



KISA SÜRELİ +4 °C DE SAKLANAN PERİFERİK HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİN ETKİNLİĞİ

EFFICACY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS STORED SHORT TERM AT +4 °C

Ayhan DÖNMEZ Seçkin ÇAĞIRGAN Filiz VURAL Mustafa PEHLİVAN Murat TOMBULOĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı, Bornova, İZMİR

Anahtar sözcükler: periferik hematopoetik kök hücre, +4 °C, olog transplantasyon
Key words: peripheral hematopoietic stem cells, +4 °C, autologous transplantation

ÖZET

Otolog periferik kök hücre transplantasyonu (OPKHT) değişik hematolojik neoplastik hastalıklarda sık olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kemik iliği veya periferik kandan toplanan kök hücreler, nispeten toksik ve ürün volümünü arttıran ilave işlemleri takiben ya programlı bir şekilde dondurulduktan sonra sıvı azot içinde -180 °C de yada doğrudan mekanik dondurucuda -80 °C de saklanmaktadır. Bu işlemler zaman alıcı ve masraflı olup deneyimli eleman gerektirir. Bu çalışmada 8 hastada 1-3 lökaferez ile toplanan periferik kök hücreler ilave bir işlem yapılmaksızın buzdolabında +4 °C de saklanmıştır. Hastalara uygulanan yüksek doz kemoterapiden 24 - 48 saat sonra ürünler reinfüze edilmiştir. Tüm olgularda nötrofil engraftmanı medyan 15. (11-43) günde olmuş, progresif hastalık ile kaybedilen bir olgu dışındakilerde trombosit engraftmanı da medyan 25. (12-49) günde meydana gelmiştir. Kök hücrelerin +4 °C de kısa süreli saklanması; ürüne ek bir işlem gerektirmemesi, dondurma için gerekli olan alt yapıya ihtiyaç göstermemesi ve ek bir maliyet getirmemesi nedeniyle tüm merkezlerde kolaylıkla uygulanabilir. Sonuçlar kısa süreli hazırlık rejimi gerektiren OKPKHT uygulamalarında kök hücrelerin +4 derecede saklanması güvenli ve etkili olduğunu göstermektedir.

SUMMARY

Autologous peripheral blood stem cell transplantation is a widely used treatment modality in hematological malignancies in last years. Progenitor cells collected from bone marrow or peripheral blood are stored in liquid nitrogen tanks (-180 °C) or in mechanical freezers (-80 °C). Cryopreservation is a relatively difficult and time consuming procedure. Volume overload and the toxicity of cryoprotectant agent are other major problems. In this study, peripheral blood progenitor cells collected from 8 patients by 1-3 leucapheresis were refrigerated at +4 °C without applying any procedure. After high dose therapy these products were reinfused to patients in 24 - 48 hours. Neutrophil engraftment (>500//,lL) occurred in all patients median at 15th (11-43) day. Platelet engraftment (>20000//uL) occurred in all but one patient who died due to progressive myeloma at 25th (12-49) day. Storage of peripheral blood progenitor cells in refrigerator at +4 °C is a very easy method that can be applied in every transplantation center. It is also cheaper and there is no need to any other troublesome freezing procedures. The results of study showed that this method can be used safely in short lasting conditioning regimens.

GİRİŞ

Kemoterapiye duyarlı hematolojik neoplastik hastalıklarda otolog periferik kök hücre desteğinde yüksek doz kemoterapi günümüzde sık olarak uygulanmaktadır. Son

15 yıldır giderek artan sıklıkta hematopoetik kök hücre kaynağı olarak kemik iliği yerine periferik kan tercih edilmektedir (1, 2). Hematopoetik kök hücreler DMSO, HES gibi kriyoprotektan ajanlarla muameleden sonra programlı dondurularak sıvı azot içinde çok uzun yıllar saklanabilmektedir. Mekanik dondurucuda -80 °C de saklanan kök hücrelerin en az 2 yıl süre ile etkinliğini koru-

Yazışma adresi: Ayhan DÖNMEZ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı, Bornova, İZMİR
Makalenin geliş tarihi: 25.06.2003; Kabul tarihi: 25.07.2003

duğu gösterilmiştir (2, 3). Ancak pahalı olması, yetmişmiş eleman ve gerekli donanım gerektirmesi bu yöntemlerin birçok merkezde uygulanmasını kısıtlamaktadır.

+4 °C de ve başka bir işlem yapılmaksızın 5 güne kadar saklanan periferik hematopoetik kök hücrelerin etkinliği çoğunluğu onkolojik malign tümörler (meme kanseri, sarkom, germ hücreli tümör, Hodgkin ve multipl myelom) olmak üzere birçok uygulamada gösterilmiştir (4, 5). Bu çalışmada kolay uygulanabilmesi ve ucuz olması da göz önüne alınarak hazırlama rejimi nispeten kısa olan hematolojik malign hastalıklarda +4 °C de saklanan hematopoetik periferik kök hücrelerin OPKHT' nu uygulanan hastalarda hematolojik düzelme üzerine olan etkinliği araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Haziran 1997 - Aralık 1998 tarihleri arasında 3 non-Hodgkin lenfoma (NHL), 1 Hodgkin hastalığı (HH), 3 multipl myelom (MM) ve 1 primer amiloidoz (PA) olmak üzere toplam 8 olguya +4 °C'de saklanan hematopoetik kök hücre desteğinde OPKHT yapılmıştır. Olguların 3' ü kadın 5' i erkek olup medyan yaş 43 (34-54)' dir. Hastaların klinik özellikleri tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. Hastaların klinik özellikleri

Toplam	8	
Cinsiyet (E/K)	5/3	
Yaş (medyan)	43 (34-54)	
Histoloji - M komponent	<u>NHL-HH</u>	<u>MM-PA</u>
Orta dereceli NHL	2	
Yüksek dereceli NHL	1	
Nodüler sklerozan HH	1	
igG		1
IgA		1
Hafif zincir		1
Evre		
II A-B	1	1
III A-B		2
IV B	3	
Hastalık durumu		
Sensitif relaps	3	
Kısmi yanıt	1	
Yanıtız		4

Mobilizasyon rejimi olarak 4 olguda yalnızca G-CSF (Neupogen, 5-10 µg/kg), 4 olguda ise kemoterapi (3 olguda siklofosfamid, 1 olguda DHAP) + G-CSF kullanıldı. Tek başına G-CSF ile mobilize edilen hastalarda 5. günde, kemoterapi + G-CSF ile mobilize edilen hastalarda ise lökosit sayısı 1000/|iL olduğunda aferez işlemine

başlandı Kök hücre toplama işlemi femoral kateter yoluyla ve Cobe BCT Spectra cihazıyla gerçekleştirildi. Üründeki mononükleer hücre (MNH) miktarı en az 2.5×10^8 /kg olana kadar lökafereze devam edildi. CD34 sayımları o dönemdeki teknik nedenlerden dolayı yapılamadı. Toplanan ürünler ilave bir işlem yapılmaksızın buzdolabında +4 °C de saklandı. Saklanma süresince sık aralarla plazma ile hücrelerin karışması ve "unfriendly coupling" önlenmesi amacıyla torbalar nazikçe karıştırıldı.

Hazırlama rejimi olarak MM ve PA' lı hastalarda melfalan (200 mg/m², 1. gün), NHL' li 2 olgu ile HH' li olguda CY (1.5 gr/m², 4 gün) + VP-16 (300 mg/m², 4 gün) + Mitoksantron (20 mg, 1. gün), NHL' li diğer olguda ise CY (1.5 gr/m², 4 gün) + VP-16 (300 mg/m², 4 gün) kullanılmıştır (Tablo 2). HH ve NHL' li hastalarda hazırlama rejimine 2. lökaferez sonrası aynı gün başlanmış, birinci gün toplanan ürünler en uzun 120, ikinci gün toplananlar ise 96 saat süreyle +4 °C de saklanmıştır. MM ve PA' lı olgularda ise hazırlama rejimine lökaferezdten bir gün sonra başlanmıştır. Uygulanan hazırlık rejiminden 24 - 48 saat sonra ürünler reinfüze edilmiştir. Kök hücre infüzyonundan 24 saat sonra büyüme faktörü başlanmış, nötrofil sayısı ardışık 3 gün 500 / JLL olana kadar devam edilmiştir.

Tablo 2. Hazırlama rejimleri

NHL-HH	n	MM-PA	n
CY (1.5 gr/m ² , 4 gün) + VP-16 (300 mg/m ² , 4 gün) + Mitoksantron (20 mg, 1. gün)	3	Melfalan (200 mg/m ² , 1. gün)	4
CY (1.5 gr/m ² , 4 gün) + VP-16 (300 mg/m ² , 4 gün)	1		

SONUÇLAR

Medyan 2 (1-3) aferez ile toplanan $5.7 (2.5-7.2) \times 10^8$ MNH/kg' dan oluşan ürünler ilave bir işlem yapılmaksızın 48-120 saat süre buzdolabında +4 °C de saklanmıştır, infüzyon öncesi "trypan blue dye exclusion test" yöntemi ile bakılan canlılık oranı % 75-93 olarak bulunmuştur. Tüm olgularda nötrofil engraftmanı medyan 15. (11-43) günde gerçekleşmiştir. 19. günde progresif hastalık nedeniyle kaybedilen 1 hasta (2 aferez ile toplanan ürünleri 48 ve 72 saat süreyle +4 °C de saklanan) dışındaki olgularda ise medyan 35. (12-49) günde trombosit engraftmanı olmuştur.

MM tandı bir olgu (trombosit engraftmanı gelişmeyen) progresif hastalık ve sepsis, HH olan bir olgu ise engraftman sonrası masif pulmoner hemoraji ile erken dönemde kaybedilmiştir (19 ve 47. günlerde). Her iki hastada da önceki çeşitli kemoterapi rejimlerine refrakter durumda OPKHT gerçekleştirilmiştir.

NHL tanılı kısmi yanıtli bir ve sensitif relapsli iki hastada tam remisyona sağlanmıştır. Refrakter MM tanılı 2 olgudan birinde tam remisyona, diğerinde ise kısmi yanıt elde edilmiştir. PA' lı hastada ise işlem sonrası klinik tabloda değişiklik gözlemlenmemiştir. Uzun dönemde NHL tanılı bir hasta yaklaşık iki yıl remisyonda izlendikten sonra takip dışı kalmıştır. 30. ayda nüks eden bir hasta 42. ayda kaybedilmiş, diğer bir hasta ise halen hastalıksız (6 yıl) olarak izlenmektedir. Kısmi yanıt elde edilen MM tanılı hasta 10. ayda tam yanıt elde edilen diğer MM lu hasta ise 42. ayda hastalık progresyonu ile, OPKHT sonrası stabil seyreden PA' lı hasta ise 5. yılda kaybedilmiştir.

TARTIşMA

Hastaların tümünde lökosit, erken dönem kaybedilen bir olgu hariç diğerlerinde trombosit engrafmanı izlenmesi, +4 °C'de saklanan kök hücrelerin yüksek doz tedaviye destek olarak kullanılabilceğini göstermektedir. +4 °C de saklanan ürünlerde infüzyon öncesi canlı hücre oranı aynı dönemde kliniğimizde uygulanan ve -80 °C de saklanan ürünler ile eşdeğer düzeyde (% 75 - 93) bulunmuştur. Hehler ve arkadaşları periferik kök hücreyi +4 °C de saklamanın etkinliğini göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada günlük olarak viabilite, granulosit-makrofaj koloni-forming ünit, eritroit burst forming ünit ve "mixed lineage" koloni-forming ünit ölçümleri yapmışlar ve bu yöntemin 5 güne kadar güvenle kullanılabilceğini belirtmişlerdir (4). Papadimitriou ve arkadaşları ise yüksek volümlü tek aferez ile topladıkları ürünleri +4 °C'de saklayarak hem yüksek volümlü aferezin hem de +4 °C de 24-48 saat süre ile ürünleri saklamanın etkinliğini göstermişlerdir (1).

Papadimitriou ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi yüksek volümlü tek bir lökaferez ile toplanan gün sayısının azaltılması, kök hücrelerin +4 °C derecede saklama süresini kısaltacağından viabilite üzerine olumlu etki gösterebilir.

KAYNAKLAR

1. Papadimitriou C, Dimopoulos M, Kouvelis V et al. Non-cryopreserved peripheral progenitor cells collected by a single very large-volume leukapheresis: A simplified and effective procedure for support of high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Apheresis* 2000; 15:236-241.
2. Jansen J, Thompson J, Dugan M. Peripheral blood progenitor cell transplantation. *Therapeutic Apheresis* 2002; 6(1):5-14.
3. Montanari M, Capelli D, Poloni A et al. Long-term hematologic reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: a comparison between controlled-rate freezing and uncontrolled-rate freezing at 80°C. *Transfusion* 2003; 43:42-49.
4. Hechler G, Weide R, Heymanns J et al. Storage of noncryopreserved peripheral blood stem cells for transplantation. *Annals of Hematology* 1996; 72(5):303-306.
5. Bezwoda R, Dansey R, Seymour L et al. Non-cryopreserved, limited number (1 or 2) peripheral blood progenitor cell (PBPC) collections following GCSF administration provide adequate hematologic support for high dose chemotherapy. *Hematol Oncol* 1994; 12(3):101-110.
6. Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, et al: Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: current practice in Europe in 1998. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 21(1):1-7.
7. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al: Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin lymphoma. *N Engl J Med* 1995; 333:1540.
8. Attal M, Harousseau: Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. *Hematol/Oncol Clin N Am.* 1997; 11 (1):133-146.

Bizim hastalarımızda ise 10 - 14 L günlük volüm ile medyan 2 günlük işlem gerekmiştir.

Günümüzde NHL, HH, MM ve akut lösemide otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonu, seçilmiş olgularda etkin bir tedavi yöntemi olarak önerilmektedir (6). Otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonunun kemosenitif relapsli agresif NHL ve MM da, standart kurtarıcı kemoterapiye üstün olduğu kanıtlanmıştır (7, 8). NHL tanılı hastalarımızdan birisi işlemden 6 yıl sonra tam remisyondadır. NHL tanılı diğer 2 hastadan biri remisyonda 2 yıl izlenmiş ancak daha sonra takip dışı kalmıştır, ikinci hasta ise 30 ay remisyonda kaldıktan sonra nüks ve progresyon nedeniyle 42. ayda kaybedilmiştir. Kısmi yanıt ve tam remisyona sağlanan MM' lu 2 olgu ile PA' lı bir olgumuz kök hücre transplantasyonu işleminde (sırasıyla) 10, 66 ve 60 ay sonra progresif hastalık nedeniyle kaybedilmiştir.

Sonuç olarak, düşük maliyeti, yetişmiş teknik eleman gerektirmemesi, volüm sorunu yaratmaması ve toksik madde içermemesi gibi avantajları nedeniyle kök hücrelerin +4 °C de saklanması oldukça cazip görünmektedir. Ancak engrafman sürelerinin dondurularak saklanmış kök hücrelerle yapılmış işlemlere göre uzun olması ciddi bir sorun olarak dikkati çekmektedir. Bunun nedeni toplanan kök hücre sayısının nispeten azlığı olabilir. Papadimitriou ve arkadaşlarının çalışmalarında gösterdiği gibi daha yüksek sayıda kök hücre toplanması ile bu durum değişebilir (1). Bu konuda diğer dondurma yöntemleri ile yapılacak prospektif çalışmalar aydınlatıcı olacaktır. +4 °C de kök hücre saklamanın BEAM, Bu/Cy gibi uzun süren hazırlama yöntemleri için uygun olmaması kullanımına önemli bir kısıtlama getirmektedir. Hazırlama rejimi birkaç gün içinde tamamlanabilen MM gibi hastalıklarda ise kök hücrelerin +4 °C de saklama işlemi oldukça avantajlı görünmektedir.