

Hematopoietik kök hücre transplantasyonunda CD34 (+) hücre seleksiyonu ve ayıklama

Fikret Arpacı (*)

ÖZET

Periferik kan kök hücreler otolog kök hücre naklinde kök hücre kaynağı olarak kemik iliğinin yerini almaktadır. Tümör kitlesi her ne kadar periferik kan kök hücre fraksiyonlarında kemik iliğinden daha az olsa da, modern araştırma yöntemleri tümör hücrelerini periferik kan kök hücre fraksiyonlarında ortaya koyabilir. Graft içindeki tümör hücreleri posttransplant döneminde nüklere katkıda bulunabilir. Periferik kan kök hücre fraksiyonlarını tümörden ayıklama işlemi negatif ya da pozitif seleksiyonla yapılabilir. CD34 pozitif seleksiyon, on beş yıldan beri otolog transplantasyonda grafitin tümör hücrelerinden temizlenmesinde, allojenik transplantasyonda T hücre depleksiyonunda, gen tedavisinde progenitor hücrelerin saflaştırılmasında ve progenitor hücrelerin ex-vivo ekspansiyonunda başarıyla kullanılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Ayıklama, CD34 pozitif hücre, hücre seleksiyonu, pozitif ve negatif seleksiyon

SUMMARY

CD34 (+) cell selection and purging in hematopoietic cell transplantation

Peripheral blood stem cells have replaced bone marrow as the primary source for autologous stem cell transplantation. Although tumor burden appears to be lower in peripheral blood stem cell fractions than in the bone marrow, modern detection methods can detect the tumor cell present in peripheral blood stem cell fractions. Tumor cells in the graft may contribute to relapses in posttransplant period. Purging of peripheral blood stem cell fractions can be done either by negative or positive selection. CD34 positive selection has been successfully used to deplete tumor cells from grafts for autologous transplantation, to deplete T cells for allogeneic transplantation, to enrich progenitor cells for gene therapy and ex-vivo expansion strategies of progenitor cells for 15 years.

Key words: Purging, CD34 (+) cell, cell selection, positive and negative selection

Giriş

Otolog kök hücre nakline aday hastaların önemli bir kısmında kemik iliğinin malign hücrelerle tutulu olduğu gösterilmiştir. Bu infiltrasyon meme kanserli hastalarda %25-50, non-Hodgkin lenfomalı olgularda %30-35, Hodgkin hastalığında %45-50, nöroblastomlu hastalarda %65-70 ve küçük hücreli akciğer kanserinde %50'ye varan oranlarda olabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda otolog kemik iliği transplantasyonunun (KİT) yerini bugün artık periferik kök hücre transplantasyonu (PKHT) almıştır.

PKHT'de tümör hücre kontaminasyonu

Her ne kadar otolog PKHT'de tümör kontaminasyonu otolog KİT'den daha azsa da, modern araştırma teknikleriyle aferez ürünlerinin önemli ölçüde tümör hücreleri içerdiği gösterilmiştir. Evre IV meme kanserli olgularda bu oran %20, evre II yüksek riskli olgularda %11 olarak bulunmuştur (1). Bu kontaminasyon Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalı hastalarda %30 ve %5 (2), nöroblastomlu olgularda ise %15'dir (3).

Aferez ürünlerinde tümör hücre kontaminasyonu birkaç faktör etkileyebilmektedir. Bunlar:

- Kemik iliği tutulumu ve yaygınlığı
- Mobilizasyon rejimi
- İndüksiyon kemoterapisi
- Kemoterapi ile mobilizasyon arasındaki süre
- Aferez sayısı

Kemik iliği tutulumu ile aferez ürünlerinin kontaminasyonu arasında güçlü bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Kemik iliği tutulumu olduğu gösterilen meme kanserli hastaların aferez ürünlerinde kontaminasyon oranı %35 iken, kemik iliği tutulumu olduğu gösterilemeyenlerde bu oran %18'lere inmektedir (3).

Sadece büyüme faktörlü mobilizasyon yapılan hastalarda (meme kanserli, evre IV) aferez ürün kontaminasyonu %25, kemoterapi+büyüme faktörü kullanılarak yapılan mobilizasyonlarda %16 olarak gösterilmiştir (4). Buna karşılık, bir başka çalışmada sadece

*GATF Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı

Bu derleme 1. Ulusal Hücresele Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresinde (Kapadokya 5-8 Mart 2009), konferans olarak sunulmuştur

Aynı basım isteği: Dr. Fikret Arpacı, GATF Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Etilik-06018, Ankara

E-mail: farpaci@gata.edu.tr

Makalenin geliş tarihi: 12.05.2009 • **Kabul tarihi:** 04.07.2011

büyüme faktörü ile mobilizasyonda bu oran %13, büyüme faktörü+kemoterapi ile mobilizasyonda %23 olarak bulunmuştur (5).

Bir diğer çalışmada ise kontaminasyonun her iki tip mobilizasyonda da aynı olduğu gösterilmiştir (6). Büyüme faktörü tipinin ise kontaminasyon üzerinde farklılık yaratmadığı belirtilmiştir.

Gluck ve ark. aferez öncesi indüksiyon kemoterapisinin önemini gösterdikleri çalışmalarında evre IV meme kanserli hastalarda kontaminasyonu birinci indüksiyon kemoterapisinden sonra %23, ikinci ve üçüncü kemoterapilerden sonra %5 ve %7 olarak bulmuşlardır (7). Aynı çalışmada, kontaminasyon eğer aferez, kemoterapinin 10-18. günleri arasında uygulanırsa %15, 18-30. günleri arasında yapılırsa %31 olarak tespit edilmiştir. Evre IV 459 meme kanserli hastada yapılan bir çalışmada tek aferez yapılanlara göre (%5), 3 aferez uygulanan hastalarda daha fazla kontaminasyon olduğu (%31) bulunmuştur (8).

Aferez ürünlerindeki bu kontaminasyonun klinik önemi tam olarak ortaya konmamıştır. Ancak post-transplant relapslardan sorumlu olabileceği araştırma konusu olmuştur. Brenner ve ark. gen işaretleme tekniği kullanarak, nöroblastomlu ve akut lösemili hastalarda posttransplant relapsların aferez ürünündeki malign hücrelerden kaynaklandığını göstermişlerdir (9). Aynı relaps paterni kronik miyelositer lösemide de ortaya konmuştur (10). Moss (4) ve Fields (11) evre IV meme kanserli olgularda, tümör kontaminasyonlu aferez ürünlerinin, kontaminasyonsuz aferez ürünlerine göre daha yüksek relaps oranı ve daha kısa toplam sağ kalıma sebep olduklarını göstermişlerdir. Buna karşılık evre IV meme kanserli hastalarda yapılan bir başka çalışmada tümör kontaminasyonunun kötü "outcome" a yol açmadığı, posttransplant relapslardan daha çok eski hastalık bölgelerinin sorumlu olduğu belirtilmiştir (12).

Son yıllarda henüz etkinliği iyi ortaya konmuş olmasa da aferez ürünlerindeki malign hücre kontaminasyonunu azaltan çalışmalar ve "purging"li (ayıklama) transplantasyonlar klinik araştırmaların konusu olmuştur. Gribben ve ark. folliküler non-Hodgkin lenfomalı olgularda immünolojik arındırmadan sonra bcl-2 negatif hale gelen olgularda relaps oranının bcl-2 pozitif kalan olgulara göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir (13). Aynı şekilde farmakolojik ayıklama yapılan birinci remisyonadaki akut miyelositer lösemili hastalarda klinik yarar sağlanabileceği belirtilmiştir (14).

Malign hücre kontaminasyonunun saptanması

Histolojik olarak normal iliklerde veya aferez ürünlerinde, malign hücre kontaminasyonu immünohistokimyasal, hücre kültür yöntemleri veya moleküler tekniklerle ortaya konabilir (Tablo I).

Tablo I. Tümör hücre kontaminasyonu saptama yöntemi ve duyarlılıkları

Yöntem	Duyarlılık
Işık mikroskobu	1/101-1/102
Southern blot	1/102
Flöresan insitu hibridizasyon	1/102
Akım sitometri	1/103-1/104
İmmünohistokimya	1/104-1/106
Klonojenik kültür tekniği	1/104-1/106
Polimeraz zincir reaksiyonu	1/105-1/106

Malign hücreleri gösterebilme, çalışılan tekniğin duyarlılığına ve örnekteki hücre sayısına bağlıdır. Kemik iliği ve periferik kan harvestlerinde ortalama olarak 10^{10} - 10^{11} hücre toplanmaktadır. Morfolojik olarak maksimum duyarlılığı $1/10^3$ olarak kabul etsek bile, teorik olarak histolojik olarak normal olgulardan topladığımız ürün içinde en az 10^7 - 10^8 malign hücre olabilecektir.

Bu kontaminasyonu azaltmak için değişik ayıklama teknikleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle malign hücre kontaminasyonu >4 log azaltılabilmektedir. Ancak tam bir temizleme henüz mümkün değildir.

Ayıklama teknikleri

Kemik iliğinin ya da aferez ürününün malign hücrelerden temizlenme işlemine ayıklama denir. Ayıklamada 2 önemli nokta vardır. Birincisi, tümör hücreleri mümkün olduğunca fazla eradike edilmeli, ikincisi ise eradikasyon işlemi olabildiğince selektif olmalıdır ve normal progenitör kök hücreler zarar görmemelidir. Bu amaçla değişik ayıklama yöntemleri geliştirilmiştir (Tablo II).

Tablo II. Ayıklama teknikleri

Fiziksel
Büyüklik
Yoğunluk
Ozmotik aglütinasyon
Hipertermi
Farmakolojik
4-hidroperoksisiklofosamid, Mafosfamid
Asta-Z
İmmünolojik
İndirekt monoklonal antikorlar
Kompleman
Manyetik partiküller
Direkt monoklonal antikor
Kemoterapötik ajan
Toksinler
Manyetik partiküller
Radyonüklid ajan

Fiziksel ayıklama: Hücre çaplarına ve sedimantasyon farklılıklarına göre ayırma işlemidir. Buna “counterflow elutriation” adı da verilir. Lektin aglütinasyon yönteminde ise sıklıkla “soybean” aglütinin kullanılır. Bu aglütinin nonimmünglobulin bir glikoprotein olup, hücrelerin yüzeyindeki karbonhidratlara bağlanarak onları aglütine eder. Soybean aglütinin normal progenitör hücreler için nontoksiktir.

Farmakolojik ayıklama: 4-hidroperoksisiklofosfamid siklofosfamidin aktif metabolitidir. Mafosfamid de yine siklofosfamidin daha stabil aktif bir metabolitidir. Her ikisi de farmakolojik arıdırımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hazırlamak kolaydır, in vitro stabildir ve kısa bir zaman gerektirir. Diğer farmakolojik yöntemler olarak sisplatin ve MC-540 (merosyanin) kullanılabilir. Sisplatin, nöroblastom ve küçük hücreli akciğer kanserinde kullanılır. MC-540 bir boyadır. Malign hücrelere tercihen bağlanır ve onları fotosensitize eder, ardından bu hücreler beyaz ışıkta öldürülür. Bu yöntem progenitör hücrelere çok az zarar verir ve klinikte daha çok lösemi ve lenfoma olgularında kullanılır.

İmmünolojik ayıklama: Bu yöntemin esası tümör hücrelerinin önce monoklonal antikolarla bağlanıp ardından kompleman, manyetik partiküller, toksin, kemoterapötik veya radyonüklid ajanlarla tahribine ya da seperasyonuna dayanır. İmmünolojik ayıklama direkt, ya da indirekt olarak yapılabilir. İndirekt yöntemde hedef hücreler önce IgG grubu bir monoklonal antikorla bağlanır ve ikinci seansta kompleman ya da monoklonal antikora karşı oluşturulmuş bir antikora bağlı manyetik partiküller eklenir. Direkt yöntemde ise sadece tek bir inkübasyon işlemi kısıtılır. Bunun için genellikle IgM tipi monoklonal antikora önceden bağlanmış manyetik partikül, toksin, kemoterapötik ya da radyonüklid ajan kullanılır.

İdeal bir ayıklama işleminin olabilmesi için şu faktörler önemli bulunmuştur (15):

- Hedef antijen normal progenitör hücrelerde olmamalı
- Hedef antijen klonojenik tümör hücrelerinde yüksek yoğunlukta olmalı
- Tümör hücre antijen ekspresyon heterojenliği az olmalı

Ayıklama işlemi negatif (-) ya da pozitif (+) seleksiyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Negatif seleksiyonda hedef hücre (öldürülen ya da ayıklanan) tümör hücreleridir. Buna karşılık pozitif seleksiyonda hedef hücre normal progenitör kök (CD34+) hücreleridir. Negatif seleksiyon yönteminde normal progenitör hücrelerin de zarar görmesi ve bunun da muhtemel bir graft yetersizliğine sebep olması nedeniyle CD34(+) seleksiyon yöntemi günümüzde daha cazip bir ayık-

lama yöntemi olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan ayıklamanın etkinliği ard arda yapılan pozitif ve negatif seleksiyonlarla da artırılabilir (>7 log). Bu durumda maliyet ve kullanılan zamanın artacağı açıktır.

CD34 (+) seleksiyon

CD34 antijen, 115 kDa ağırlığında bir yüzey glikofosfoprotein olup, normal kemik iliği hücrelerinin %1-3'ü bu antijeni taşırlar (16). CD34(+) hücreler “steady state” periferik kanda gösterilemeyecek kadar düşük orandadır. Ancak mobilizasyondan sonra bu oran %1'e ulaşabilir. (17). CD34 antijenin birçok malign tümörde bulunmaması (Tablo III) ve FDA tarafından onaylanması (18), bu yöntemi CD34 (-) malign hastalıklarda diğer ayıklama yöntemlerine göre daha cazip kılmaktadır.

Tablo III. Malignitelere CD34 antijen ekspresyonu

CD34(+) maligniteler	CD34(-) maligniteler
Akut miyelositer lösemi	Kronik lenfositler lösemi
Akut lenfoblastik lösemi	Hodgkin hastalığı
Kronik myelositer lösemi	Multipl miyelom
Miyelodisplastik sendromlar	Meme kanseri
Vasküler orijinli tümörler	Adult solid tümörlerin çoğu*
	Nöroblastom
	PNET / Ewing sarkomu

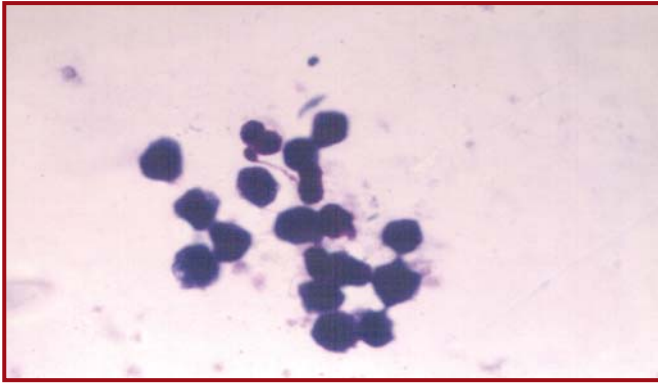
*: Skuamöz hücreli akciğer kanserli 4 olguda (CD34 (+) ekspresyonu gösterilmiştir)

CD34(+) hücreler immünoadsorpsiyon, immüno-manyetik ve akım sitometri yöntemleri ile değişik performanslarda izole edilebilmektedir (19). Bu amaçla 3 seperasyon cihazı sıklıkla kullanılır. Bunlar Ceprate (Cell Puro Inch Bothell, WA), Isolex (Baxter, Fenmell, Division, Deerfield, IL) ve CliniMACS'dır (Miltenyi, Biotec, GmbH, Bergish, Gladbach, Germany). Akım sitometri tekniği büyük volüm işlemler için pratik olmadığı için, yüksek oranda tümör hücre depleksyonu (>7 log) yapmasına karşın çok sınırlı kullanılmaktadır. Ceprate biotin-avidin immünoafinite tekniğiyle, Isolex ve CliniMACS ise immüno-manyetik teknikle kök hücreleri izole etmektedir. Yapılan araştırmalarda (CD34+) hücrelerin saflık (“purity”) ve korunma (“recovery”) oranları sırasıyla Ceprate için %42 ve %52, Isolex 300 için %86 ve %41, Isolex 300'i için %97 ve %50, CliniMACS için %95 ve %65 olarak bulunmuştur (19) (Tablo IV). Isolex ve CliniMACS aynı teknikle çalıştıkları halde, CliniMACS ile daha iyi performans elde edilmesinin temel sebebi kullanılan manyetik partiküllerin büyüklüğüne bağlanabilir (20,21). Isolex'te mikrosfer olarak daha büyük “dynabead”ler kullanılırken, CliniMACS'te 50 nm çapında nanopartiküller kullanılmaktadır. Küçük çap ve düşük nonspesi-

Tablo IV. Kemik iliği ve periferik kandaki progenitör hücrelerin değişik separatörlerle ayrılma performansları

Separatör	Kemik iliği		Periferik kan	
	CD34 saflığı (%)	CD34 korunması (%)	CD34 saflığı (%)	CD34 korunması (%)
Ceprate	72	42	42	52
Isolex-300	80	33	86	41
Iselex-300i	Bilgi yok	Bilgi yok	97	50
CliniMACS	Bilgi yok	Bilgi yok	95	65

fik bağlanma CD34(+) hücrelerin daha yüksek saflıkta elde edilmesini sağlamaktadır (Şekil 1). Diğer taraftan manipülasyon ve separasyon sürelerinin diğer cihazlardan daha kısa olması (tüm manipülasyon 2.5 saat, separasyon 1 saat) progenitör hücrelerin daha yüksek korunma oranıyla izole edilebilmesini sağlamaktadır. Nitekim bu özellikleri nedeniyle MACS ("magnetic activated cell sorting separation") sistemi Avrupa Kemik İliği Transplantasyon (EBMT) Grubu'nca pilot çalışmalar için daha uygun bulunmuştur (22). Normal scale CliniMACS sisteminin kapasitesi 6×10^{10} total çekirdekli hücre ve 6×10^8 CD34(+) hücredir. Handgretinger ve ark. CD34(+) hücrelerin %99 saflıkla elde edilmeleri halinde CD34(-) malignitelerde en az 4 log tümör hücre depleksiyonunun mümkün olacağını göstermişlerdir (23). Diğer taraftan pozitif seleksiyonda eğer $>1-2 \times 10^6$ /kg CD34(+) toplanırsa engraftment'in gecikmediği, tam ve uzun süreli olduğu gösterilmiştir (24).



Şekil 1. CD34(+) seleksiyonu (CliniMACS) işlemiyle pozitif fraksiyonda toplanmış CD34(+) hücreler (GATA Arşivinden)

CD34(+) seleksiyonunun en önemli dezavantajı posttransplant dönemde özellikle sitomegalovirusa (CMV) bağlı enfeksiyonları ve CMV'ye bağlı mortaliteyi artırmasıdır.

CD34(+) seleksiyona ait klinik sonuçlar

Pozitif seleksiyona ait çalışmalar bugün için oldukça azdır. Randomize çalışmalar ise henüz yok denecek kadar azdır.

Meme kanseri: Shpall ve ark.nın 120 meme kanserli olguda yaptıkları araştırmada, pozitif seleksiyon yapılan grupta engraftmanın seleksiyon yapılmayan gruptan farklı olmadığı gösterilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında sağ kalım konusunda bir bilgi vermemişlerdir (25). Evre III yüksek riskli olgularda yapılan randomize çalışmada + seleksiyon yapılanlarda hastaliksız sağ kalım daha uzun bulunmakla birlikte, toplam sağ kalım farklı bulunmamıştır (26).

Multipl miyelom: Normal ve malign plazma hücreleri CD34 antijen ekspresyona etmez. Multipl miyelomlu olgularda plazma hücrelerinin %10 oranında periferik kanda bulunabilecekleri de gösterilmiştir (27). CD34(+) seleksiyonunun önemini araştırdığı bir randomize çalışmada seleksiyon yapılan olgularla yapılmayan olguların toplam sağ kalımları farklı bulunmamıştır (28).

Non-Hodgkin lenfoma: Gorin ve ark. 15 düşük grade non-Hodgkin lenfomalı olgudan 8'inin pozitif seleksiyondan sonra bcl-2 açısından negatif hale geldiğini ve hastaların kısa süreli takiplerinde %73'ünün relapsız kaldığını göstermişlerdir (29).

Nöroblastoma: Civin ve ark. 13 pediyatrik nöroblastomlu olguda pozitif seleksiyon yapmışlar ve engraftment'in olumsuz etkilenmediğini göstermişlerdir (30). Uzun süreli sonuçlar henüz yoktur.

Oldukça kısıtlı sayıda çalışmalardan elde edilen bu sonuçlara göre yorum yapmak oldukça güçtür. Randomize çalışma güçlükleri ise ortadadır. Bir öteye göre ayıklamanın klinik etkinliğini gösterebilmek için 1000'in üzerinde hastaya ihtiyaç vardır (31). Diğer taraftan bu yöntemin pahalı, zaman alan, zahmetli ve sofistike bir yöntem olması da diğer güçlükleri oluşturmaktadır.

Türkiye'de CD34(+) seleksiyon

Türkiye'de ilk periferik CD34(+) seleksiyon, yüksek gradientli immünomanyetik seleksiyon yöntemi (CliniMACS) kullanılarak Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kemik İliği Transplantasyon Merkezi'nde Şubat 1998'de gerçekleştirilmiş ve ilk pilot çalışma sonuçları Arpacı ve ark. tarafından yayınlanmıştır (32).

Şubat 2009'a kadar 119 seleksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 119 pozitif seleksiyonun 60'ı otolog transplantasyon için, 59'u ise haploidentik allojeneik transplantasyon için yapılmıştır. Otolog transplantasyon uygulanan 53 hastanın 29'u meme kanseri, 8'i non-Hodgkin lenfoma, 2'si multipl miyelom, 9'u nöroblastom, 1'i ALL, 1'i skleroderma, 1'i multipl skleroz, 1'i AML ve 1'i de osteosarkom olgusudur. Hastalara bu yöntemle ortalama 2.14×10^6 /kg CD34(+) hücre verilmiştir. Lökosit engraftmanı ($\geq 1000/\text{mm}^3$) median 13. günde, platelet engraftmanı (≥ 50.000) median 16. günde oluşmuştur. Posttransplant ateşli gün, antibiyotik kullanılan gün, eritrosit ve platelet transfüzyon sayıları hastanede kalış süreleri ve engraftment zamanları manipülasyon yapılmayan nakillerden farklı bulunmamıştır. Uzun süreli takip sonuçları ise henüz belirtilmemiştir. CD34(+) hücrelerin median saflık oranı %96, median korunma oranı ise %64 olarak bulunmuştur. Diğer taraftan median T hücre depleksiyonunun 4.05 log ve B hücre depleksiyonunun da 2.71 log olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında CliniMACS'ın normal scale columnlarında total çekirdekli hücre sayısı aşılabilir (CD34+ hücre kapasitesi aşılmamak şartıyla) sistemin performansının bozulmadığını göstermişlerdir (33). Tümör hücre depleksiyonu, %96'lık saflık oranı göz önünde tutulduğunda, 3-4 log arasındadır. Çoğu haploidentik allojeneik transplantasyon uygulanan 46 hastanın 26'sı SCID, 6'sı Fanconi anemisi, 3'ü osteopetrozis, 3'ü AML, 2'si ALL, 1'i KML, 1'i JMML, 1'i MHC Class 2 eksikliği, 1'i MDS, 1'i amegakaryositik trombositopeni ve 1'i de hemafagositik sendromdur. Haploidentik transplantasyonların %90'dan fazlası Türkiye'nin önde gelen pediatrik KİT merkezlerinde (Tablo V) gerçekleştirilmiştir (34-36). Maliyet hesaplamaları yapılırsa, 1 seleksiyon işleminin maliyeti 10000 Euro civarındadır. Bu paraya ithalat ve diğer vergi ücretleri dahildir.

Tablo V. Allojeneik transplantasyon için teknik yardım yapılan kemik iliği transplantasyon merkezleri

Merkez	İşlem sayısı
Hacettepe Tıp Pediatrik İmmünoloji	17
Ankara Tıp Pediatrik İmmünoloji	14
Hacettepe Tıp Pediatrik Hematoloji	11
Gazi Tıp Erişkin Hematoloji	4
Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı	4
GATA Pediatrik Hematoloji	4
Ege Tıp Pediatrik Hematoloji	2
Çukurova Tıp Pediatrik Hematoloji	1
Ankara Tıp Pediatrik Hematoloji	1
Ankara Tıp Erişkin Hematoloji	1
Toplam	59

Gelecek

CD34(+) seleksiyon yöntemi tümör hücrelerinin ayıklanması dışında değişik amaçlar için kullanılabilir. Bunlardan biri >4 log T hücre depleksiyonu yapabilmesi nedeniyle "mismatch" haploidentik ve "unrelated" allojeneik nakillerde "graft versus host" hastalığını önlemek amacıyla yöneliktir. Bu şekilde kullanım bazı transplant merkezlerinde uygun doku grubu bulunamayan ALL, AML, MDS, KML, immün yetersizlik, metabolik-genetik hastalıklarda ve aplastik anemide uygulanmaktadır. Bir başka kullanım amacı, B hücre depleksiyonu (>2.5 log) da yapabilmesi nedeniyle bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmasıdır. Bu özelliğinden dolayı aynı zamanda posttransplant dönemde görülen B hücreli malignitelerde azaltma yapabileceği potansiyeli de vardır. Ex vivo olarak periferik ve kord kanı kök hücrelerinin ekspansiyonu, gen tedavisi ve CD34(+) hücrelerden elde edilecek dendritik hücrelerle yapılabilecek immünoterapi de gelecekte büyük ümit vadeden uygulama alanlarıdır. CD34(+) seleksiyon gittikçe artan sıklıkta transplantasyonlarda kullanılmaktadır. Henüz tümör ayıklaması konusunda klinik önemi bilinmese de, diğer ayıklama yöntemlerine göre taşıdığı üstünlükler nedeniyle daha fazla tercih edilmektedir. Klinik önemi çok merkezli randomize çalışmalarla belirlenecektir (37,38).

Kaynaklar

- Franklin W, Shpall EJ, Archer P, et al. Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 41: 1-13.
- Sharp JG, Kessinger A, Vaukhan WP, et al. Detection and clinical significance of minimal tumor cell contamination of peripheral stem cell harvests. *Int Cell Cloning* 1992; 10 (Suppl 1): 92.
- Moss TJ. Sensitive detection of metastatic tumor cells in bone marrow. *Prog Clin Biol Res* 1994; 389: 567-577.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cell. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85: 1419-1424.
- Kleinman MB, Wiley EL, Guo M, et al. Immunohistochemical detection of breast cancer cells in paired peripheral blood progenitor cell specimens collected after cytokine or cytotoxic and myelosuppressive chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1297-1301.
- Passos-Coelho, Ross AA, Kahn DJ, et al. Similar breast cancer cell contamination of single day peripheral blood progenitor cell collections in obtained after priming with hemopoietic growth factor alone or after cyclophosphamide followed by growth factor. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2569-2575.

7. Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, et al. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven year outcome of multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1788-1794.
8. Kahn DG, Prilutskaya M, Cooper B, et al. The relationship between the incidence of tumor contamination and number of phereses for stage IV breast cancer. *Blood* 1997; 90 (Suppl 1): abstr 2514.
9. Brenner MK, Rill DR, Moen RC, et al. Gene marking to trace origin of relaps after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-86.
10. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, et al. Genetic marking shows that Ph+ cell present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow transplantation in CML. *Blood* 1994; 83: 4068-4076.
11. Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, et al. Clinical significance of bone marrow transplantation metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1868-1876.
12. Cooper SW, Moss TJ, Ross MA, et al. Occult tumor contamination of hematopoietic stem-cell products does not effect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3509-3517.
13. Gribben JG, Freedman AS, Neuberck D, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1525-1533.
14. Gorin NC, Aegerter P, Auvert B, et al. Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: A European survey of the role of marrow purging. *Blood* 1990; 75: 1606-1614.
15. Gribben JG. Antibody-mediated purging. In: Thomas ED, Blume KG, Forma SJ (eds). *Hematopoietic Cell Transplantation*. 2nd ed. Blackwell Science Inc, 2004: 244-253.
16. Krause DS, Fackler MJ, Civin CJ, Stratford MW. CD34: structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
17. Siena S, Bregni M, Gianni M. Estimation of peripheral blood CD34+ cells for autologous transplantation in cancer patients. *Exp Hematol* 1993; 21: 203.
18. Isola L, Skerret D, Lipton J, et al. Haplo mismatch allogeneic BMT using CD34+ selected bone marrow cells. *Blood* 1997; 90 (Suppl 1): 342b.
19. Nieto Y, Shpall EJ. CD34+ blood stem cell transplantation. In: Reiffers J, Goldman J, Armitage JO (eds). *Blood Stem Cell Transplantation*. London: Martin Dunitz Ltd, 1998: 187-201.
20. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. Controllable T cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11: 231-238.
21. Arpacı F, Gee A, Broulette M, et al. Controllable T cell depletion of marrow by high gradient magnetic separation. *Exp Hematol* 1996; 24: 626-628.
22. Müller A, Köhler A, Zinti F. CD34+ progenitor selection for allogeneic transplantation. Experiences from the use of two different separation systems. *Blood* 1997; 90 (Suppl 1): 345b.
23. Handgretinger R, Lang P, Schumm M, et al. Isolation and transplantation of autologous peripheral CD34+ progenitor cells highly purified by magnetic activated cell sorting. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 987-993.
24. Champlin R, Bail E, Holland K, et al. Importance of cell dose with CD34-selected autologous marrow transplant: Result of controlled trial. *Blood* 1995; 86: 293a.
25. Shpall EJ, Johns RB, Bearman SJ, et al. Transplantation of enriched CD34+ positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34+ positive peripheral blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994; 12: 28-36.
26. Cornetta K, Sledge G, Yanovich S, et al. High dose chemotherapy and stem cell transplant in breast cancer: a randomized multicenter study of CD34 selection. *Asco Proceedings*. 2001; 20 (1): 17a (Abstract 66).
27. Billadeau D, Quam L, Thomas W, et al. Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood multiple myeloma patients. *Blood* 1992; 80: 1818-1824.
28. Stewart Ak, Schiller G, Vescio R, et al. *ASH Proceedings* 1999; 714a (Abstract 3151).
29. Gorin NC, Lopez M, Laporte JP, et al. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995; 85: 1647-1654.
30. Berenson RJ, Anders RG, Bensinger WI, et al. Selection of CD34+ marrow cells for autologous marrow transplantation. In: Dicke KA, Spitzer G, Jagannath S, Evinger-Hodges MJ (eds). *Autologous Bone Marrow Transplantation*. Proceeding of the Fourth International Symposium. The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Boston: 1989: 55-60.
31. Appelbaum FR. Is purging stuck in purgatory. *Oncology* 1994; 8: 24-30.
32. Arpacı F, Öztürk B, Kömürcü Ş, et al. Isolation of peripheral CD34+ progenitor cells by high gradient immunomagnetic cell selection and autologous peripheral blood stem cell transplantation: Results of first pilot study in Turkey. *Turk J Haematol* 1999; 16: 41-49.
33. Arpacı F, Çetin T, Ozet A, et al. The excessive numbers of total nucleated cells does not affect the performance of the CliniMACS. *J Clin Apheresis* 2004; 13: 197-201
34. Yalman N, Bilgen H, Anak S, et al. Haploidentical peripheral blood stem cell transplantation for infantile malignant osteopetrosis. *Turk J Immunol* 2000; 5: 9-12.
35. Balcı YI, Akdemir Y, Gumruk F, et al. CD-34 selected hematopoietic stem cell transplantation from HLA identical family members for Fanconi anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 50: 1065-1067.
36. Arpacı F, Tezcan İ, Kuzhan O, et al. G-CSF-mobilized haploidentical peripheral blood stem cell transplantation in children with poor prognostic nonmalignant disorders. *Am J Hematol* 2008; 83: 133-136.
37. Arpacı F. Periferik kan kök hücre transplantasyonunda "Purging" uygulama teknikleri ve klinik önemi. *Hematoloji – Onkoloji* 2000; 2: 133-138.
38. Arpacı F. Aferez ürünü ve hücreden arındırma. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1: 82-85.