



KÖK HÜCRE NAKLİNDE G-CSF KULLANIMI

**Prof. Dr. Bülent Eser, Erciyes Üniversitesi
Dedeman Hematoloji-Onkoloji Hastanesi**

Anlatım Planı

- Otolog kök hücre mobilizasyonunda kullanım
- Allojenik periferik kök hücre donöründe kullanım
- G-CSF ile hazırlanmış kemik iliği kullanımı
- Otolog nakil sonrası kullanım
- Allojenik nakil sonrası kullanım

OTOLOG KÖK HÜCRE MOBİLİZASYONUNDA KULLANIM

Mobilizasyon mantığı?

Periferal kan kök hücre içeriği kemik iliğindeki daha azdır:

- Kemik iliği hücrelerinin ortalama %1'i CD34 eksprese ederken
- Periferik kan çekirdekli hücrelerinin %0.03-% 0.06'sı CD34 eksprese eder
- Mobilizasyon kemik iliğindeki kök hücreleri periferal kana yönlendirmek için kullanılan bir yöntemdir.
 - HKH'ler, akım sitometri ile CD34+, CD38-, Thy-1+ (CD90), Lin– fenotipiyle karakterizedir.

PKH mobilizasyonunda hedefler?

- Donörün ve hastanın sağlığının korunması ve güvenliğinin sağlanması
- İşlemin en kısa sürede ve en az komplikasyonla sonlandırılması
- Yeterli miktarda kök hücre toplanması (beklenen yetersizlik oranının düşük olması)
- Tümör kontaminasyonunun az olması veya olmaması

Mobilizasyon protokolleri

Kemoterapi:

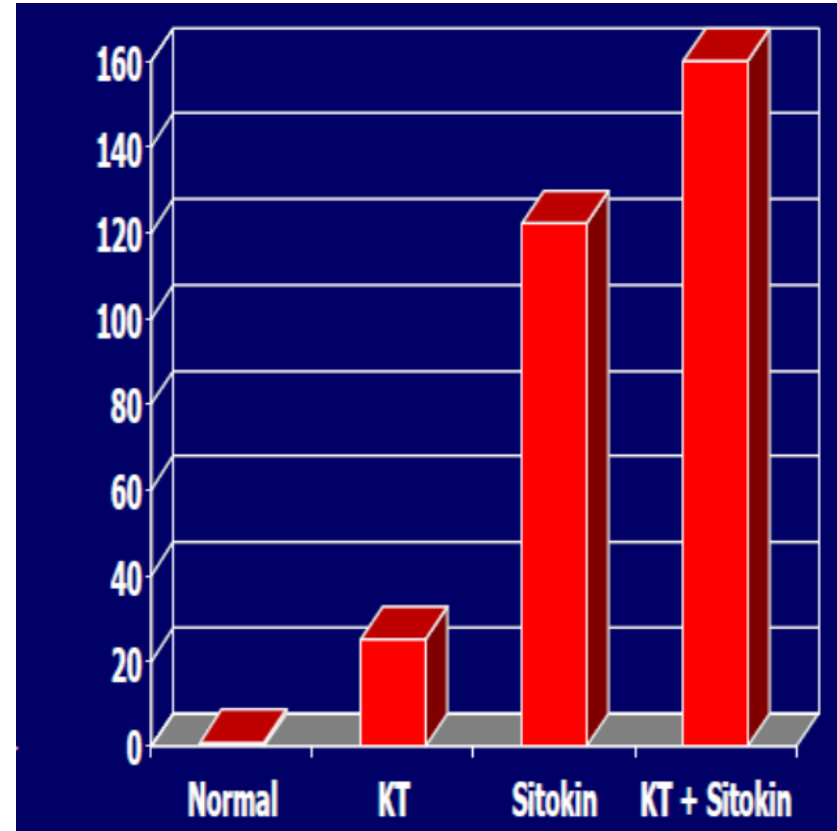
- Periferik kanda kök hücre konsantrasyonunu 20-25 kat arttırır
- Siklofosfamid
- Etoposid
- Siklofosfamid + Etoposid

Sitokin (G-CSF):

- Periferik kanda progenitor hücre konsantrasyonu 60-100 kat artar
- Filgrastim
- Lenograstim

Kombinasyon (Kemoterapi + sitokin):

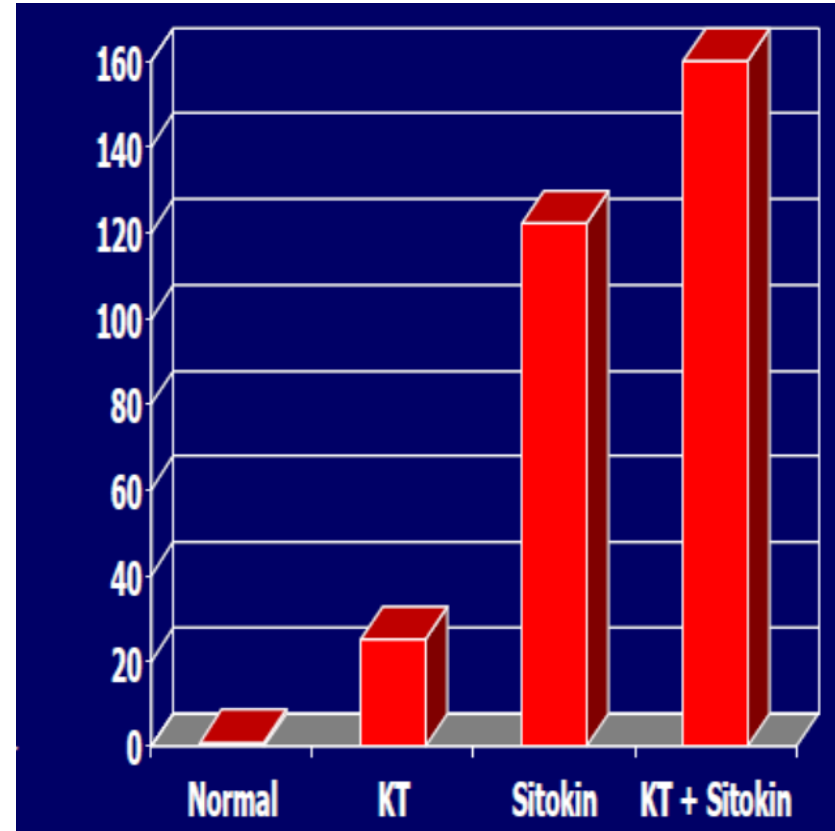
- Periferik kanda kök hücre konsantrasyonunu 100-160 kat arttırır



Mobilizasyon protokolleri

Sitokin (G-CSF):

- Periferik kanda progenitor hücre konsantrasyonu 60-100 kat artar
- Filgrastim
- Lenograstim



G-CSF ve GM-CSF ilk kullanımı

- 1988 yılında iki farklı çalışmayla CSF kullanılarak başarılı mobilizasyon gerçekleştirildi.
- Birinci çalışmada GM-CSF, ikinci çalışmada G-CSF kullanıldı ve «colony-forming cells» artış oranları sırasıyla 60 ve 100 kat olarak bulundu.

[Socinski MA, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet*. 1988;1:1194-1198.]

[Dührsen U, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood*. 1988;72:2074-2081.]

Sitokin/Kemokin İçerikli Mobilizasyon Rejimleri

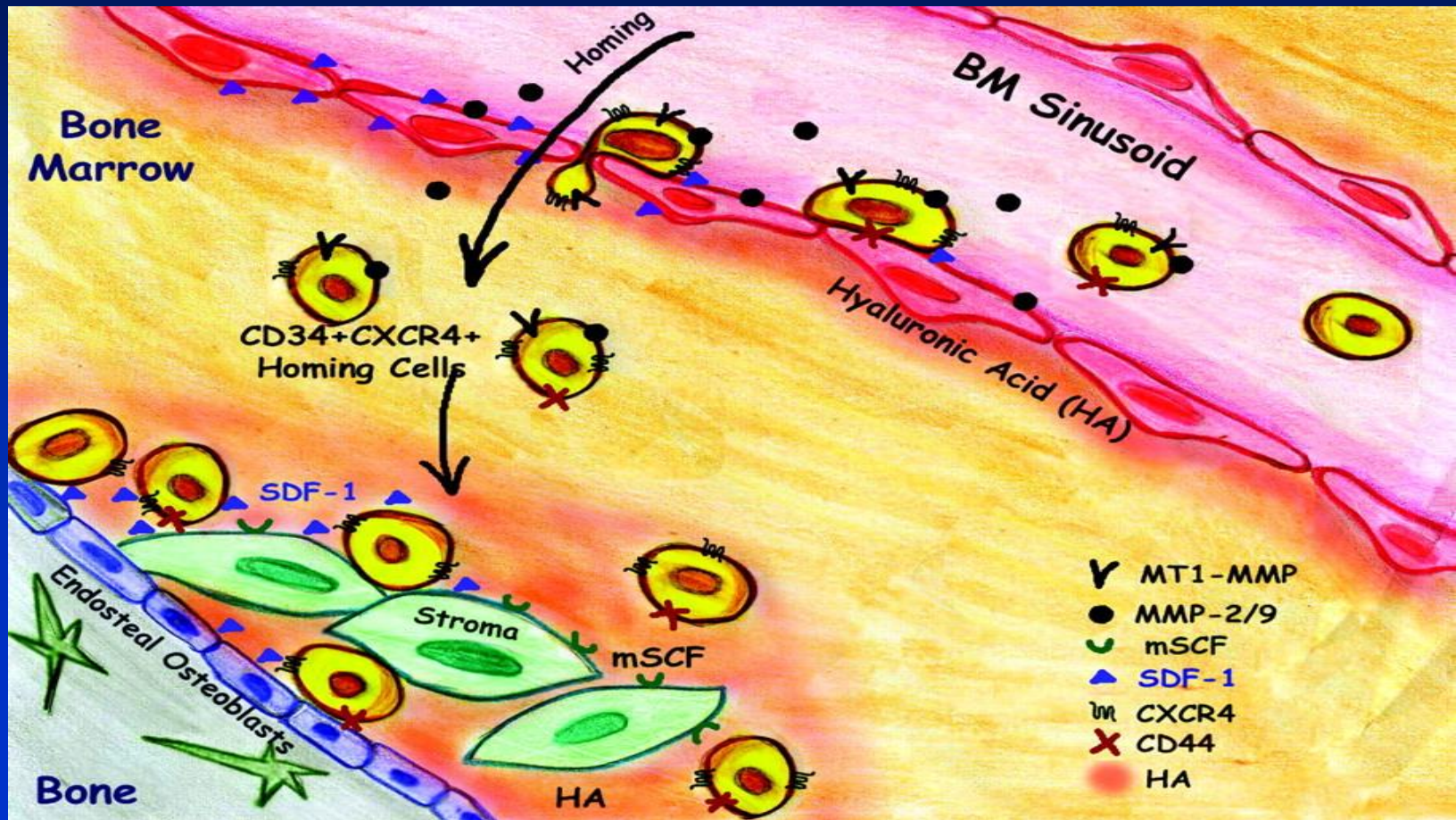
- rhG-CSF + rhGM-CSF (Lane et al., 1999)
- rhG-CSF + r-methuSCF (Shpall et al., 1997)
- rhGM-CSF/rhG-CSF + Flt3 ligand (Lebsack et al., 1997)
- rhG-CSF + rhTPO (Champlin et al., 1997)
- rhG-CSF + Interleukin-3 (Geissler et al., 1996)
- MIP-1 α (Broxmeyer et al., 1995)
- rhG-CSF + Erythropoietin (EPO) [Olivieri et al., 1995]

Sonuç:

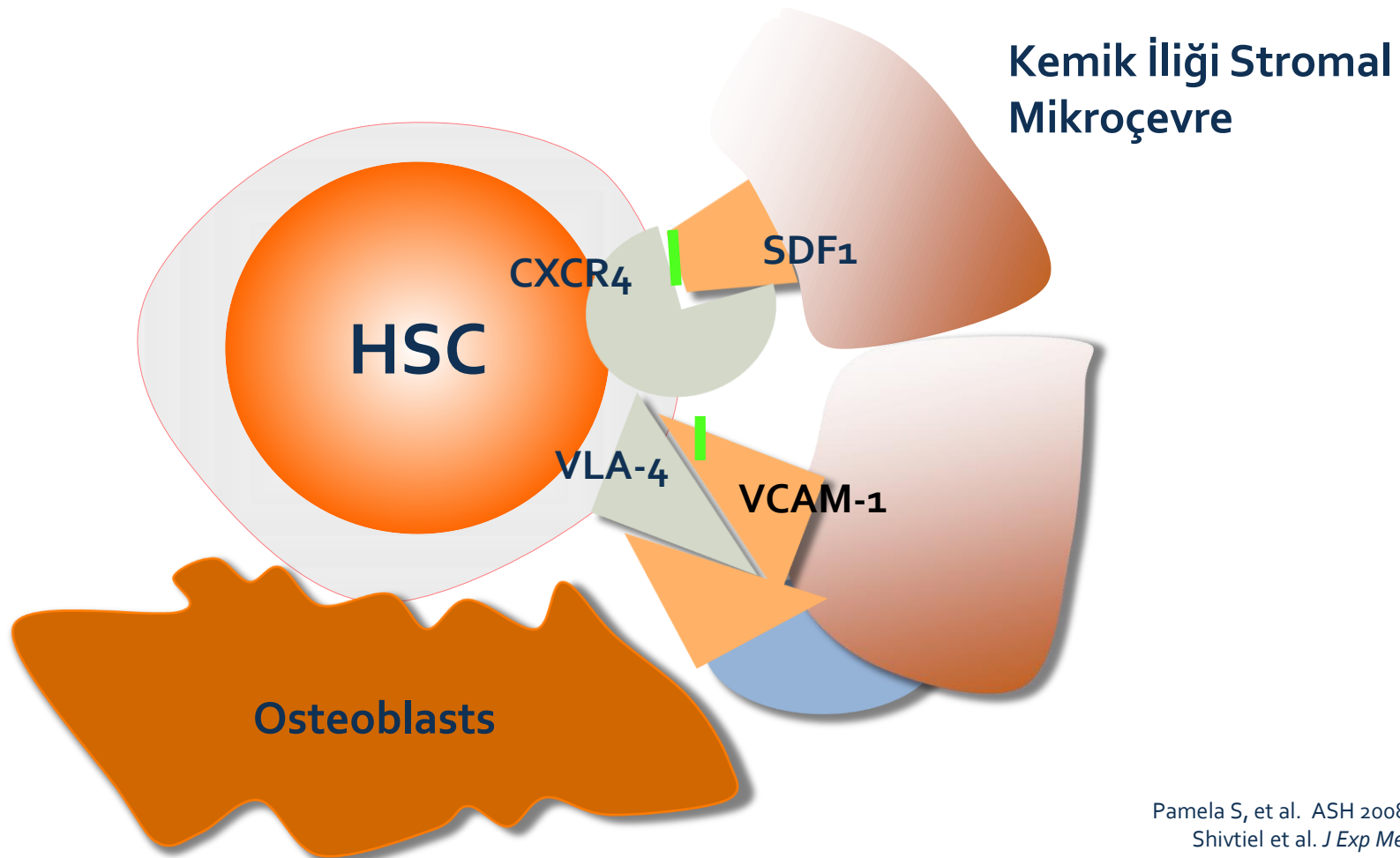
Tek ajan G-CSF diğer sitokinler veya kombinasyonları ile karşılaştırıldığında eşit veya daha üstün kök hücre mobilizasyonu sağlamaktadır.

Kök Hücrelerin Kemik İliğine Göçü

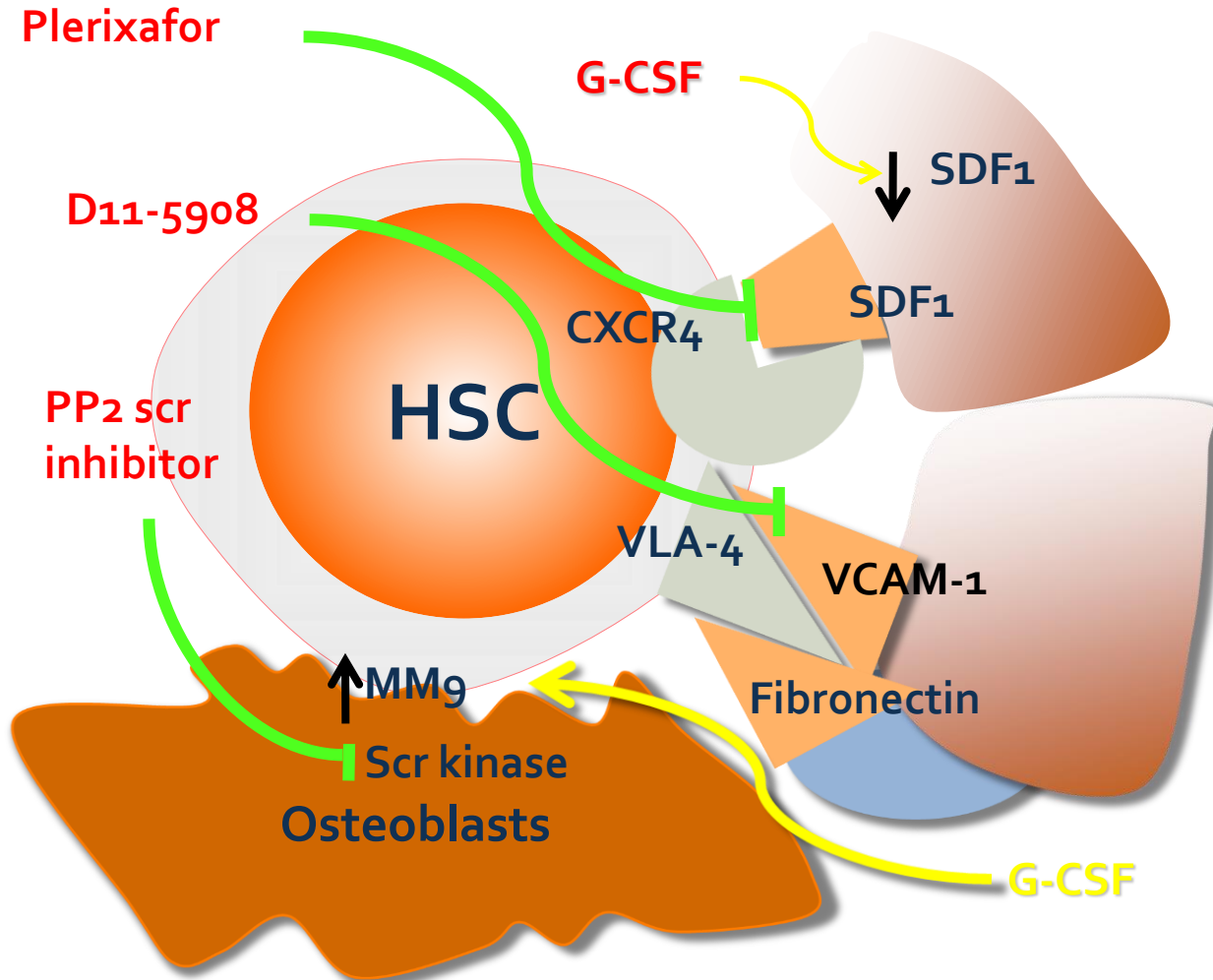
[T. Lapidot et al., 2003]



Stem Cell Niche



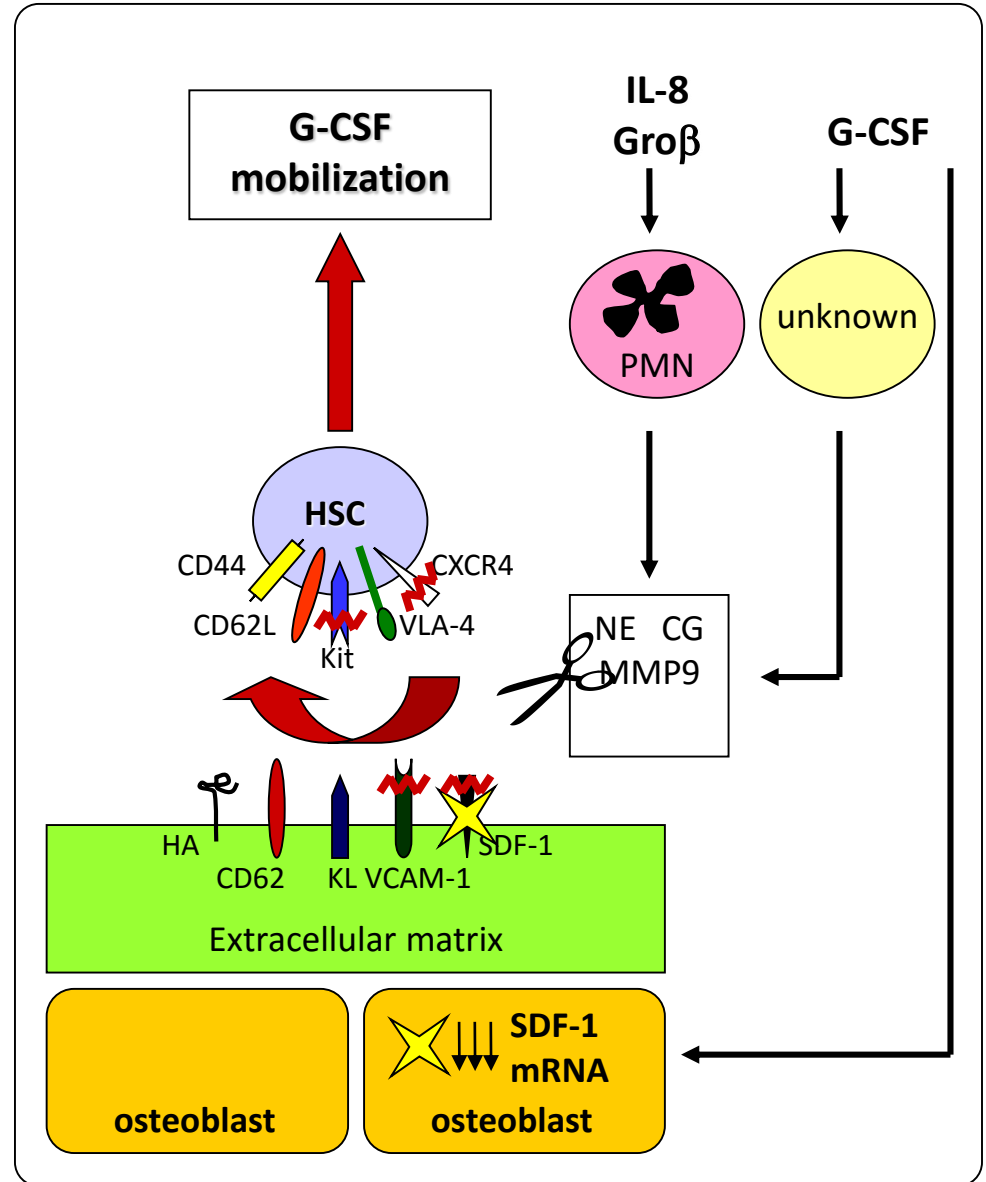
Kök Hücre Mobilizasyon Ajanları



Pamela S, et al. ASH 2008. Abstract #: 858;
Shivtiel et al. *J Exp Med*. 2008;205:2381.

G-CSF ile mobilizasyon

- G-CSF–ile indüklenen mobilizasyonda **kritik basamak SDF-1/CXCR4 sinyalizasyonunun kesilmesi**
- Kemik iliğinde SDF-1 yapımının ana kaynağının osteoblastlar olduğu düşünülmektedir.
- G-CSF kemik iliğinde **osteoblast aktivitesini kuvvetli inhibe eder ve SDF-1 ekspresyonunu azaltır.**



CD34⁺ Hücre Miktarını Etkileyen Faktörler

Hasta ilişkili

Yaş

Seçilen mobilizasyon rejimi

Kemoterapi tabanlı rejimlerde daha fazla hücre toplanabilir.

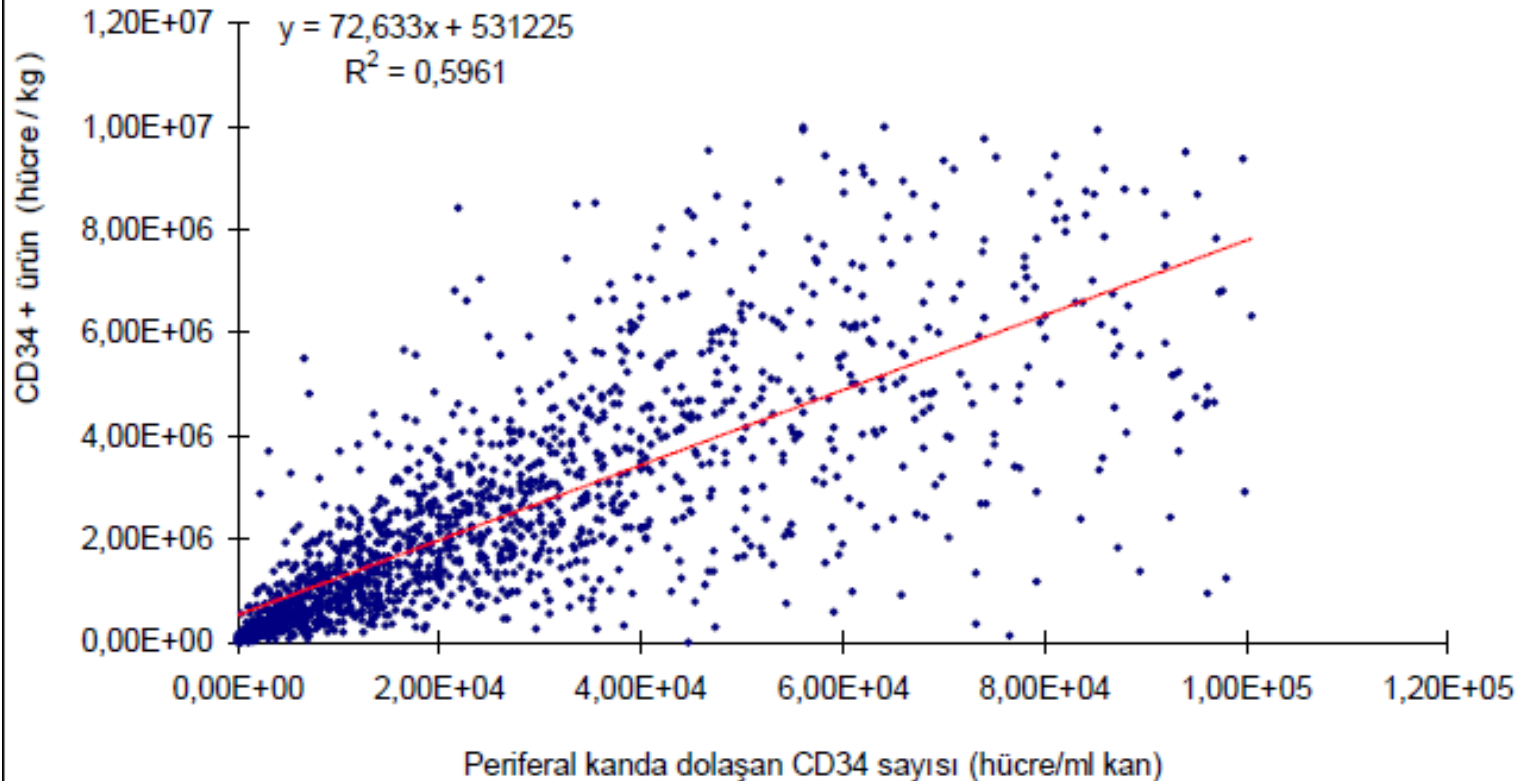
Daha önce aldığı tedavilerin türü ve miktarı

Alkilleyiciler, lenalidomide, fludarabin, radyasyon

Mobilizasyon zamanında trombosit sayısı

Mobilizasyon ürün belirleyicisi: aferez öncesi PK CD34 sayısı

İlk mobilizasyonda 1. aferez günü toplanan CD34 ürünü ile periferel CD34 sayısı korelasyon göstermektedir



Aferez Öncesi Periferde Mutlak CD34+ Hücre Sayısının Önemi



- $<10/\mu\text{l}$ ise kök hücre aferezi yapılmamalı
- $>10/\mu\text{l}$ işleme başlanabilir
- $>20/\mu\text{l}$ optimal aferez zamanı
- $>40/\mu\text{l}$ olduğu durumlarda tek seansta yeterli kök hücre toplama olasılığı %95 kadardır.

EBMT 1998, Courmayeur, İtalya

Hedeflenen Kök Hücre Miktarı?

Genelde $\geq 2 \times 10^6$ CD34⁺ hücre/kg hematopoetik engrafman için sınırdır

> 2.5×10^6 CD34⁺ hücre/kg verilen hastaların %95'inde 18. güne kadar kalıcı nötrofil engrafmanı gerçekleşmektedir.

5×10^6 /kg hızlı trombosit engrafmanı için sınır değerdir.

> 5×10^6 /kg dozların daha hızlı ve iyi engrafmana yol açtığına dair bir kanıt mevcut değildir.

To LB, et al. *Blood*. 1997;89:2233-58;
Schiller G, et al. *Blood*. 1995;86:390-7;
Kiss JE, et al. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:303-10;
Weaver CH, et al. *Blood* 1995;86:3961-9;
Dercksen MW, et al. *J Clin Oncol*. 1995;13:1922-32.

Mobilizasyon başarısızlığı nedenleri nelerdir?

- **$<2 \times 10^6$ CD34+ hücre/kg** = %10-20
- Yaş: Yaşlı hastalar
- Primer hastalık: Lenfoma hastaları (%35)
- Önceki Kemoterapiler:
- Sayısı: Arttıkça risk artmakta
- Alkilleyici ajanlar
- Mobilizasyondan 2 ay önce fludarabin tedavisi
- Kemik iliği alanlarına RT alması
- Trombositopeni (düşük ürün belirteci)
- Mobilizasyon öncesi PK CD34+ hücre sayısı düşüklüğü
- Kemo-mobilizasyon sonrası nötrofil düzelmesinde gecikme

McCarty J. IBMTR 2007 Meeting Education Book

Mobilizasyon başarısızlığı var: NE yapabilirim?

Mobilizasyonu tekrarla

- Yüksek volüm aferez
 - Maliyet artış ı Morbidite artışı
- Alternatif ve/veya Yüksek doz sitokin
 - Yüksek doz G-CSF
 - SCF, GM, GM-CSF, IL IL-3
- Kemo-mobilizasyon
 - Toksisite, FEN, maliyet artışı
- AMD3100 Plerixifor (Mozobil);); SDF SDF-1 alfa inhibit inhibitörü
- Büyüme hormonu (GH)

Kemik iliği harvest

- Maliyet artışı
- Engraftman yavaş

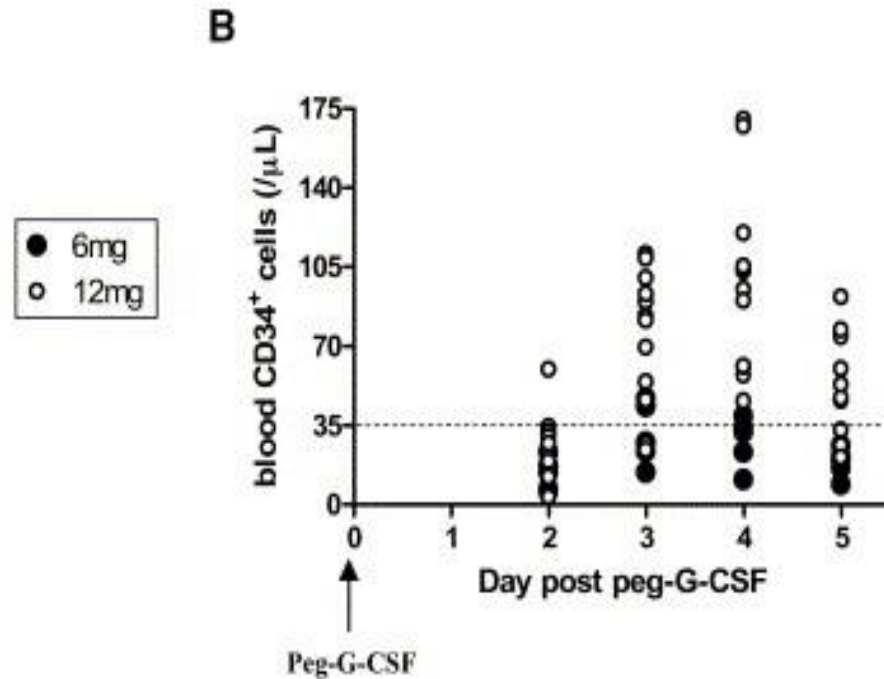
YETERSİZ MOBİLİZASYONDA YENİ ALTERNATİFLER

- G-CSF + **Growth hormone** (GH)
(Carmelo Carlo-Stella, et al. Blood. 2004;103: 3287-3295)
- **Parathormon** 40 µg -100 µg, 1-14. günler G-CSF 10 µg/kg/gün 10-14. günler
(Ballen KK, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2007;13:838-43.)
- G-CSF 10µg/kg/gün 4 gün, sonrasında G-CSF + **plerixafor** 240µg/kg x1
(Liles WC, et al. Transfusion. 2005;45:295-300.)

Pegile filgrastim ve filgrastim

- Filgrastim plazma yarı ömrü:
3-4 saat
- Pegile filgrastim plazma yarı ömrü
~ 33 saat

Pegile-G-CSF standard G-CSF'ye benzer mobilizasyon kinetiğini tek dozla gösterir...



Hill et al, Biol of Blood and Marrow Transplantation, 2006

Stem Cells Mobilized by Chemotherapy and a Single Dose Pegylated G-CSF in Patients With Multiple Myeloma [U. Steidl et al., 2005]

| | pegfilgrastim group | filgrastim group |
|--|------------------------|---------------------|
| Cytokine dose total | 12 mg | 7.5 mg |
| WBC > 1 x 10 ⁶ /ul | day 12 | day 14 |
| PB CD34 ⁺ cell count at maximum | day 12 | day 15 |
| Maximal PB CD34 ⁺ cell count | 78/ul | 111/ul |

Stem Cells Mobilized by Chemotherapy and a Single Dose Pegylated G-CSF in Patients With Multiple Myeloma [U. Steidl et al., 2005]

| | pegfilgrastim group | filgrastim group |
|----------------------------------|------------------------|---------------------|
| Day of 1 st apheresis | 13 | 15 |
| Number of aphereses | 1 | 1 |
| CD34 ⁺ cells/kg | 7.4 | 10.8 |
| Mobilization failures | 0 | 0 |

Multiple myelomalı hastalarda kök hücre mobilizasyonu için sabit doz tek ajan Pegfilgrastim

[C. Hosing et al., 2005]

- 15 CD34⁺ cells/ μ l'ye ulaşıldığı ortalanca gün 3 gün [2-4]
- Hedefe ulaşmak için gereken ortalanca lökaferez sayısı 2 [1-5]
- Toplanan ortalanca CD34⁺ hücre dozu: 8.4×10^6 /kg [4.1-15.8]
- Ortanca toplanan CD34⁺ hücre dozu/işlenen kan 19.3×10^5 /kg [6.4-77.4]

Multiple myelomalı hastalarda kök hücre mobilizasyonu için sabit doz tek ajan Pegfilgrastim

[C. Hosing et al., 2005]

- Ortanca infüze edilen CD34⁺ hücre dozu:
4.2 x 10⁶/kg [2.6-9.4]
- Nötrofil >0.5 x 10⁶/μl olduğu ortalanca gün
10 gün [9-11]
- Platelet >20 x 10⁶/μl olduğu ortalanca gün
11 gün [0-17]
- Toksisite profili filgrastime benzer

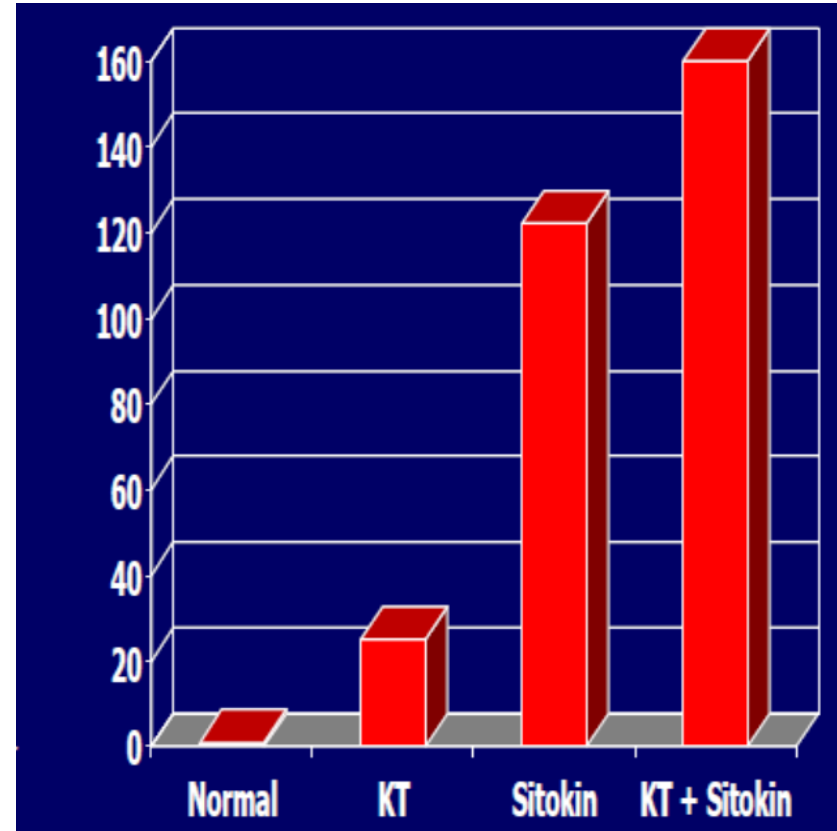
Kök Hücre Mobilizasyonu için Pegfilgrastim Uygulaması: Sorunlar

- Yeterli mobilizasyon yapılamayanlarda G-CSF dozunda düzenleme yapma imkanı yok.
- Ciddi G-CSF toksisitesi gelişenlerde ilaç etkisini hızla bloke etme veya geri döndürme imkanı yok.
- Kök hücre mobilizasyonunda FDA onayı yok.

Mobilizasyon protokolleri

Kombinasyon (Kemoterapi + sitokin):

- Periferik kanda kök hücre konsantrasyonunu 100-160 kat arttırır



Kombinasyon Metodları

- Kemoterapi ve sitokin kombinasyonu periferal kanda progenitör hücre içeriğini daha fazla artırmak için destek sağlar.
- WBC sayısı düşük düzeyden iyileşirken başlar :
Kemoterapi başlamasından tipik olarak 12-14 gün sonra
WBC eşiği:
 - > 1,000
 - > 3,000
 - > 10,000

G-CSF ve Kemoterapi + G-CSF

| Study | Disease State(s) | N | Mobilization Regimen | Median Total Collected CD34+ Cells X 10 ⁶ /kg (Range) | Median Apheresis Sessions (Range) | Number of Mobilization Failures |
|-------------------------------------|------------------|-----|----------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------|
| Alegre A, et al. ¹ | MM | 22 | G-CSF | 4.85 (2.1–10.1) | 3 (2–6) | NR |
| | | 18 | Cy+GM-CSF | 6.8 (1.8–34.8) | 5 (4–12) | NR |
| Desikan KR, et al. ² | MM | 22 | G-CSF | 5.8 (NR) | 5 | 23% |
| | | 22 | Cy+G-CSF | 33.4 (NR) | 7 | 18% |
| Dazzi C, et al. ³ | NHL | 12 | G-CSF | 2.89 (1.7–5.6) | 16 total | NR |
| | | 12 | Cy+G-CSF | 6.41 (2.2–25.9) | 15 total | NR |
| Narayanasami U, et al. ⁴ | NHL, HD | 22 | G-CSF | 2.5 (0.3–12.4) | NR (1–3) | 1 |
| | | 24 | Cy+G-CSF | 7.2 (0.3–44.8) | NR (1–3) | 1 |
| Pusic I, et al. ⁵ | NHL, MM, HD | 976 | G-CSF | 3.36 (NR) | 2 (1–5) | 182 |
| | | 64 | Chemo+G-CSF | 5.43 (NR) | 1.5 (1–5) | 12 |

Chemo = various chemotherapeutic agents; Cy = cyclophosphamide; HD = Hodgkin's disease; MM = multiple myeloma; NHL = non-Hodgkin's lymphoma; NR = not reported.

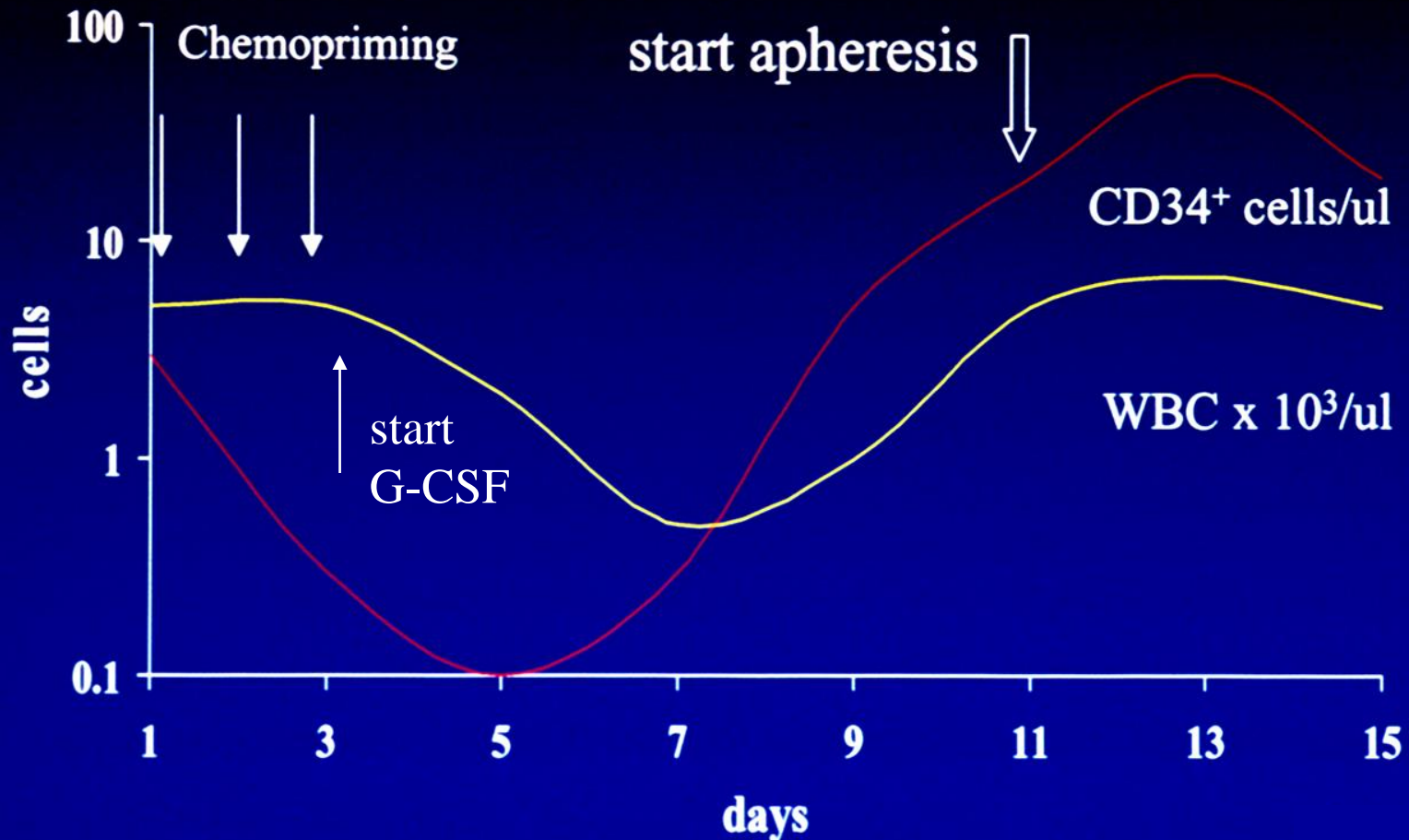
¹Alegre A, et al. *Bone Marrow Transplant*. 1997;20:211–217; ²Desikan KR, et al. *J Clin Oncol*. 1998;16:1547–1553; ³Dazzi C, et al. *Leuk Lymphoma*. 2000;39:301–310;

⁴Narayanasami U, et al. *Blood*. 2001;98:2059–2064; ⁵Pusic I, et al. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1045–1056.

En etkili mobilizasyon rejimi?

- Cyclophosphamide standart doz [4-7 g/m²].
- Genelde 4 g/m² kullanılıyor.
- 7 g/m² ile toksisite yüksek, fakat en iyi hücre toplama kalitesi bu dozda gerçekleşiyor.
- 1,5 g/m² ile dahi yeterli hücre toplanabiliyor
(Deliliers GL, et al. Leuk Lymphoma 2002; 43:1957-60)
- G-CSF dozu genelde: 5-10 µg/kg/gün

Induction of stem cell rebound by chemoprimering



Aferez Öncesi Periferde Mutlak CD34+ Hücre Sayısının Önemi



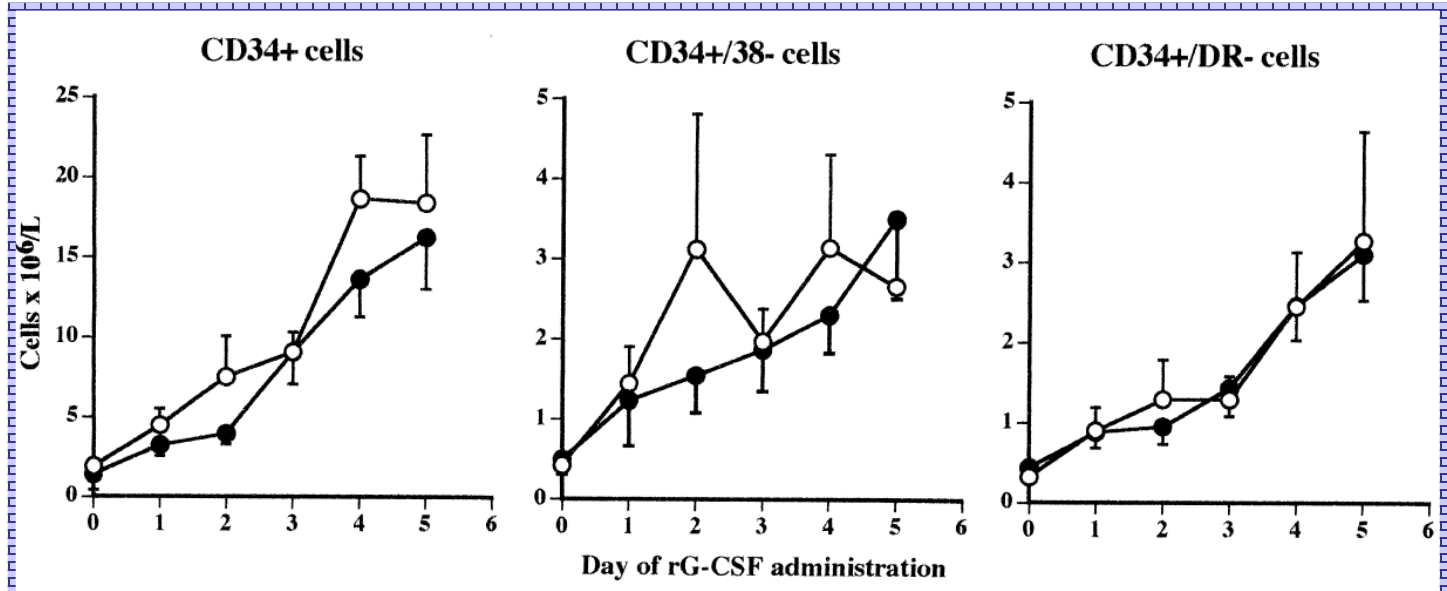
- $<10/\mu\text{l}$ ise kök hücre aferezi yapılmamalı
- $>10/\mu\text{l}$ işleme başlanabilir
- $>20/\mu\text{l}$ optimal aferez zamanı
- $>40/\mu\text{l}$ olduğu durumlarda tek seansta yeterli kök hücre toplama olasılığı %95 kadardır.

EBMT 1998, Courmayeur, İtalya

Otolog Kök Hücre Mobilizasyonunda Lenograstim - Filgrastim

(De Ariba F, et al BJH 1997;96:418-420)

- Meme kanserli 30 hasta



| CD34+ | Filgrastim | Lenograstim | p |
|-------------------------------|------------|-------------|-------|
| İlk aferez | 0,77±0,12 | 0,73±0,15 | |
| İkinci aferez | 1,42±0,23 | 1,00±0,16 | |
| Toplam | 2,71±0,60 | 2,09±0,27 | >0,05 |
| Toplam aferez maliyeti (US\$) | 2357±166 | 2464±127 | >0,05 |



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Transfusion and Apheresis Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/transci



The comparison of Filgrastim (Neupogen®), biosimilar filgrastim (Leucostim®) and Lenograstim (Granocyte®) as a first line peripheral blood stem cell mobilization strategy in autologous hematopoietic stem cell transplantation: A single center experience from Turkey

Serdar Sivgin^{a,*}, Esen Karakus^a, Leylagul Kaynar^a, Fatih Kurnaz^a, Cigdem Pala^a, Muzaffer Keklik^a, Gokmen Zararsiz^b, Musa Solmaz^c, Bulent Eser^a, Mustafa Cetin^a, Ali Unal^a

^a Dedeman Stem Cell Transplantation Hospital, Department of Hematology, Faculty of Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

^b Department of Medical Statistics, Department of Hematology, Faculty of Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

^c Apheresis Unit, Dedeman Stem Cell Transplantation Hospital, Department of Hematology, Faculty of Medicine, Erciyes University, Kayseri, Turkey

Results: A total of 96 patients who underwent autoHSCT were retrospectively analyzed. The median number of leukapheresis cycle necessary to harvest a minimal count of 3×10^6 CD34+/kg was 2 in Neupogen™ (min–max: 1–4) and Granocyte™ (min–max: 1–3) groups and 1 (min–max: 1–2) in Leucostim™ group.

The median doses of G-CSF agents

(µg/kg/day) in PBSC collection procedure were;

10.00 (min–max: 7.00–12.00) in the Neupogen™ group,

8.00 (min–max: 7.25–9.00) in the Leucostim™ group and

8.50 (6.00–9.50) in the Granocyte™ group. T

here was no statistical significance among groups ($p = 0.067$).

The number of total collected PB CD34+ cells (10^6 /kg) was

7.64 (min–max: 4.09–13.86) in the Neupogen™ group,

13.43 (min–max: 8.15–23.38) in the Leucostim™ group and

5.45 (min–max: 4.28–9.40) in the Granocyte™ group.

The data showed that patients in the Leucostim™ group had significantly higher PB CD34+ cells compared to patients in the Granocyte™ group ($p = 0.013$).

Conclusion: Leucostim™ was comparable to Neupogen™ for PBSC mobilization in patients who underwent autoHSCT.

**ALLOJENİK KÖK HÜCRE
DONÖRÜNDE G-CSF
KULLANIMI**

İlk Allo-PKHN denemesi

- 1989 yılında HLA-tam uyumlu kardeş donörden mobilize edilmemiş, T hücre depleksyonu yapılmış periferik kan kök hücre nakli denemesi yapıldı.

Kessinger A, et al. *Bone Marrow Transplant*. 1989;4(6):643-646.

G-CSF ile Allo-PKHN denemesi

- 1993 yılında G-CSF ile mobilize edilmiş kök hücre kullanılarak allo-PKHN yapılan bir vaka yayınlandı. Vakada 3 seride engrafman gelişmiş olup GVHD gözlenmemiştir, fakat takip süresi sadece 58 gün olan bu vakada kalıcı engrafman olup olmadığı konusunda kanıt elde edilemedi.

Russell NH, et al. *Lancet* 1993;341(8858):1482.

G-CSF ile başarılı Allo-PKHN

- 1995 yılında peş peşe 3 merkezden başarılı allojenik PKHT sonuçları yayınlandı;
- M. D. Anderson Cancer Center,
- Fred Hutchinson Cancer Research Center,
- Kiel University Hospital in Germany,

Körbling M, et al. *Blood*. 1995;85: 1659-1665.

Bensinger WI, et al. *Blood*. 1995;85:1655-1658.

Schmitz N, et al. *Blood*. 1995;85(6): 1666-1672.

Sağlıklı Allojenik Kök Hücre Donöründe G-CSF Kullanımı

- Hematolojik hastalıkların dışlanması hem donör hem de hasta güvenliği açısından önemlidir.
- G-CSF uygulaması sonrasında gizli lösemik klonun uyarılması endişesi mevcuttur.
- İlave olarak malign klonun donörden hastaya geçişi riski de mevcuttur.
- Donör kaynaklı hematolojik malignite gelişen 20'den fazla vaka yayınlanmıştır.

G-CSF Allojenik Donör Seçimi

- Bazı araştırmacılar 55 yaş üzerindeki donörlerde kemik iliği değerlendirmesi yapılmasını önermektedir.
- Fakat genelde tam kan sayımı yeterli bulunmaktadır.
- Malign hücre geçme riski olduğu için hikayesinde malignite olan donörler genelde reddedilir.

Vericide Büyüme Faktörü Kullanılmasının Muhtemel Kontrendikasyonları

- İnflamatuvar durumlar
- Venöz tromboz öyküsü ve aterosklerotik vasküler hastalıklar (Özellikle $15\mu\text{g/kg}$ 'dan yüksek dozlarda dikkatli olunmalıdır)
- Otoimmün hastalıklar
- Kemoradyoterapi ile tedavi edilen malignite öykülü donörler.

Martin Körbling, Blood 1997

G-CSF dozu

- 5-32 $\mu\text{g/kg}$ arası dozlar uygulanabiliyor.
- Daha yüksek G-CSF dozu daha fazla CD34⁺ hücre mobilizasyonunu sağlıyor ve daha fazla hücre toplanıyor (16 $\mu\text{g/kg}$ üzeri yan etki fazla)
- Bir çalışmada G-CSF 12 $\mu\text{g/kg}$ günde iki dozda uygulanmasının günde tek doz 10 $\mu\text{g/kg}$ uygulamaya göre aferezle daha fazla CD34⁺ hücre toplanmasını sağladığı görülmüştür.

(Engelhardt M, et al. J Clin Oncol. 1999;17:2160–2172)

G-CSF dozu

İkiye bölünmüş dozda uygulamanın tek doza üstün olduğunu gösteren başka çalışmalar da mevcuttur.

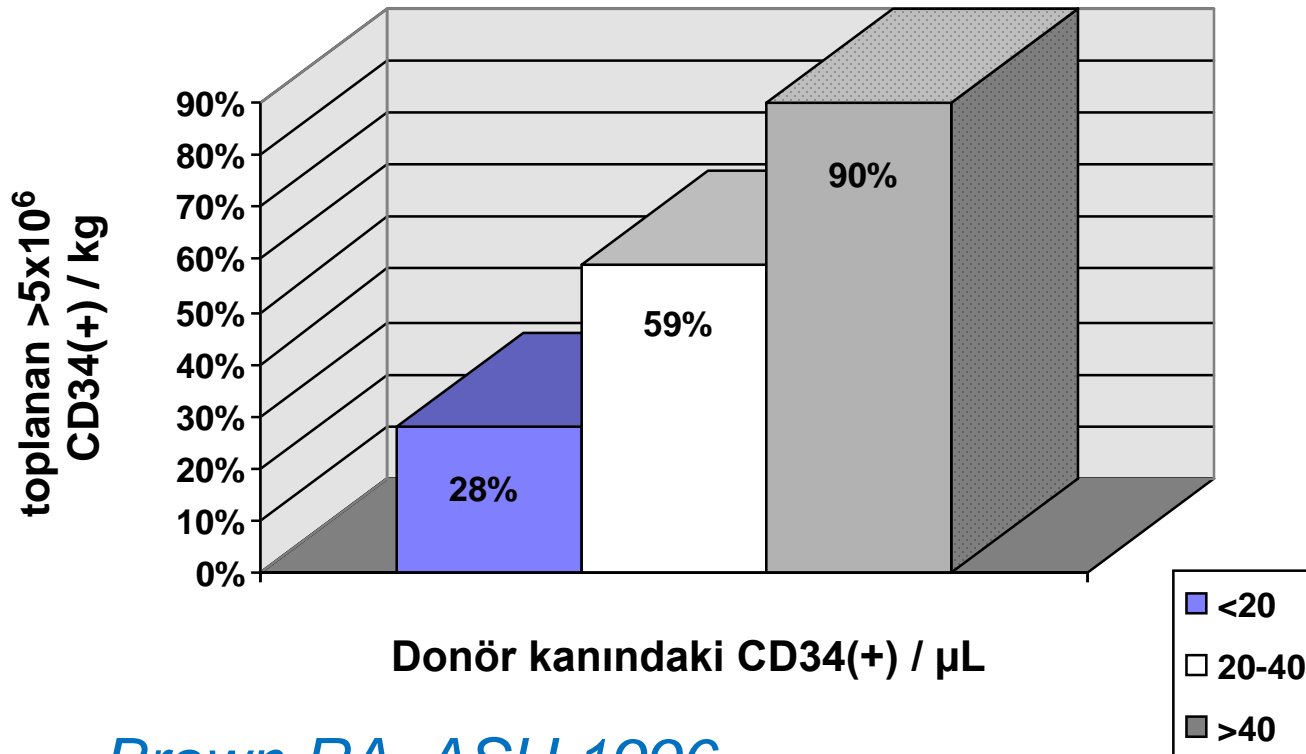
(Arbona C, et al. Bone Marrow Transplant. 1998;22:39–45.)

(Kroger N, et al. Br J Haematol. 2000;111:761–765.)

G-CSF Dozu ve Aferez Zamanı

- İki prospektif çalışma sonucuna göre; (Stroncek ve ark. ve Grigg ve ark.) 10 µg/kg dozunda G-CSF ile pik CD34 miktarı 4-6. günlerde elde edilmiştir.
- Aynı zamanda [colony-forming units granulocyte macrophage (CFU-GM), burst-forming units-erythrocyte (BFU-E)] miktarları da paralel olarak maksimuma ulaşmıştır.
- Yüksek dozlarda da bu pik en fazla 1 gün önceye kayar.

Donör kanındaki mutlak CD34+ hücre sayısı ile toplanan CD34+ hücre ilişkisi



Brown RA, ASH 1996

Kök Hücre Toplanma Başarısı

Table 2. Impact of demographic data and hematological parameters on mobilization efficacy in healthy allogeneic PBSC donors (after Hölig and Kroschinsky, with modifications)

| Author | Donors, n | Sibling/unrelated | Age, median, (range), years | G-CSF preparation, daily dose | Factors affecting mobilization of CD34 ⁺ cells and apheresis yield |
|--------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------------------------|---|--|
| De la Rubia et al., 2002 [29] | 261 | sibling and unrelated | 38 (2–72) | filgrastim lenograstim 10 µg/kg | positive influence: divided G-CSF dose, WBC on day 5 of G-CSF negative impact: female gender, age > 38 years no influence: baseline CBC, G-CSF preparation, G-CSF dose |
| Suzuya et al., 2005 [30] | 59 | sibling | 16 (3–63) | lenograstim filgrastim nartograstim 10 µg/kg | positive influence: WBC, platelet count at baseline negative impact: BMI, age no influence: G-CSF preparation, sex |
| Ings et al., 2006 [24] | 400 | 263 siblings 137 unrelated | 41 (12–74) 37 (20–59) | filgrastim lenograstim 10 µg/kg | positive influence: weight > 78 kg, male sex (only apheresis yield, not peripheral CD34 count) negative impact: age > 55 years no influence: G-CSF preparation |
| Vasu et al., 2008 [31] | 639 | sibling | 40 ± 13 | filgrastim 10–16 µg/kg/day | positive influence: weight, G-CSF dose, baseline platelet count, prior apheresis for DLI collection negative impact: age, female gender, white ethnicity |
| De Lavallade et al., 2009 [32] | 129 | sibling | 51 (19–70) | filgrastim median 8.9 µg/kg | positive influence: weight, G-CSF dose no influence: age |
| Richa et al., 2009 [33] | 195 | sibling | 52 (17–71) | filgrastim 10 µg/kg | negative influence: age no influence: sex, weight and comorbidities |
| Al-Ali et al., 2011 [34] | 167 | sibling | 47 (18–74) | filgrastim 2 × 5 µg/kg | negative influence: age (donors > 50 years mobilized less well) no statement regarding other variables |
| Hölig et al., 2013 [80] | 4,393 | 465 sibling 3,928 unrelated | 48 (2–73) 34 (18–61) | lenograstim 7.5 µg/kg | positive influence: BMI, baseline platelet count, male sex, divided G-CSF dose negative impact: female sex, smoking, alcohol consumption, age (in sibling donors only) |

WBC = White blood cell count; CBC = complete blood count; BMI = body mass index; DLI = donor lymphocyte infusion.

Kök Hücre Toplanma Başarısı

Kök hücre toplama etkinliğini pozitif etkileyen faktörler

- Vücut ağırlığı
- Başlangıç PLT düzeyi
- Başlangıç mononükleer hücre sayısı
- G-CSF dozu
- Bölünmüş dozlarda G-CSF uygulamak.
- Mobilizasyon ile etnisite arasında ilişki çıkması muhtemel genetik polimorfizm ile ilişkili olabilir.

Kök Hücre Toplanma Başarısı

Kök hücre toplama etkinliğini negatif etkileyen faktörler:

- Alkol ve sigara kullanımı
- Kadın cinsiyet
- Yaş (bazı yayınlarda)

G-CSF Uygulanması sonrası laboratuvar değişiklikleri

G-CSF uygulaması sonrası laboratuvar bulguları:

- Lökositoz
- Trombosit sayısında hafif düşme
- Potasyum düzeyinde hafif düşme
- Ürik asit, alkalen fosfataz, transaminaz, LDH düzeylerinde hafif artışa yol açabilir.

G-CSF Uygulanması sonrası kısa dönem yan etkiler

- Sağlıklı donörlerde G-CSF kullanımı sonrası sık rastlanan yan etkiler;
- Kemik ağrısı,
- Baş ağrısı ve grip benzeri semptomlar; halsizlik, bulantı, gece terlemesi, subfebril ateş.
- Daha az sıklıkla; Kas ağrısı, uykusuzluk, anoreksi ve kusma gözlelenebilir.

Dalak Rüptürü

- G-CSF uygulaması sağlıklı donörlerin çoğunda hafif dalak büyümesine yol açmaktadır. Fakat birkaç hafta içinde dalak eski haline dönmektedir.
- Dalak büyümesi G-CSF dozu ve süresiyle ilişkili olabilir.
- Çok az sayıda sağlıklı donörde splenik rüptür gözlenmiştir (1:5,000 and 1:10,000)

(Akyol G, et al. A rare but severe complication of filgrastim in a healthy donor: splenic rupture. Transfus Apher Sci. 2014;50:53-5.)

Dalak Rüptürü

- Don  rlere G-CSF uygulaması sonrasında en az bir hafta süreyle abdominal travma ihtimali olan sporlardan kaçınmaları önerilmelidir.
- Splenomegalisi oldu   bilinen donörlerde G-CSF dozunun azaltılması d    n  lmelidir.

Nadir Erken Yan Etkiler

- Pulmoner bulgular interstisyel pnömoni, pulmoner infiltratlar, akciğer fibrozisi ciddi fakat nadir komplikasyonlardır.
- Nadiren ARDS gelişimi gözlenebilir.
- Geçici hiperkoagülabilité gözlenebilir.

G-CSF sonrası uzun dönem takip

- Genel olarak G-CSF'nin sağlıklı donörlerde etkisi kendini sınırlayıcı ve klinik olarak kabul edilebilir düzeylerde kalmaktadır.
- G-CSF uygulaması sonrası uzun dönem takipte özellikle hematolojik malignite gelişme riski yönünden şüpheler bulunmaktadır.

Hematolojik malignite riski

- Alman grubundan Hölig yaptığı derlemede kendi verilerini de paylaşmış ve bu derlemede 28 donörde (%0, 34) takipte malignite tespit edildiği ve bunların 8'inin hematolojik malignite olduğu rapor edilmiştir. (Hölig K. Transfus Med Hemother 2013;40:225–235)
- Yazar bu makalede AML ve Hodgkin hastalığı görülme sıklığının Alman toplumuna göre yüksek bulunduğunu da not etmiştir.

G-CSF ve hematolojik malignite riski

- Halter ve arkadaşlarının EBMT verilerinin yayınlandığı 2009 tarihli çalışmasında;
- 51,024 birinci allojenik kök hücre donasyonu yapılan donörde (27,770 kemik iliği ve 23,254 periferik kan) 20 hematolojik malignite rapor edilmiştir (8'i kemik iliği donöründe, 12'si periferik kan donöründe)
- Kliniğimizde AML tanısı alan kızının donörü olan anne G-CSF uygulamasından 3 yıl sonra AML tanısıyla tedavi aldı. 3. sıra tedavide ancak remisyon elde edildi.

G-CSF ve hematolojik malignite riski

- Schmidt ve arkadaşlarının 12.559 akraba dışı donörde yaptığı analiz sonucu, G-CSF uygulamasının sağlıklı donörlerde hematolojik maligniteye kesinlikle yol açıp açmadığı konusunda yeterli kanıta ulaşamadığı belirtilmiştir.

Schmidt AH, Mengling T, Pingel J, Rall G, Ehninger G: Follow-up of 12,559 unrelated donors of peripheral blood stem cells or bone marrow. Blood 2010;116:abstr 365.

G-CSF; ilacı kesme ve doz ayarlaması

- **Tedavinin durdurulması:** Analjeziklerle azalmayan şiddetli ağrılar, parasetamol ile düşmeyen ve 24 saat devam eden 39°C ve üzeri ateş, larinks ödemi veya anafilaktik şok gibi ciddi alerjik reaksiyonlar, lökosit > 70.000/ μ l olması.
- **Dozun % 50 azaltılması:** Lökosit sayısının 50.000/ μ l'den yüksek olması ve/veya platelet sayısının 100.000/ μ l'den düşük olması.

G-CSF gebelerde kullanım

Mevcut veriler ışığında bakıldığında G-CSF uygulaması gebelerde (hem anne hem de bebek açısından) güvenle kullanılabilir.

Bununla birlikte klinik tecrübeler sınırlı olup vaka takdimleri şeklindedir.

Bu nedenle gebelikte ve süt verme döneminde eğer alternatif yoksa tercih edilebilecek bir yöntemdir.

Pessach I, et al. Granulocyte-colony stimulating factor for hematopoietic stem cell donation from healthy female donors during pregnancy and lactation: what do we know? Human Reproduction Update, 2013;19:259–267.

G-CSF gebelik komplikasyon riski

Table II G-CSF administration during pregnancy in women and fetal outcome.

| Study | Women with hematological malignancies, who received chemotherapy and G-CSF | Fetal outcome | Complications |
|-----------------------------|--|------------------|--|
| Cavenagh et al. (1995) | 1 | Healthy newborn | No late complications |
| Lin et al. (1996) | 1 | Healthy newborn | No late complications |
| Claahsen et al. (1998) | 1 | Healthy newborn | No late complications |
| Reynoso and Huerta (1994) | 1 | Fetal death | After exposure to high dose Idarubicin & Cytosine Arabinose |
| Achtari and Hohlfeld (2000) | 1 | Healthy newborn | No late complications |
| Siu et al. (2002) | 1 | Healthy newborn | No late complications |
| Reynoso et al. (1987) | 6 | Healthy newborns | 1 with thyroid cancer at age 11 and neuroblastoma at age 14, but alive and healthy |
| Aviles and Neri (2001) | 84 | Healthy newborns | No late complications |

G-CSF lökomojenite

Table III G-CSF administration and leukemogenity risk.

| Study | Donors (pregnant women) who received G-CSF | Leukemogenity |
|--------------------------------|--|-------------------------------|
| Cavallaro <i>et al.</i> (2000) | 101 | No evidence of increased risk |
| Anderlini <i>et al.</i> (2002) | 281 (PBSC) | No evidence of increased risk |
| Pulsipher <i>et al.</i> (2009) | 2408 | No evidence of increased risk |
| Halter <i>et al.</i> (2009) | 27 770 (BM harvest) | No evidence of increased risk |
| Halter <i>et al.</i> (2009) | 23 254 (PBSC) | No evidence of increased risk |

PBSC, peripheral blood stem cells; BM, bone marrow.

Sağlıklı Vericilerde Lenograstim - Filgrastim

- N=101 sağlıklı verici (1995-2004)
- n=55 Filgrastim, doz ortalanca
- n=46 Lenograstim, doz ortalanca

| | Filgrastim (n=55) | Lenograstim (n=46) | p |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|---------|
| Ortanca G-CSF dozu (ug(kg) | 9,5±1,7 (5-12,8) | 9.2±1,6 (6,2-14) | AD |
| G-CSF MIU/kg | 0,95±0.17 | 1,19±0.22 | <0,0001 |
| CD34+ hücre/ul | | | |
| 4.Gün | 46,0 ± 33,4 | 39,8 ± 22,1 | AD |
| 5.gün | 57,8 ± 36,4 | 48,3 ± 26,5 | AD |

Sağlıklı donörde Lenograstim - Filgrastim; Yan Etki

| | Lenograstim (%) | Filgrastim (%) | p |
|---------------------|--------------------|-------------------|----|
| Kemik ağrısı | | | |
| Yok | 34,8 | 38,2 | |
| Hafif | 37,0 | 18,2 | |
| Orta | 26,1 | 36,4 | |
| Şiddetli | 2,2 | 7,3 | AD |
| Baş ağrısı | 17,4 | 18,2 | AD |
| Splenomegali | 4,3 | 5,5 | AD |
| Ateş | | | |
| Yok | 95,7 | 94,5 | |
| Var WHO grI | 2,2 | 5,5 | |
| Var WHO grII | 2,2 | 0 | AD |
| Bulantı | 15,2 | 9,1 | AD |
| Uykusuzluk | 15,2 | 7,3 | AD |

Martino M, et al. J Clin Apheresis, 2005; 20, 129-136

Pegfilgrastim

- Toplam 25 sağlıklı donör
- 15 akraba donör, 10 akraba dışı sağlıklı donör
- Tek doz 12 mg pegfilgrastim.
- Yetersiz mobilizasyon olan donörlerde (periferik kan CD34+ hücre 3. günde 5/ μ L veya 4. günde 20/ μ L'den az olanlar) 10 μ g/kg standart filgrastim ekleniyor.
- Aferez işlemi 5. gün için planlanıyor.
- Filgrastime benzer etkinlik ve yan etki profili

Haematologica 2005; 90:1665-1671 Kroschinsky F, et al.

G-CSF İLE HAZIRLANMIŞ KEMİK İLİĞİ KULLANIMI

G-CSF ile hazırlanmış kemik iliği

Hipotez: G-CSF ile hazırlanmış kemik iliği uygulaması G-CSF ile elde edilen periferik kan kök hücre uygulamasına göre;

- Daha hızlı engrafman sağlayabilir,
- GVHD riskini arttırmayacağı düşünülmüştür.

G-CSF uygulama süresi genelde 3-5 gün

G-CSF dozu 5-10 µg/kg

G-CSF ile hazırlanmış kemik iliği

- G-CSF ile mobilize edilen periferik kan kök hücre (G-PBSC) ile G-CSF ile uyarılmış kemik iliği (G-BM) karşılaştırıldığında;
- Engrafman süreleri birbirine yakın bulundu.
- G-BM ile Akut GVHD şiddetinde azalma ve
- Daha az oranda kronik GVHD gözlemlendi.

Morton J, et al. Blood. 2001;98:3186-3191)

G-CSF ile hazırlanmış kemik iliği

- G-CSF ile uyarılmış kemik iliği (G-BM) ile yapılan transplantasyonda, kemik iliği ile yapılan transplantasyona (SS-BM) göre nötrofil ve platelet engrafmanı daha hızlı olmuştur ($P < 0.05$).
- Derece III–IV akut GVHD ve yaygın kronik GVHD, G-BM grubunda SS-BM grubuna göre anlamlı oranda düşük gözlemlendi ($P < 0.05$).
- Kronik GVHD oranı G-BM ve SS-BM grubunda benzer olup G-PBSC ile kıyaslandığında ikisi de düşük bulundu ($P < 0.05$).

Yuhang Li, et al. Chinese Medical Journal, 2015;128:20-24.

G-CSF ile uyarılmış kemik iliği

- G-BM ve G-PBSC gruplarında kendi aralarında benzer sağkalım, lösemisiz sağkalım gösterirken SS-BM grubuna göre yüksek sağkalıma sahiptiler.
- Tansplant ilişkili mortalite de G-BM ve G-PBSC gruplarında kendi aralarında benzer iken SS-BM grubunda daha yüksek orandaydı.
- Lösemi nüks oranı yönünden 3 grup arasında fark bulunamadı.

Yuhang Li, et al. Chinese Medical Journal, 2015;128:20-24.

Otolog Kök Hücre Nakli Sonrası G-CSF Kullanımı

NÖTROFİL ENGRAFMANINA ETKİ

- 100'den fazla hasta içeren çok sayıda randomize kontrollü çalışmada G-CSF kullanımının erken nötrofil engrafmanına faydalı etkisi olduğu görülmüştür (seviye 1A)
- Çalışmaların çoğunda mutlak nötrofil sayısının (MNS) $>500/\mu\text{l}$ olduğu gün +9 ile +11.günler arasındır.
- G-CSF kullanılan gruplarda kullanılmayan gruplara göre nötrofil engrafmanı 2 ile 9.5 gün daha önce gerçekleşmiştir.

NÖTROFİL ENGRAFMANINA ETKİ

- G-CSF uygulamasının nötrofil engrafmanı üzerine etkisi infüze edilen CD34+ hücre sayısından bağımsız bulunmuştur.

(Daha önceki çalışmalarda verilen yüksek CD34+ hücre sayısı daha erken nötrofil engrafmanı ile ilişkili bulunmuştur.)

Trombosit Engrafmanına Etki?

- **Hipotez:** Myeloid prekürsörler nötrofil yapımına yönlendiği için megakaryosit gelişimi gecikebilir.
- Çalışmaların çoğunda G-CSF uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında platelet engrafman (plts >20 000/ μ l) süresi açısından fark görülmemiştir.

Trombosit Engrafmanına Etki?

- 100'ün üzerinde hasta içeren randomize kontrollü 9 çalışmanın sekizinde platelet engrafman süresi açısından fark bulunamamıştır (Kanıt düzeyi 1B).
- Sadece bir plasebo kontrollü randomize çalışmada platelet engrafman süresinde artış gözlenmiştir. (Faber E, et al. Eur J Haematol 2006; 77: 493–500.)

Eritrosit ve Trombosit Transfüzyon İhtiyacı

- Eritrosit ve trombosit transfüzyon ihtiyaçları yönünden karşılaştırıldığında G-CSF ve kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir.



Nötropenik Ateş

- 100'den fazla hasta içeren randomize kontrollü çalışmaların tamamında nötropenik ateş gözlenen gün sayısı açısından G-CSF uygulanan ve uygulanmayan grup arasında fark gözlenmemiştir.

(Kanıt düzeyi 1A)

Profilaktik antibiyotik kullanımı

- Profilaktik i.v. antibiyotik kullanımı açısından çalışmaların çoğunluğunda G-CSF uygulanan ve uygulanmayan grup arasında fark gözlenmemiştir.

Profilaktik olmayan antibiyotik kullanımı

- İki randomize kontrollü olmak üzere 4 bağımsız çalışmada G-CSF kullanılmayan hastalarda G-CSF kullanılan hastalara göre profilaktik dışı i.v. antibiyotik kullanılan gün sayısı daha fazla bulunmuştur.
- 100'den fazla hasta içeren randomize kontrollü çalışmalardan 6'sında profilaktik dışı i.v. antibiyotik kullanılan gün sayısı yönünden iki grup arasında fark yokken iki çalışmada G-CSF kullanan hastalarda i.v antibiyotik kullanım süresi daha kısa bulunmuştur.

Hastanede Kalış Süresi

- Çalışmaların yaklaşık yarısında G-CSF kullanılan hastalarda kullanılmayanlara göre hastanede kalış süresi kısa bulunurken diğer yarısında iki grup arasında yatış süresi açısından fark gözlenmemiştir.

Hastanede Kalış Süresi

- Sadece randomize kontrollü çalışmalar dikkate alındığında 100'den fazla hasta içeren çalışmalarda G-CSF kullanılan hastalarda hastanede kalış süresi daha kısa bulunurken
- 100'den az hasta içeren çalışmalarda iki grup arasında fark gözlenmemiştir.

Sonuç: Kanıt düzeyi 1B olmak üzere G-CSF kullanılanlarda hastanede kalış süresi kısalmaktadır.

Hastane Maliyeti

- Çalışmaların büyük çoğunluğunda G-CSF kullanılan hastalarda, G-CSF kullanılmayan hastalara göre;
- Hastanede kalış süresi daha kısa
- Genel hastane maliyeti daha düşük bulunmuştur.

G-CSF'nin erken (0 ile +4) ve geç ($\geq +5$) başlanmasının farkı var mı?

- Nötrofil engrafmanı açısından çalışmaların çoğunluğunda fark bulunamamıştır.
(Kanıt düzeyi 1B).
- Trombosit engrafmanı açısından (plt >20 000/ μ l) randomize kontrollü çalışmaların tamamında fark bulunamamıştır (10-14. günler arası)
(Kanıt düzeyi 1A)

G-CSF'nin erken (0 ile +4) ve geç ($\geq +5$) başlanmasının farkı var mı?

- Eritrosit ve trombosit transfüzyon ihtiyacı açısından iki grup arasında fark yok.
- Nötropenik ateş gözlenen gün sayısı açısından tüm çalışmalarda iki grup arasında fark yok (Kanıt düzeyi 1A).
- Randomize kontrollü çalışmaların çoğunluğunda profilaksi dışı i.v. antibiyotik kullanılan gün sayısı açısından fark bulunamamıştır (Kanıt düzeyi 1B).
- Randomize kontrollü çalışmaların çoğunluğunda hastanede kalış süreleri açısından fark bulunamamıştır (Kanıt düzeyi 1B).

Pegile filgrastim ve filgrastim

- Filgrastim plazma yarı ömrü:
3-4 saat
- Pegile filgrastim plazma yarı ömrü
~ 33 saat

Filgrastim ve pegile filgrastim

- 4 non-randomize çalışmada etkinlik ve güvenilirlik yönünden filgrastim ile pegfilgrastim karşılaştırılmıştır.
- 4 çalışmanın tamamında nötrofil ve platelet engraftmanı, transplant sonrası hastanede kalma süresi açısından iki grup arasında fark gözlenmemiştir.

Ballestrero A, et al. Ann Hematol 2008; 87: 49–55.

Jagasia MH, et al. Bone Marrow Transplant 2005; 35: 1165–1169.

Staber PB, et al. Bone Marrow Transplant 2005; 35: 889–893.

Vanstraelen G, et al. Exp Hematol 2006; 34: 382–388.

Filgrastim ve pegile filgrastim

- Çalışmaların üçünde nötropenik ateş açısından karşılaştırma yapılmış olup 2 çalışmada gruplar arasında fark yokken bir çalışmada pegfilgrastim alan hasta grubunda nötropenik ateş süresi filgrastim grubuna göre belirgin olarak kısa bulunmuştur (1.6 güne karşı 3 gün).
- Bu çalışmada nötropeni süresi açısından da 1 günlük fark gözlenmiştir (8.3'e karşı 9.5 gün).
- Diğer taraftan profilaktik olmayan i.v. antibiyotik kullanımı ve hastanede kalma süreleri açısından iki grup arasında fark gözlenmemiştir.

Otolog Nakil Özet

- Otolog nakil sonrası G-CSF kullanımı ile;
- Hızlı nötrofil engrafmanı (level 1A)
- Hastanede yatış süresinde kısalma (level 1B)
- Plt engrafmanında değişme yok (level 1B)
- Febril nötropenik gün sayısında değişme yok (level 1A).
- G-CSF'nin etkinliği infüze edilen CD34+ hücre dozundan bağımsızdır.

Otolog Nakil Özet

- G-CSF'yi 5. gün veya sonrasında uygulama ile ilk 4 gün uygulama sonuçlar açısından eşit etkinliğe yol açıyor.
- Bu nedenle hastanın maruziyetini azaltmak ve maliyet açısından 5. gün veya daha sonra uygulama öneriliyor.
- Pegile filgrastim filgrastimle karşılaştırılabilir etkinlik ve yan etki profiline sahip görünmekle birlikte kesin karar verebilmek için randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

G-CSF preparatlar, dozlar

- Filgrastim 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ i.v.
- Lenograstim 150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
- Lenograstim 263 $\mu\text{g}/\text{gün}$
- 300 $\mu\text{g} / \text{gün}$ i.v.
- 480 $\mu\text{g} / \text{gün}$ i.v.
- Peg 6mg SC +5. gün ve filgrastim 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ +7
- Peg 6mg SC +1. gün ve filgrastim 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ +1 veya +4

Allojenik Kök Hücre Nakli Sonrası G-CSF Kullanımı

Allojenik Nakil Sonrası Kullanım

- Yapılan çalışmaların çoğunda filgrastim i.v. veya s.c. yolla 5 ile 10 $\mu\text{g/kg/gün}$ dozlarında kullanılmıştır.
- Periferik kan kök hücre nakli çalışmalarının çoğunda nötrofil engrafmanı ortalama +11 ile +16. günler arasında olmaktadır. G-CSF kullanımı ile bu süre 1-4 gün arasında kısalmaktadır.
- Randomize kontrollü ve 100'den fazla hasta içeren çalışmalarda G-CSF kullanımının nötrofil engrafmanını hızlandırdığı görülmüştür (Kanıt düzeyi 1B).

Allojenik nakil sonrası G-CSF

- Platelet engrafman süresi yönünden fark yok. (Kanıt düzeyi: 1B).
- PBSCT çalışmalarının çoğunluğunda G-CSF kullanımı ile nötropenik ateşli geçen gün sayısı açısından fark ortaya çıkmamıştır.
- Enfeksiyon gelişme sayısı, profilaktik olmayan antibiyotik kullanımı, eritrosit ve platelet infüzyon kullanımı açısından G-CSF kullanan ve kullanmayan hastalar arasında fark gözlenmemiştir.

Hastanede Kalış Süresi

- Çalışmaların büyük bölümünde (randomize kontrollü 100'ün üzerinde hasta içeren 2 çalışma da bunun içindedir) G-CSF kullanımının hastanede kalış süresini değiştirmedeği görülmüştür (Kanıt düzeyi 1B).

GVHD sıklığı

- Allojenik nakil sonrası hastaya G-CSF uygulaması için ana kaygı konusu GVHD sıklığında ve şiddetinde artma riskidir.
- Bununla birlikte özellikle periferik kök hücre ile yapılan nakiller sonrası G-CSF uygulamasının GVHD riskini arttırmadığı görülmüştür (Kanıt düzeyi 1B).

GVHD sıklığı

- Diğer taraftan kemik iliği kullanılarak yapılan allojenik nakillerde posttransplant G-CSF kullanımının incelendiği 2 retrospektif çalışmada G-CSF kullanımının akut GVHD sıklığında belirgin artışa yol açtığı görülmüştür.
- Bu çalışmalardan birinde periferik kök hücre kullanılan hastalarda ise fark gözlenmemiştir.
- Transplant ilişkili ve genel mortalite açısından ise çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (negatif veya etkisiz).

Ringden O, et al. J Clin Oncol 2004; 22: 416–423.

Remberger M, et al. Bone Marrow Transplant 2003; 32: 217–223.

TİM, Hastalıksız ve Toplam Sağkalım

- PKHN transplant ilişkili mortalite, hastalıksız sağkalım, toplam sağkalım yönünden G-CSF kullanan ve kullanmayan hastalar arasında fark bulunamamıştır (Kanıt düzeyi 1B)
- Allojenik kemik iliği nakli hastalarında da benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Allo-KHN sonrası G-CSF kullanımı: Özet

- Periferik kök hücre nakli yapılan hastalarda GVHD ve sağkalım yönünden fark olmaması nedeniyle bu hastalarda,
- Hızlı nötrofil engrafmanı elde etmek amacıyla uygulanabilir. Fakat elde edilen erken engrafmanın hastalarda infeksiyöz komplikasyonlar ve hastanede kalış süresi açısından bir düzelmeye yol açmadığı bilinmektedir.

TEŞEKKÜRLER

