TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PERİFERİK HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE NAKİL ÜRÜNÜNDE CANLILIK DEĞERLENDİREN YÖNTEMLERİN KIYASLANMASI

Dr. Hacer DOĞAN VARAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman İLHAN

ANKARA
2013

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Hacer Doğan Varan	**Tarih:** 27 / 06 / 2013
Anabilim/Bilim Dalı	: İç Hastalıkları ABD	
Tez Danışmanı	: Prof.Dr.Osman İLHAN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: Periferik Hematopoietik Kök Hücre Nakil Ürününde Canlılık Değerlendiren Yöntemlerin Kıyaslanması

Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Osman İLHAN
Hematoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Ahmet DEMİRKAZIK
Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Doç.Dr.Filiz ÇAY ŞENLER
Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PERİFERİK HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE NAKİL ÜRÜNÜNDE CANLILIK DEĞERLENDİREN YÖNTEMLERİN KIYASLANMASI

Dr. Hacer DOĞAN VARAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman İLHAN

ANKARA
2013

(Ankara Tıplılar Vakfı tarafından desteklenmiştir.)

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

İç hastalıkları ihtisasım süresince, tecrübeleri ve bilgilerinden faydalandığım AÜTF İç hastalıkları Anabilim dalının değerli öğretim üyelerine ve yan dal araştırma görevlilerine,

Saygı ve sevgi çerçevesinde huzurlu bir uzmanlık eğitim süreci geçirmemde katkıları olan çok değerli çalışma arkadaşlarıma,

Fikirleri, tecrübeleri ve önerileri ile her zaman ufkumu açan ; enerjisini,çalışma azmini ve gençlere olan inancını kendime örnek aldığım,verdiği sorumluluklarla kendime kattığım nice güzelliği fark ettiğim, değerli tez danışman hocam, Prof. Dr. Osman İLHAN'a

Bu tez çalışmasının yürütülmesine özverili çalışmalarıyla katkıda bulunan; AÜTF Terapotik Aferez Merkezi biyoloğu Meltem BAY'a, AÜTF hematoloji laboratuar sorumlusu Yrd. Doç. Dr Klara DALVA ve akım sitometri laboratuarı biyoloğu Aydın ÖZTÜRK'e

Tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasında katkıları olan sayın Zeynep GENÇTÜRK'e

Hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteğini yanımda hissettiğim, karşılıksız sevgileri ve destekleri için biricik aileme ve yol arkadaşım, değerli eşim Özkan VARAN'a

Teşekkür ederim .

Dr. Hacer Doğan Varan

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

KISALTMALAR ..... **iv**

ŞEKİL VE TABLO DİZİN ..... **v**

1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **2**

2.1. Kemik İliği Nakline Tarihsel Bakış 2

2.1.1. Hematolojik Hastalıklar İçin Allogenik HKHN Uygulanması 3

2.1.2 Hematolojik Hastalıklar İçin Otolog HKHN uygulanması 4

2.1.3 Periferik Kök Hücre Uygulaması 5

2.1.4. Göbek kordonu kanı uygulaması 6

2.1.5. Türkiye'de Hematopoietik Kök Hücre Nakli 6

2.1.6. Türkiye Aferez Aktivitesi 7

2.2. Hematopoietik Kök Hücre Nakli Endikasyonları 7

2.2.1 Allogenik HKHN Endikasyonları 9

2.2.2. Otolog HKHN Endikasyonları 9

2.3. Hazırlama rejimi 10

2.4. Kök Hücre Graftı 11

2.4.3. Göbek Kordonu Kanı 14

2.5. Aferez İle Elde Edilen Hematopoietik Öncü Hücrelerin Dondurularak Saklanması 15

2.5.1. Hücrelerin dondurularak saklanması: 15

2.6. Hücresel Tedavi Ürünlerinde Canlılık Değerlendirilmesi 17

2.6.1. Metod 1. Tripan mavisi kullanarak hücresel canlılığın değerlendirilmesi: .. 18

2.6.2 Metod 2. Eosin Y ile Canlılık değerlendirilmesi 19

2.6.3. Metod 3.Akridin Oranj –Etidium bromid Kullanılarak Floresan Mikroskop İle Canlılık Değerlendirlmesi..... 19

2.6.4. Metod 4. Akımsitometri -7-Amino –Aktinomisin D (7AAD) ile Canlılık Değerlendirmesi..... 20

2.7. Periferik hematopoietik kök hücrelerin infüzyonu: 21

2.8. Engraftman..... 21

3.YÖNTEM VE GEREÇLER 23

3.1. Hastaların Çalışmaya Alınma Kriterleri 23

3.2. Hastaların Çalışmadan Dışlanma Kriterleri..... 23

3.3. Akridin Orange-Etidium Bromide İle Canlılık Değerlendirmesi 24

3.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Değerlendirilmesi..... 24

3.5. Eosin Y ile Canlılık Değerlendirilmesi..... 25

3.6. Akım sitometri- 7AAD ile Canlılık Değerlendirilmesi 25

3.6.1. Cihazda Okuma İşlemi..... 26

3.6.2. Analiz..... 26

3.7. Etik Kurul Onayı..... 27

3.8. İstatistiksel Analiz..... 27

4. BULGULAR..... 29

7. TARTIŞMA..... 36

6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 41

ÖZET 42

SUMMARY 44

KAYNAKLAR 46

KISALTMALAR

TP : Tripan mavisi

AO/EB : Akridin oranj-Etidyum bromid

EO : EosinY

7AAD : 7 Amino- Aktinomisin D

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

TVI : Total vücut ışınlaması

HKH : Hematopoietik kök hücre

HKHN : Hematopoietik kök hücre nakli

PHKH : Periferik hematopoietik kök hücre

PHKHN : Periferik hematopoietik kök hücre nakli

HLA : Human lökösit antigen

GVHH : Graft versus host hastalığı

G-CSF : Granülosit koloni uyarıcı faktör

GM-CSF : Granülosit monosit koloni uyarıcı faktör

TKİ : Tirozin kinaz inhibitörü

HKH(GK) : Hematopoietik kök hücre göbek kordonu

ATP : Adenozin trifosfat

GVT : Graft versus tümör

DLI : Donör lenfosit infüzyonu

HT : Hücresel tedavi

SF : Serum fizyolojik

FGZ : Faz geçiş zamanı

WBMT : The Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation

ŞEKİL VE TABLO DİZİN

Şekil 1. Akımsitometri-7AAD yöntemi ile canlılık değerlendirilmesi..... 21
Şekil 2. Akridin Orange Etidiyum Bromide yöntemi ile canlılık değerlendirmesi. 24
Şekil 3. Flowsitometri-7AAD yöntemi ile CD45+ hücrelerde canlılık değerlendirmesi27

Tablo 1. HKHN'nin Sık Olarak Kullanıldığı Hastalıklar 8
Tablo 2. CD34 sayısı ve direk üründe canlılık yüzdelerine ait veriler..... 29
Tablo 3. RPMI'lı üründe canlılık yüzdelerine ait veriler..... 29
Tablo 4. RPMI'lı ürün ile direk üründeki canlılık yüzdelerine ait istatistikler..... 34

Grafik 1. Akridin oranj-Etidyum Bromide- 7AAD (direk ürün)..... 30
Grafik 2. Eosin Y- Akım sitometri -7AAD (direk ürün)..... 30
Grafik 3. Tripan mavisi- Akım sitometri -7AAD (direk ürün)..... 31
Grafik 4. Akridin oranj-Etidyum bromid – Akım sitometri -7AAD (RPMI'lı ürün).... 31
Grafik 5. Eosin Y- Akım sitometri -7AAD (RPMI'lı ürün)..... 32
Grafik 6. Tripan mavisi - Akım sitometri -7AAD (RPMI'lı ürün)..... 34

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hematolojik malignitelerde, bazı solid tümörlerde ve kemik iliği yetmezliği oluşturan durumlarda tedavi amacı ile periferik hematopietik kök hücre nakli (PHKHN) artan sıklıkta kullanılmaktadır. Nakil öncesi hastanın kendisinden veya allogenik vericiden toplanan periferik hematopoietik kök hücreler (PHKH) çoğunlukla dondurularak saklanmakta ve nakil sırasında çözülerek hastaya infüze edilmektedir. Dondurma sırasındaki işlemlerde[1]ve çözme sırasında hücre kayıpları oluşmaktadır.

PHKHN ürünlerinin biyolojik veya terapotik etki sağlayabilmesi içeriğindeki canlı hücrelerle mümkün olmaktadır. PHKH'lerin dondurularak saklanmasından hastaya infüze edilmesine kadar olan süreçte meydana gelen hücre kayıplarının belirlenmesinde (canlılık oranı tespiti) farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Günümüzde hücresel kayıpları saptamada en değerli izlem ölçütü, hematopoietik dokunun kültür ortamında koloni oluşturma yetisinin değerlendirilmesidir. Hücre kültürü 7-14 gün süren bir değerlendirmeyi gerektirmektedir. Bu nedenle, nakil öncesi hastaya verilecek PHKHN ürününde canlılık oranını erken saptamada pratikte sıklıkla Tripan mavisi (TP) ve Eosin Y(EO) gibi konvansiyonel metodlar ve flöresan boyalar (akridin oranj-etidyum bromid(AO/EB)) kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, canlılık değerlendirmesinde sık kullanılan TP,EO,AO/EB yöntemleri ile pratikte kullanılmayan ancak daha objektif bir yöntem olan akım sitometri- 7 Amino- Aktinomisin D (7AAD) yöntemi kıyaslandı.

Hangi yöntemin akım sitometri-7AAD yöntemini ile daha uyumlu sonuçlar verdiği ve canlılığı daha güvenilir bir şekilde saptadığının belirlenmesi amaçlandı

Ayrıca bu çalışmada, nakil ürününe dondurma sırasında kriyoprotektan amaçlı eklenen ancak oda ısısında toksik kabul edilen dimetilsülfoksit (DMSO)'nun seyreltilmesinin, canlılık oranları ve canlılık değerlendirmesi üzerine etkisi de araştırıldı.

PHKHN ürününde pratikte sık kullanılan canlılık değerlendiren yöntemler ile akım sitometri-7AAD yöntemini kıyaslayan bu çalışma, literatürde yapılan ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik İliği Nakline Tarihsel Bakış

Hematopoietik hücrelerin hematolojik hastalıkların tedavisi için kullanılması 19.yüzyılın sonlarında tarif edilmiştir. Tıbbi bir tedavi olarak hematopoietik hücrelere duyulan ilgi, nükleer silahların ve enerji santrallerinin geliştirilmesini takiben, II. Dünya Savaşından sonra hızlanmıştır.

Radyasyonun hayvanlarda hematopoiezi doza bağımlı olarak bir şekilde baskıladığı, yüksek dozlarda kemik iliği fonksiyonunun kaybolduğu belirtilmiştir. Radyasyona maruz bırakılan hayvanın korunmuş olan kemik iliği ve dalağından gelen veya radyasyona maruz bırakılmamış hayvandan gelen hematopeietik hücrelerin, miyeloablatif radyasyon hasarını düzeltebildiği saptanmıştır.

1950'lerin ortalarında bir fare lösemi modelinde, total vücut ışınlaması (TVI) ve bunu takiben homolog hayvanlardan alınan kemik iliği hücrelerinin uygulanmasının, aksi durumda ölümcül olacak olan lösemi hücreleri dozunu eradike ettiği ve hematopoiezi düzelttiği saptanmıştır [2].

1957'de, ilerlemiş lösemi olan hastalara TVI, bunu takiben normal kişilerden kemik iliği hücreleri verilmiştir. Geçici engraftman sadece bir hastada gözlenmiştir ve hiçbirisinde devam eden yarar olmamıştır.

1959'da bir nükleer enerji santralinde çalışanlar, kaza ile radyasyona maruz kalmışlardır. Zararlı etkileri geri döndürmek üzere sağlıklı kişilerden alınan kemik iliği hücreleri uygulanmış, ancak yarar gözlenmememiştir [3]. Ama bu deneme, hematopoietik kök hücre nakline (HKHN) karşı genel bir ilgi uyandırmış ve 30 yıl sonra Çernobil nükleer reaktör kazasının kurbanları için HKHN denenmiştir [4]. Altı hastada geçici engraftman gerçekleşmiştir, hastaların çoğunda endojen hematopoietik düzelme sağlamasına rağmen, nakil yapılan 13 hastanın 2'si sağ kalmıştır. Ölümlerin büyük çoğunluğu yanıklara ve nonhematopoietik radyasyon toksisitelerine bağlı olarak gerçekleşmiş, 2 hasta graft- versus- host hastalığına (GVHH) bağlı olarak ölmüştür.

2.1.1. Hematolojik Hastalıklar İçin Allogenik HKHN Uygulanması

Hematolojik maligniteleri tedavi etmek için verilen radyasyon tedavisinin miyelosüpresif etkilerini hafifletmek amacı ile HKHN uygulanmak üzere çok sayıda araştırmacı tarafından başka denemeler yapılmıştır.

Lösemiyi tedavi etmek için yapılan ilk denemelerde TVI ve bunu takiben kemik iliği hücrelerinin infüzyonu uygulanmıştır. Daha sonra tedavi rejimine siklofosfamid eklenmiştir. Bundan sonra busulfan ve antitimosit globulin gibi diğer ajanlar uygulanmıştır.

HKHN'nin ilk sonuçları başarısız olmuştur. 1970'lerin başlarına kadar biriken insan deneyimi, az sayıda hastada yarar sağlandığını ortaya koymuştur.Verici engraftmanı, transplantların yarısından azında gerçekleşmiş ve bu şekilde tedavi edilen 200'den fazla hastadan sadece birkaçı sağ kalmıştır [5].

Bu sebeple 1960'lı yıllarda klinik HKHN'ne ilgi azalmış olup araştırmacılar hayvan çalışmalarına dönmüşlerdir.

Hayvanlarda yapılan kapsamlı çalışmalara dayalı olarak HKHN ile ilgili erken denemelerin başarısızlığı, vericiler ile alıcılar arasındaki doku uygunluk (histokompatibilite) sorunlarına atfedilmiştir. 1960'da Burnet ve Medavar'a transplantasyon alanının başarısını belirleyen edinsel immünolojik toleransı keşfettikleri için Nobel ödülü verilmiştir [6].

HLA (Human lökösit antigen) sisteminin anlaşılmasında ve klinik HLA tip tayini uygulamasındaki ilerlemeler 1970'lerde klinik transplantasyona ilgiyi yeniden uyandırmış, allogenik HKHN'de güvenilir verici engraftmanını sağlamak üzere kesin şekilde uyumlu vericinin gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Transplantasyon ile yakından ilgili alanlarda gerçekleşen ilerlemeler de sonuçların iyileşmesine yardımcı olmuştur. Trombosit infüzyonu, trombositopeniye bağlı fatal kanama riskini azaltırken, daha etkili antibiyotikler ve aplazi esnasında bunların kullanımı ile ilgili daha yeni stratejiler de fatal enfeksiyon riskini azaltmıştır.

Transplantasyondan sonra yeni immünsüpresif rejimlerin kullanımı hem graft reddini, hem de GVHH riskini çok düşürmüştür. Akraba olmayan bir vericiden ilk HKHN 1979'da gerçekleşmiştir; akut lösemisi olan bir hastaya HKHN uygulanmış ve hastada 2 yıl süre ile GVHH olmaksızın lösemi saptanmamıştır.

Daha sonraki on yıllarda HLA tip tayinindeki ilerlemeler ile vericilerin daha hassas bir şekilde seçilmesi, yeni antimikrobiyaller ile fatal enfeksiyon risklerinin azaltılması, pretransplant tedavideki düzenlemeler ile toksisitenin azaltılması ve yeni geliştirilen immunsüpresif ajanlarla (siklosporin ve metotreksat kombine kullanımı) transplant sonuçları artan bir şekilde iyileşmiştir. Daha uzun takiple birlikte sağkalım eğrilerinde bir plato görülmüştür. Bu durum, HKHN'nin bazı hastalarda şifa sağladığına işaret etmiştir.

2.1.2 Hematolojik Hastalıklar İçin Otolog HKHN uygulanması

Çoğu kemoterapi ve radyoterapi rejimlerinin amacı kanser hücrelerini eradike etmek olmasına rağmen, sağlıklı hematopoietik kök hücreler (HKH) de doza bağımlı bir şekilde tahrip olur.

Bazı kanserlerde (özellikle hematolojik malignitelerde), dozun artırılması ile daha fazla malign hücre harabiyeti böylece daha sık ve uzun süren yanıtlar elde edilebilir. Ancak, böyle yoğun tedavi rejimlerinden sonra derin miyelosupresyon hatta ölümcül myeloablasyon oluşabilir. Öncelikle hayvanlarda ve daha sonra hastalarda, önceden toplanmış olan otolog hematopoietik kök hücrelerin infüzyonu ile hematopoiezin düzeltilebileceği bildirilmiştir.

1950'lerden itibaren kemik iliği hücrelerinin soğutularak başarılı bir şekilde korunabileceği bilinmesine rağmen, bu ilgi daha sonradan genel klinik kullanıma girmiştir. 1959'da üç lösemi hastası TVI ile tedavi edilmiştir ve bunu takiben remisyon esnasında toplanmış olan otolog kemik iliği uygulanmıştır [7]. 1960'ların başlarında, yüksek doz kemoterapi ve/veya radyoterapiye bağlı gelişen miyelosupresyonun düzelmesini kolaylaştırmak için kemik iliğinden alınan otolog hematopoietik hücreler kullanılmıştır [8].

Ne yazık ki, bu erken denemelerden hastaların klinik yarar görüp görmediği kolay anlaşılamamıştır. Hematopoiezin düzelmesinin, infüze edilen kemik iliğinin mi sonucu olduğu, yoksa rezidüel kemik iliğinin spontan iyileşmesi mi olduğu belirlenememiştir. İnfüze edilen kemik iliğindeki malign hücrelerin relapstan sorumlu olup olmadığı da bilinmemekteydi.

1970'lerin sonlarında, otolog hematopoietik hücrelerin yüksek doz kemoterapiyi kolaylaştırmak açısından yararları daha inandırıcı bir şekilde gösterilmiştir [9].

1980'lerde kriyoprezervasyon ve hücre işlenmesinde ilerlemeler, otolog HKHT'nin daha yaygın klinik uygulamasına yol açmıştır.

Otolog HKHN ile birlikte yüksek doz kemoterapi, Hodgkin dışı lenfoma Hodgkin lenfoma ve multiple myeloma gibi ancak yüksek doz kemoterapiye karşı cevap oluşturulan hastalıklar ve bazı solid tümörler için ideal bir terapotik seçenektir.

2.1.3 Periferik Kök Hücre Uygulaması

Başlangıçta kemik iliği hem allogenik, hem de otolog HKHN için kök hücre graftlarının kaynağı idi. Bu mantıklıydı, çünkü kemik iliği hematopoietik hücrelerin en zengin kaynağıdır ve normalde dolaşımda az sayıda hematopoietik öncüler bulunur. Ancak, dolaşımdaki hematopoietik hücrelerin sayısı, konvansiyonel doz kemoterapiden sonra iyileşme dönemi esnasında ve granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) veya G-CSF ilaveten pleriksafor uygulamasından sonra önemli derecede artar. Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) veya eritropoietin gibi diğer hematopoietik büyüme faktörleri de dolaşımdaki hematopoietik hücrelerde daha az derecede de olsa artışa neden olur.

Kemik iliğinden alınan hematopoietik kök hücreleri (HKH, kemik iliği) büyüme faktörü ‘‘mobilizasyonu’’sonrasında, periferik kan öncü hücreleri (HKH,PHKH) ile karşılaştıran randomize çalışmalar, mobilize periferik kan graftları kullanılarak benzer tedavi sonuçları ile birlikte daha hızlı engraftmanı ortaya koymuştur [10,11]. Günümüzde, otolog HKHN'de graft kaynağı olarak daha çok periferik kök hücreler kullanılır; çünkü daha fazla sayıda kök hücre toplanır, toplama işlemi nispeten daha kolaydır ve hasta için daha uygundur.

2.1.4. Göbek kordonu kanı uygulaması

Göbek kordonu kanı hematopoietik kök hücrelerden zengindir. Doğumda, anne ve bebek için herhangi bir tehlike olmaksızın toplanabilir. Test ve kriyoprezervasyondan sonra göbek kordonu kanı dünyadaki çeşitli bankalarda saklanır ve göbek kordonu kanı kayıtlarında listelenir.Test daha önceden tamamlanmış olduğu için kriyoprezervasyon yapılmış uygun verici birimleri, transplant için çok hızlı bir şeklide hazırlanabilir.

Göbek kordonunun immun hücreleri olgunlaşmamış olduğu için alıcılar tarafından HLA farklılığı daha iyi tolere edilebilir ve iki antijene kadar uyumsuzluk olan bir birim uygun bir graft olabilir [12]. Göbek kordonu kanı, transplanta gereksinimi olan ama uygun bir kardeş vericisi olmayan çocuklar için de tercih edilen bir seçenek haline gelmiştir. Erişkinlerde, bir göbek kordonu birimindeki hematopoietik kök hücrelerin sayısı güvenilir engraftman için yeterli olmayabilir. Erişkinlerde, multiple göbek kordonu kanı, multiple göbek kordonu kanı birimlerinin ve deneme safhasında olan diğer stratejilerin kullanımı araştırılmaktadır.

2.1.5. Türkiye'de Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu

Türkiye'de ilk kemik iliği nakli 1984 yılında Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde uygulanmıştır.

Türkiye'de ilk otolog periferik kök hücre nakli 1992 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Nakli Ünitesi'nde Hodgkin Dışı Lenfomalı bir olguya yapılmıştır. Takiben 1993 yılında, aynı merkezde graft reddi gelişen aplastik anemili bir olguya ilk allogeneik periferik kök hücre nakli gerçekleştirilmiştir. Türkiye'de ilk allogeneik kordon kanı kök hücre nakli yine Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Nakli Ünitesi'nde Ekim 1995'te bir Talasemi olgusuna uygulanmıştır. 1990'lı yılların başında birkaç merkezde uygulanmaya başlayan HKHN yılda 10 civarında iken, 2012 yılı itibariyle Sağlık Bakanlığı onaylı 60 merkezde yılda yaklaşık 2600 hematopoietik kök hücre nakli yapılmaktadır.

2.1.6. Türkiye Aferez Aktivitesi

Türkiye'nin ilk Aferez Ünitesi 1994'de Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde kurulmuştur.

1998 yılında Türkiye'de toplam 31 farklı aferez merkezinde 30.136 aferez işlemi gerçekleştirilmiştir. 10 merkezde, 82 allogeneik vericiden 145 PHKH aferezi, 17 merkezde 271 otolog vericiden toplam 981 PHKH aferezi gerçekleştirilmiştir [13].

Türkiye Aferez Derneği 2000 yılında kurulmuştur. 2010 yılında Sağlık Bakanlığı tarafından terapotik aferez kuralları yayınlanmıştır. Bu düzenleme ile Türkiye'deki merkezlerin uluslararası kalite normları ile uyum sağlayan bir yapılanmaya sahip olmasına olanak sağlanmıştır. Sağlık Bakanlığı tarafından gerçekleştirilen bu düzenleme kapsamında aferez eğitim merkezleri oluşturumuş,kalifiye eleman sayısı artırılmıştır. Aferez ve kök hücre nakli uygulamaları her geçen yıl artmıştır.

2011 yılı itibariyle 31 farklı şehirde Sağlık Bakanlığı onaylı toplam 53 aferez merkezi mevcuttur. 2012 de bu rakam 60 merkeze yükselmiştir. 2011 yılı itibariyle toplamda yaklaşık 50.000 donör aferezi gerçekleştirilmiştir [13]. Bu verilerle Türkiye Avrupa'nın 5. en çok kök hücre nakli yapılan ülkesi olmuştur.

2.2. Hematopoietik Kök Hücre Nakli Endikasyonları

The Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT) verilerine göre 2013 yılı itibariyle dünyada toplam bir milyon hastaya HKHN yapılmıştır. Her yıl dünya çapında 50.000'den fazla yeni hastaya HKHN gerçekleştirilmektedir. Bu nakillerin %53'ü otolog %47'si allogeneik nakildir. Lösemi ve miyelodisplastik sendromlar, allogenik HKHN'lerinin 2/3'ünden sorumlu iken, multiple myelom ve Hodgkin dışı lenfoma otolog HKHN'lerinin 2/3'ünden sorumludur [14].

Belirli bir hastada HKHN'nin düşünülmesi kararı, HKHN dışı tedavilerin sürekli hastalık kontrolu sağlama olasılığının ve hastanın işlemi tolere etmesi konusunda fizyolojik uyumluluğun değerlendirilmesini içerir. Allogenik HKHN için

uygun verici ön koşul iken, otolog HKHN açısından yeterli sayıda kök hücre toplanması ön koşuldur. HKHN'nin düşünülebileceği hastalıklar Tablo 1'de sıralanmıştır.

Tablo 1. HKHN'nin Sık Olarak Kullanıldığı Hastalıklar

Hastalık	**Hastalık Durumu**	**HKHN Tipi**
Akut myelojen lösemi	Relapstan sonra Yüksek riskli sitogenetik varsa ilk remisyonda İlk indüksiyona yanıtsız	Allogenik
Akut lenfoblastik lösemi	Relapstan sonra Yüksek riskli sitogenetik varsa ilk remisyonda İlk indüksiyona yanıtsız	Allogenik
Miyelodisplastik sendromlar	Aşırı yüksek sayıda blast veya yüksek riskli sitogenetik veya çok hatlı sitopeniler	Allogenik
Kronik miyolejen lösemi	Tirozin kinaz inh.başarısızlığı Hızlanmış safha Blastik kriz	Allogenik
Kronik lenfositik lösemi	Daha agresif davranışla birlikte veya yüksek riskli sitogenetikle birlikte relapstan sonra	Allogenik
Aplastik anemi	Ciddi kategori	Allogenik
Miyeloproliferatif hastalıklar	Kemik iliği yetersizliği ile birlikte harcanmış safha veya yaklaşmakta olan kemik iliği yetersizliği ile birlikte yüksek riskli özellikler veya akut lösemiye ilerleme	Allogenik
Beta talasemi veya orak hücre anemisi gibi hemoglobinopatiler	Yüksek riskli prognostik özelliklerle birlikte olan hastalık durumu	Allogenik
İleri evre Hodgkin dışı lenfoma	Relapstan sonra İlk remisyonda yüksek riskli özellikler	Otolog
Erken evre Hodgkin dışı lenfoma	Kısa ilk remisyon veya agresif davranış veya Richter transformasyonu ile relapstan sonra	Otolog veya Allogenik
Hodgkin hastalığı	Relapstan sonra veya ilk tedaviye yanıt yoksa	Otolog
Multiple myelom	İlk remisyonda Relapstan sonra	Otolog Otolog
Nöroblastoma	İlk remisyonda ilerlemiş safha	Otolog
Pediatrik merkezi sinir sistemi tümörleri	Agresif malignite	Otolog

2.2.1 Allogenik HKHN Endikasyonları

Allogenik HKHN, akut ve kronik lösemi, myelodisplastik sendromlar veya aplastik anemi olan hastalar için terapotik bir seçenektir [15, 16]. Akut miyelojen veya lenfoblastik lösemi olan hastalarda, lösemi ilk indüksiyon tedavisine yanıt vermezse veya ilk yanıttan sonra relaps gelişirse, allogenik HKHN düşünülür. İlk remisyonda olan hastalarda kemoterapi ile sürekli kontrol olasılığının düşük olacağına işaret eden belli sitogenetik anomaliler, HKHN için endikasyon olarak kabul edilir. Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) ile kronik miyelojen lösemi de sürekli kontrol elde edilebildiği için, günümüzde Allogenik HKHN sadece TKİ ile yanıtsız duruma geçen veya hastalığı hızlanmış safhada olan veya blast krizinde olan hastalarda düşünülür. Miyelodisplastik sendrom olan hastalarda, aşırı blast sayısı varsa, olumsuz sitogenetik bulgular varsa allogenik HKHN gündeme alınır. Ciddi aplastik anemi olan hastalarda, uygun kardeş verici varsa, allogenik HKHN planlanır. Diğer miyeloproliferatif hastalıklar,ciddi orak hücreli anemi, talasemi ve diğer ciddi hematolojik hastalıklarda zaman zaman allogenik HKHN yapılabilmektedir.

2.2.2. Otolog HKHN Endikasyonları

Otolog HKHN, multiple miyelom veya lenfoma olan hastalar için terapotik bir seçenektir [15, 16]. Multiple miyelom hastaları için otolog HKHN'nin bir sağkalım avantajı sağladığı gösterilmiştir ve bu nedenle hastalık yükünü azaltmak üzere ilk kemoterapi küründen sonra düşünülür. Klinik çalışmalar, ardışık HKHN'nin multiple myelom olan hastalarda, ek sağkalım yararı sunabileceğini göstermektedir.Özellikte ilk transplantta yanıtı tam olmayan agresif lenfoma olan hastalarda, otolog HKHN relapstan sonra planlanır. Agresif lenfoma formlarının olduğu bazı hastalarda, otolog HKHN ilk remisyonda da gündeme alınabilir.

İlerlemiş nöroblastoma, tekrarlayan veya inatçı Hodgkin hastalığı, tekrarlayan erken evreli Hodgkin dışı lenfoma, pediatrik merkezi sinir sistemi tümörleri ve tekrarlayan testiküler karsinom gibi diğer hastalıklarda otolog HKHN ile şifa sık elde edilirken, multiple myeloma gibi diğer hastalıklarda şifa elde edilemez, ama HKHN uzun süreli remisyon ile sağ kalımın uzamasını sağlar.

Transplant süreci üç temel öğeye ayrılabilir: Hazırlama rejimi, kök hücre infüzyonu ve destekleyici bakım önlemleri.

2.3. Hazırlama rejimi

Hazırlama rejiminin hedefleri Allojenik ve Otolog HKHN için farklıdır [15].

Otolog transplantasyonda hedef mümkün olduğu kadar çok kanser hücresini öldürmektir . Hazırlama rejimi, altta yatan hastalığa karşı etkili olmak üzere seçilmiş ajanlardan (ilaçlar ve/ veya radyoterapi) oluşur . Bu ajanların arzu edilen özellikleri doğru bir anti-tümör doz-yanıt eğrisi ve ciddi hematopoietik dışı toksisite olmamasıdır. Altta yatan kanserin tipine bağlı olarak otolog HKHN için çeşitli hazırlama rejimleri uygundur.

Hepatik veno-oklüziv hastalık, interstisyel pnömoni, mukozit ve hemorajik sistit gibi toksisiteleri en düşük düzeye indirmek için hazırlama rejimleri yıllar içerisinde iyileştirilmiştir.

Allojenik HKHN için hazırlama rejiminin hedefi, sadece anti-tümör etki değil, aynı zamanda graft atılımını önlemek için alıcı immünitesinin de baskılanmasıdır. Sadece sınırlı sayıda ajan hem immünsüpresif, hem de anti-tümör aktiviteye sahiptir; bu nedenle, geçmişte allojenik HKHN'de sadece birkaç hazırlama rejimi yaygın olarak kullanılmıştır (en sık siklofosfamid ve total vücut irradyasyonu). Busulfan immünsüpresif değildir, ama güçlü miyeloablatif özellikler gösterir; siklofosfamidle birlikte allojenik hazırlama rejiminde yararlıdır.

Güçlü immünsüpresif aktivitesi olan, ama daha az sitotoksisitesi olan ilaçların (örneğin, Fludarabin, kladrabin ve pentostatin gibi pürin analogları) ve antitimosit globülin ile alemtuzumab gibi güçlü T hücre antikorlarının kullanmaya başlanması, allojenik HKHN için hazırlama rejimlerinde etkili olan ajan sayısını artırmıştır [17], [15].

Ayrıca, allojenik HKHN'de yoğunluğu azaltılmış hazırlama rejimleri üzerinde artan ilgi hazırlama rejiminin anti-tümör özelliklerini daha az dikkate alırken, graftın

adaptif immünoterapotik özelliklerinden faydalanarak bir dizi yeni hazırlama rejiminin ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur.

Allojenik HKHN, aplastik anemi gibi bir kemik iliği yetmezliği durumu için uygulandığı zaman anti- tümör aktiviteye gereksinim yoktur ve tek başına immünsüpresif özellikleri olan bir hazırlama rejimi yeterlidir. Tek ajan olarak siklofosfamid bu bağlamda sık rastlanan bir seçimdir.

2.4. Kök Hücre Graftı

Kök hücre graftının birinci ve en önemli amacı, hematopoiezi yeniden sağlamaktır [15, 18]. Hematopoietik güç CD34 + hücre içeriği ile ilişkilidir. Otolog HKHN'de optimal nötrofil geri kazanımı sağlamak üzere, alıcının vücut ağırlığı başına 2- 2.5 X 10^6 lık bir CD34 dozu yeterlidir [19]. Trombosit geri kazanımını optimize etmek üzere CD34 + hücre dozunun ≥5x10^6 /kg yeterlidir. Allogenik ortamda klinik gözlemler, immün hücrelerin kanseri kontrol etmek açısından rolünü aydınlattıktan sonra graftın immün gücü üzerinde de ilgi oluşmuştur. T lenfositlerinin azalmasının, allogenik HKHN'den sonra relaps riski ile ilişkili olduğu görülmüştür. Verici lenfositlerinin, allogenik HKHN'den sonra relaps gelişmiş olan hastalarda tekrar remisyon oluşturabildikleri gözlenmiştir. İmmünoterapotik güç, CD3+ hücre içeriği ile ilişkilidir ve alıcının vücut ağırlığı kg'ı başına 10^7- 10^8 CD3+ hücresi içeren donör lenfosit infüzyonlarının (DLI) genellikle HKHN'den sonra, relapsı önlemek için verildiği zaman güçlü anti-tümör etkileri vardır. Ancak daha yüksek CD3+ sayıları, daha fazla GVHH riski ile de ilşkilidir . Günümüzde, ciddi GVHH'e neden olmaksızın optimal anti-tümör aktiviteye sahip bir CD3+ hücre dozunun bulunması ve/veya GVHH'yi en az düzeye indirirken, antitümör etkileri en yüksek düzeye çıkaracak hücre alt gruplarının belirlenmesi umut edilmektedir .

HKHN için üç kök hücre kaynağı kullanılmıştır. Geçmişte kemik iliği en sık kullanılan kaynak olmuştur. Ancak son 20 yıl içinde periferik kandan alınan hücreler, kemik iliğinden alınan hücrelerin yerini almıştır. Günümüzde, allogenik HKHN vakalarının çoğunda ve otolog HKHN vakalarının %90'ından fazlasında Periferik hematopoietik kök hücre (PHKH) kullanılmaktadır. Üçüncü kaynak olan göbek kordon kanı, özellikle çocuklarda akraba dışı allogenik HKHN için giderek popüler olmaktadır.

2.4.1.Kemik iliği

Kemik iliği olgun hematopoietik hücreler ve kök hücreler gibi olgunlaşmamış hematopoietik öncülerin bir karışımını içerir. Hematopoietik kök hücreleri,farklılaşma olmaksızın kendi kendine yenilenme kapasitesi ve bütün hematopoietik soylara farklılaşabilme becerisi ile karakterizedir. CD34, Thy-1 ve c-kit belirteçleri taşırlar ve diğer belirteçler açısından negatiftirler [20]. Kemik iliği hücrelerinin yaklaşık olarak %1-3 ü CD34+ dir ve CD34+ hücrelerin sadece küçük bir bölümü, daha primitif olan fenotipe sahiptir. Ancak CD34+ hücre fraksiyonu kök hücre olmayan birçok hücre içermesine ve kök hücreler sadece küçük bir bölümü oluşturmasına rağmen, CD34+ hücrelerin sayısı hızlı bir şekilde ölçülebilir ve çok sayıda çalışma bunun hematopoietik gücün güvenilir bir ölçüsü olduğunu saptamıştır.

Kemik iliği hücreleri, genel anestezi altında posterior iliyak krestlerden multiple iğne aspirasyonu ile toplanır ve hedef olarak alıcı vücut ağırlığı kg'ı başına 2-5x10^8 lökosit sayısı elde etmek üzere 10-20 ml /kg'lik bir hacim hedeflenir. Örneğin ve uygulamanın kalitesine göre, bu materyalin %25-75' i kontamine olmuş periferik kandır. Çıkarılan kemik iliği hacmi,toplam kemik iliği hacminin sadece %1-5'ini temsil eder; kemik iliği toplanması lökosit ve/veya trombosit sayılarında sadece geçici değişikliklerle sonuçlanır ve bilinen uzun vadeli hematopoietik sonuçları yoktur. Ancak, vericilerde anemi oluşabilir ve kemik iliği alındıktan sonra eritrosit geri kazanımını kolaylaştırmak üzere, genellikle demir desteği sağlanır. Kan sayımı bir ay içerisinde normalleşir . Kemik iliği alınmasına bağlı ciddi komplikasyonlar nadir görülür (bütün uygulamaların %1.5'inden azında) [21]. Daha hafif olarak; kemik iliği alım bölgesinde ağrı, genel anestezi uygulamak için kullanılan entübasyona bağlı boğaz ağrısı ve anestezi sonrası başağrısı sık görülen komplikasyonlardır.

2.4.2.Periferik Kan

Kemoterapi veya G-CSF vasıtası ile periferik kana mobilize edilen öncü hücreler, giderek artan bir şekilde graft kaynağı olarak kullanılmaktadır [16]. PHKH'nin HKH(K)'ye üstünlükleri daha hızlı engraftman ve potansiyel olarak toplamaya karşı

daha iyi toleranstır, çünkü genel anestezi gereksinimi yoktur. Otolog durumda, kemik iliğinde tümör bulunduğu zaman HKHN'nin tümör kontaminasyonu daha az olabilir.

Allogenik HKHN söz konusu olduğunda yaklaşık 10 kat daha fazla olgun lenfoid hücre vardır bu durum bir dezavantaj (daha fazla GVHH'ye neden olur) veya avantaj (graft versus tümör etkisi oluşturmak üzere daha fazla lenfoid hücre ve alıcıya karşı graft reddini yönetebilen immünite) olabilir.

PHKH'nin CD34+ hücreleri daha az sayıda adezyon molekülü (VLA-4) taşırlar [22]. Bunların G0-G1 safhasında olma olasılığı yüksektir [23] ve kendi kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler [24], kemik iliği öncü hücreleri ile karşılaştırıldığında büyüme faktörlerine yanıt olarak klonogenik potansiyelleri daha yüksektir. PHKH'deki T lenfositleri, kanda mevcut T lenfositlerinden de farklıdır. Bunlar Th1'den Th2 immunofenotipine kadar kutuplaşma gösterirler ve bu nedenle akut GVHD'ye neden olma olasılıkları daha düşükken [25], kronik GVHH oluşturma olasılıkları daha yüksektir. PHKH 50 kat daha fazla monosit içerir ve HKH(Kemik iliği)'ne göre anlamlı derecede daha fazla lenfoid dentritik hücre kapsar; bu hücreler, PHKH graftında T hücrelerinin alloreaktif potansiyelinin azalmasına katkıda bulunabilir. PHKH graftlar daha fazla natural killer hücre de içerir [26]. Bu farklar toplu olarak allogenik HKHT'de PHKH'nin GVHH ve GVT etkilerinde önemli biyolojik role sahiptir.

G-CSF'nin bir yan etkisi olan kemik ağrısı, PHKH toplanmasının en sık görülen komplikasyonudur [21, 27]. Toplama işlemlerinin %1'inden azında ciddi istenmeyen olay oluşur [21, 28]. G-CSF'nin uzun vadede hematopoietik toksisiteleri hakkında endişeler ifade edilmiştir, ama bugüne kadar PHKH vericilerde bunlar belgelenememiştir. Özellikle allogenik transplantta, kemik iliği ile periferik kan kök hücreleri arasındaki seçim için göz önünde tutulması gereken verici faktörleri: Uygun periferik venöz giriş (santral venöz kateter yerleştirilmesinden kaçınmak için),homolog kan transfüzyonu olasılığı (kemik iliğinden hücre alınan yaşlı kişilerde daha olası), kemik iliğinden hücre alınmasını zorlaştırabilecek morbid obezite veya ortopedik bir hastalık ve G-CSF'ye karşı alerji veya G-CSF ile alevlenebilecek inflamatuar göz hastalığı veya otoimmun hastalık öyküsüdür.

Alıcı açısından ise yukarıda belirtilmiş olan PHKH ile GVHH riskinin daha yüksek olması konusu [29],[30] özellikle GVT etkisinin gerekli olmadığı aplastik anemi gibi malign olmayan hastalıklar için transplantasyon yapılanlarda göz önünde tutulmalıdır.

2.4.3. Göbek Kordonu Kanı

Önemli derecede olgun olmayan kök hücre içeriğine, miyeloablatif hazırlama sonrasında devamlı çok hücre engraftmanı sağlayabildiğinin gösterilmesine ve vericiden iki HLA antijeni farklılık gösteren alıcılarda engraftman kabiliyetine (daha az GVHH ile birlikte) dayalı olarak göbek kordonu kanı, akraba olmayan uygun allogenik HKHN için giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Dünya genelinde artan sayıda göbek kordonu bankası, verici olarak uygun bir aile üyesi olmadığı zaman allogenik HKHN için hızla temin edilebilir olabilen bir graft seçeneği sunmaktadır.

HKH(GK) birimleri, HKH(K) ve PHKH graftlara göre en az 10 kat daha az sayıda çekirdekli hücre ve CD34+ hücresi içerir, ama HKH(K)'ye göre kök hücre sayısı kısıtlı olmasına rağmen çok daha yüksek bir olgunlaşmamış kök hücre oranına sahiptir [31]. Megakaryositik öncü hücreler nispeten nadir olabilir [32] ve PHKH'den gelenlere göre olgunlaşma için gerekli endomitotik siklusları oluşturma becerileri bozuk olabilir [33].

Göbek kordonu kanından gelen T lenfositler, erişkin kemik iliğinden ve erişkin kanından gelen T lenfositleri gibi primer allogenik uyarıya yanıt verme eğilimindedir, ama alloantijen ile tekrar karşılaştıklarında düşük yanıt verirler [34]. Bunların kemokin yanıtı da periferik kan lenfositlerin yanıtına göre farklılık gösterir [35]. Göbek kordonu kanının NK hücre aktivitesi nispeten düşük olmasına rağmen, sitokinler göbek kordonu kanının NK aktivitesini in vitro olarak kolaylıkla aktive ederler [36].

HKH(GK) graftların bu biyolojik özellikleri, allogeneik HKHN'de görülen klinik farklılıkların bazılarından (yavaş trombosit kazanımı, alıcı ile HLA farklılığının daha iyi tolere edilmesi ve GVT etkisinin korunması ile birlikte daha düşük GVHH riski) sorumlu olabilir.

Alıcı açısından hızlı erişilebilirlik ve daha az sıkı olan HLA uyumu koşulları, verici bulunmasında gecikme veya uygun vericinin belirlenememesi nedeni ile akraba olmayan bir verici transplantın gerçekleştirilemediği alıcıların hızla bir göbek kordonu HKHN'e yönlenebileceği anlamına gelir. Göbek kordunu kanının bir dezavantajı, hematopoietik kök hücrelerin sayısının erişkin hastalar için sıklıkla yeterli olmamasıdır. Ayrıca özellikle trombositlerin engraftmanı daha yavaş olabilir. Graft başarısızlığı göbek kordonu kanı transplantlarının %10-20'sinde gerçekleşir. Engraftman başarısızlığını en iyi gösteren parametre çekirdekli hücre sayısı olmuştur.(daha az sayı daha yüksek red olasılığına işaret eder [37]. Genel olarak, engraftman için alıcı vücut ağırlığı kg'ı başına 2.5-3.5x10^7'lik eşik hücre dozu gereklidir [38]. Bugüne kadar CD34+hücre sayıları ve koloni testleri, önemli olmalarına ve daha ileri çalışmalarla yaralı bilgiler sağlayacak olmalarına rağmen engraftman konusunda ipucu verici olamamışlardır. Daha fazla HLA farklılığının daha yüksek bir graft rejeksiyonu riski taşıması beklenir, ama en azından uyumsuzluğun iki veya daha az antijen olduğu kişilerde, bunun gösterilmesi zor olmuştur. Bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim vardır. İmmun yeni yapılanma daha yavaş olup erken fırsatçı enfeksiyonların riskini artırır, ancak daha geç dönemde anti-tümör etki gelişmesine neden olur. Bu nedenle, göbek kordonu kanı çocuklarda artan şekilde kullanılmasına rağmen, erişkin transplant alıcılarında rolü henüz açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.5. Aferez İle Elde Edilen Hematopoietik Öncü Hücrelerin Dondurularak Saklanması

2.5.1. Hücrelerin dondurularak saklanması:

Bugün kök hücrelerin saklanmasında kullanılan en yaygın yöntemdir. Ancak kriyoprezervasyonun hücreler üzerine son derece olumsuz etkileri de olabileceğinden kriyoprezervasyon işleminde dikkat edilmesi gereken önemli noktalar vardır.

1- Dondurma işlemlerinin yan etkileri ve önemi;

a. ***Solüsyon etkileri*****:** Bu olayın en temel mekanizmasını serum fizyolojik (SF) gibi bir biyolojik sıvının donma işlemi esnasında geçirdiği aşamalara bakarak anlamak mümkündür.

SF yavaş yavaş soğutulmaya başladığında 0.15 M olan NaCl konsantrasyonu suyun kristalleşmeye başladığı dönemlerde 5.2 M kadar yükselmekte ve konsantrasyon; tekrar 21.1°C'nin üstüne çıkılana kadar, bu değerlerde kalmaktadır. Böyle bir durumda artan osmotik yük nedeni ile hücreler doğal olarak büzüşerek çökmekte ve parçalanmaktadır. SF hızla soğutulursa (-20°C/dk) bu sefer hücre içinde kristal formasyonu ve termal hasar oluşmakta, hücre parçalanmaktadır. Bu durumda yapılması gereken su moleküllerini bağlayarak su kristalizasyonunu yavaşlatmak amacı ile gliserol veya dimetilsülfoksit (DMSO) gibi kolligatif bir kriyoprotektan ajan kullanmak gerekmektedir [39]. Kriyoprotektif bir ajanın penetran (hücre içine geçen) olması da hücrenin korunabilmesi açısından önemlidir. Penetran bir kriyoprotektif, donma esnasında hücre içerisine geçerek internal kristalizasyonun önüne geçecektir. Bu gün kullanılan kriyoprotektif ajanlar içinde en penetran olan DMSO'yken, hidroxyethyl starch (HES)'in hemen hiç penetrasyon özelliği yoktur. Ancak bu ajanların penetrasyon özelliği, hücreler dondurulduktan sonra çözünürken bir dilüsyon şokuna da neden olabilmektedir. Bu açıdan dondurulma işlemi esnasında tek bir kriyoprotektif ajanın kullanılmasından çok, birden fazla kriyoprotektif kullanımı ve uygun karışımları daha ideal sonuçları verebilmektedir. Özetle dondurma işlemi sırasında kriyoprotektanlar son derece önemlidir. Bu ajanlar donma sırasında oluşan olumsuz "solüsyon etkilerini" su-lipid-protein kompleksinin kristalize olmasını engeller ve bu şekilde tersiyer yapı korunmuş olur [40]. HES'in çözünme sırasında hücre membranını dıştan sararak, çözünme sırasında topaklanma ve jel formasyonu oluşmunu engellediği bilinmektedir.Bu nedenle %5 DMSO+% 6 HES kombinasyonu birlikte kriyoprotektan amaçlı kullanılmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda HES'in %5 DMSO ile kombine kullanımda kriyoprezervasyon sonrası CD34 sağkalımını iyileştirmediği sonucuna varmışlardır [41]. Günümüzde en optimal DMSO oranının %5 olduğu düşünülmektedir.

***b. Faz geçiş zamanı ve önemi*:** Bu kritik bir süreçtir. Su sıvı durumdan katı duruma geçerken ısı ortaya çıkar . Eğer dondurma sırasında bu durum dikkate alınmazsa faz geçiş zamanında (FGZ) bir uzama meydana gelir. Bu süreç ile hücre canlılığı arasında kuvvetli bir orantı vardır. FGZ uzadıkça hücre yıkımının arttığı gösterilmiştir.

***c. Geçiş fazı sonrası donma ısısı*:** Bu dönemde -50°C'ye kadar olan soğumanın dakika da 5°'den daha yavaş olması önerilmektedir. İdeal soğutma hızı 1-3°C/dk olup ,

-50°C'u ye ulaşıldıktan sonra ürün daha düşük ısılara, örneğin direkt olarak sıvı azot (-190°C) içine olarak kaldırılabilir. Ancak ideal olan –80°C'ye ulaşmasını beklemek ve sonra uzun süreli saklama için azot içine kaldırılmaktadır.[39]

2- Saklama- Depolama:

Bu döneme kadar ürün kayıpsız hazırlanmış ise, bundan sonra hücresel hasar oluşması –80 °C nin üzerinde beklenmez, ancak yapılan çalışmalar –79 °C'nin altında saklanan ürünlerde saklama zamanı ile doğrusal ilişkili olarak belirgin hücresel hasar oluşabileceğini göstermektedir. Kritik olan –79 °C'nin altında saklanması halinde 2-3 sene kadar ürünün saklanabileceği rapor edilmektedir.

3- Dondurulmuş Hücrelerin çözülmesi:

Dondurulmuş hücreler tekrar ısıtılırken, iki önemli sorun hücre harabiyetine yol açmaktadır. Birincisi,ısınma sırasında hücre içinde kristal oluşumu yeniden başlar ve hücrede mekanik hasara yol açar.

İkincisi, donma sırasında gelişen olayların tam tersinin çözünme sırasında gerçekleşerek ekstraselüler alanın hipotonik karakter kazanmasıdır. Bu hipotonisite de hücrenin şişerek patlamasına yol açar. Özellikle bu olay kuvvetli penetran kriyoprezervatiflerin varlığında daha belirgindir. Bu iki olaydan hücreleri koruyabilmenin en iyi yolu çözünmenin, dondurmanın aksine çok hızla yapılmasıdır. Bugün için 70°C/dk'nin üzerinde olan ısıtmanın hücreleri bu iki olumsuz etkiden koruyabildiği gösterilmiştir [39].

2.6. Hücresel Tedavi Ürünlerinde Canlılık Değerlendirilmesi

Hücresel tedavi ürünlerinin biyolojik veya terapotik etki sağlayabilmesi içeriğindeki canlı hücrelerle mümkün olmaktadır. Dolayısıyla HT ürünlerinde yaşayan ve ölü hücrelerin oranını belirlemek amacı ile yapılan testler ürünün fonksiyonel kapasitesini ve nihayetinde ürünün tedavi potansiyelini değerlendirmedeki ilk önemli adımdır. Nekrotik hücre ölümünün gerçekleştiği hücreler tipik olarak hızla şişer, membran bütünlüğü bozulur ve sitoplazmik içeriğini çevresine salar. Hücre canlılığının en erken testlerinden biri krom salınım testidir, bu test hücre membranı bozuldukça

salınan radyoaktif krom alımına dayanır ve genellikle sitotoksisite tetkiki olarak kullanılır. Bu testin yerini bugün membran bütünlüğünün ‘‘altın standartı’’olarak kabul edilen ‘‘tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin mikroskopik değerlendirmesi’’tetkiki almıştır. Bu testte canlı hücreler, tripan mavisinin intakt hücre membranından geçmesini engellerler ve ışık mikroskobunda renksiz olarak izlenirler; hasar görmüş canlı olmayan hücrelerin membranları ise boyanın hücre içine girmesine izin vererek mavi bir renk almasına yol açarlar. Eosin Y de bir dışlama boyası olup canlı hücre membranları tarafından dışlanır. Hasar görmüş hücre mebranından geçerek ölü hücreleri boyar. Tripan mavisi ve eosin Y yöntemi ucuz ve basit olmalarına rağmen aynı zamanda da subjektif yöntemlerdir. Metod 1 ve Metod 2’de her iki yöntem ayrıntılı anlatılmıştır.

Bazı floresan boyaların geliştirilmesi, canlılığın saptanması için membran bütünlüğüne dayanan daha ileri yöntemleri ortaya çıkarmıştır. Ancak bu aynı zamanda canlı ve canlı olmayan hücrelerin birlikte boyanmasına neden olmaktadır . Akridin oranj ve etidyum bromide boyaları kullanan floresan boyalara bir alternatif yöntem de Metod 3’de verilmiştir. Soluk zemin, boyanmış hücrelerin daha stabil olması ve klonojenik tetkikler ile daha iyi korelasyon gösteren bu yöntemin daha az değişkenliği, doğrusallığı ve daha basit skorlamayı sağladığı gösterilmiştir. Nekrotik hücre ölümü görülen hücreleri değerlendirmek için diğer hedefler ise adenozin trifosfat (ATP) üretimi ve indirgeyen eşdeğerler gibi temel metabolik yolakların ölçümünü içermektedir. Bunlara ek olarak, bazı sayım yöntemleri; örneğin canlı olmayan hücreleri dışlayan kapı alma stratejilerine dayanan akım sitometri temelli tahliller de canlılık değerlendirmesi testinin bir parçası olarak yer almaktadır. Metod 4’de ayrıntılı anlatılmıştır.

2.6.1. Metod 1. Tripan mavisi kullanarak hücresel canlılığın değerlendirilmesi:

Tripan mavisi ile boyama dışlama yöntemi ile canlılık saptanması, canlı olmayan hücrelerin membranlarındaki hasarın bazı boyaların hücre içine pasif difüzyonla girmesine izin vermesiyle boyanması, ancak canlı hücrelerinde boyanın girmesine izin vermemesi ile boyanmaması prensibine dayanır [42]. Hazırlanmış olan 0.5 cc %0.04’lük tripan mavisi boyası ile 0.5 cc hücre süspansiyonu(0.5 - 2x10^6 içeren) polistren tüpte karıştırılır ve oda sıcaklığında 2-3 dk bekletilerek mikroskopik olarak incelenir. Canlı hücreler boyaya geçirgen olmadığı için berrak yuvarlak ve refraktil

olarak izlenir. Canlı olmayan (ölü) hücreler tripan mavisi boyasını dışlayamaz ve hücre içi mavi bir görünüm alır . Eritrositler sayıma dahil edilmez. Eritrositler lökositlere göre küçük boyutları ile ayırt edilebilir . Ayrıca kıvrıntılı ve çentikli olabilir.

Canlılık yüzdesi, şeffaf görülen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüz ile çarpılarak ile hesaplanır.

2.6.2 Metod 2. Eosin Y ile Canlılık değerlendirilmesi

Eosin Y ile hücre canlılık değerlendirme yöntemi de canlı olmayan hücrelerin membranlarındaki hasarın bazı boyaların hücre içine pasif difüzyonla girmesine izin vermesiyle boyanması, ancak canlı hücrelerinde boyanın girmesine izin vermemesi ile boyanmaması prensibine dayanır. Hazırlanmış olan 0.5 cc %0.1'lük eosin Y boyası ile 0.5 cc hücre süspansiyonu (0.5 - 2x10^6 içeren) polistren tüpte karıştırılır ve oda sıcaklığında 2-3 dk bekletilerek mikroskopik olarak incelenir ve mikroskopik olarak incelenir [43]. Canlı hücreler boyaya geçirgen olmadığı için berrak yuvarlak ve refraktil olarak izlenir. Canlı olmayan (ölü) hücreler eosin Y boyasını dışlayamaz ve hücre içi kırmızı bir görünüm alır.

Canlılık yüzdesi, şeffaf görülen hücre sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüz ile çarpılarak ile hesaplanır.

2.6.3. Metod 3.Akridin Oranj –Etidium bromid Kullanılarak Floresan Mikroskop İle Canlılık Değerlendirlmesi

Hücre canlılığını değerlendirmenin bu yönteminde aynı anda canlı ve ölü hücrelerin görülmesini sağlayan iki reaktif kullanılır: Akridin Oranj ve Etidium bromide (AO/EB) . AO ve EB nükleik asitler ile etkileşime giren flöresan boyalardır.AO, DNA arasına giren ve yeşil flöresan renk veren(uyarılma dalga boyu 500 nm) canlı hücre membranlarının geçirgen olduğu bir boyadır.Öteki taraftan, EB canlı olmayan hücrelerin membranlarının geçirgen olduğu DNA arasına giren ve turuncu renkli floresan(uyarılma dalga boyu 536nm) olan bir boyadır [44, 45]. Bir damla hücre süspansiyonu ile bir damla AO/EB boyası lam üzerinde karıştırılır. 1-2 dk bekletilerek floresan mikroskopta 430X de incelenir. Canlılık yüzdesi, yeşil boyanan hücrelerin toplam hücre sayısına oranı yüz ile çarpılarak ile hesaplanır.

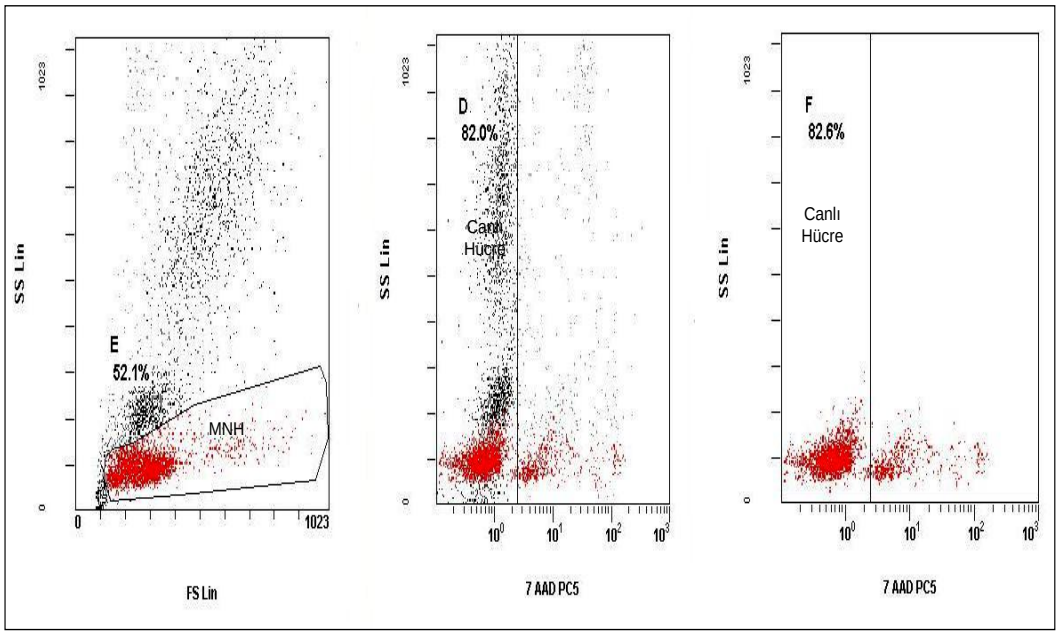
2.6.4. Metod 4. Akımsitometri -7-Amino –Aktinomisin D (7AAD) ile Canlılık Değerlendirmesi

Akım sitometri yöntemi, bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküllerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilerek; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edilmesine dayanan bir yöntemdir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potanasiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.

Akım sitometri ile hücre canlılığı tespiti floresan veren boyalar (7AAD, Propidyum Iyodür) kullanılarak yapılmaktadır. Bu boyalar ile membranı geçirgen hale gelmiş olan hücrelerin DNA'sının boyanması sağlanarak ölü hücrelerin kullanılan florokromun özelliklerine göre sinyal vererek ayırt edilmesi sağlanmaktadır.

7AAD (7-Amino –Aktinomisin D) aktinomisin analoğu olup 7. pozisyonunda amin grubu içerir. 7AAD canlı hücre membranlarından geçemez. Hasarlanmış hücre membranından penetre olarak DNA daki citosin-guanin baz çiftinden zengin bölgelere bağlanır [46]. 7AAD argon laser ile 488 nm mavi dalga boyunda uyarılma ile maximum absorbsiyon gösterir [47]. 635- 680 nm arasında pik uyarılma göstererek koyu kırmızı renkte floresan verir. Bu spektral özellikleri ile flowsitometrik analiz için uygun bir bileşiktir. 488 nm de uyarılma özelliğine sahip diğer föresan boyalarla (fluorescein isothiocyanate (FITC) ve phycoerythrin (PE)) birlikte kullanılabilir. Bu şekilde immunfenotipleme yapılarak çekirdekli hücre alt grubunda canlılık değerlendirmesi yapılır [48].

Canlı hücre floresan vermezken ölü hücrelerin kullanılan 7AAD ile koyu kırmızı renkte sinyal verir.



Şekil 1. Akımsitometri-7AAD yöntemi ile canlılık değerlendirilmesi

2.7. Periferik hematopoietik kök hücrelerin infüzyonu:

Kriyoprezervasyonla saklanan hücreler hastanın yatak başında çözdürülür. Hücreler genellikle hasta başında bulunan 37ºC'deki su banyosunda çok hızlı olarak çözülür. Torbanın içinde bulunan hücreler çözüldükçe bu süreci hızlandırmak için hafif bir masaj uygulanır ve bu süreç torba içinde bulunan bütün buzlar eriyinceye kadar devam eder. Daha sonra torba su banyosundan alınır ve torba içeriği ağırlık şırıngası vasıtası ile mikroagregat filtresinden geçirilerek hastaya infüze edilirler [49]. İlk torbanın çözülmesi bitmeden ikinci torbanın çözülmesine geçilmez. İnfüzyon sırasında DMSO ile ilişkili en sık görülen yan etkiler öksürük, boğaz kaşıntısı, bulantı, kusma ve kaşıntıdır. Daha nadiren hafif veya ciddi alerjik reaksiyonlar, akut böbrek yetmezliği, kardiyolojik, respiratuar ve nörolojik komplikasyonlar gelişebilir.

2.8. Engraftman

Başarılı bir transplantasyonun gerçek ölçüsü engraftman ve hematopoietik rekonstitüsyonun sağlanmasıdır [50]. Engraftmanı gösteren belirleyiciler her bir hücre tipinde hücre tipinin geri kazanılması için gereken zamanlardır. Hastanın nötrofil sayısı

ardı ardına 3 gün boyunca 0.5x10^6/ml'den yüksek olduğunda ilk gün nötrofil engraftman günü olarak kabul edilir. Hastalarda trombosit desteği olmadan trombosit sayısının 20x10^6/ml'den büyük olduğu ardı ardına 3 günün ilk günü ise trombosit engraftman günü olarak kabul edilir [51].

3.YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Kök Hücre Nakli Ünitesi ve Terapotik Aferez Merkezi'nde yapıldı. Çalışma öncesinde Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik onay alındı. Çalışma Ankara Tıplılar Vakfı tarafından sağlanan maddi kaynak ile gerçekleştirildi. HKHN yapılan, 18 yaş üstü, 12 hastaya ait toplam 20 adet PHKHN ürünü bu çalışmada incelendi. Çalışma öncesi hastalar bilgilendirilerek ve onamları alınarak çalışmaya alındı.

3.1. Hastaların Çalışmaya Alınma Kriterleri

1. Çeşitli endikasyonlarla allojenik veya otolog PHKH nakli yapılan ve PHKH'leri nakil zamanına kadar dondurularak saklanan hastalar,

2. Göbek kordonu kanı kök hücreleri ile nakil yapılan hastalar

3.2. Hastaların Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

1.PHKH nakil ürünü dondurularak saklanma işlemi uygulanmamış hastalar,

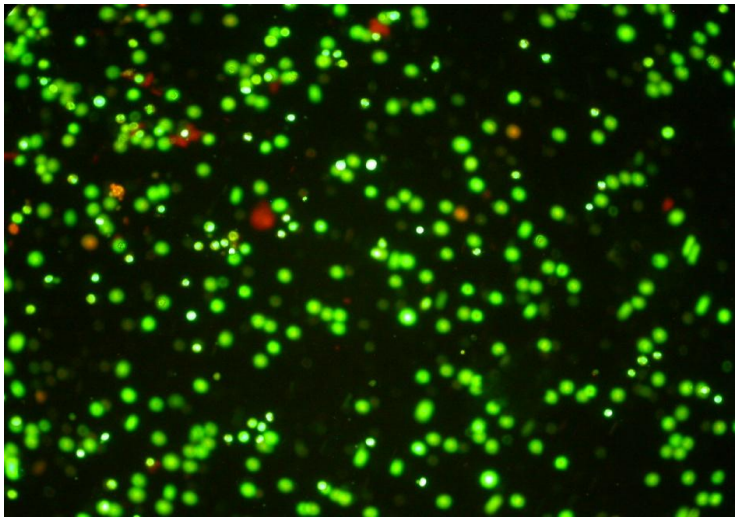
2.Hematopoietik kök hücre nakli için kemik iliği kök hücreleri kullanılan hastalar

Çalışmaya dahil edilen 12 hastaya verilen toplam 20 adet PHKHN ürünün 3 tanesi allojenik (1 tanesi göbek kordonu kanı), 17 tanesi otolog PHKH idi. Nakil günü %10 DMSO+ otolog plazma ile kriyoprezerve edilmiş ürünler sıvı azot tankı ile nakil ünitesine transfer edildi. Nakil öncesinde 37ºC de hızlı eritilen üründen hastaya verilmeden hemen önce canlılık değerlendirmesi için toplam 1 ml örnek alındı. Alınan örneğin 0.5 ml kadarı oda sıcaklığında toksik kabul edilen DMSO oranını seyreltmek üzere Roswell Park Memorial Institute (RPMI) solusyonu ile 1:2 oranında sulandırıldı, EDTA'lı tüpe alındı ve RPMI'lı ürün olarak adlandırıldı. Kalan 0,5 ml örnek (DMSO oranı:%10) ise hiçbir muamele yapılmadan ETDA'lı tüpe alındı ve direk ürün olarak adlandırıldı. Nakil sonrası alınan örnekler Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji laboratuarına ve Terapotik Aferez Ünitesine getirilerek, nakil sonrası 2 saat içerisinde, 2 kişi tarafından, 4 farklı yöntemle (Akridine Orange –

Etidyum Bromid, Tripan mavisi, Eosin Y, akım sitometri - 7AAD) eş zamanlı canlılık değerlendirilmesi yapıldı.

3.3. Akridin Orange-Etidium Bromide İle Canlılık Değerlendirmesi

Örnekler (RPMI'lı ürün ve direk ürün) 1: 9 oranında Serum fizyolojik ile dilüe edildi.10 µl AO/EB ile 10 µl ürün örneği lam üzerine pipet ucu ile karıştırılarak, flöresan mikroskopla (Zeiss Axioskop MC100) ile 10X20'lik büyütmede incelendi. Bu işlem RPMI'lı ve direk ürün örnekleri için tekrarlandı. Canlı hücreler açık yeşil, ölü hücreler turuncu olarak izlendi (Şekil- 2). İncelenen üç farklı sahadan elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalaması alınarak örneğe ait canlılık yüzdesi belirlendi ve kaydedildi.



Şekil 2. Akridin Orange Etidiyum Bromide yöntemi ile canlılık değerlendirmesi.

3.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Değerlendirilmesi

Örnekler (RPMI'lı ürün ve direk ürün) 1: 9 oranında Serum fizyolojik ile dilüe edildi. Daha sonra dilue edilmiş RPMI'lı ve direk ürün örneğinden ayrı ayrı 100 er µl örnek alınarak 2 farklı tüpe konuldu. Her iki tüpdeki örneğin üzerine 100 er µl %0.4'lük tripan mavisi boyama solusyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dk beklendi. Her iki boyanmış örnekten ayrı ayrı 10 µl alınarak lam üzerinde konuldu ve üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse, E200) 40x10 luk büyütmede canlılık

değerlendirmesi yapıldı. Canlı hücreler şeffaf izlenirken, ölü hücreler mavi renkte izlendi. Üç farklı sahadan elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalaması alınarak canlılık yüzdesi belirlendi ve kaydedildi.

3.5. Eosin Y ile Canlılık Değerlendirilmesi

Örnekler (RPMI'lı ürün ve direk ürün) 1: 9 oranında Serum fizyolojik ile dilüe edildi. Daha sonra dilue edilmiş RPMI'lı ve direk ürün örneğinden ayrı ayrı 100 er µl örnek alınarak 2 farklı tüpe konuldu. Her iki tüpdeki örneğin üzerine 100 er µl %1'lik EosinY boyama solusyonu eklenerek 5 dk beklendi. Her iki boyanmış örnekten ayrı ayrı 10 µl alınarak lam üzerinde konuldu. Üzerine lamel kapatılarak, ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse, E200) 40x10' luk büyütmede canlılık değerlendirmesi yapıldı. Canlı hücreler şeffaf izlenirken, ölü hücreler kırmızı renkte izlendi. Üç farklı sahadan elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalaması alınarak canlılık yüzdesi belirlendi ve kaydedildi.

3.6. Akım sitometri- 7AAD ile Canlılık Değerlendirilmesi

1.Boş bir tüpe 20 µL 7-AAD boyası ve 10µl CD 45 FITC antikoru pipetlendi.

2.Nakil ürünü örneğinden 100 µl eklenip vortekslendi.

3.Oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dk inkübe edildi.

4.Eritrositlerin parçalanması için tüplere "Facs Lysing" stok solusyonunun 1/10 oranında seyreltilmesi ile elde edilen "Facs Lysing" çalışma solusyonundan 2 ml eklenip vortekslendi.

5.10 dk oda ısısında karanlıkta bekletildi.

6.300g 'de 5 dk santrifüj edilip üstte kalan kısım döküldü.

7. Hücreleri yıkamak için tüpe 2 ml "Cellwash" solusyonu eklendi.

8.300g'de 5 dk santrifüj edilip üstte kalan kısım döküldü.

9. Tekrar 2 ml "Cellwash" eklenip 300g'de santrifüj edildi.

10. Üstte kalan kısım dökülerek 500 µl Cell wash eklenerek hücreler resüspande edildi ve cihazda okuma işlemine geçildi.

3.6.1. Cihazda Okuma İşlemi

1. Facs Calibur Cihazı (Becton Dickinson San Jose, USA) açılıp günlük bakım, ayar ve kontrolu yapıldı.

2. CellQuest programı açıldı.

3.Çalışma tüpü proba yerleştirilip veri toplamaya başlandı.(set-up modunda)

4.Hücrelerin FSC-SSC (sırasıyla: volüm, 90º ile ışık saçılımı) özelliklerinin değerlendirilmesi ile tüm hücrelerin görüş alanında olduğundan emin olunca, hücrelerden toplanan sinyaller kaydedildi. Her tüpten en az 10.000 hücrenin verisi toplandı ve kaydedildi.

5.7AAD ile boyanan hücreler FL3 kanalında (680nm) pozitif sinyal verip boyanmayanlardan ayrıldı. Şekil 2'de görülmektedir.

6.Boyanan hücrelerin oranı belirlenerek örnekteki ölü hücrelerin oranını saptandı.

3.6.2. Analiz

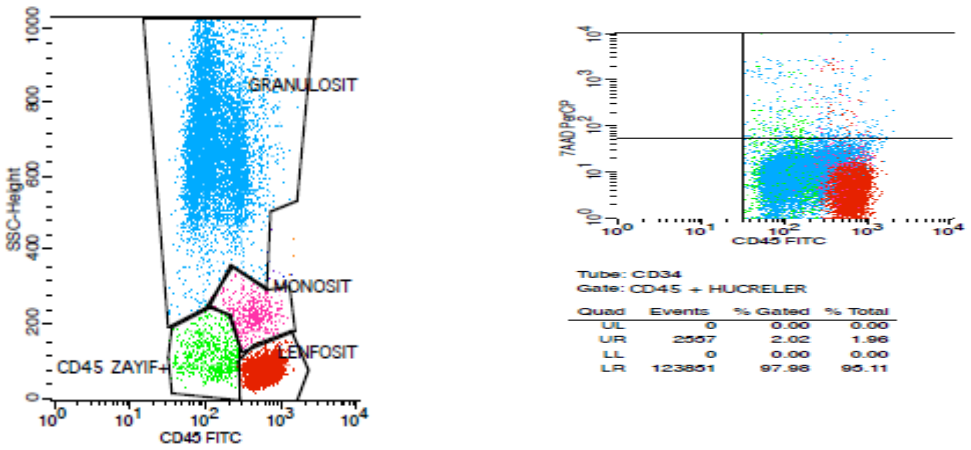
1.Facs Calibur cihazında (Becton Dickinson San Jose,USA) Cell Quest analiz programı açıldı.

2.CD45-SSC görüntüsünden CD 45+ ve zayıf+ olan lökositler seçildi.

3.CD45+ hücrelerde 7AAD analizi yapıldı. CD45'e karşı 7AAD olacak şekilde hazırlanan 2 boyutlu nokta grafiğinde hücrelerin dağılımına bakıldı (Şekil- 3).

4. Grafiklerin istatistiksel verileri cihazdan alınarak ölü hücrelerin oranı belirlendi (CD45+ ve 7AAD için pozitif boyanan hücreleri).

5. 100'den ölü hücrelerin oranı çıkarılarak canlı hücre yüzdesi belirlendi.



Şekil 3. Akım sitometri-7AAD yöntemi ile CD45+ hücrelerde canlılık değerlendirmesi

Elde edilen veriler kaydedildi. Akridin Oranj-Etidium bromide, Tripan mavisi ve Eosin Y ile elde edilen canlılık yüzdeleri, akım sitometri -7AAD yöntemi ile belirlenen canlılık yüzdeleri ile uyumluluk açısından istatistiksel olarak değerlendirildi.

RPMI'lı ürün ve direk ürüne ait canlılık oranları arasındaki fark her yöntem için kendi içinde değerlendirildi ve RPMI'lı ürün ve direk üründe saptanan canlılık oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı saptandı.

3.7. Etik Kurul Onayı

Çalışma Ankara Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25.03.2013 tarih 05- 195- 13 karar numaralı etik kurul izni ile yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama ± standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için median (min – maks), nominal değişkenler ise vaka sayısı ve (%) olarak gösterildi.

Yöntemler arasındaki uyum ICC ile değerlendirildi. Yöntemler arasında ki uyum için Bland&Altman grafikleri de kullanıldı. Yöntemler arasındaki fark; dağılım normal ise ‘‘Paired T’’ testi, dağılım normal değil ise Wilcoxon testi ile araştırıldı. $p<0,05$ ise sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 12 hastaya ait toplam 20 adet PHKHN ürünün 3 tanesi allojenik (1 tanesi göbek kordonu kanı), 17 tanesi otolog PHKH idi.

Ürünlerdeki CD34 sayısı ve direk ve RPMI'lı üründe farklı yöntemlerle saptanan canlılık yüzdelerine ait tanımlayıcı istatistikler Tablo- 2 ve Tablo- 3'de özetlenmiştir.

Tablo 2. CD34 sayısı ve direk üründe canlılık yüzdelerine ait veriler

	Verilen CD34 (10^6 /kg)	AO(%) direk ürün	TP(%) direk ürün	EO(%) direk ürün	7_AAD(%) direk ürün
N	20	20	20	20	20
Ortalama±SS	2.94±3.08	71,7 ±15.3	60,0±20,4	45,7 ±18.0	78±13,2
Ortanca(Min-Maks)	1.96(0.28-13.57)	75(30-95)	55(20-93)	50(10-85)	79(45-95)

Tablo 3. RPMI'lı üründe canlılık yüzdelerine ait veriler

	AO(%) RPMI'lı ürün	TP(%) RPMI'lı ürün	EO(%) RPMI'lı ürün	7_AAD(%) RPMI'lı ürün
N	20	20	20	20
Ortalama±SS	83.25±13.20	85,40±15,79	80,75±15,21	77,90±15,68
Ortanca(Min-Maks)	87.50(50-95)	87,5(50-100)	82,5(50-100)	79,5(43-97)

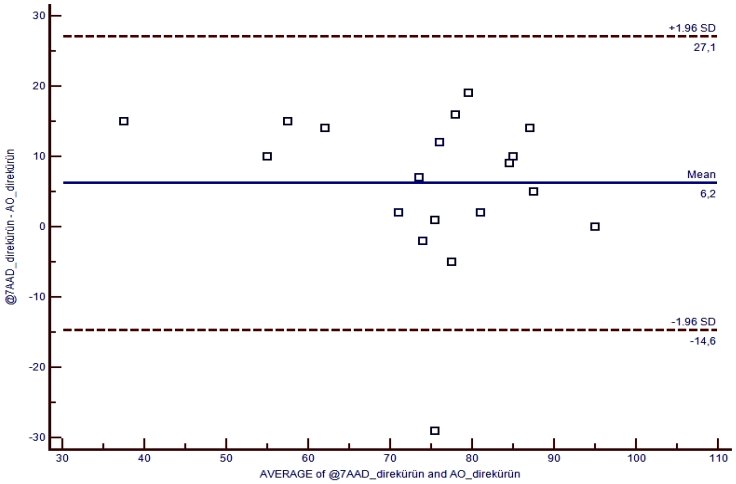
RPMI : Roswell Park Memorial Institute solusyonu

Direk ürün ve RPMI'lı üründe; AO/EB, EO, TP yöntemi ile belirlenen canlılık yüzdeleri ile akım sitometri-7AAD yöntemi ile belirlenen canlılık yüzdeleri arasındaki uyum Intraclass Correlation Coefficent ile değerlendirildi.

Direk üründe; AO/EB ile akım sitometri-7AAD yöntemleri ile belirlenen canlılık yüzdeleri arasındaki ICC uyum katsayısı 0,80 ($p<0.001$) saptandı. İki yöntem arasında iyi derecede uyum saptandı. Ölçümler arasındaki ortalama fark % 6.2, farka ait %95 güven aralığı ((-%14.6)-%27.1) olarak saptandı. Güven aralığı dışında kalan sadece 1

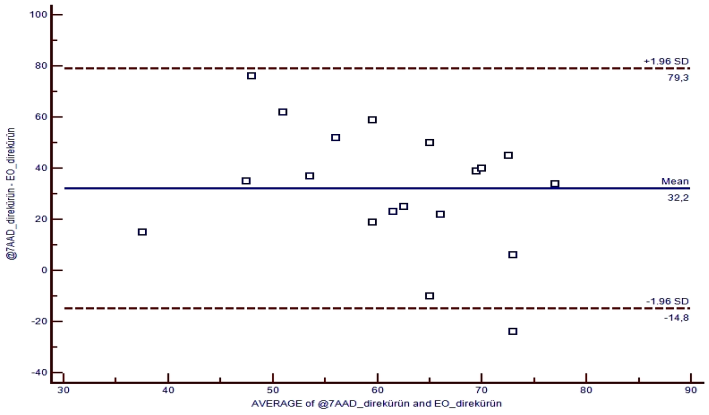
değer bulundu. İki yöntem arasındaki uyum durumunu gösteren Bland&Altman grafiği Grafik-1'de gösterilmiştir.

Grafik 1. Akridin oranj-Etidyum Bromide- 7AAD (direk ürün)



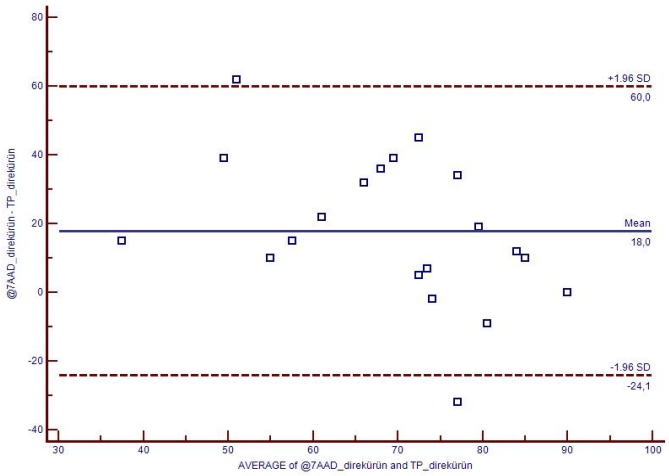
Direk üründe, EO ile akım sitometri-7AAD yöntemleri ile belirlenen canlılık yüzdeleri arasındaki ICC uyum katsayısı 0,10 saptandı (p>0.05). İstatistiksel olarak anlamlı uyum saptanmadı. Ölçümler arasındaki ortalama fark % 32.2, farka ait %95 güven aralığı ((-%14.8)-%79.3) olarak saptandı. Güven aralığı çok geniş bulundu. Güven aralığı dışında kalan 1 değer saptandı. İki yönteme ait sonuçlar arasındaki uyum durumunu gösteren Bland&Altman grafiği Grafik-2'de gösterildiği gibidir.

Grafik 2. Eosin Y- Akım sitometri -7AAD (direk ürün)



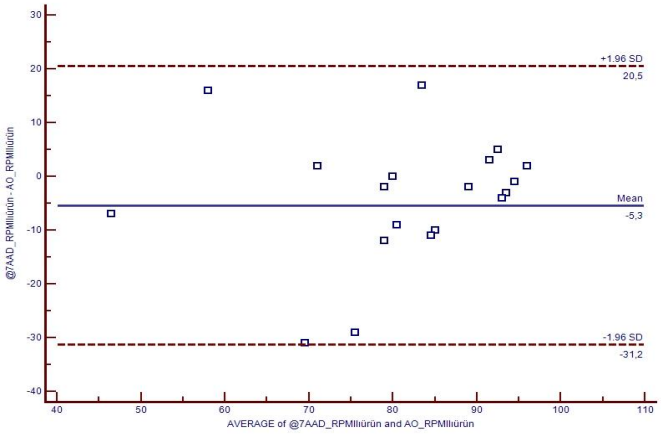
Direk üründe TP ile akım sitometri-7AAD yöntemleri ile canlılık değerlendirmesi arasındaki ICC uyum katsayısı 0,26 saptandı ($p>0.05$). İki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum saptanmadı. Ölçümler arasındaki ortalama fark % 18, farka ait %95 güven aralığı ((-%24.1)-%60) olarak belirlendi. Güven aralığı çok geniş bulundu. Güven aralığı dışında kalan 2 değer saptandı.. İki yöntem arasındaki uyum durumunu gösteren Bland&Altman Grafik-3'de gösterildiği gibidir

Grafik 3. Tripan mavisi- Akım sitometri -7AAD (direk ürün)



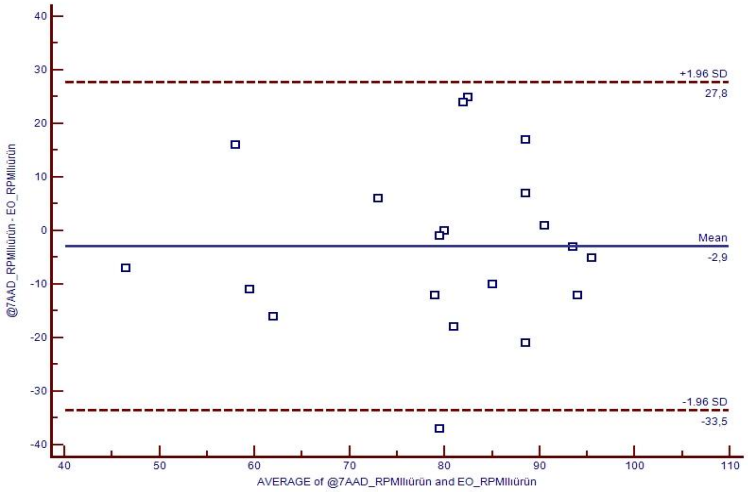
RPMI'lı üründe Akridin Oranj/Etidium bromide ile akım sitometri-7AAD yöntemleri arasındaki ICC uyum katsayısı 0,72 saptandı ($p<0.05$). İstatistiksel olarak bu uyum anlamlı kabul edildi. Ölçümler arasındaki ortalama fark %-5,3, farka ait %95 güven aralığı ((-%31.2)-%20) olarak saptandı. Güven aralığı dışında kalan değer bulunmadı. İki yöntem arasındaki uyum durumunu gösteren Bland&Altman grafiği Grafik-4'te gösterildiği gibidir.

Grafik 4. Akridin oranj-Etidyum bromid – Akım sitometri -7AAD (RPMI'lı ürün)



RPMI'lı üründe Eozin Y ile Akım sitometri -7AAD yöntemleri arasındaki ICC uyum katsayısı 0,65 saptandı. ($p<0.05$) İstatistiksel olarak bu uyum anlamlı kabul edildi. Ölçümler arasındaki ortalama fark % -2.9, farka ait %95 güven aralığı ((-%33.5)-%27,8) olarak saptandı. Güven aralığı dışında kalan sadece 1 değer bulundu . İki yöntem arasındaki uyum durumunu gösteren Bland&Altman grafiği Grafik-5'te gösterildiği gibidir.

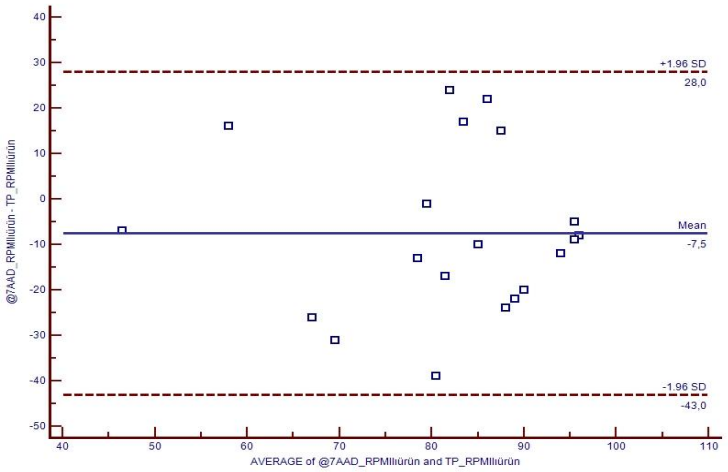
Grafik 5. Eosin Y- Akım sitometri -7AAD (RPMI'lı ürün)



RPMI'lı üründe Tripan mavisi ile 7AAD yöntemleri arasındaki ICC uyum katsayısı 0,47 saptandı ($p>0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı uyum saptanmadı. Ölçümler arasındaki Ortalama fark -% 7,5, farka ait %95 güven aralığı ((-%43)-%28)

olarak saptandı. Güven aralığı dışında kalan değer izlenmedi. İki yöntem arasındaki uyum durumunu gösteren Bland&Altman grafiği Grafik-6'da gösterildiği gibidir.

Grafik 6. Tripan mavisi - Akım sitometri -7AAD (RPMI'lı ürün)



RPMI'lı ürün ile direk üründeki canlılık oranları arasındaki fark her yöntem için kendi içinde değerlendirildi. RPMI'lı ürün ile direk üründeki canlılık yüzdelerine ait istatistikler Tablo-4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. RPMI'lı ürün ile direk üründeki canlılık yüzdelerine ait istatistikler

	Direk ürün	RPMI'lı ürün	P değeri
AO ortanca(min-max)	%75(%30-%95)	%87(%50-%95)	0,032
TP ortanca(min-max)	%55(20-93)	%88(50-100)	0,000
EO ortalama±ss	46±18	81±15	0,000
7AAD ortalama±ss	78±13	78±16	0,97

Akridin oranj- etidium bromid ile yapılan incelemelerde, direk ürün ve RPMI'lı üründeki canlılık ortanca değerleri sırasıyla (%75, %87) olarak saptandı. Wilcoxon testi ile kıyaslandığında direk ürün ve RPMI'lı üründeki canlılık yüzdeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (p=0,032).

Tripan mavisi ile yapılan incelemelerde, direk ürün ve RPMI'lı üründeki canlılık yüzdelerine ait ortanca değerler sırasıyla (%55,%88) saptandı. Wilcoxon testi ile kıyaslandığında aradaki fark anlamlı kabul edildi ($p<0.05$).

Eosin Y ile yapılan incelemelerde, direk ürün ve RPMI'lı üründeki canlılık yüzdelerine ait ortalama±ss değerleri, sırasıyla (%46±18, 81±15) saptandı Paired T testi ile kıyaslandığında aradaki fark anlamlı kabul edildi ($p<0.05$).

7AAD ile yapılan incelemelerde direk ürün ve RPMI'lı üründeki canlılık yüzdelerine ait ortalama±ss değerleri, sırasıyla (78±13, %78±16) saptandı. Paired T testi ile kıyaslandığında aradaki fark anlamlı kabul edilmedi ($p>0.05$).

7. TARTIŞMA

PHKH nakil ürünündeki hücrelerin canlılık oranı ürün kalitesinin önemli bir göstergesidir. Nakil öncesi hastaya verilecek olan üründe PHKH canlılığının hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesi için güvenilir yöntemler gereklidir.

Günümüzde dondurarak saklanan PHKH nakil ürününde, nakil öncesi canlılık oranının tespiti için, birçok merkezde sıklıkla konvansiyonel yöntemlerden olan tripan mavisi kullanılmaktadır. Konvansiyonel yöntemlerden olan eosin Y ülkemizde PHKH canlılık değerlendirmesinde tercih edilmemektedir. Flöresan boyalar ile canlılık değerlendirmesi ise flöresan mikroskop gerektirmesi nedeni ile birçok merkezde kullanılamamaktadır. Akım sitometri- 7AAD yöntemi canlılık değerlendirmesinde daha objektif bir yöntem olmakla birlikte, nispeten daha uzun değerlendirme süresine sahiptir ve daha pahalıdır. Pratikte rutin olarak PHKH'lerin nakil öncesi canlılık değerlendirmesinde kullanılmamaktadır.

Çalışmamızda dondurularak saklanan PHKH nakil ürününde, naklin hemen öncesinde alınan 1ml ürün örneğinden 2 farklı örneklem (direk ürün (DMSO oranı: %10) ve RPMI'lı ürün (DMSO oranı: %3,3)) oluşturuldu. Bu örneklerde nakil sonrasında 2 saat içerisinde 4 farklı yöntemle eş zamanlı canlılık değerlendirmesi yapıldı. Pratikte daha sık kullanılan TP, EO ve AO/EB yöntemleri, pratikte kullanılmayan ancak daha objektif bir yöntem olan akım sitometri- 7AAD yöntemi ile kıyaslandı.

PHKH canlılığını, akım sitometri- 7AAD yöntemi ile en iyi uyum içerisinde gösteren yöntemin AO/EB yöntemi olduğu saptandı.

Tripan mavisi yöntemi ile saptanan canlılık yüzdeleri ile akım sitometri- 7AAD ile belirlenen canlılık yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum gözlenmedi. Güven aralıkları geniş saptandı ve güven aralığı dışında kalan değerler gözlendi.

Eosin Y yöntemi ile; direk üründe (DMSO oranı %10), akım sitometri- 7AAD yöntemi ile elde edilen canlılık yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum

saptanmazken, RPMI'lı üründe (DMSO oranı %3) her iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum gözlendi.

Literatürde HKH canlılığını değerlendiren yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalar, kemik iliği kök hücrelerinin in vitro ortamda çeşitli hasarlayıcılara maruz bırakılarak canlılıklarının değerlendirilmesi şeklinde yapılmıştır.

Mascotti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, taze kemik iliği hücreleri, ısı şoku maruziyeti sonucu öldürülmüş kemik iliği hücreleri ile belli oranda karıştırılarak canlılık oranı değerlendirilmiştir. Canlılık oranı bilinen kemik iliği hücrelerinde, tripan mavisi ve akridin oranj/ propidyum iyodid yöntemini karşılaştırmış ve hangi yöntemin hücre kültürü testleri ile daha iyi ilişki göstereceğini saptamışlardır. Bu çalışmada akridin oranj/ propidyum iyodid metodu bilinen canlılık oranları ve hücre kültürü sonuçları ile daha iyi ilişki göstermiştir. Tripan mavisi yöntemi ise hücre kültürü sonuçları ile orta derecede uyuma sahipken, bilinen canlılık yüzdeleri ile uyumu iyi saptanmamış, düşük canlılık yüzdelerini olduğundan daha yüksek saptadığı izlenmiştir [44].

Hathaway ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, fareden elde edilen taze kemik iliği süspansiyonları çeşitli hücre hasarlayıcılarına (hızlı dondurma, ısıtma, değişik miktarlarda dimetil sülfoksit,asit ortam,serum veya doku kültür ortamı olmadan yaşlanma ve toksik madde (sodyum siyanid)) maruz bırakılarak canlı ve ölü hücrelerin akridin oranj,tripan mavisi ve eosin y ile boyanma karakteristikleri incelenmiştir. Ayrıca hücre kültürü ile değerlendirmesi yapılarak canlılık saptayan bu yöntemlerin korelasyonu değerlendirilmiştir. Sonuçta akridin oranjla elde edilen canlı hücre yüzdeleri eosin Y, tripan mavisi ve doku kültüründe elde edilen canlılık yüzdeleri ile uyumlu saptanmıştır. Dondurulmuş hücrelerde bu uyum korunurken, zehir veya ph değişikliği ile gelişen hasarlı hücrelerdeki canlılığının değerlendirmesinde akridin oranjın daha sensitif olabileceği belirtilmiştir [43].

Hathaway ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada in vitro hasara uğratılmış taze kemik iliği kök hücrelerinde her 3 canlılık yöntemi arasındaki uyum, çalışmamızda dondurularak saklanan PHKH'lerde çözünme sonrası canlılık değerlendirmesinde gösterilememiştir. Ancak DMSO gibi oda ısısında toksik olduğu bilinen maddeye

maruziyette canlılık sonuçları, çalışmamızda AO/EB yöntemi ile daha doğru olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, DMSO oranı farklı, direk ürün(DMSO oranı:%10) ve RPMI'lı (DMSO oranı:%3) üründe canlılık yüzdeleri arasındaki fark her yöntem için kendi içinde kıyaslandığında; TP, EO ve AO/EB yöntemleri ile direk üründe canlılık yüzdeleri anlamlı olarak daha düşük bulundu. Ancak Flowsitometri- 7AAD yöntemi ile incelemede her iki ürüne ait canlılık yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi.

Oda ısısında hücreler üzerine toksik etkisi olduğu bilinen DMSO (%8)'nun oda ısısında 2 saat içerisinde hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmadığı bilinmektedir [52]. Çalışmamızda daha objektif bir yöntem olan akım sitometri-7AAD yönteminde canlılık oranlarının, farklı DMSO oranları içeren ürün örneklerinde 2 saat içerisinde değişmemesi bu bilgiyi destekler niteliktedir. Ancak çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre 2 saate kadar DMSO maruziyeti; TP, EO ve AO/EB ile canlılık değerlendirmesi sonuçlarını etkiliyor gibi görünmektedir. Bu sebeble bu yöntemlerle canlılık değerlendirmesinde hızlı davranmanın daha güvenilir sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

Isık mikroskobu ve flöresan mikroskop ile canlılık değerlendirmesi pratik olmakla birlikte, dezavantajı sonuçların subjektif olmasıdır. TP yönteminde, eritrositler ve hücresel debris de tripan mavisi ile boyanmayı etkileme özelliğine sahiptir. Ayrıca zaman içinde tripan mavisinin, hücreler üzerine toksik etkisi nedeni ile ölü hücrelerin arttığı bilinmektedir [44]. Bu nedenle yorumlaması daha zordur ve hazırlanan preparatların hızlıca değerlendirilmesini gerektirir.

EO yöntemi ile canlılık değerlendirmesi zaman ile daha az etkilenmekle birlikte ölü hücrelerin belirlenmesi daha subjektiftir [53].

AO/EB yöntemi ile sadece çekirdeli hücreler boyanmaktadır. Hücresel debrise veya eritrositlere ait görüntü yoktur. Canlı ve ölü hücreler farklı renklerle boyanması sebebi ile daha net ayırt edilmektedir. Bu sebeple yorumlaması daha hızlı ve kolay olmaktadır [54].

AO/EB de zaman içerisinde hücrelere toksik olmayıp daha stabil bir canlılık değerlendirmesi sunmaktadır [44]. Ancak çalışmamızda DMSO içeren PHKH nakil ürünlerde bu durum gösterilememiştir.

Akım sitometri 7AAD yöntemi ise diğer metodlardan farklı olarak daha fazla hücrenin değerlendirilmesi ve hücre subgruplarına ait canlılık oranlarının belirlenmesine imkan sağlamaktadır. Bu yöntemle daha objektif ve güvenilir bir değerlendirme yapılabilmektedir [47,48].

PHKH canlılığının engraftman üzerine etkisini değerlendiren çalışmalarda ;

Abrahamsen ve arkadaşları; OPKHN yapılan 119 hastada, CD34+ hücre sayısı ile verilen canlı CD34+ hücre sayısının engraftman üzerine etkisi incelenmiştir. Canlı CD34 + hücre miktarının nötrofil ve trombosit engraftmanı ile ilişkili olduğu ancak 2x10^6/kg üzerinde CD34+ hücre içeren ürün alan hastalarda engraftmanı anlamlı etkilemediği saptanmıştır [55].

Scaradavou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çift ünite kordon nakli yapılan hastalarda CD34+ hücre viabilitesinin engraftman üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçta düşük CD34+ hücre viabilitesinin engraftman yetersizliği ile ilişkili olduğunu saptanmıştır.

Bu çalışmada ayrıca CD45+ hücrelerdeki canlılığın CD34+ hücrelerdeki canlılıkla ve engraftmanla korelasyonu incelenmiş ve uyum saptanmamıştır [56].

Pratikte PHKH nakil ürününde AO/EB, EO, TP yöntemleri ile temel olarak çekirdekli hematopoietik hücrelerin (CD45+) canlılık oranı değerlendirebilmektedir. CD34+ hücrelerde canlılık oranı hakkında AO/EB, TP, EO ile fikir edinilememesi bu yöntemlerin dezavantajıdır. Her ne kadar Scaradavou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CD45+ hücrelerdeki canlılık oranı ile CD34+ hücrelerdeki canlılık oranı arasında bir uyum saptamamışlarsa da CD45+ hücrelerdeki canlılık oranının engraftman kinetikleri üzerine etkisi araştırılmayı bekleyen konular arasındadır.

Sonuç olarak; dondurularak saklanan PHKH ürününde nakil öncesi canlılığı değerlendirmede AO/EB güvenilir, hızlı bir metod gibi görünmektedir. TP yöntemi

akım sitometri-7AAD yöntemi ile uyumunun düşük olması ve güven aralığı dışında kalan değerler olması sebebi ile canlılık değerlendirmesinde yanlış değerlendirmelere neden olabilir. EO yönteminin, TP yöntemine kıyasla akım sitometri-7AAD yöntemi ile daha uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak DMSO'nun zaman içerisinde AO/EB, TP, EO ile canlılık değerlendirmesi sonuçlarını etkileme olasığı nedeniyle, değerlendirmenin nakil sonrası ivedilikle yapılması ile daha güvenilir sonuçlar elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Dondurularak saklanan PHKH nakil ürününde nakil öncesi pratikte sık kullanılan yöntemler ile saptanan hematopoietik total nükleer hücre canlılık oranlarını, hücre kültürü yöntemi ve engraftman kinetikleri ile kıyaslayan örneklem sayısının daha geniş olduğu yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Dondurularak saklanan PHKH nakil ürününde nakil öncesinde canlılığının değerlendirmesinde akım sitometri-7AAD yöntemi ile en uyumlu yöntemin AO/EB olduğu saptanmıştır.

2. TP yöntemi, akım sitometri-7AAD yöntemi ile uyumunun düşük olması ve güven aralığı dışında kalan değerlere sahip olması sebebi ile PHKH canlılık değerlendirmesinde yanlış değerlendirmelere neden olabilir. EO yönteminin TP yöntemine kıyasla akım sitometri-7AAD yöntemi ile daha uyumlu olduğu görüldü. TP ve EO yöntemlerinde canlı hücreler şeffaf görülmektedir. Eritrositler ve hücresel debris özellikle tripan mavisi yöntemi ile değerlendirmeyi etkilemektedir. Bu sebeple TP ve EO yorumlaması nispeten zor yöntemlerdir. Sonuçlar daha subjektifdir.

3. AO/EB yönteminde sadece çekirdekli hücreler görülmektedir. Ayrıca bu yöntem canlı ve ölü hücrelerin farklı renklerde görülmesine imkan vermektedir. Bu sebeple daha kolay ve güvenilir bir değerlendirme imkanı sunmaktadır.

4. DMSO oranındaki azalmanın flowsitometri- 7AAD yöntemi ile oda ısısında 2 saat içerisinde canlılık oranında belirgin değişiklik oluşturmadığı saptandı. Bununla birlikte AO/EB, TP ve EO yöntemleri ile DMSO'yu daha fazla oranda içeren üründe, canlılık yüzdeleri anlamlı olarak daha düşük saptandı. DMSO maruziyeti zaman içerisinde; AO/EB, TP ve EO yöntemleri ile canlılık değerlendirmesini olumsuz etkilemektedir. Bu yöntemlerle PHKH nakil ürününde canlılık değerlendirmesinin, nakil sonrası ivedilikle yapılması uygundur.

5. Periferik hematopoitetik kök hücre canlılığının değerlendirmesinde AO/EB pratik ve güvenilir bir yöntemdir. Periferik hematopoitetik kök hücrelerde canlılık değerlendiren bu yöntemlerin hücre kültürü sonuçları ve engraftman kinetikleri ile karşılaştırıldığı daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

PERİFERİK HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE NAKLİ ÜRÜNÜNDE CANLILIK DEĞERLENDİREN YÖNTEMLERİN KIYASLANMASI

GİRİŞ VE AMAÇ: Günümüzde hematopoietik kök hücre nakli çoğunlukla PHKH kullanılarak yapılmaktadır. Dondurularak saklanan PHKH'lerin nakil öncesi canlılığının hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesi için güvenilir yöntemler gereklidir. Çalışmamızda, canlılık değerlendirmesinde sık kullanılan yöntemler (Tripan mavisi(TP) ve Eosin Y(EO) ile Akridin –oranj- etidium bromid (AO/EB)) ile daha objektif bir yöntem olan akım sitometri- 7AAD yöntemi ile kıyaslandı. PHKH nakil öncesinde canlılığın hangi yöntemle daha güvenilir ve hızlı bir şekilde tespit edildiğinin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca bu çalışmada, PHKH'lerin dondurularak saklanmasında kriyoprotektan olarak kullanılan ve oda ısısında toksik olduğunu bilinen DMSO maruziyetinin canlılık değerlendirmesi sonuçları üzerine etkisi değerlendirildi.

HASTALAR VE YÖNTEM: Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Kök Hücre Nakil Ünitesi'nde PHKH nakli yapılan 12 hastaya ait %10 DMSO+ otolog plazma ile kriyoprezerve edilmiş toplam 20 adet üründen naklin hemen öncesinde 1 ml örnek alındı. Örneğin 0.5 ml kadarı DMSO oranını seyreltmek üzre RPMI solusyonu ile 1:2 oranında sulandırıldı ve geri kalan 0.5 ml (%10 DMSO içeren) örnek hiçbir işlem yapılmadan ETDA'lı tüpe alındı. Her iki örnekte nakil sonrası iki saat içerisinde iki kişi tarafından, eş zamanlı dört farklı yöntemle canlılık yüzdesi değerlendirildi. AO/EB, TP, EO yöntemleri ile elde edilen sonuçlar, akım sitometri-7AAD ile uyumluluk açısından değerlendirildi. RPMI'lı ürün ve direk ürüne ait canlılık yüzdeleri arasındaki fark her yöntem için kendi içlerinde kıyaslandı.

BULGULAR: PHKH nakil ürününde, canlılığı akım sitometri- 7AAD yöntemi ile en iyi uyum gösteren yöntemin AO/EB olduğu saptandı. TP yöntemi ile akım sitometri- 7AAD yöntemi canlılık sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı uyum gözlenmedi.

RPMI'lı üründe EO yöntemi, akım sitometri- 7AAD ile istatistiksel olarak uyumlu saptandı. Direk üründe EO ve akım sitometri- 7AAD arasında anlamlı uyum saptanmadı.

TP, EO ve AO/EB yöntemleri ile direk üründe RPMI'lı ürüne göre canlılık yüzdeleri anlamlı olarak daha düşük bulundu. Ancak akım sitometri- 7AAD yöntemi ile direk ürün ve RPMI'lı ürün canlılık yüzdeleri karşılaşirıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi.

SONUÇ: Dondurularak saklanan PHKH nakil ürününde nakil öncesinde canlılığı akım sitometri- 7AAD ile en iyi uyum içerisinde gösteren yöntemin AO/EB olduğu saptandı. TP ve EO yöntemlerinin nakil öncesi PHKH canlılık değerlendirmesinde yanıltıcı olabileceği saptandı. İki saat süresince DMSO maruziyetinin TP, EO ve AO/EB ile canlılık değerlendirmesi sonuçlarını olumsuz etkilediği saptandı. PHKH nakil ürününde canlılık değerlendiren yöntemlerinin hücre kültürü ve engraftman kinetikleri ile kıyaslayan daha geniş örneklemli yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

COMPARISON OF VIABILITY ASSESMENT METHODS IN PERIPHERAL HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION PRODUCT

BACKGROUND: Today, the peripheral hematopoietic stem cells (PHSC) are commonly used in hematopoietic stem cell transplantation. Reliable methods for rapid and accurate determination of the postthawing PHSC viability is required. In this study, commonly used viability assesment methods are compared with a more objective viability assesment method (flow cytometry-7AAD). So we aimed to determine which method is the most reliable and practical for determination of peripheral hematopoietic stem cell viability shows product quality. Also we evaluated the effect of DMSO (used as a cryoprotectant in PHSC cryopreservation and has toxic effects at room temperature on PHSC viability) exposure on the results of PHSC viability assesment.

MATERIALS AND METHODS: In this study, total of 20 peripheral blood stem cell transplantation products cryopreserved in 10% DMSO + autologous plasma, collected from 12 patients, examined just before transplantation .Total 1cc sample had received just prior to infusion. Two different sample was created for each sample.0.5 cc of sample was diluted with RPMI solution, diluting ratio was 1:2 and the remaining 0.5 cc (10% DMSO) was included in a tube with EDTA without any operations. First sample was called ‘‘product with RPMI’’, and the other sample called ‘‘direct product’’.

Two diferent sample for each product, were evaluated simultaneously with four different viability assesment methods (acridine orange-ethidium bromide(AO/EB), tyripan blue(TB), eosinY(EY), flowcytometry- 7AAD) by two investigator within two hours after transplatation. Viability results determined by AO/EB, TB, EY was evaluated for the compliance with the results of flowcytometry- 7AAD method. The difference between the percentages of viability of the the ‘direct product’ and ‘product with RPMI’ were compared for each method among themselves.

RESULTS: In both sample, AO/EB was the best compatible method with flowcytometry- 7AAD . Compliance between TB – flowcytometry- 7AAD methods was found statistically non significant.

In ‘product with RPMI’, statitically significant corelation was found between EY and flow cytometry-7AAD methods. In direct product, no significant corelation was found between EY and flow cytometry-7AAD methods .

Direct product had significantly lower percentage of cell viability than ‘product with RPMI’ determined by TB, EY and AO/EB methods. However, comparing the percentage of viability of direct product and ‘Product with RPMI’ determined by flow cytometer-7AAD, no statistically significant difference was found.

CONCLUSION: AO/EB is the best compatible method with flow cytometer-7AAD for determining the viability of postthawing peripheral hematopoietic stem cell transplantation product. TP and EO can be misleading in the evaluation of hematopoietic peripheral blood stem cell viability. Exposure to DMSO within two hours seems to influence viability results determined by TP, EO and AO/EB methods.

In order to clarify this situation, new studies with larger sample that compares viability assesing methods’ results with cell culture and engraftment kinetics, are needed.

KAYNAKLAR

1. Civriz Bozdag, S., et al., Impact of age and diagnosis on viability during centrifugation and cryopreservation of peripheral blood stem cell products. Transfus Apher Sci, 2012. 47(1): p. 117-20.

2. Barnes, D.W., et al., Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. Br Med J, 1956. 2(4993): p. 626-7.

3. Mathe, G., et al., [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. Rev Fr Etud Clin Biol, 1959. 4(3): p. 226-38.

4. Baranov, A., et al., Bone marrow transplantation after the Chernobyl nuclear accident. N Engl J Med, 1989. 321(4): p. 205-12.

5. Weinstock, D.M., et al., Radiologic and nuclear events: contingency planning for hematologists/oncologists. Blood, 2008. 111(12): p. 5440-5.

6. Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar, Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature, 1953. 172(4379): p. 603-6.

7. Mc, G.J., Jr., et al., Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. N Engl J Med, 1959. 260(14): p. 675-83.

8. Kurnick, N.B., Autologous and isologous bone marrow storage and infusion in the treatment of myelo-suppresson. Transfusion, 1962. 2: p. 178-87.

9. Appelbaum, F.R., et al., Prolonged complete remission following high dose chemotherapy of Burkitt's lymphoma in relapse. Cancer, 1978. 41(3): p. 1059-63.

10. Kanteti, R., et al., Randomized trial of peripheral blood progenitor cell vs bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease: a clinical and molecular analysis. Bone Marrow Transplant, 1999. 24(5): p. 473-81.

11. Vose, J.M., et al., Autologous transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial evaluating graft source and minimal residual disease. J Clin Oncol, 2002. 20(9): p. 2344-52.

12. Stanevsky, A., G. Goldstein, and A. Nagler, Umbilical cord blood transplantation: pros, cons and beyond. Blood Rev, 2009. 23(5): p. 199-204.

13. Altuntas, F., A. Unal, and O. Ilhan, Turkish apheresis activity for 2011. Transfus Apher Sci, 2012. 47(1): p. 57-8.

14. Barriga, F., et al., Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. Biol Res, 2012. 45(3): p. 307-16.

15. JR., W., Overview of hematopoietic stem cell transplantation in Hematopoietic stem cell transplantation :A handbook for clinicans.2009: Bethesda p. 1-8.

16. MM, H., in Thomas' hematopoietic cell transplantation 2009: Oxford,UK :Wiley-Blackwell. p. 15-26.

17. Bolanos-Meade J, J.R., in Hematopoietic stem cell transplantation:A handbook for clinicans, G.D. Wingrad JR, Leather H, et all, Editor 2009: Betasta,MD :AABB p. 51-60.

18. M, K., Stem cell grafts in Hematopoietic stem cell transplantation: A handbook for clinicans G.D. Wingrad JR, Leather H, et all, Editor, MD:AABB: Bethesda. p. 105-14.

19. Ilhan, O., et al., The impact of the CD34+ cell dose on engraftment in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Transfus Sci, 1999. 20(1): p. 69-71.

20. Baum, C.M., et al., Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(7): p. 2804-8.

21. Miller, J.P., et al., Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. 14(9 Suppl): p. 29-36.

22. Mohle, R., et al., Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery. Exp Hematol, 1995. 23(14): p. 1535-42.

23. Lemoli, R.M., et al., Cycling status of CD34+ cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Blood, 1997. 89(4): p. 1189-96.

24. Petzer, A.L., et al., Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(4): p. 1470-4.

25. Pan, L., et al., Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. Blood, 1995. 86(12): p. 4422-9.

26. Barrett, A.J. and V. Malkovska, Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. Br J Haematol, 1996. 93(4): p. 754-61.

27. Pulsipher, M.A., et al., Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. Blood, 2009. 113(15): p. 3604-11.

28. Gyger, M., R.K. Stuart, and C. Perreault, Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor. Bone Marrow Transplant, 2000. 26(1): p. 1-16.

29. Champlin, R.E., et al., Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Blood, 2000. 95(12): p. 3702-9.

30. Eapen, M., et al., Peripheral blood grafts from unrelated donors are associated with increased acute and chronic graft-versus-host disease without improved survival. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. 13(12): p. 1461-8.

31. Broxmeyer, H.E., et al., Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(9): p. 4109-13.

32. Kanamaru, S., et al., Low numbers of megakaryocyte progenitors in grafts of cord blood cells may result in delayed platelet recovery after cord blood cell transplant. Stem Cells, 2000. 18(3): p. 190-5.

33. Bornstein, R., et al., Cord blood megakaryocytes do not complete maturation, as indicated by impaired establishment of endomitosis and low expression of G1/S cyclins upon thrombopoietin-induced differentiation. Br J Haematol, 2001. 114(2): p. 458-65.

34. Risdon, G., et al., Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(6): p. 2413-7.

35. Sato, K., et al., Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. J Immunol, 2001. 166(3): p. 1659-66.

36. Gaddy, J., G. Risdon, and H.E. Broxmeyer, Cord blood natural killer cells are functionally and phenotypically immature but readily respond to interleukin-2 and interleukin-12. J Interferon Cytokine Res, 1995. 15(6): p. 527-36.

37. Gluckman, E., et al., Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. N Engl J Med, 1997. 337(6): p. 373-81.

38. Armitage S, S.E., Cord blood graft collection and processing in Hematopoietik stem cell transplantation :A handbook for clinicans G.D. Wingard JR, Leather H,et all, Editor 2009, MD:AABB: Bethesda. p. 125-35.

39. Rowley, S.D., Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. J Hematother, 1992. 1(3): p. 233-50.

40. Kubota, S., et al., The effect of freeze rate, duration of phase transition, and warming rate on survival of frozen canine kidneys. Cryobiology, 1976. 13(4): p. 455-62.

41. Rowley, S.D., et al., A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. Bone Marrow Transplant, 2003. 31(11): p. 1043-51.

42. Tennant, J.R., Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. Transplantation, 1964. 2: p. 685-94.

43. Hathaway, W.E., L.A. Newby, and J.H. Githens, The Acridine Orange Viability Test Applied to Bone Marrow Cells. I. Correlation with Trypan Blue and Eosin Dye Exclusion and Tissue Culture Transformation. Blood, 1964. 23: p. 517-25.

44. Mascotti, K., J. McCullough, and S.R. Burger, HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. Transfusion, 2000. 40(6): p. 693-6.

45. Bank, H.L., Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. Diabetologia, 1987. 30(10): p. 812-6.

46. Lecoeur, H., et al., Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. J Immunol Methods, 1997. 209(2): p. 111-23.

47. Zelenin, A.V., et al., 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. Cytometry, 1984. 5(4): p. 348-54.

48. Schmid, I., et al., Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. Cytometry, 1992. 13(2): p. 204-8.

49. P, L., Graft, processing,storage and infusion, in Hematopoietic stem cell therapy, L.J. Ball ED, Law P, Editor 2000.

50. Zubair, A., et al., Early neutrophil engraftment following autologous BMT provides a functional predictor of long-term hematopoietic reconstitution. Transfusion, 2003. 43(5): p. 614-21.

51. PV, O.D., Engraftmant, in Hematopoietic stem cell transplantation: A handbookfor clinicans, G.D. Wingard JR, Leather H,et all, Editor 2009: Bethesda,MD:AABB.

52. Rowley, S.D. and G.L. Anderson, Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. Bone Marrow Transplant, 1993. 11(5): p. 389-93.

53. Black, L. and M.C. Berenbaum, Factors Affecting the Dye Exclusion Test for Cell Viability. Exp Cell Res, 1964. 35: p. 9-13.

54. Bank, H.L., Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. In Vitro Cell Dev Biol, 1988. 24(4): p. 266-73.

55. Abrahamsen, J.F., T. Wentzel-Larsen, and O. Bruserud, Autologous transplantation: the viable transplanted CD34+ cell dose measured post-thaw does not predict engraftment kinetics better than the total CD34+ cell dose measured pre-freeze in patients that receive more than 2x10(6) CD34+ cells/kg. Cytotherapy, 2004. 6(4): p. 356-62.

56. Scaradavou, A., et al., Cord blood units with low CD34+ cell viability have a low probability of engraftment after double unit transplantation. Biol Blood Marrow Transplant, 2010. 16(4): p. 500-8.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hematopoietik kök hücre nakil ürününde canlılık değerlendirmesinde kullanılan yöntemlerin kıyaslanması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Osman İlhan			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Laboratuar Çalışması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

ASLI GİBİDİR

29 Mart 2013

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ		
	Karar No:05-195-13	**Tarih: 25 Mart 2013**
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Yurtdışında
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Yurtdışında
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

ASLI GİBİDİR

29 Mart 2013