening capillary leak syndrome after G-CSF mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation. Bone Marrow Transplant. 2001;28(3):311-2. Epub 2001/09/06.

53. Oiso N, Watanabe K, Kawada A. Granulocyte colony-stimulating factor-induced Sweet syndrome in a healthy donor. British journal of haematology. 2006;135(2):148. Epub 2006/07/22.

54. Adler BK, Salzman DE, Carabasi MH, Vaughan WP, Reddy VV, Prchal JT. Fatal sickle cell crisis after granulocyte colony-stimulating factor administration. Blood. 2001;97(10):3313-4. Epub 2001/05/23.

55. Anderlini P, Rizzo JD, Nugent ML, Schmitz N, Champlin RE, Horowitz MM. Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) and European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) databases. Bone Marrow Transplant. 2001;27(7):689-92. Epub 2001/05/22.

56. J. Apperley EC, E. Gluckman, T. Masszi. The EBMT Handbook Haematopoetic Stem Cell Transplantation. 6th ed. Genoa: Forum service editore; 2012.

57. W. Nicholas Haining CD, Leslie Lehmann. Principles of Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. In: Stuart H. Orkin DGN, David Ginsburg, A. Thomas Look, David E. Fisher, Samuel E. Lux, editor. Hematology of Infancy and Childhood. 7th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2009. p. 397-455.

58. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. British medical journal. 1956;2(4993):626-7. Epub 1956/09/15.

59. English D, Klingemann HG. The foundations of cellular therapy: Barnes and Loutit, 1957. Journal of hematotherapy & stem cell research. 2001;10(3):323-4. Epub 2001/07/17.

60. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. The Journal of clinical investigation. 1959;38:1709-16. Epub 1959/10/01.

61. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. Cancer research. 1965;25(9):1525-31. Epub 1965/10/01.

62. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. Lancet. 1968;2(7583):1364-6. Epub 1968/12/28.

63. De Koning J, Van Bekkum DW, Dicke KA, Dooren LJ, Radl J, Van Rood JJ. Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. Lancet. 1969;1(7608):1223-7. Epub 1969/06/21.

64. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. Transplantation. 1970;9(6):571-87. Epub 1970/06/01.

65. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. Acta haematologica. 1958;20(1-4):156-66. Epub 1958/07/01. Iso-leuco-anticorps.

66. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. The New England journal of medicine. 1980;303(10):565-7. Epub 1980/09/04.

67. Gluckman E. A Brief History of HSCT. EBMT Handbook: Haematopoetic Stem Cell Transplantation. 2012. Epub 6th.

68. Martino M, Fedele R, Massara E, Recchia AG, Irrera G, Morabito F. Long-term safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors: is it all clear? Expert opinion on biological therapy. 2012;12(5):609-21. Epub 2012/03/27.

69. Gluckman E. History of cord blood transplantation. Bone Marrow Transplant. 2009;44(10):621-6. Epub 2009/10/06.

70. Pediatrik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu Ulusal Veri Tabanı Verileri. 21 Pediatrik KİT çalıştayı; Ankara2010.

71. Morton J, Hutchins C, Durrant S. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF)-primed allogeneic bone marrow: significantly less graft-versus-host disease and comparable engraftment to G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells. Blood. 2001;98(12):3186-91. Epub 2001/11/24.

72. Bensinger WI. Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow. Current opinion in oncology. 2012;24(2):191-6. Epub 2011/12/22.

73. Arcese W, De Angelis G, Cerretti R. Granulocyte-mobilized bone marrow. Current opinion in hematology. 2012;19(6):448-53. Epub 2012/09/08.

74. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. Blood. 1988;72(6):2074-81. Epub 1988/12/01.

75. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. Blood. 2001;98(5):1289-97. Epub 2001/08/25.

76. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. The Journal of clinical investigation. 2003;111(2):187-96. Epub 2003/01/18.

77. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, 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(12):4437-45. Epub 1995/12/15.

78. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, et al. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. Lancet. 1992;339(8794):640-4. Epub 1992/03/14.

79. de la Rubia J, Arbona C, de Arriba F, del Canizo C, Brunet S, Zamora C, et al. Analysis of factors associated with low peripheral blood progenitor cell collection in normal donors. Transfusion. 2002;42(1):4-9. Epub 2002/03/16.

80. Kroger N, Sonnenberg S, Cortes-Dericks L, Freiberger P, Mollnau H, Zander AR. Kinetics of G-CSF and CD34+ cell mobilization after once or twice daily stimulation with rHu granulocyte-stimulating factor (lenograstim) in healthy volunteers: an intraindividual crossover study. Transfusion. 2004;44(1):104-10. Epub 2003/12/25.

81. Ings SJ, Balsa C, Leverett D, Mackinnon S, Linch DC, Watts MJ. Peripheral blood stem cell yield in 400 normal donors mobilised with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): impact of age, sex, donor weight and type of G-CSF used. British journal of haematology. 2006;134(5):517-25. Epub 2006/10/05.

82. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. Blood. 2003;102(8):2728-30. Epub 2003/07/12.

83. Leotta S, Poidomani M, Mauro E, Spadaro A, Marturano E, Milone G. AMD3100 for urgent PBSC mobilization and allogeneic transplantation from a normal donor after failed marrow harvest. Bone Marrow Transplant. 2011;46(2):314-6. Epub 2010/05/04.

84. Neumann T, Kruger WH, Busemann C, Kiefer T, Dolken G. Successful mobilization of PBSCs in a healthy volunteer donor by addition of plerixafor after failure of mobilization with G-CSF alone. Bone Marrow Transplant. 2011;46(5):762-3. Epub 2010/08/03.

85. Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, Landmark JD, Dooley DC, Law P, 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):643-6. Epub 1989/11/01.

86. Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. Lancet. 1993;341(8858):1482. Epub 1993/06/05.

87. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. The New England journal of medicine. 2012;367(16):1487-96. Epub 2012/10/19.

88. Nagafuji K, Matsuo K, Teshima T, Mori S, Sakamaki H, Hidaka M, et al. Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry. International journal of hematology. 2010;91(5):855-64. Epub 2010/05/14.

89. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. Blood. 2007;110(4):1397-400. Epub 2007/05/04.

90. Peters C, Cornish JM, Parikh SH, Kurtzberg J. Stem cell source and outcome after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children and adolescents with acute leukemia. Pediatric clinics of North America. 2010;57(1):27-46. Epub 2010/03/24.

91. Pidala J, Anasetti C, Kharfan-Dabaja MA, Cutler C, Sheldon A, Djulbegovic B. Decision analysis of peripheral blood versus bone marrow hematopoietic stem cells for allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15(11):1415-21. Epub 2009/10/14.

92. Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. British journal of haematology. 2010;150(2):196-9. Epub 2010/05/12.

93. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, et al. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. Blood. 2006;107(12):4628-35. Epub 2006/02/25.

94. Socie G, Mary JY, Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, Locasciulli A, et al. Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Blood. 2007;109(7):2794-6. Epub 2006/11/18.

95. Kojima S, Ohara A, Tsuchida M, Kudoh T, Hanada R, Okimoto Y, et al. Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children. Blood. 2002;100(3):786-90. Epub 2002/07/20.

96. Sloand EM, Yong AS, Ramkissoon S, Solomou E, Bruno TC, Kim S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(39):14483-8. Epub 2006/09/19.

97. Ehlers S, Herbst C, Zimmermann M, Scharn N, Germeshausen M, von Neuhoff N, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) treatment of childhood acute myeloid leukemias that overexpress the differentiation-defective G-CSF receptor isoform IV is associated with a higher incidence of relapse. J Clin Oncol. 2010;28(15):2591-7. Epub 2010/04/22.

98. Lyman GH, Dale DC, Wolff DA, Culakova E, Poniewierski MS, Kuderer NM, et al. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome in randomized controlled clinical trials of cancer chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor: a systematic review. J Clin Oncol. 2010;28(17):2914-24. Epub 2010/04/14.

99. Smith RE, Bryant J, DeCillis A, Anderson S. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. J Clin Oncol. 2003;21(7):1195-204. Epub 2003/03/29.

100. Rauscher GH, Sandler DP, Poole C, Pankow J, Mitchell B, Bloomfield CD, et al. Family history of cancer and incidence of acute leukemia in adults. American journal of epidemiology. 2002;156(6):517-26. Epub 2002/09/13.

101. Bennett CL, Evens AM, Andritsos LA, Balasubramanian L, Mai M, Fisher MJ, et al. Haematological malignancies developing in previously healthy individuals who received haematopoietic growth factors: report from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. British journal of haematology. 2006;135(5):642-50. Epub 2006/10/24.

102. Makita K, Ohta K, Mugitani A, Hagihara K, Ohta T, Yamane T, et al. Acute myelogenous leukemia in a donor after granulocyte colony-stimulating factor-primed peripheral blood stem cell harvest. Bone Marrow Transplant. 2004;33(6):661-5. Epub 2004/01/13.

103. Horowitz MM, Confer DL. Evaluation of hematopoietic stem cell donors. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:469-75. Epub 2005/11/24.

104. Halter J, Kodera Y, Ispizua AU, Greinix HT, Schmitz N, Favre G, et al. Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. Haematologica. 2009;94(1):94-101. Epub 2008/12/09.

105. Confer DL, Miller JP. Long-term safety of filgrastim (rhG-CSF) administration. British journal of haematology. 2007;137(1):77-8; author reply 9-80. Epub 2007/03/16.

106. Hasenclever D, Sextro M. Safety of AlloPBPCT donors: biometrical considerations on monitoring long term risks. Bone Marrow Transplant. 1996;17 Suppl 2:S28-30. Epub 1996/03/01.

107. Kaplinsky C, Trakhtenbrot L, Hardan I, Reichart M, Daniely M, Toren A, et al. Tetraploid myeloid cells in donors of peripheral blood stem cells treated with rhG-CSF. Bone Marrow Transplant. 2003;32(1):31-4. Epub 2003/06/20.

108. Shapira MY, Kaspler P, Samuel S, Shoshan S, Or R. Granulocyte colony stimulating factor does not induce long-term DNA instability in healthy peripheral blood stem cell donors. American journal of hematology. 2003;73(1):33-6. Epub 2003/04/18.

109. Nagler A, Korenstein-Ilan A, Amiel A, Avivi L. Granulocyte colony-stimulating factor generates epigenetic and genetic alterations in lymphocytes of normal volunteer donors of stem cells. Experimental hematology. 2004;32(1):122-30. Epub 2004/01/17.

110. Hernandez JM, Castilla C, Gutierrez NC, Isidro IM, Delgado M, de las Rivas J, et al. Mobilisation with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. 2005;19(6):1088-91. Epub 2005/04/15.

111. Marmier-Savet C, Larosa F, Legrand F, Witz B, Michallet M, Ranta D, et al. G-CSF-induced aneuploidy does not affect CD34+ cells and does not require cell division. Blood. 2010;115(4):910-1. Epub 2010/01/30.

112. Donadieu J, Leblanc T, Bader Meunier B, Barkaoui M, Fenneteau O, Bertrand Y, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. Haematologica. 2005;90(1):45-53. Epub 2005/01/12.

113. Olnes MJ, Poon A, Miranda SJ, Pfannes L, Tucker Z, Loeliger K, et al. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on Monosomy 7 aneuploidy in healthy hematopoietic stem cell and granulocyte donors. Transfusion. 2011. Epub 2011/09/03.

114. Hirsch B, Oseth L, Cain M, Trader E, Pulkrabek S, Lindgren B, et al. Effects of granulocyte-colony stimulating factor on chromosome aneuploidy and replication asynchrony in healthy peripheral blood stem cell donors. Blood. 2011;118(9):2602-8. Epub 2011/07/02.

115. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. Mutation research. 2000;463(2):111-72. Epub 2000/07/29.

116. Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. Diagnostic cytopathology. 2012;40(1):84-90. Epub 2011/12/20.

117. Anwar WA, Salama SI, el Serafy MM, Hemida SA, Hafez AS. Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs. Mutagenesis. 1994;9(4):315-7. Epub 1994/07/01.

118. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutation research. 2003;534(1-2):65-75. Epub 2002/12/31.

119. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis. 2007;28(3):625-31. Epub 2006/09/16.

120. Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Vande Loock K, et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. Archives of toxicology. 2011;85(8):873-99. Epub 2011/05/04.

121. Chang WP, Hwang BF, Wang D, Wang JD. Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate gamma-radiation in residents of irradiated buildings. Lancet. 1997;350(9074):330-3. Epub 1997/08/02.

122. Bettega D, Calzolari P, Doneda L, Belloni F, Tallone L, Redpath JL. Differential effectiveness of solar UVB subcomponents in causing cell death, oncogenic transformation and micronucleus induction in human hybrid cells. International journal of radiation biology. 2003;79(3):211-6. Epub 2003/05/15.

123. Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. Mutation research. 2008;659(3):274-83. Epub 2008/06/28.

124. Murgia E, Ballardin M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. Mutation research. 2008;639(1-2):27-34. Epub 2007/12/25.

125. Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmuller S, et al. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. Mutagenesis. 2007;22(1):3-4. Epub 2006/12/13.

126. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature protocols. 2007;2(5):1084-104. Epub 2007/06/05.

127. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environmental and molecular mutagenesis. 1989;13(1):34-43. Epub 1989/01/01.

128. El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2008;17(5):1111-9. Epub 2008/05/17.

129. Ionescu ME, Ciocirlan M, Becheanu G, Nicolaie T, Ditescu C, Teiusanu AG, et al. Nuclear Division Index may Predict Neoplastic Colorectal Lesions. Maedica. 2011;6(3):173-8. Epub 2012/03/01.

130. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and biophysical research communications. 1984;123(1):291-8. Epub 1984/08/30.

131. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research. 1988;175(1):184-91. Epub 1988/03/01.

132. Piperakis SM. Comet assay: a brief history. Cell biology and toxicology. 2009;25(1):1-3. Epub 2008/06/17.

133. Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. Archives of toxicology. 2013;87(6):949-68. Epub 2013/05/21.

134. Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. Methods. 2009;48(1):46-53. Epub 2009/03/10.

135. Nandhakumar S, Parasuraman S, Shanmugam MM, Rao KR, Chand P, Bhat BV. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics. 2011;2(2):107-11. Epub 2011/07/21.

136. Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, Carrara HH, Andrade JM, Takahashi CS. Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. Clinical and experimental medicine. 2010;10(2):87-92. Epub 2009/11/11.

137. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. Radiation research. 1990;122(1):86-94. Epub 1990/04/01.

138. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. Mutagenesis. 2008;23(3):143-51. Epub 2008/02/20.

139. Fruchtman SM, Mack K, Kaplan ME, Peterson P, Berk PD, Wasserman LR. From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. Seminars in hematology. 1997;34(1):17-23. Epub 1997/01/01.

140. Friedrisch JR, Pra D, Maluf SW, Bittar CM, Mergener M, Pollo T, et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. Mutation research. 2008;649(1-2):213-20. Epub 2007/11/09.

141. Kawaguchi S, Nakamura T, Yamamoto A, Honda G, Sasaki YF. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? Journal of nucleic acids. 2010;2010:541050. Epub 2010/11/06.

142. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. Mutagenesis. 2011;26(1):43-9. Epub 2010/12/18.

143. Söylemez E KZ, Aliyev V, Soylemezoglu T. Effect of cigarette smoking on DNA damage according to nine comet assay parameters in female and male groups. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2012;65:39-46.

144. Suzuya H, Watanabe T, Nakagawa R, Watanabe H, Okamoto Y, Onishi T, et al. Factors associated with granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell yield in healthy donors. Vox sanguinis. 2005;89(4):229-35. Epub 2005/11/03.

145. Martino M, Callea I, Condemi A, Dattola A, Irrera G, Marcuccio D, et al. Predictive factors that affect the mobilization of CD34(+) cells in healthy donors treated with recombinant granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Journal of clinical apheresis. 2006;21(3):169-75. Epub 2006/03/15.