

## **Ağırlığı 25 kg'ın altında olan yüksek riskli nöroblastom'lu çocuklar için kök hücrelerin toplanması, dondurulması ve çözdürülmesi: Fas'ta tek bir merkez sonuçları**

### **ÖZET:**

*Giriş:*Nöroblastom tedavisinde kaydedilen ilerlemelerin önemli bir bileşeni yüksek doz kemoterapiyi desteklemek için periferik kan kök hücrelerinin kullanımı olmuştur. Bu çalışmada, standart ve büyük hacimli lökoferezis (LVL) işlemleriyle tedavi görmüş bir dizi küçük çocukla ilgili deneyimimizi rapor ediyor ve % 10 dimetil sülfoksit (DMSO) kullandıktan sonra, çözdürme sonrası DMSO depleasyonu uygulayarak ve canlılığı etkileyebilecek değişkenlerin sayısını analiz ederek tek bir kurumun otolog periferik kan kök hücrelerinin (PBSC) kriyoprezervasyonu konusundaki deneyimini güncelliyoruz.

*Yöntemler:*Temmuz 2016 ile Ekim 2019 tarihleri arasında İbn Sina üniversite hastanesinde ağırlığı 25 kg'ın altında olan 29 çocuğa toplam 36 aferez uygulandı.

*Bulgular:*Ortalama vücut ağırlığı 14 kg (9–22) olan yedi kadın ve yirmi iki erkek araştırıldı. Vakaların % 82,8'inde en az  $3 \times 10^6$ /kg vücut ağırlığı (BW) CD34+ hücresi elde etmek için tek bir aferez yeterliydi. 22 aferezde LVL gerçekleştirildi. Aferez başına ortalama  $5,9 \times 10^6$ /kg sayıda CD34 hücresi toplandı. Toplam 60 PBSC örneği dondurularak saklandı ve 46 örnek infüze edildi. Ortalama hücre canlılığı yüzdesi, dondurma öncesi  $94,75 \pm 1,14$ 'ten, çözdürme sonrası  $70,84 \pm 8,6$ 'ya geriledi ( $p < 0,001$ ). Çözdürme sonrası canlılık ve saklama süresi ( $r = -0,233$ ;  $p = 0,234$ ) veya toplam çekirdekli hücre sayısı ( $r = 0,344$ ;  $p = 0,073$ ) arasında hiçbir korelasyon bulunamadı.

*Sonuç:*Gerekli önlemler alındığı takdirde lökoferez, küçük pediatrik hastalarda güvenli ve uygulanabilir bir yöntemdir. Kriyoprezervasyonun birçok zorluğu bulunmaktadır, özellikle de çözdürme sonrası hücre canlılığında azalmaya neden olmaktadır.

### **GİRİŞ:**

Nöroblastom, sempatik sinir sisteminin embriyonal bir malinitesidir; çocukluk çağıının üçüncü en sık görülen kötü huylu tümörü ve bebeklik çağıının en sık görülen solid tümörüdür.<sup>1</sup> Yoğun kemoterapi sonrası otolog kök hücre nakli, solid tümörlü pediatrik hastalar için umut verici bir tedavi protokolüdür.<sup>1</sup> Aferez teknolojisinin gelişmesinden bu yana, periferik kan kök hücrelerinin (PBSC) aferez yoluyla toplanması, otolog transplantasyon için umut verici ve tercih edilen bir hücre kaynağı olarak giderek kemik iliğinin yerini almıştır.<sup>2</sup> Zamanla, çocuklarda lökoferezin fizibilitesini ve güvenliğini değerlendirmek ve kanıtlamak için çok sayıda çalışma yapılmıştır.<sup>3-5</sup> Başarılı pediatrik PBSC toplama algoritmaları, yeterli damar yoluna, en uygun toplama zamanlamasına, çocuğun hemodinamik ve elektrolit durumunun yeterli şekilde hazırlanmasına ve küçük çocuklar için uygun önlemlerin kullanıldığı etkili bir aferez işlemine bağlıdır.<sup>6-7</sup> İstenilen CD34+ sayısına ulaşmak için (en az  $2 \times 10^6$ ), alıcının ağırlığına göre birçok grup çeşitli stratejiler önermiştir.<sup>8-9</sup> Hedef CD34+ hücrelerini toplamanın ve lökoferez sayısını azaltmanın bir yolu, büyük hacimli lökoferez uygulanmasıdır; bu, hastanın toplam kan hacminin en az üç kez işlenmesini içeren bir prosedürdür.<sup>10</sup> Dünya çapında birçok merkez CD34+ hücre hasadının sayısını artırmak için zayıf mobilize edicilerle bu yaklaşımı kullanmaktadır.<sup>10</sup> Teknik olarak yetişkin işlemine benzerliklerine rağmen, pediatrik hastalarda lökoferez, deneyimli ekiplere, uygun etik önlemlere ve hastanın büyüklüğüne göre bazı prosedür değişikliklerine ihtiyaç duyar.<sup>5,7</sup> Yüksek riskli nöroblastom tedavi şeması, PBSC greftinin kullanılıncaya kadar saklanmasını gerektirir. Kriyoprezervasyon için dünya çapındaki farklı nakil merkezleri tarafından çeşitli protokoller kullanılmaktadır.<sup>11-13</sup> Bu süreç kritiktir ve

kriyoprotektan solüsyonu, saklama sıcaklığı, donma hızı, hücre konsantrasyonu ve saklama süresi de dahil olmak üzere birçok unsurun dikkate alınmasını gerektirir.

Bu çalışmanın amacı, ağırlığı 25 kg'ın altında olan bir dizi çocukta yeni Spectra Optia cihazı kullanılarak yapılan standart ve büyük hacimli lökoferez (LVL) işlemleriyle ilgili deneyimlerimizi aktarmaktır. İkinci amaç, tek bir kurumun, % 10 dimetil sülfoksit (DMSO) kullanarak otolog periferik kan kök hücresi (PBSC) kriyoprezervasyonu yapılması ve çözündürme sonrası DMSO deplesyonu uygulanması konusunda güncel deneyimlerimizi sunmak ve canlılığı etkileyebilecek çeşitli değişkenlerin analizini yapmaktır.

## **YÖNTEMLER:**

### **Hastalar**

Tüm hastalar, primer tümörün ameliyatla lokal kontrolü ve bununla birlikte neoadjuvan kemoterapi uygulaması, yüksek doz kemoterapi konsolidasyonu ve ardından otolog CSH ve son olarak retinoik asit ile rezidüel hastalığın kontrolü şeklindeki HR-NBL-MA 2010 protokolüne göre tedavi edildi.<sup>14</sup> Şekil 1.

Protokol 2-3 günlük kemoterapi döngüsünden sonra hücrelerin toplanmasını önerir ancak bu, toplama günü randevularındaki aksaklıklar nedeniyle nadiren mümkün olur. Çoğu zaman toplama 4-5 döngüden sonra ve bazen de cerrahiden sonra yapılır.

İbn Sina Üniversitesi Hastanesindeki bölümümüzde Temmuz 2016'dan 2019 Ekim'e kadar gerçekleştirilen tüm pediatrik otolog PBSC aferezlerindeki veriler retrospektif olarak toplandı. Dahil edilen hastalar, PBSC aferez işlemine tabi tutulduklarında 25 kg'dan daha az ağırlıkta olan çocuklardı.

### **Mobilizasyon**

PBSC mobilizasyonuna başlamadan önce aferez doktorunun, hastaların uygun olup olmadığını kontrol etmesi gerekir. Uygunluk, fizik muayene ile radyolojik (elektrokardiyogram ve ekokardiyografi gibi) ve laboratuvar sonuçlarının (tam periferik kan sayımı, kalsiyum, potasyum, magnezyum, pıhtılaşma parametreleri, böbrek değerleri, hepatik enzim ve seroloji gibi) doğrulanmasını içerir.

Tüm toplamalar 4 gün boyunca günde iki kez deri altından uygulanan granülosit koloni-uyarıcı faktör (G-CSF)'le mobilizasyondan (5 µg/kg) sonra gerçekleştirildi. Periferik kan CD34+ hücre sayımı G-CSF uygulamasının 4 üncü gününde kontrol edildi. Aferez öncesi sayımları  $\geq 20 \times 10^6/L$  CD34+ olan hastaların hücrelerinin iyi mobilizörler olduğu kabul edildi, CD34+ sayısı  $< 20 \times 10^6/L$  olanlar zayıf mobilizörler olarak değerlendirildi. Mobilizasyon protokolünün 5 inci gününde PBSC toplama işlemi, G-CSF uygulamasını takip eden 2—3 saat içinde başlatıldı. Alıcının vücut ağırlığı başına gerekli sayıda CD34+ hücresi toplanmadıysa, G-CSF uygulaması tekrarlandı ve 6. günde ikinci bir lökoferez uygulandı.

### **Kök hücre toplama**

Lökoferez; femoral, subklavyen veya juguler venlerde santral bir damar yoluyla sürekli akım kan hücresi ayırıcısı (Spectra Optia Terumo BCT) kullanılarak gerçekleştirildi. Girişim yerleri hastanın bedenine ve yaşına göre seçildi. Santral venöz kateterin yerleştirilmesi bir anestezi uzmanı tarafından gerçekleştirildi. Spectra Optia

aferez sistemi vücut ağırlığı 25 kg'dan az hastalarda toplam kan hacmi (TBV) hesaplaması yapmadığı için operatörün daha sonra manuel hesaplama yapması gerekti.

Lökoferezden önce ekstrakorporeal hat, dilüsyonel anemiye önlemek ve hipovolemik durumdan kaçınmak için 200 ml ABO ve Rhesus uyumlu löko-deplese edilmiş paketlenmiş kırmızı kan hücreleri ile hazırlandı. Aferezde kullanılan tek antikoagülan 1:12 oranındaki sitrat dekstroz formülasyonu A (ACD-A) idi. İşlemden önce ve sonra serum iyonize kalsiyum seviyeleri izlendi. Sitrat intoksikasyonu nedeniyle hipokalsemiye önlemek için, tüm pediatrik hastalara yavaş infüzyonda 100 ml normal salin içinde sürekli kalsiyum glukonat (1g x 10 kg vücut ağırlığı) verildi.

Tüm hastalar sedasyon yapılmadan tedavi edildi, ancak işlem sırasında çeşitli faaliyetlerle (çizim ve boyama gibi) ve ebeveyn varlığıyla yönlendirildi. Çocuklar aferez boyunca düzenli olarak kardiyak monitörle ve nabız oksimetresiyle izlendi. Aferez öncesinde, sırasında ve hemen sonrasında hastanın hayati belirtileri kaydedildi, hastanın aferez işlemi toleransına bağlı olarak akım hızı hekimin kararına göre ayarlandı.

Heedeflenen CD34+ hücre verimi  $5.10^6$ /kg BW (vücut ağırlığı) idi,  $3.10^6$ /kg BW verimi minimum düzeyde de olsa kabul edildi. Hastaların nakil sırasında ağırlık kazanması durumunda hedeflenen CD34+ hücre sayısından mümkün olduğunca daha fazlasını toplamaya çalıştık.

#### **Numune alma**

Aferez öncesi ve sonrası hematoloji analizörü (Sysmex K21N) kullanılarak periferik kan analizi yapıldı. Hem lökoferez öncesi periferik kan örneğinde hem de lökoferez ürünüde, flow sitometri (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) ile kök kit reaktifleri kullanılarak, Uluslararası Hematoterapi ve Greft Mühendisliği Derneği (ISHAGE) spesifikasyonlarına göre CD34+ hücrelerin miktarı belirlendi.

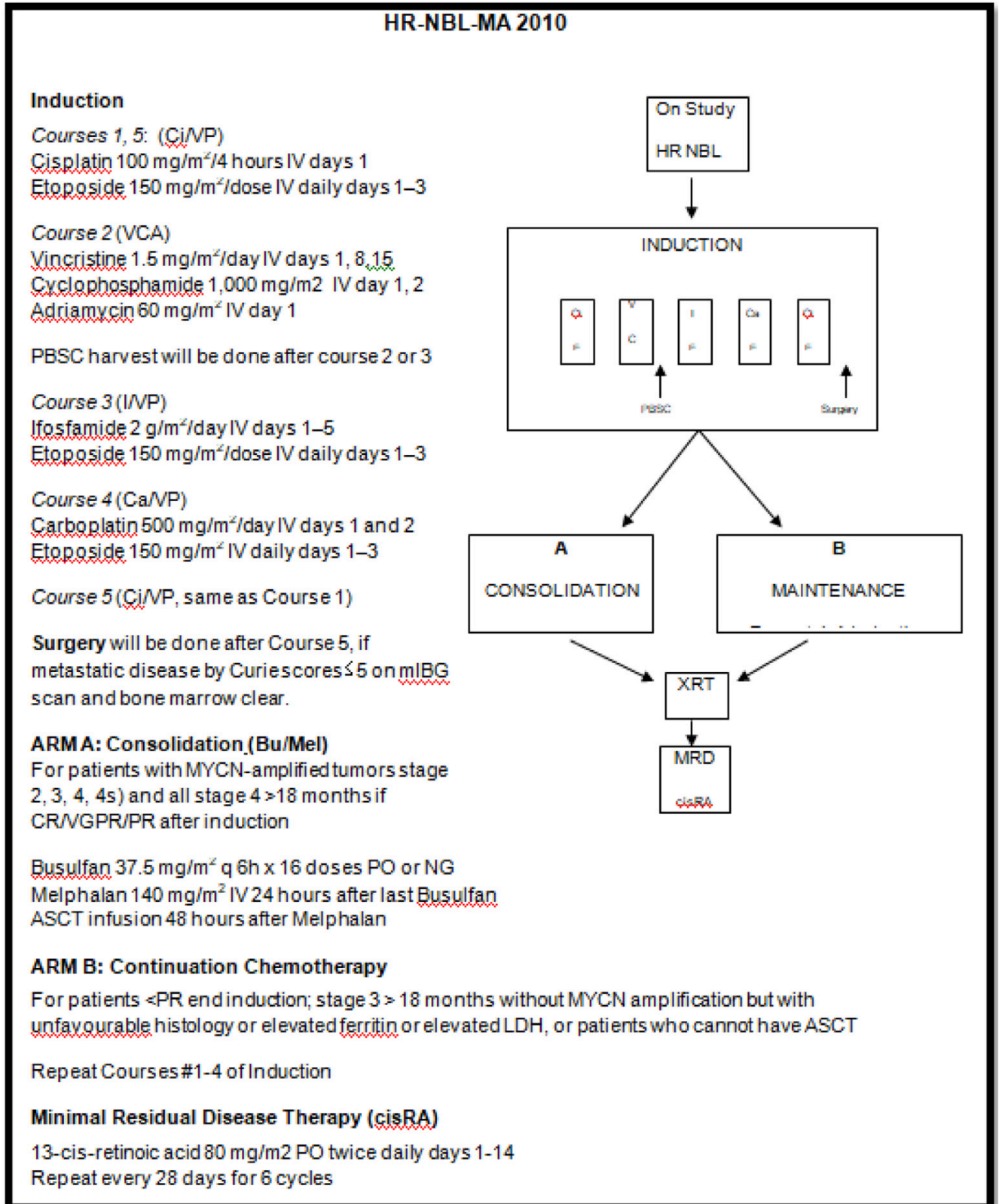
#### **KRİYOPREZERVASYON VE ÇÖZDÜRME YÖNTEMLERİ:**

Hücreler, toplandıktan sonraki ilk 24 saat içinde donduruldu. Tüm ürünler ilk dondurma için hız kontrollü dondurucuda donduruldu ve daha sonra azot buharı fazlı dondurucularda (sıcaklık aralığı  $-145$  ila  $-195$  C°) saklandı.

İlk olarak, PBSC'ler 600 ml'lik bir kan transfer torbasına aktarıldı ve 870 rpm'de (160 g) 18 dakika boyunca aralıksız olarak santrifüjlendi. Uygun hücre konsantrasyonunu elde etmek için fazla plazma çıkarıldı. Ürün, dondurma işlemine uygun torbalara dağıtıldı ve kriyoprezervasyon işlemi için kontrol görevi görmek üzere küçük miktarlar kriyoviyallere aktarıldı.

Kriyoprezervasyon solüsyonu % 6 hidroksietil nişasta (HES) (Voluven, Fresenius Kabi, Sevres, Fransa) ve aferez ürününe eklendikten sonra % 10'luk son DMSO konsantrasyonuna ulaşmak için % 20 DMSO ile hazırlandı. Kriyoprotektan solüsyonun eklenmesinden sonra, torbalar ve flakonlar aşağıdaki şekilde hız kontrollü bir dondurucuya (CryoMed Dondurucu, Thermo) aktarıldı: Kontrollü dondurma hızı 4°C'de başladı. Bu sıcaklığı  $-5,2$ °C'ye kadar 2°C/dakika,  $-90$ °C'ye kadar 45°C/dakika,  $-50$ °C'ye kadar 25°C/dakika,  $-15$ °C'ye kadar 10°C/dakika ve  $-40$ °C'ye kadar 2°C/dakika şeklinde soğutma izledi ve işlem 10°C/dakika'lık son soğutma hızıyla  $-120$ °C sıcaklığa kadar tamamlandı. Kriyoprezervasyon işlemi sonrasında torbalar buharlı azotta saklandı.

Nakil gününde torbalar 39°C'deki su banyosunda 2 ila 3 dakikada hızla çözdürüldü. Çözdürüldükten hemen sonra hücre canlılığı test edildi. Yıkama prosedürleri HES yıkama solüsyonu ile manuel olarak gerçekleştirildi. Numune süspansiyon edildikten sonra santrifüj edildi ve infüzyondan önce normal salin içinde tekrar süspansiyon edildi.



Şekil 1. – Yüksek riskli nöroblastomun HR-NBL-MA 2010 protokolüne göre tedavisi.

## **KRİYOPREZERVASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ:**

Canlı çekirdekli hücrelerin (NC) sayısı, hem taze hem de çözdürülmüş numuneler üzerinde gerçekleştirilen tripan mavisi boya dışlama testi ile değerlendirildi. Çekirdekli hücre seviyeleri hematoloji analizörü ile belirlendi, CD34+ hücre sayıları, flow sitometri ile yıkamadan sonra toplanan küçük miktarlarda belirlendi.

### **İstatistiksel analiz**

İstatistiksel analiz için Windows IBM SPSS istatistik sürümü 20.0 kullanıldı. Hasta özellikleri ve aferez sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak veya aralıklı medyan (çeyrekler arası aralık) ile tanımlanır. Biz toplam CD34+ hücrelerinin verimi ve aferez öncesi CD34+ hücre sayısı arasındaki ilişkiyi test etmek için Spearman'ın korelasyonunu kullandık. Aferez öncesi ve aferez sonrası trombosit sayımları arasındaki farklar, eşleştirilmiş numuneler t-testi ile test edildi. Karşılaştırılan canlılık yöntemleri arasındaki farkların istatistiksel önemi bağımsız örneklerde t-testi kullanılarak değerlendirildi. CD34+ hücre sayılarının ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel önemi eşleştirilmiş numunelerde Wilcoxon testi kullanılarak değerlendirildi. Çözdürme sonrası canlılık ile saklama süresi arasındaki ve çözdürme sonrası canlılık ile toplam çekirdekli hücre sayısı arasındaki ilişkiyi test etmek için Spearman korelasyonunu kullandık.

### **SONUÇLAR:**

Çalışma süresi boyunca nöroblastoma'lı ve 25 kg'dan daha az ağırlıktaki 29 çocuğa 36 periferik kök hücre aferezi yapıldı. 22 erkek (%75,9) ve 7 kadın (%24,1) hasta vardı. Ortalama yaş 3 yaş (1,2–6,5 yaş arasında) ve ortalama ağırlık 14 kg (9–22 kg arasında) idi.

Her prosedürde ortalama toplam kan hacmi  $1,117 \pm 261$  ml (630 – 1,650 ml arası) idi. 22 aferez işleminde büyük hacimli lökoferez, 14 lökoferezde ise 3'ten az siklus uygulandı. Çift lümenli santral venöz kateter kullanılarak venöz girişim yapıldı: Aferezler sırasında kateterler 28 işlemde (%77,8) jugular vene, 6 işlemde (%16,7) femoral vene ve 2 işlemde (%5,5) subklavyen vene yerleştirildi. Toplanan PBSC özelliklerinin teknik ayrıntıları Tablo 1'de gösterilmektedir.

<b>Tablo 1.— Lökoferez ve ürün özelliklerinin teknik detayı</b>		
<b>Veri</b>	<b>Değer</b>	<b>Aralık</b>
İşlenen toplam kan hacmi (x)*	$3.1 \pm 0.6$	1.7 – 4.4
İşlenen kan hacmi (ml)**	3,414 (2,607.75; 4,323.25)	1,356 – 5,810
ACD-A hacmi (ml)**	315 (237; 390.25)	123 – 528
İşlem süresi (dakika)*	$290 \pm 61$	137 – 444
CD34+ hücreler $\times 10^6$ /kg BW**	5.9 (3.05; 9.55)	0.7 – 19.7

ACD-A:sitrat dekstroz formülü A; BW:vücut ağırlığı  
\* Ortalama  $\pm$  standart sapma  
\*\* Medyan (çeyrekler arası aralık)

24 vakada, istenen CD34+ hücre sayısını (en az  $3 \times 10^6$ /kg vücut ağırlığı) elde etmek için tek bir aferez yeterliydi (%82,8). 5 vakada art arda iki günde iki aferez yapıldı. Yukarıda bahsedilen 24 çocuktan üçünde, ilk işlemde yetersiz sayıda CD34+ hücresi olması nedeniyle iki işlem gerekti, diğer iki tanesinde ise hedeflenen CD34+ hücreye ( $\geq 5 \times 10^6$ /kg vücut ağırlığı) ulaşmak için yeniden işlem yapıldı. İki hastada mobilizasyon zayıftı ve yeterli sayıda CD34+ hücre elde etmek için ek hematopoietik progenitör mobilizasyonu gerekti.

İlk aferez gününden itibaren kazanılan hasta vücut ağırlığı dikkate alındığında periferik kan CD34+ hücre sayısı ile toplam CD34+ hücre verimi arasında anlamlı doğrusal ilişkiye sahip güçlü bir korelasyon bulundu [ $r = 0,714$ ;  $p < 0,001$ ].

İyi mobilizasyon gösteren grupta aferezin ilk günündeki aferez öncesi CD34+ hücre sayısı ile LVL ve standart aferez sonrası ürün özellikleri Tablo 2'de gösterilmektedir. LVL uygulanan iyi mobilizasyonlu hastalarda aferez öncesi CD34+ hücre sayısı daha düşük iken, hastanın vücut ağırlığı dikkate alındığında büyük hacimli lökoferez ve standart aferez arasında kök hücre ürünündeki CD34+ hücre sayısı ve CD34 kök hücre verimi arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Her lökoferezden sonra trombositlerde anlamlı bir azalma gözlemlendi [ $r = 0,937$ ;  $p < 0,001$ ], ancak düşük trombosit sayısı nedeniyle kanama olmadı, hemoglobin seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ( $p > 0,05$ ). Her lökoferezden sonra trombosit sayısındaki ortalama düşüş %40,3 (% 26,6 — 55,28 aralığında) idi.

Sitrat toksisitesine bağlı herhangi bir olumsuz olay gözlenmedi. Lökoferez ile ilgili yalnızca dört vazovagal etki kaydedildi, bir vakada ise lökoferez başlangıcında nabız sayısı 120 bpm'nin üzerinde idi ve işlemin sonunda kan basıncında hafif ve geri dönüşümlü bir düşüş yaşandı.

<b>Tablo 2.— İyi mobilizasyon gösteren grupta aferez öncesi CD34+ hücre sayısı ile LVL ve standart aferez sonrası ürün özellikleri</b>			
	<b>LVL</b>	<b>Standart aferez</b>	<b>p**</b>
Toplam aferez sayısı (n)	15	11	—
Toplam kan hacmi işlem zamanı	3.5 (3—4.3)	2.5 (1.7—2.9)	
Periferik CD34+ hücre sayısı/ $\mu$ l*	42 (22—188)	64 (24—207)	> 0.05
Üründeki CD34+ hücreler (hücre/ $\mu$ l)*	958 (229—2,484)	979 (773—2,173)	> 0.05
CD34+ hücre $\times 10^6$ /kg vücut ağırlığı*	7.07 (2—16.5)	6.36 (3.2—19.7)	> 0.05
LVL: büyük hacimli lökoferez; BW:vücut ağırlığı * Ortalama (aralık) ** Mann-Whitney testi			

PBSC'lerin kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası laboratuvar özellikleri Tablo 3'te açıklanmıştır. Toplam 60 PBSC numunesi ortalama  $72,25 \times 10^3$ / $\mu$ l (aralık 33,8—593; çeyrekler arası aralık 51.15 — 88.4) hücresel konsantrasyonda dondurularak saklandı.

Toplam 46 numune infüze edildi. Ortalama greft saklama süresi 56 gündü ve saklama süresi 13 ila 244 gün arasında değişiyordu.

Tablo 3.— Kriyoprezervasyondan önce ve sonra PBSC ürününün özellikleri				
Greft özellikleri	Kriyoprezervasyondan önce		Kriyoprezervasyondan sonra	
	Değer	Aralık	Değer	Aralık
Torba sayısı	36		60	
Toplam çekirdekli hücre (x10 <sup>3</sup> /μl)	124.21 ± 36.7*	[168—202]	72.25 (51.15; 88.4)**	[33.8—593]
Canlılık	94.63 ± 1.35*	[91—98]		[]
CD4+ hücre sayısı (/μl)	842.9 (536.5; 1280.78)**	[65—2484]	499.75 (408.38; 704)**	[65—2,173]
CD34+ hücreler (x10 <sup>6</sup> /kg)	5.9 (3.05; 9.55)**	[0.69—19.7]	3.03 (2.52; 5.17)**	[0.5—19.7]
Torba hacimleri	96 ± 27.48**	[25—180]	121.6 ± 16.15*	[40—150]
* Ortalama ± standart sapma ** Medyan (çeyrekler arası aralık)				

Ortalama  $4 \pm 0,9 \times 10^6$ /kg (aralık:2—5.8) alan 23 hastada (44 numune) DMSO, infüzyondan önce uzaklaştırıldı. Toplamadan sonraki ve çözdürmeden sonraki PBSC greftlerinde hücre canlılığı değerlendirildiğinde canlılık endeksleri istatistiksel farklılıklar gösterdi (Tablo 4). Donmadan önce %  $94 \pm 1,14$  olan ortalama hücre canlılığı yüzdesi çözdürmeden sonra %  $70,84 \pm 8,6$  'ya düştü ( $p < 0,001$ ). Çözdürme sonrası canlılık ve saklama süresi ( $r = -0,233$ ;  $p = 0,234$ ) veya toplam çekirdekli hücre sayısı ( $r = 0,344$ ;  $p = 0,073$ ) arasında hiçbir korelasyon bulunamadı.

Dondurma öncesi ve çözdürme sonrası CD34+ hücre sayısında önemli bir fark gözlemlendi (Tablo 4). Ortalama son infüzyon hacmi  $97 \pm 20$  ml idi. Tüm ürünler sterilite testine gönderildi ve tüm kültür sonuçları negatifti.

Tablo 4.— Çözdürmeden önce ve sonra canlılık ve CD34+ hücre sayısı			
Değişken	Kriyoprezervasyondan önce	Kriyoprezervasyondan sonra	p**
CD34+ hücre sayısı (μl)**	471 (516; 951)	461 (347.95; 637.43)	< .001
Canlılık (%)*	$94 \pm 1.14$	$70.84 \pm 8.61$	< .001
* Ortalama ± standart sapma ** Medyan (çeyrekler arası aralık)			

## TARTIŞMA:

Pediyatrik hastalarda otolog kök hücre nakli için lökoferez kullanımındaki artış devam etmektedir.<sup>15</sup> 25 kg'dan daha hafif olan küçük çocuklarda bile lökoferez etkili ve güvenlidir ancak bu teknik işlem öncesi birçok hazırlık gerektirir.<sup>5</sup> Bu çalışmada 9 ila 22 kg arası ağırlıktaki 29 pediyatrik hastada 36 seansta gerçekleştirilen lökoferez işlemini retrospektif olarak inceledik.

Kök hücre toplama sırasındaki ilk zorluk, işlem sırasında çocukları, özellikle de hastalıklarıyla ilgili çeşitli travmalar yaşamış olan çocukları işbirliği içinde tutmaktır.<sup>16</sup> Pediyatrik hastalara yönelik bazı duygusal riskler

çocuğu ve aileyi aferez için hazırlayarak en aza indirgenebilir.<sup>5</sup> Bizim deneyimimizde tüm çocuklar aferez için önceden hazırlandı, sedasyon yapılmadan tedavi edildi ve bir ebeveynin varlığında boyama veya TV izleme gibi bir aktivitelere yönlendirildi.

Lökoferezde damar yolu çok önemlidir ve işlem sırasında gereken sabit kan akış hızının sürdürülebilmesi için venöz girişim yeterlidir. Çocuklarda damar yolu için, çoğu makale yazarı femoral, juguler veya bizim hastalarımızda yaptığımız gibi subklavyen vene çift lümenli diyaliz kateteri kullanılarak girilmesini önermektedir.<sup>7,17</sup> D. Orbach ve arkadaşları<sup>18</sup> yeterli kan akış hızı elde etmek için periferik ven kullanımının yeterli olduğunu bildirmiştir. Bizim vakalarımızda santral venöz kateter kullanımıyla ilgili herhangi bir olumsuz olay kaydetmedik ancak bu sürecin femoral arteriyovenöz fistül<sup>18</sup> ve kanama<sup>10</sup> gibi ciddi komplikasyonlara neden olabileceğine dair bazı çalışmalar rapor edilmiştir.

Eğer ekstrakorporeal hacim çocuğun toplam kan hacminin % 10-15'ini aşıyor ise çok sayıda merkez sıklıkla prime (işleme hazırlama) yapmayı tercih eder.<sup>3-4</sup> Uygulamamız, tüm PBSC toplamarından önce, normal salin ve antikoagülan sitrat dekstroz çözelti formülü A ile prime yapmak, ardından lökositten yoksun uyumlu kırmızı kan hücreleri kullanarak ikinci bir prime yapmak şeklindedir ve işlemin sonunda geri yükseltme yoktur. Orbach ve arkadaşları<sup>18</sup> çoğu durumda başlangıçtaki hemogloblin seviyesine bağlı olarak düşük ağırlıktaki çocuklarda kanın prime yapılmasından kaçınılabileceğini bildirmiştir.

Çoğu makale yazarı pediatrik aferezde<sup>19</sup> sitratin heparinle kombine edilerek kullanılmasını önermektedir, R.W. Maitta ve arkadaşları<sup>16</sup> tarafından bildirilen seride olduğu gibi bizim serimizde de ACD-A tek başına kullanılmıştır. Sitratin en sık görülen yan etkisi hipokalsemidir.<sup>20-21</sup> Aferez sırasında sitrat toksisitesini önlemek için çoğu makale yazarı oral veya parenteral yolla profilaktik kalsiyum verilmesini önermektedir<sup>3,17</sup> ve pediatrik kalsiyum dozu, maksimum 5ml/dak. hızda 5 ila 10 dakika içinde iv yolla 100—200 mg/kg'dir.<sup>21</sup>

Kök hücre toplama etkinliğini artırmak için değiştirilebilir parametrelerden biri de işlenen kanın hacmidir. İdeal toplama amacına ulaşmak için birçok ekip, hastaların 3—6 TBV'nin işlenmesinde LVL kullanımını tavsiye etmiştir.<sup>10-22</sup> LVL, pediatrik zayıf mobilizörlerde bile, toplanan CD34+ hücrelerin sayısını arttırmada daha etkili olmuştur.<sup>10</sup> Bizim serimizde 22 aferez işleminde LVL uygulandı ve 14 lökoferezde 3'ten az siklus gerçekleştirildi. Sonuçlarımız hem standart aferez prosedürünün hem de LVL'nin uygulanabilir olduğunu ve istenilen sayıda CD34+ hücre (en az  $3 \times 10^6$ /Kg BW) elde etmek için vakaların % 82,8'inde tek bir aferezin yeterli olduğunu göstermektedir. CD34+ toplama etkinliğini olumlu yönde etkileyen bir diğer faktör de periferik dolaşım kanında, toplama gününden bir gün önceki veya toplama günündeki CD34+ hücre konsantrasyonudur.<sup>23</sup> Bizim serimizde, hastaların % 86'sı iyi mobilizördü ve hastanın vücut ağırlığı dikkate alınarak yapılan kan CD34+ hücre sayımı ile toplam CD34+ verimi arasında güçlü bir korelasyon mevcuttu. Literatüre uygun olarak, aferez öncesi CD34+ hücre sayımı PBSC toplama işlemini başlatmak için hâlâ en iyi göstergedir.<sup>24,25</sup>

Diğer makale yazarları gibi<sup>10,26</sup> biz de her lökoferezden sonra trombosit sayısında azalma gözlemledik, ancak vakalarımızda trombositopeni ile ilgili hiçbir komplikasyon rapor edilmedi. Protokolümüze göre hastanın kanama riskini önlemek amacıyla trombosit sayısı  $90 \times 10^9$ /L'nin üzerinde çıkınca aferez başlattık.

Yüksek riskli nöroblastom tedavi şeması PBSC greftinin kullanıma kadar saklanması gerektiğini işaret eder. Kriyoprezervasyon için, dünya çapında farklı nakil merkezlerinde farklı protokoller kullanılır. Bu süreç kritiktir ve birkaç noktanın dikkate alınmasını gerektirir.



Hücrelerin toplanmasından sonra dondurma—öncesi saklama, kriyoprezervasyon sonucunu etkileyebilir. Guttridge ve arkadaşları, kriyoprezervasyon sürecindeki gecikmelerin göbek kordonu kanındaki (UCB) kriyoprezervasyon sonrası CD34+ hücre canlılığını önemli ölçüde etkilediğini bildirdi.<sup>26</sup> Optimum hücre canlılığını sağlamak için kriyoprezervasyonun 48 saat veya daha az zaman içinde yapılması tavsiye edilmektedir.<sup>28</sup>

Bu alandaki araştırmaların çoğu, süreçteki kritik noktaları belirlemeye odaklanmaktadır.

Hacmin azaltılması, hematopoietik kök hücrelerin (HSC) kriyoprezervasyonundan önceki ilk adımdır. Bu işlem canlı hücrelerin yüksek oranda geri kazanılmasını sağlamalıdır. Hacmin azaltılmasından sonra toplam çekirdekli hücre kazanımı > %75 olmalıdır.<sup>13</sup>

Dondurma sırasındaki yüksek hücre konsantrasyonunun, hücre kaybının olası bir nedeni olduğu tespit edilmiştir. Literatür incelemesine dayanarak, dondurularak saklanan nakil greftindeki maksimum NC konsantrasyonunun  $4 \times 10^8$ /ml'yi aşmamasına dikkat ediyoruz.<sup>27</sup>

Nihai konsantrasyonda % 10'luk DMSO, insan albümini veya SF gibi diğer katkı maddeleri de dahil olmak üzere, bir dondurma çözeltisinde en çok kullanılan bileşendir. DMSO'nun kriyoprotektan etkisi dondurma ve çözündürme işlemleri sırasındaki hücre hasarını önlemektir.<sup>13</sup> Olumsuz hasta reaksiyonlarını en aza indirmek için, DMSO depleyonu amacıyla ön yıkama, merkezimizde rutin olarak gerçekleştirilmektedir.

Önemli derecede hücre canlılığı kaybına neden olabilecek diğer bir faktör çözündürmedir. Bizim verilerimize göre dondurularak saklanan hücreleri çözündürmek, CD34+ hücre sayılarında ve canlılıklarında önemli bir azalmaya neden oldu. CD34+ hücrelerdeki ve hücre canlılığındaki bu azalma daha önce rapor edilmiş oranlarla benzerdi.<sup>28</sup>

Diğer birçok çalışmada olduğu gibi<sup>28-29</sup> bizim serimizde de çözündürme sonrası canlılık ile saklama süresi arasında bir korelasyon bulunmadı.

Bu çalışma analiz edilen örneklem büyüklüğü ile sınırlı olup, nakil sonrası hematopoietik iyileşme dönemine ilişkin veriler mevcut değildir. Ancak merkezimizdeki deneyimleri paylaşmak istiyoruz.

## **SONUÇ:**

Yetişkinlerdeki işleme teknik benzerliklerine rağmen küçük çocuklardaki lökoferez, hâlâ pediatrik hasta yönetimi konusunda çok az deneyime sahip olan dünyamızda bazı operatörleri endişelendiriyor. Mevcut metin diğer aferez ekiplerine karşılaştırmalı bir çalışma olarak hizmet edebilir ve onları çocuklarda lökoferez başlatmaya teşvik edebilir.

Sonuç olarak lökoferezin küçük çocuklarda sedasyon yapılmadan, LVL bile uygulansa uygun önlemler alındığında güvenli ve iyi tolere edilebilir olduğu sonucuna varabiliriz. En önemli faktörler kök hücre toplanmasından bir gün önceki veya toplama günündeki periferik kan CD34+ hücre konsantrasyonu, çocuğun elektrolit ve duygusal stres durumlarının yeterli bir şekilde hazırlanması, iyi bir venöz girişim ve tek kullanımlık malzemenin ekstrakorporeal hacminin yönetimidir. Kriyoprezervasyon süreci kritiktir. Bu makalede, kök hücre greftinin kalitesini etkileyebilecek çeşitli değişkenleri inceledik.

**ÇIKAR ÇATIŞMALARI:**

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

**REFERANSLAR:**