

Strokovni prispevek/Professional article

NAPOVEDNA VREDNOST ŠTEVILA CELIC CD34+ V KRVI BOLNIKA/DAROVALCA PRED ZBIRANJEM KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC Z LEVKAFEREZAMI

PREDICTIVE VALUE OF CD34+ CELLS IN BLOOD OF PATIENT/DONOR BEFORE HEMATOPOIETIC STEM CELLS COLLECTION BY LEUKAPHERESIS

Dragoslav Domanovič

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-16; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 63-7

Ključne besede: celice CD34+; napovedna vrednost; bolnik/darovalca; krvotvorne matične celice; levkafereza

Izvleček – Izhodišča. V raziskavi smo poskusili določiti napovedno vrednost celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca za oceno uspešnosti zbiranja krvotvornih matičnih celic (KMC). Ta ocena je pomembna za določitev optimalnega časa pričetka zbiranja z levkaferezo.

Metode. V retrospektivni raziskavi smo s statističnimi metodami analizirali 74 zbiranj KMC s celičnim ločevalcem Amicus pri 39 bolnikih in 15 zdravih darovalcih. Število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem smo primerjali z njihovim številom v zbranem pripravku z namenom ugotoviti njihovo napovedno vrednost za doseganje ciljnega števila v pripravku $> 2 \times 10^6$ celic CD34+/kg telesne mase prejemnika.

Rezultati. Izsledki so potrdili uspešnost mobilizacijskih protokolov in učinkovitost postopkov zbiranja KMC. Visok koeficient korelacije ($r = 0,82$) med številom celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem in njihovim številom/kg telesne mase prejemnika v pripravku je bil statistično značilen ($p < 0,05$). Z ROC (receiver operating characteristics) analizo smo določili mejno vrednost $42 \times 10^6/l$ celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred postopkom kot tisto, ki je imela pozitivno napovedno vrednost 87% oziroma negativno napovedno vrednost 91,6%.

Zaključki. Analiza je pokazala, da ima število celic CD34+ v krvi pred zbiranjem zelo visoko napovedno vrednost in se lahko uporablja za določanje optimalnega časa pričetka zbiranja KMC z levkaferezami.

Uvod

V zadnjih letih se povečuje število avtolognih in alogeničnih presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC), pridobljenih iz venske krvi, ki so skoraj popolnoma nadomestile odvzem KMC iz kostnega mozga. Presaditev KMC iz venske krvi ima v pri-

Key words: CD34+ cells; predictive value; patient/donor; hematopoietic cells; leukapheresis

Abstract – Background. In the study we tried to define a predictive value of the circulating CD34+ cells in patients/donors blood for estimation of the hematopoietic stem cells (HSC) collection efficacy determine the optimal time to initiate the collection by leukapheresis procedure.

Methods. We retrospectively analyzed 75 collections of HSC using the Amicus cell separator in 39 patients and 15 donors. Circulating CD34+ cell counts in patients/donors were compared to the achieved CD34+ cell yields to determine its predictive value for the collection of a targeted yield of $> 2 \times 10^6$ CD34+ cells/kg body weight of patient.

Results. The results of cell counts confirmed that mobilization regimens were successful and HSC collections efficient. High correlation coefficient ($r = 0.82$) between the number of circulating CD34+ cells before collection and CD34+ cell yield/kg of patient's body weight was statistically significant ($p < 0.05$). With ROC analysis we determined the cut-off value $42 \times 10^6/l$ CD34+ cell counts in the blood of patients/donors before collection that had a positive predictive value 87% and a negative predictive value 91.6%.

Conclusions. Analysis showed that the number of circulating CD34+ cells before the procedure express a very high predictive value and can be used for determining the optimal time to initiate collection of HSC by leukapheresis.

merjavi s presajanjem kostnega mozga več prednosti, kot so hitrejša prijetje presadka in zgodnejši pričetek tvorbe levkocitov in trombocitov po presaditvi, zmanjšanje potrebnega nadomestnega zdravljenja s pripravki trombocitov in eritrocitov ter boljše preživetje bolnikov (1).

KMC se nahajajo v krvi v zelo majhnem številu. Lahko jih osamimo s celičnimi ločevalci, tako da z levkaferenznimi postopki ločujemo mononuklearne celice (MNC) od večine ostalih sestavin venske krvi. Število KMC ocenjujemo fenotipsko, na podlagi števila celic CD34+ oziroma na podlagi njihovega proliferativnega potenciala z določanjem števila granulocitno-makrofagnih kolonij, ki zrastejo na gojišču (CFU-GM) (2). Pred zbiranjem je potrebno število KMC v krvi povečati z dajanjem citostatikov ali krvotvornih rastnih dejavnikov (CSF) oziroma z dajanjem obeh skupaj (3). S tem zvečamo njihovo število v krvi na raven, ko jih lahko učinkovito zbiramo.

Molekularni in biološki mehanizmi mobilizacije KMC niso povsem pojasnjeni, zato mobilizacijski protokoli temeljijo le na izkustvenih ugotovitvah.

Raziskave so pokazale, da sta začetek delovanja presadka in stabilnost presaditve odvisna od števila presajenih KMC. Priporočajo, naj odmerek presajenih MNC vsebuje od $1,0 \times 10^6$ do $5,0 \times 10^6$ celic CD34+ /kg telesne mase prejemnika oziroma od $1,0 \times 10^5$ do $5,0 \times 10^5$ CFU-GM/kg telesne mase prejemnika (4). Značilno hitrejše ukoreninjenje presadka pa so zabeležili po presaditvi več kot 15×10^6 celic CD34+/kg telesne mase prejemnika (5). Zaradi tega so mobilizacijski protokoli in levkaferenzni postopki naravnani na zbiranje čim večjega števila celic CD34+, pri čemer se MNC zbirajo iz več kot 3-kratne krvne prostornine oziroma iz več kot 15 litrov krvi bolnika/darovalca s t. i. levkaferenzami velike krvne prostornine (LVV).

Število zbranih celic CD34+ je sorazmerno njihovi koncentraciji v krvi bolnika/darovalca pred levkaferozo (6). Na podlagi števila celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca in uporabljenega postopka zbiranja lahko napovemo, koliko celic CD34+ bomo zbrali, kar je pomembno predvsem za določanje optimalnega časa pričetka zbiranja. Pri tem je naš cilj zbrati čim večje število celic CD34+ s čim manjšim številom levkaferenznih postopkov. To je bolj ugodno za bolnika/darovalca in bolj ekonomično. Za napoved števila zbranih celic CD34+ so izdelali številne matematične enačbe in algoritme, ki poleg števila celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca upoštevajo še dodatne dejavnike, kot so prostornina predelane krvi, hitrost krvnega pretoka v celičnem ločevalcu, trajanje zbiranja, učinkovitost uporabljenega ločevalca, spol, starost ter telesna masa in višina bolnika/darovalca (7, 8).

Material in metode dela

Zasnova raziskave

V retrospektivni raziskavi smo iz izsledkov zbiranja KMC s celičnim ločevalcem Amicus določali napovedno vrednost števila celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred pričetkom zbiranja glede na doseganje cilja $> 2 \times 10^6$ celic CD34+/kg telesne mase prejemnika. V ta namen smo uporabili statistične postopke.

Bolniki in darovalci

V raziskavi smo analizirali 54 primerov zbiranja KMC pri 39 bolnikih in 15 zdravih darovalcih v obdobju od januarja 2002 do julija 2003. Za zagotovljenje ciljnega števila $> 2 \times 10^6$ celic CD34+ na kg telesne mase prejemnika smo opravili 74 levkaferoz.

Pri večini bolnikov z malignimi boleznimi krvotvornega tkiva smo KMC mobilizirali z dajanjem citostatikov in ravnega dejavnika G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor). Manjši skupini bolnikov in tudi vsem zdravih darovalcem smo dajali le G-CSF. V obeh skupinah smo dajali odmerek $10 \mu\text{g/kg}$ telesne mase G-CSF subkutano, razdeljeno v dva dnevna odmerka.

Zbiranje KMC s celičnim ločevalcem

KMC smo zbirali z levkaferenzami standardne prostornine (LSV) (predelava dveh krvnih prostornin) s celičnim ločevalcem Amicus (Baxter Healthcare, IL, ZDA). Način zbiranja z ločevalcem Amicus je zasnovan na ločevanju v eni komori in cikličnem prečrpavanju ločenih enojedrnih celic v plastično vrečko zunaj centrifuge. Parametre ločevanja smo nastavili po navodilih proizvajalca. Za preprečevanje strjevanja krvi v stroju smo uporabili raztopino antikoagulant ACD v razmerju s krvjo 1 : 12. Ločevalni sistem je na začetku napolnjen s fiziološko raztopino in raztopino ACD. Pri vsakem zbiranju smo predelali dvakratno krvno prostornino bolnika/darovalca, ki smo ga izračunali iz standardne enačbe (9). Prostornino predelane krvi v enem ciklusu smo določili po navodilih proizvajalca na podlagi števila levkocitov v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem (1000 ml/ciklus pri številu levkocitov $> 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ v krvi darovalcev in $> 35 \times 10^3/\mu\text{l}$ v krvi bolnikov; oziroma $1400\text{--}1600 \text{ ml/ciklus}$ pri številu levkocitov $< 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ v krvi darovalcev in $< 35 \times 10^3/\mu\text{l}$ v krvi bolnikov). Število ciklusov je bilo odvisno od določene dvakratne krvne prostornine bolnika/darovalca. Ciljno število zbranih celic je bilo $> 2 \times 10^6$ celic CD 34+/kg telesne mase prejemnika.

Laboratorijske analize

Število levkocitov, MNC in diferencialno krvno sliko (DKS) smo določali z elektronskim števcem CellDyne 3200 (Abbott Laboratories, IL, ZDA) v svežih vzorcih krvi bolnika/darovalca oziroma v zbranih pripravkih MNC. Število celic CD34+ smo določali s pretočnim citometrom Coulter Epics XL-MCL (Beckman-Coulter/Immunotech, FL, ZDA) z dvojnimi protitelesi anti-CD34 in anti-CD45 po mednarodnem protokolu v laboratoriju Hematološke klinike (10).

Iz števila MNC in celic CD34+ pred postopki in po njih ter iz prostornine predelane krvi smo izračunali učinkovitost zbiranja MNC in celic CD34+ z napravo Amicus po naslednji enačbi: učinkovitost zbiranja (%) = (pridobitek celic/ skupno število predelanih celic) $\times 100$; skupno število predelanih celic = [(število celic pred zbiranjem + število celic po zbiranju)/2] \times (prostornina predelane krvi - prostornina uporabljenega antikoagulant) (11).

Statistični postopki

Za določanje napovedne vrednosti števila celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred postopkom zbiranja smo uporabili statistične postopke. Koeficient korelacije po Pearsonu smo uporabili za določanje povezanosti med številom zbranih celic CD34+ in številom celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem. Z linearno multiplo regresijo ($y = 0,082 * x_1 + 0,029 * x_2 - 6$; y = število celic CD34+ $\times 10^6/\text{kg}$ telesne mase; x_1 = število celic pred postopkom in v krvnem pripravku; x_2 = volumen predelane krvi v ml/kg telesne mase) (12) smo izračunali predvideno število zbranih celic. Predvideno število smo primerjali s številom zbranih celic (test Mann Whitney U za dva neodvisna vzorca). S tem smo preverili, ali z našimi postopki zberemo število celic CD34+, ki ustreza statistično napovedanemu številu. Za določanje mejne vrednosti števila celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred posegom, ki ima največjo napovedno vrednost za zbiranje predvidenega števila celic smo uporabili analizo ROC («receiver operating characteristic»).

Rezultati

Demografski podatki so prikazani v razpredelnici 1, iz katere je razvidno, da je bilo v raziskavo vključenih 39 bolnikov (72%) in 15 (28%) zdravih darovalcev v približno enakem razmerju spolov (29 žensk in 25 moških). Za zbiranje ciljnega števila celic CD34+ je bilo potrebno 1,37 levkaferoznega postopka.

Razpr. 1. Demografski podatki.

Table 1. Demographic data.

	Bolniki Patients	Darovalci Donors	Skupaj Total
Število primerov / Number of cases	39	15	54
Ženske / Female	19	10	29
Moški / Male	20	5	25
Število zbiranj / Number of collections	53	21	74
Povprečno število zbiranj po primeru / Mean number of collections per case	1,35	1,4	1,37

Podatki števila celic v krvi in v pripravku (Razpr. 2) so izraženi kot srednje vrednosti. Ker so podatki porazdeljeni nesimetrično, smo za merilo srednje vrednosti izbrali mediano. Mediana števila levkocitov v krvi bolnikov/darovalcev je bila $24,3 \times 10^9/l$ ($3,36 \times 10^9/l - 279,5 \times 10^9/l$) in je bila približno enaka pri bolnikih ter značilno večja ($p < 0,05$) pri zdravih darovalcih. Mediana skupnega števila polimorfonuklearnih celic (PMN) je znašala $21,3 \times 10^9/l$ ($3,87 \times 10^9/l - 257,5 \times 10^9/l$), števila MNC $3,19 \times 10^9/l$ ($0,988 \times 10^9/l - 11 \times 10^9/l$) in števila celic CD34+ $48,06 \times 10^6/l$ ($0,681 \times 10^6/l - 257,6 \times 10^6/l$). Med bolniki in darovalci je bila statistično značilna razlika glede števila celic posameznih celičnih vrst. V pripravkih bolnikov/darovalcev je bila mediana števila levkocitov $206 \times 10^9/l$ ($92 \times 10^9/l - 320 \times 10^9/l$), števila PMN $64 \times 10^9/l$ ($3 \times 10^9/l - 161 \times 10^9/l$), MNC $146 \times 10^9/l$ ($52 \times 10^9/l - 353 \times 10^9/l$) in celic CD34+ $1135 \times 10^6/l$ ($92 \times 10^6/l - 8138 \times 10^6/l$). Število zbranih levkocitov v pripravku je bilo pri bolnikih in darovalcih enako. Več MNC in celic CD34+ smo zbrali pri darovalcih kot pri bolnikih, pri katerih je bilo več PMN v pripravkih.

Mediana števila celic CD34+/kg telesne mase prejemnika v pripravku je bila $2,12 \times 10^6$ ($0,17 \times 10^6 - 13,57 \times 10^6$) in se ni razlikovala od mediane z multiplo regresijo izračunanih vrednosti, ki je znašala $1,917 \times 10^6$ ($0,202 \times 10^6 - 18,197 \times 10^6$) celic CD34+/kg telesne mase prejemnika.

Učinkovitost zbiranja celic je prikazana na sliki 1. Z napravo Amicus je bila mediana učinkovitost zbiranja MNC 61,04% (25–99,3%) in celic CD34+ 54,55% (38,64–89,9%). Pri darovalcih je bila učinkovitost manjša kot pri bolnikih. Tudi prostornina predelane krvi je bila pri darovalcih manjša.

Korelacija

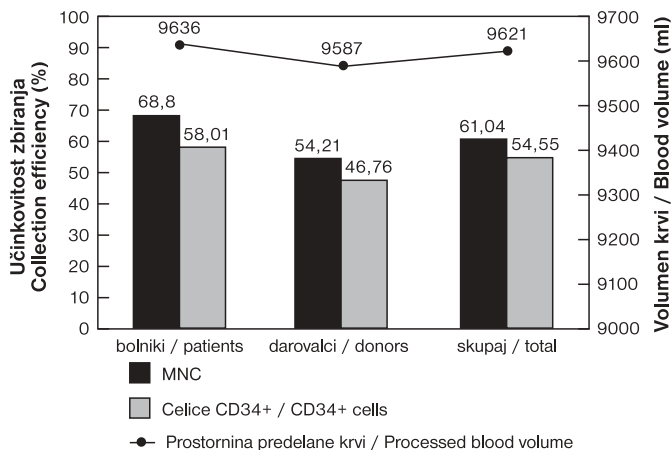
Primerjava podatkov je pokazala visoko stopnjo statistično značilne povezave (Pearsonov koeficient korelacije $r = 0,821$, $p < 0,05$) med številom celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem in številom zbranih celic CD34+ /kg telesne mase prejemnika (Sl. 2). Iz diagrama je razvidno, da smo v

Razpr. 2. Število celic v krvi pred zbiranjem in v zbranih pripravkih.

Table 2. Blood cell counts before collection and in the collected products.

Število celic v krvi pred zbiranjem* Number of cells before collection	Bolniki	Darovalci	Skupaj
	patients	Donors	Total
Levkociti / Leukocytes $\times 10^9/l$	20,56(6,36–279,5)	47,1(6,81–85,9)	24,3(3,36–279,5)
PMN $\times 10^9/l$	17,28(3,87–257,5)	38,3(4,58–84,58)	21,3(3,87–257,5)
MNC $\times 10^9/l$	2,7(0,988–11)	6,91(2,01–10,4)	3,19(0,988–11)
CD34+ $\times 10^6/l$	39,6(7,86–235,2)	73,44(0,681–257,6)	48,06(0,681–257,6)
Število celic v pripravku Number of cells in the collected products			
Volumen / Volume (ml)	113(92–216)	187(120–320)	117(92–320)
Levkociti / Leukocytes $\times 10^9/l$	208(106–416)	202(92–294)	206(92–416)
PMN $\times 10^9/l$	78(14–161)	35(3–73)	64(3–161)
MNC $\times 10^9/l$	135(52–246)	167(90–253)	146(52–353)
CD34+ $\times 10^6/l$	1026(118–3138)	1478(92–3265)	1135(92–8183)
CD34+ $\times 10^6/kg$			
Telesne mase / Body weight	1,78(0,17–13,53)	3,44(0,226–7,229)	2,12(0,17–13,53)

* Podatki o številu celic so prikazani kot mediana s spodnjo in zgornjo mejo medianinega razreda.
Cell number data are shown as median values with the range.



Sl. 1. Učinkovitost zbiranja MNC in celic CD34+ ter volumen predelane krvi pri zbiranju KMC s celičnim ločevalcem Amicus.

Figure 1. The efficiency of MNC and CD34+ cells collection and the volume of processed blood during hematopoietic stem cell collection using Amicus cell separator.

primeru, ko je bilo število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem $< 40 \times 10^6/l$ (navpična črtkana črta) le v dveh primerih zbrali ciljno število $> 2 \times 10^6$ celic CD34+/kg telesne mase prejemnika (vodoravna črtkana črta), v ostalih primerih je bilo to število manjše od ciljnega. Ko je bilo število celic CD34+ v krvi bolnika darovalca pred zbiranjem $> 40 \times 10^6/l$, ciljnega števila nismo dosegli v 6 primerih. V ostalih primerih se je število zbranih celic CD34+ /kg telesne mase prejemnika povečevalo sorazmerno s povečanjem njihovega števila v krvi bolnika/darovalca pred postopkom.

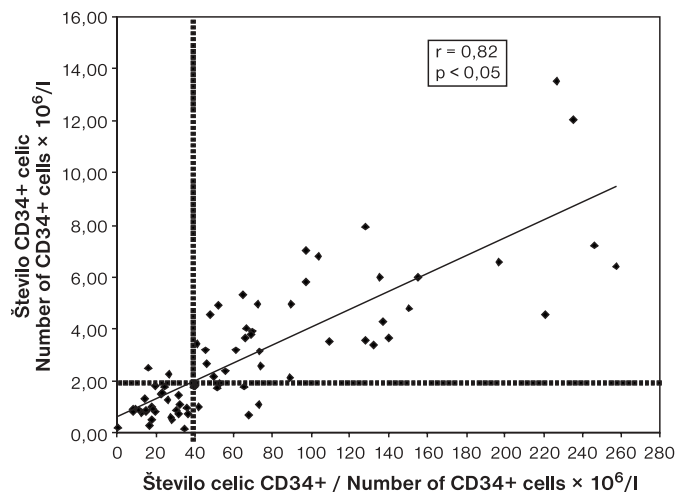
Napovedna vrednost

Število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem smo evalvirali kot kazalec za oceno verjetnosti zbiranja $> 2 \times 10^6$ celic CD34+ /kg telesne mase prejemnika z levkafereznim postopkom. Za določitev mejne vrednosti celic CD34+ smo uporabili ROC krivuljo, ki predstavlja diagram specifičnosti in občutljivosti kot funkcije mejne vrednosti. Ko se število celic CD34+ spreminja od najmanjše do največje vrednosti, se diagram premika od zgornjega desnega kota proti spodnjemu levemu in oblikuje krivuljo. Mejna vrednost je tista, katere diagram je najbližje zgornjemu levemu kotu.

V našem primeru je to vrednost $42 \times 10^6/l$ (Sl. 3). V tej točki je za doseganje ciljnega števila celic CD34+ na kg telesne mase ($> 2 \times 10^6$) specifičnost 86,5% in občutljivost 92,1%. Pri takšni specifičnosti in občutljivosti ter incidenci 50% je bila pozitivna napovedna vrednost 87,216% in negativna napovedna vrednost 91,631%.

Razpravljanje

Optimizacija mobilizacije in zbiranja KMC iz krvi je izjemno pomembna za zagotavljanje zadostnega števila celic, kar omogoča hitro in učinkovito delovanje presadka. Optimalen čas za pričetek zbiranja je izredno težko napovedati ali določiti. V ta namen so uporabili številne parametre, med njimi je najpogo-



Sl. 2. Povezava med številom celic CD34+ v krvi bolnikov/darovalcev in zbranim številom celic CD34+/kg telesne mase prejemnika.

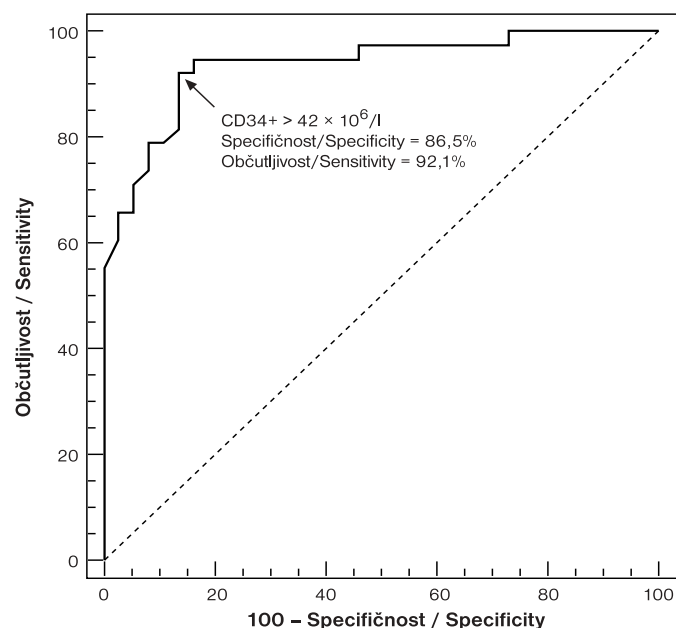
Figure 2. The relationship between the number of CD34+ cells in the blood of patients/donors and the number of collected CD34+ cells/kg of the recipient's body weight.

stejšje v praktični uporabi število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred pričetkom postopka (14).

V nalogi smo hoteli ugotoviti, ali je število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem dovolj dober kazalec za napoved števila celic CD34+, zbranih z levkaferezami, pri čemer je bilo ciljno število $> 2 \times 10^6$ celic CD34+/kg telesne mase prejemnika. Analiza števila celic v krvi bolnikov/darovalcev pred pričetkom zbiranja je potrdila učinkovitost mobilizacijskega postopka, saj je bila dosežena srednja vrednost števila celic CD34+ primerljiva s podatki drugih avtorjev (15). Učinkovitost zbiranja s celičnim ločevalcem je bila v skladu tako s podatki proizvajalca kot tudi z izsledki drugih raziskav (16). Tudi primerjava dejanskega števila zbranih celic CD34+ z njihovim izračunanim številom v pripravku ni pokazala statistično značilne razlike ($p = 0,111$). Zato lahko potrdimo, da značilnosti mobilizacijskega postopka in učinkovitost zbiranja niso vplivali na izsledke raziskave. Pri tem je treba poudariti, da ugotovitve veljajo za zbiranje KMC z LSV in so izsledki učinkovitosti zbiranja večji pri uporabi LVV.

V raziskavi smo potrdili visoko stopnjo povezave med številom CD34+ celic v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem in njihovim pridobitkom na kg telesne mase prejemnika ($r = 0,82$), ki je bila tudi statistično značilna ($p < 0,05$). Dobljena vrednost koeficienta korelacije je v skladu s podatki, ki so navedeni v literaturi, kjer se le-ti gibljejo med $r = 0,8$ in $r = 0,9$ (17). Razlogi, zakaj koeficient korelacije ni večji, so v tem, da je bil v preiskovani populaciji veliki delež bolnikov (72%), pri katerih so pri zbiranju pogostejši zapleti s prekinitvami (nezadosten pretok krvi zaradi sprememb na venah) ali celo predčasnim zaključkom postopka. Pri bolnikih se pridobi manj celic CD34+ tudi zaradi zdravljenja s citostatiki pred tem (18).

Z analizo ROC je bilo določeno, da ima mejno število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca $42 \times 10^6/l$ pozitivno napovedno vrednost 87%. Kar pomeni 87% verjetnost, da bo v pripravku zbrano $> 2 \times 10^6$ celic CD34+/kg telesne mase prejemnika, če je število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca, večje kot $42 \times 10^6/l$. Negativna napovedna vrednost je bila 91,6% in označuje stopnjo verjetnosti, da v zbranem pripravku ne bo ciljnega števila celic CD34+, če je njihovo število v krvi bolnika/darovalca manjše kot $42 \times 10^6/l$.



Sl. 3. Krivulja ROC za določanje mejne in napovedne vrednosti števila celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem. Področje pod krivuljo = 0,936, interval zaupanja 95% = 0,855–0,979.

Figure 3. The ROC curve for determination of cut-off and predictive values of CD34+ cell number in the blood of patient/donor before collection. Area under the curve = 0.936, confidence interval 95% = 0.855–0.979.

Zaključki

Raziskava je potrdila statistično značilno korelacijo med številom celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca pred zbiranjem z njihovim številom v pripravku. Zato lahko število celic CD34+ v krvi bolnika/darovalca uporabimo za napoved optimalnega časa pričetka zbiranja KMC iz krvi. Statistična analiza je tudi pokazala, da mora imeti bolnik/darovelec več kot $42 \times 10^6/l$ celic CD34+ v krvi, da z visoko stopnjo verjetnosti zberemo več kot 2×10^6 celic CD34+/kg telesne mase prejemnika, kar zagotavlja uspešno presaditev.

Literatura

- Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, et al. Blood and stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 2000; 95: 3702–9.
- Wats MJ, Linch DC. Peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang* 1997; 73: 135–42.
- Gillespie TW, Hillyer CD. Peripheral blood progenitor cells for marrow reconstitution: mobilization and collection strategies. *Transfusion* 1996; 36: 611–24.
- Bender JG, To LB, Wikians S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1: 329–41.
- Ketterer N, Salles G, Raba M et al. High CD34+ cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3184–55.
- Passos-Coelho JR, Braine HG, Davis JM et al. Predictive factors for peripheral blood-progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization. *J Clin Oncol* 1995; 13: 705–14.
- Humpe A, Riggert J, Meineke I et al. A cell kinetic model of CD34+ cell mobilization and harvest: development of predictive algorithm for CD34+ cell yield in PBPC collection. *Transfusion* 2000; 40: 1363–70.
- Passos-Coelho JR, Braine HG, Davis JM et al. Predictive factors for peripheral blood-progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization. *J Clin Oncol* 1995; 13: 705–14.

9. Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 1962; 51: 224-323.
 10. Sutherland RD, Anderson L, Keeney M et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother* 1996; 5: 213-26.
 11. Rowley SD, Prather K, Bui KT et al. Collection of peripheral blood progenitor cells with an automated leukapheresis system. *Transfusion* 1999; 39: 1200-6.
 12. Witt V, Fischmeister G, Scharner D et al. Collection efficiencies of MNC subpopulations during autologous CD34+ peripheral blood progenitor cell (PBPC) harvest in small children and adolescents. *J Clin Apheresis* 2001; 16: 161-8.
 13. Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2547-55.
 14. Scots R, Van Riet I, Damiaens S et al. The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 509-15.
 15. Yu J, Leisenring W, Bensinger WI et al. The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield. *Transfusion* 1999; 39: 442-50.
 16. Snyder EL, O'Donnell L, Dengler TJ et al. Ex vivo evaluation of PBMNCs collected with a new cell separator. *Transfusion* 2001; 41: 940-1.
 17. Möhle R, Murea S, Pförsich M et al. Estimation of progenitor cell yield in a leukapheresis product by previous measurement of CD34+ cells in peripheral blood. *Vox Sanguinis* 1996; 71: 90-6.
 18. Brown RA, Adkins D, Goodnough LT et al. Factors that influence the collection and engraftment of allogeneic peripheral-blood stem cells in patients with hematologic malignancies. *J Clin Onc* 1997; 15 (9): 3067-74.
-