

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OTOLOG VE ALLOJENEİK PERİFERİK KÖK HÜCRE AFEREZİ
İLE TOPLANAN ÜRÜNLERDEN YAPILAN NAKİLLERDE KÖK
HÜCRE KÜLTÜR KOLONİ SAYISI İLE NAKİL SONRASI
ENGRAFTMAN ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Tamer SARI

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMAFEREZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**


**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman İLHAN**

**Ankara
2007**

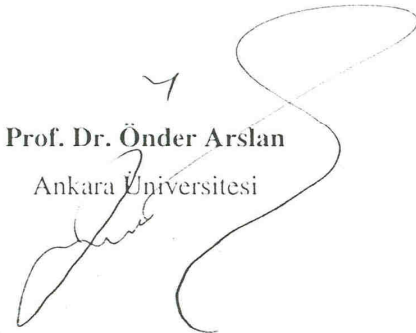
Ankara Üniversitesi sağlık Bilimleri Enstitüsü
Hemaferez Yüksek Lisans **Programı**
Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışıma, aşığıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 20.11.2007


Prof. Dr. Osman İlhan
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Osman I. Özcebe
Hacettepe Üniversitesi


Prof. Dr. Hamdi Akan
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Önder Arslan
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Muhit Özcan
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay.....	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Şekiller ve Grafikler.....	vi
Tablolar	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Aferezis (Hemaferezis)	1
1.2. Kök Hücre Aferezi.....	2
1.3. Kök Hücrelerin Dondurulması (kriyoprezervasyonu) ve Saklanması. ...	3
1.4. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	5
1.5. Ototolog Kök Hücre Transplantasyonu.....	5
1.6. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu.....	6
1.7. Kök Hücre.	7
1.8. Embriyonik Kök Hücre.....	8
1.9. Erişkin Kök Hücre.....	8
1.10. Hematopoietik Kök Hücre	9
1.11. Normal İnsan Kan ve Kemik İliği Hücre Kültürlerindeki Koloni tipleri	10
1.12. Eritroid Koloniler.....	11
1.13. CFU-E (Eritroid Koloni oluşturan Üniteler)	12
1.14. BFU-E	12
1.15. Olgun BFU-E	13
1.16. Primitif BFU-E.....	13
1.17. Granulopoitik Koloniler	13
1.18. Multi-lineage Koloniler.....	14
1.19. Koloni Kültür Ortamı ve Hesaplama Prosedürleri.....	15
1.20. Amaç	20

2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Periferik Hematopoietik Hücre Mobilizasyonu ve Toplanması.....	22
2.2. Otolog Kök Hücrelerin Eritilmesi.....	22
2.3. Hematopoietik Hücrelerin İnfüzyonu	23
2.4. Kültür Yöntemi ve Koloni Oluşturan Birimlerin Sayımı.....	23
2.4.1. Gereken Malzemeler	23
2.4.2. Kök Hücre Kültür Protokolü.....	24
2.5. Engraftman Kinetikleri.....	27
2.6. İstatistik	27
3. BULGULAR	28
3.1. Greft Kalitesi	28
3.2. Kültür Özellikleri	28
3.3. İnfüze Edilen Greftte Koloni Oluşturan Birimler	30
3.4. CD34+ hücre Sayısı ve koloni oluşturan Birimler Arasındaki İlişki	30
3.5. Engraftman Kinetikleri.....	30
3.6. Engraftman Kinetikleri ve Greftteki CD34+ Hücre Sayısı ile İlişkisi.....	31
3.7. Engraftman Kinetikleri ve Koloni Oluşturan Birimler ile İlişkisi.....	32
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
ÖZET	49
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimi almamda çok büyük yardımlarını gördüğüm tez danışmanım Prof. Dr. Osman İlhan'a, manevi desteğini gördüğüm Prof. Dr. Muhit Özcan'a, hemaferез yüksek lisans programında eğitimime katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyelerine, çalışma süresince her konuda yardımlarını gördüğüm Uzman Dr. Pervin Topçuoğlu'na, aferez ünitesi teknik sorumlusu Uzman Biyolog Erol Ayyıldız'a; aferez ünitesinden Uzman Biyolog Meltem Bay ve tüm diğer ünite çalışanlarına, çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Yaman Zorlutuna, Prof. Dr. Ayşe Gürel, Doç. Dr. Serdar Günaydın ve Op. Dr. Oğuz Moldibi'ye sonsuz teşekkürler ederim.

Tamer Sarı

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Kök hücreleri ve hematopoez	8
Şekil 2A. İnsan hemapoietik hücre kolonilerinin tanılayıcı görüntüleri.....	17
Şekil 2B. İnsan hemapoietik hücre kolonilerinin tanılayıcı görüntüleri.....	18
Şekil 2C. İnsan hemapoietik hücre kolonilerinin tanılayıcı görüntüleri.....	19
Şekil 3. Methocult ortamında insan hematopoietik CFU ölçümü	26
Grafik-1: Nötrofil engraftmanı ($0,5 \times 10^9/L$) ile CFU-GEMM arasında ilişki	33
Grafik- 2: Nötrofil engraftmanı ($1,0 \times 10^9/L$) ile CFU-GEMM arasında ilişki.....	33
Grafik -3: Trombosit engraftmanı ile BFU-E arasında ilişki	34

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo-1: Hasta Özel likleri	21
Tablo-2: İnfüze edilen graftın kalitesi	28
Tablo-3: Graftın kriyoprezervasyonn öncesi ve kriyoprezervasyon eritme işlemi sonrası koloni oluşturan birimlerin karşılaştırılması	29
Tablo-4: İnfüze edilen graftaki koloni oluşturan birimlerin miktarı	30
Tablo-5: Grafttaki CD34+ hücre sayısı ve engraftman kinetikleri	31
Tablo 6: Engraftman kinetikleri ile koloni oluşturan birimler arasında ilişki	32
Tablo 7: Kriyoprezervasyon sonrası eritildikten sonra kültüre edilen graftaki koloni oluşturan birimler ve engraftman arasındaki ilişki	34

1. GİRİŞ

1.1.Aferezis (Hemaferezis)

Aferez, kanın bir komponentinin alınıp geri kalanının hastaya veya donöre geri verilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır.Hemaferezis, aferezis ile eşanlamlı olarak kullanılmaktadır.Sitaferesis ise aferezin bir cinsi olup kanın hücresel elamanlarının ayrılıp geri kalanın hastaya veya donöre geri verilmesi işlemidir.

Kan komponentlerini birbirinden ayırmak amacıyla çeşitli teknikler kullanılmaktadır.Bunlar santrifüj, filtrasyon ve adsorbsiyondur.Santrifüj tekniğinde kan komponentleri özgül ağırlıklarına göre birbirinden ayrılır.Filtrasyon tekniğinde kan komponentleri birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılır.Adsorbsiyon tekniği daha çok immunoadsorbsiyon işlemleri için kullanılan bir uygulamadır.Biyoaktif membranlar kullanılarak istenilen elamanlar plazmadan ayrılabilir.Bunlardan santrifüj tekniği aferez cihazlarında en çok kullanılır.Bazı aferez cihazlarında ise bu tekniklerin kombinasyonu (Örnek.:Fenwall Autoferesis C cihazı) kullanılmaktadır.

Aferez cihazları devamlı akım veya aralıklı akım tekniği ile çalışır.Devamlı akım tekniği ile çalışan cihazların özellikleri; az ekstrakorporeal hacim, kısa işlem süresine sahip olmaları,buna karşılık çift kol gerektirmeleri (bir giriş,bir çıkış) ve taşınabilir olmamasıdır. Aralıklı akım ile çalışan cihazlar ise, daha fazla ekstrakorporeal hacim ve uzun işlem süresine sahiptir.Buna karşılık taşınabilir olup tek kol (tek giriş-çıkış) gerektirirler (İlhan, 1997, Bölüm 24).

Günümüzde aferez tekniği; plazmaferezis, trombosit aferezi, eritrositaferesis, granülositaferes, lenfositaferez, periferik kök hücre aferezi gibi yaygın kullanım alanına sahiptir. Aferezis uygulamaları hastalara ve sağlıklı donörlere yapılabilmektedir.Uygulanan kişiye göre terapötik aferez (hastaya tedavi amaçlı işlem yapılması) ve donör aferezi (sağlıklı vericiden kan komponenti toplanması) olarak ikiye ayrılır. Bu iki işlem aynı yöntemi kullanır ancak amaçları farklıdır (McCullough, 1997 Bölüm 2, Arslan, 2002,s:1).

1.2. Kök Hücre Aferezi

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelere kök hücre denmektedir. Erişkinde kemik iliğinde bulunan kan (hematopoitik) kök hücresinden laboratuvarında ya da insan bedeninde yeni kan kök hücreleri, hatta farklı hücreler elde etmek mümkündür. Kan kök hücrelerinin kemik iliğinden kana geçişinin arttırılması yani mobilizasyonu ile çevre kanında kök hücre miktarı daha da artmaktadır. Bu bilgi ile kan kök hücrelerinin çevre kanından kolayca toplanabileceği gerçeği ortaya çıkmıştır (Goldman, J.M ve ark, 1978).

Çevre kanında canlı kan kök hücrelerinin bulunduğu kanıtlanması dolaşan kan kök hücrelerinin, klinikte yüksek doz tedaviyi izleyerek kan yapımının yeniden düzenlenmesinde kullanımını gündeme getirmiştir (Richman, C.M ve ark 1995).

Aferez cihazlarındaki teknolojik ilerlemelerin kök hücrelerin kemik iliği yerine periferik kandan elde edilmesine büyük yardımları olmuştur. Periferik kan kök hücre toplanması daha az ağrılıdır, daha ucuzdur ve kemik iliğine göre periferik kök hücreler ile yapılan nakillerde daha hızlı bir hematolojik iyileşme olur (Korbling ve ark 1995).

Bu cihazlarla yapılan allojeneik kök hücre toplanmasında hücre canlılığının olumsuz yönde etkilenmediği gösterilmiştir (Bakanay, S.M ve ark., 2006).

Allojeneik kök hücre kaynağı olarak periferik kan kök hücrelerinin kullanımı giderek artmaktadır (Arat, M ve ark 2004).

Periferik kan kök hücre aferezinin ne zaman yapılacağı çok önem arz etmektedir. Aferez öncesi dolaşımdaki CD34 pozitif hücrelerin miktarının bilinmesi periferik kök hücre aferezinin zamanlaması ve başarısı için çok önemlidir (Demirer, T ve ark 2002).

Periferik kök hücre aferezinde hastalardan veya gönüllü vericiden lökoferez ile içinde CD34+ hücrelerinde bulunduğu mononükleer hücreler toplanır. Kan kök hücresinin kemik iliğinden kana en fazla geçtiği günü yakalamak ve o gün afereze

başlamak gereklidir.Bu şekilde yüksek miktarda kök hücre elde edilir.Genel olarak mobilizasyon tekniği kandaki kök hücrelerin sayısını arttırmak için kullanılır.Bunun için kullanılan ilaç G-CSF(koloni stimulan faktör) yada GF(büyüme faktörü) dir. Otolog kök hücre aferezi için G-CSF, kemoterapi ile beraber kullanılır.

Hastaya infüze edilen CD34 pozitif hücrelerinin sayısının hesaplanması önemlidir. Bunun için ideal vücut ağırlığı veya ayarlanmış ideal vücut ağırlığı baz alınabilir (Topçuoğlu ve ark 2007).

Kök hücre transplantasyonları kök hücrelerin kaynağına göre kemik iliği transplantasyonu, periferik kan kök hücre transplantasyonu, kordon kanı transplantasyonu olarak üçe ayrılır.Ayrıca kök hücrenin temin edildiği donöre görede otolog kök hücre transplantasyonu, allojenik kök hücre transplantasyonu ve sinjeneik kök hücre transplantasyonu olarak kategorize edilirler.

Türkiye’de 1992 yılında ilk otolog periferik kök hücre nakli ve 1993 yılında ilk allojeneik periferik kök hücre nakli Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı’nda yapılmıştır (Gürman ve ark 1995).

1.3. Kök Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyonu) ve Saklanması

Hematopoitik kök hücrelerinin, elde edilmesinden hastaya infüzyonuna kadar geçen sürede canlılık ve fonksiyonlarını tam olarak koruyabileceği bir ortamda saklanması, hematopoitik yeniden yapılanmada önem arz etmektedir. Uygun şekilde dondurulduğu ve saklandığı zaman kök hücreler, hematopoitik yeniden yapılandırma kapasitelerini yıllarca koruyabilir (2.Ulusal Hemaferaz Kongresi Eğitim Kitabı sayfa 47, 2005).

Uzun süreli (hafta, ay, yıl) saklama gereksiniminde kök hücrelerin -80°C veya daha düşük ısılarda, canlılıklarını sürdürmeleri için gerekli işlemlerden geçirildikten sonra dondurularak saklanması gerekir.Hematopoitik kök hücrelerin dondurularak saklanmasında temel teknik basamaklar şöyledir:

1. Dondurma öncesi:

- Gerekiyorsa eritrositlerin azaltılması
- Kriyoprotektan ilavesi (Dimetilsülfoksit-DMSO-; Hidroksietil starç-HES-)
- Dondurularak saklama işleminin hücreler üzerine olumsuz etkilerini azaltan plazma proteinleri (otolog plazma veya plazma protein konsantreleri) ile işlem

2. Soğutma-dondurma dönemi: Programlı kademeli soğutma veya doğrudan -80°C dondurucuya yerleştirilmesi

3. Saklama: Nitrojen likit veya buhar fazında saklama veya -80°C mekanik dondurucuda saklama.

Dondurma işlemi esnasında kriyoprotektanlar son derece önemlidir. Bu ajanlar donma sırasında oluşan olumsuz solüsyon etkilerini su-lipit-protein kompleksinin kristalize olmasını engelleyerek ve hücre ile dışarısını eşzamanlı likit fazdan donma fazına geçirerek termal hasarı önler.

Farklı hücreler için optimal soğutma hızları farklılık gösterir ve en uygun soğutma hızı da kullanılan kriyoprotektana ve konsantrasyonuna göre değişkenlik gösterir. Programlı-kademeli hücre dondurucuları dondurma işleminin farklı fazlarında ürünün istenilen hızda dondurulmasını sağlar. %10 DMSO konsantrasyonunda hazırlanmış hematopoietik kök hücreler -40°C'ye kadar -1-2°C/dakika, daha sonra -5°C/dk hızda -80- -120°C'ye kadar soğutulur. Bu noktada ürün programlı dondurucudan alınarak uzun süreli saklama için tercihe göre likit veya buhar fazında nitrojen ortamına yerleştirilir. Günümüzde hematopoietik kök hücre ürünlerini merkezlerin çoğu nitrojenin likit fazında -190°C'de saklar.

1.4. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulmuş hücreler tekrar ısıtılırken iki önemli sorun hücre harabına yol açmaktadır. Birincisi, ısınma sırasında hücre içinde kristal oluşumunun başlaması ve hücrede mekanik hasarın ortaya çıkması. İkincisi, donma sırasında gelişen olayların tam tersinin, çözülme sırasında gerçekleşerek ekstrasellüler alanın hipotonik karakter kazanmasıdır. Bu olayın nedeni; ekstrasellüler ortamın, intrasellüler ortamdan önce çözülmesi sonucu oluşan ani serbest sıvı salınımıdır. Bu hipotonisite hücrelerin şişerek patlamasına yol açar. Özellikle bu olay, kuvvetli penetran kriyoprezervatiflerin varlığında daha belirgindir (1.Hemaferezis Atölye Çalışması Eğitim Kitabı Sayfa 55, Mayıs 2002).

Bu iki olaydan hücreleri koruyabilmenin en iyi yolu, çözünmenin dondurmanın aksine çok hızlı yapılmasıdır. Hücreleri çözünme sırasındaki ozmotik şoktan (dilüsyon şoku) koruyabilmenin bir yolu da hücre dışı osmolaritenin korunabilmesi için penetran olmayan (HES gibi) kriyoprezervatiflerin, penetran kriyoprotektanlarla beraber kullanılmasıdır.

Ayrıca ürün çözüldükten sonra ürün dilüe edilirken bu dilüsyonun yavaş yapılması da osmotik şoktan korunmak için gereklidir (hücre içinde yoğun bulunan DMSO 'nun dilüsyonla azalan osmotik gradiente bağlı olarak hücreden dışarı çıkışı için zaman tanınmalıdır). Bu nedenle donma esnasındaki etkilerden korunmada çok etkin olan penetran kriyoprezervatiflerin beraber kullanılması, en ideal kriyoprezervatif karışımı olacaktır. Bu karışımın getireceği bir diğer avantajda ürün çözüldükten sonra 37°C'ye gelen ürünlerdeki dimetilsülfoksit'in hücrelere olan direkt toksik etkisinin konsantrasyonun düşük olması nedeniyle daha az zarar verecek olmasıdır (Rowley ve ark 1993).

1.5. Otolog Kök Hücre Transplantasyonu

Otolog kök hücre transplantasyonu, hastadan elde edilen ve aynı hastaya geri verilen kök hücreleri tanımlar. Yüksek doz kemoterapi alan hastalarda kemik iliği yetmezliği olmakta ve hasta ölmektedir. Bunu önlemek için hastanın hematopoietik

kök hücreleri toplanır ve uygun şartlarda dondurulur,daha sonra hastaya yüksek doz tedavi verilir. Dondurulan kök hücreler 24 saat sonra eritilerek katater aracılığı ile hastaya geri verilir.Otolog kök hücre transplantasyonu kemosensitif malignitelere yüksek doz kemoterapi verilmek için yapılan işlemdir.

Otolog kök hücre transplantasyonu, kemik iliği ve periferik kan kök hücre olarak iki tipte yapılır.Otolog periferik kan kök hücre toplanmasının avantajları; hücrelerin kolay ve fazla miktarda toplanması,genel anestezi gerektirmemesi, toplanan hücreler arasında kemik iliğine göre daha az malign hücre olması ve hematopoietik iyileşmenin hızlı olmasıdır (To, L.B ve ark 1992, Duncan, N ve ark 1996).

Otolog kök hücre transplantasyonunun aşamaları; hasta seçimi,mobilizasyon rejimi ve kök hücre aferezi, kök hücrelerin dondurulması, yüksek doz kemoterapi, dondurulan hücrelerin eritilerek hastaya verilmesi şeklinde olmaktadır.

1.6. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu

Allojenik kök hücre transplantasyonu, gönüllü vericiden elde edilen ve hastaya verilen kök hücreleri tanımlar.Allojenik kök hücre transplantasyonu kemik iliği, periferik kök hücre ve göbek kordon kanı olarak üç şekilde yapılabilir.Allojenik kök hücre transplantasyonunun amacı;belirli bir hazırlama rejimi sonrası hematopoietik veya immünopoietik orijinli bir maligniteyi yok etmek, bu şekilde boşaltılan kemik iliği kavitesine verici orijinli hematoimmünopoietik dokuyu oluşturacak kök hücreleri yerleştirmektir.

Allojenik kök hücre transplantasyonunun aşamaları; hastaya transplant kararı verilmesi ve hazırlıklar, verici seçimi, hasta ve vericinin hazırlanması, hazırlık rejimi, kök hücre toplanması ve infüzyonu, graft versus host hastalığı profilaksisi, destek tedavisi ve engraftman takibi şeklinde olmaktadır.

1.7. Kök Hücre

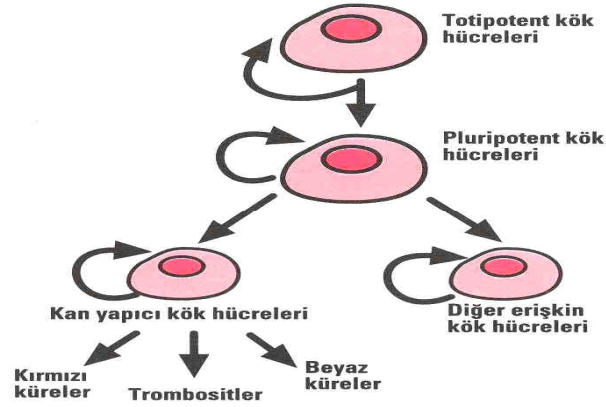
Kök hücreler genel olarak kendi kendini yenileyebilen, çok yönlü farklılaşabilen klonojenik hücreler olarak tanımlanır (Till, McCulloch,1961;Metcalf ve Moore, 1971).Kök hücreler, organizmanın yaşamı boyunca belirsiz periyotlarda kendi kendine bölünebilme kabiliyeti olan hücrelerdir.Uygun koşullarda ve uygun sinyaller eşliğinde kök hücreler organizmayı oluşturan diğer hücelere dönüşebilirler.Bu, kök hücrelerin kalp hücreleri,deri hücreleri ve sinir hücreleri gibi belirli şekil ve fonksiyona sahip olgun hücelere gelişebilme potansiyelidir.Kök hücreler, sadece doku ve organların gelişiminden ve yenilenmesinden sorumlu biyolojik birimler olmayıp aynı zamanda doğal seleksiyonla evrim geçiren birimlerdir (Irving, L. Weissman, 2000).

Kök hücreler; totipotent, pluripotent, unipotent olarak üç türe ayrılırlar.

Totipotent kök hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Bu hücreler; embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanırlar.Döllenmiş yumurta'ya "totipotent" denir.Latince totus'un anlamı bütün demektir.Totipotent hücre embriyoyu oluşturan tüm hücreleri, dokuları ve uterusu embriyonun gelişimini destekleyecek doku ve hücreleri oluşturma potansiyeline sahiptir.

Pluripotent kök hücreler organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir.Birçok bilim adamı pluripotent terimini mezoderm, endoderm ve ektoderm dediğimiz üç embriyonik germ tabakasının hepsinden oluşan hücreleri veren kök hücreleri tanımlamak için kullanır. Bu üç embriyo germ tabakası vücuttaki tüm hücrelerin embriyonik kaynağıdır. Vücudu oluşturan birçok farklı özelleşmiş hücrelerin tümü bu germ tabakalarının birinden köken alır.

Unipotent kök hücreler multi-potensiyel kök hücresi ve bu hücrelerin bölünmeleri sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış olan hücrelerdir. Unipotent kök hücre terimi sadece belirli bir hücreye kadar farklılaşabilen yetişkin organizmalardaki hücreler için kullanılan bir terimdir. Bu özellik dokuların devamlı olarak kendi kendini yenilemesine olanak sağlar.



Şekil 1. Kök Hücreleri ve Hematopoez

1.8. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücreler embriyonun gelişmesinin en erken dönemlerinden köken alır ve blastosit olarak adlandırılır. Embriyonik kök hücreler, blastositin iç hücre tabakasından embriyo uterin duvarına yerleşmeden önceki aşamasında oluşurlar. Embriyonik kök hücreler kendi kendini yenileyebilir ve pluripotenttir. Üç germ tabakasından köken alan hücrelere dönüşebilir İnsandaki ilk embriyonik kök hücre,1998 yılında Thomson ve arkadaşları tarafından elde edilmiştir (Thomson, J.A 1998). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar embriyonik kök hücrelerin gelecekte öncelikle nörodejeneratif, diabet ve myokard enfarktüsü gibi hücre dejenerasyonu ve ölümüyle karakterize hastalıkların hücre nakli ile gerçekleştirilebilecek tedavilerinde, erken dönem embriyonik gelişimin moleküler ve genetik düzeyde incelenmesinde, kanser tedavisinde ve ilaç fonksiyon testlerinde kullanılacak yegane hücresel kaynak olabileceğini göstermektedir.

1.9. Erişkin Kök Hücre

Erişkin kök hücreler, erişkin bireylerden elde edilen, birçok hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir. Diğer bütün kök hücreler gibi erişkin kök hücreler de iki temel özelliğe sahiptirler: Kendilerinin eş kopyalarını üretebilirler ve uzun dönemde

hücre proliferasyonu sağlayabilirler. Özel işlevleri yerine getirecek gelişmiş hücre tiplerine dönüşebilirler.

Tipik olarak kök hücreler tam farklılaşma fazından biraz önce ara hücre tipine dönüşür. Bu ara hücre tipine prekürsör veya progenitor (öncü) hücre denir. Progenitor hücreler fetal veya erişkin dokularda kısmen farklılaşmış hücrelerdir, daha sonra bölünerek tam farklılaşırlar. Bu hücelere, kararlı veya belli bir gelişme yoluna yönelmiş hücreler denilebilir.

Erişkin kök hücreler tüm dokularda dağılmışlardır ve buldukları yere göre farklı davranırlar. Erişkin bir kök hücre olarak sınıflanabilmek için, organizmanın yaşamı boyunca, hücrenin kendini yenileme özelliğine sahip olması şarttır. Bu kriter kök hücrenin doğasının temel kuralı olsa da in vivo olarak göstermek çok zor hatta imkansızdır.

1.10. Hematopoietik Kök Hücre

Hematopoietik kök hücreler, kandan ve kemik iliğinden izole edilen, kendi kendilerini yenileyebilen, çeşitli özelleşmiş hücelere farklılaşabilen, kemik iliğinden kan dolaşımına mobilize olabilen ve apoptosiz (zararlı ve gereksiz olan hücrelerin kendi kendini yok etme işlemi) denilen programlanmış hücre ölümüne gidebilen hücrelerdir. Hematopoietik kök hücreler, hücre popülasyonu içinde en iyi tanımlanmış hücrelerdir. Till, McCulloch, Wu, ve Siminovitch'in çığır açan deneyleri ile başlayarak lethal (öldürücü) dozda radyasyona maruz kalmış konakçılarının dalaklarında klon oluşturabilen (klonojenik) kemik iliği hücrelerinin myeloeritroid koloniler oluşturduğu ortaya konmuştur (Till ve McCulloch, 1961; Becker ve ark 1963). Bazı vakalarda bu klonojenik hücreler ikincil konakçılara transfer edildiğinde yeniden bütün kan hücre serilerini oluşturduğu gözlenmiştir (Siminovitch ve ark, 1963).

Kan hücreleri vücuttaki her bir hücre tipinin immün korunmasından ve devamlı bakımından sorumludur. Bu yüzden sürekli olarak deri hücreleri ile birlikte vücuttaki diğer dokulara göre kendi kendini en fazla yenileme yeteneğine sahiptir.

Kan ve immün (bağışıklık sistemi) hücrelerini oluşturan kök hücreler hematopoietik kök hücreler olarak bilinir.

Erişkin dokularındaki kök hücreler, fenotipik ve fonksiyonel olarak tanımlanmalarıyla birlikte direkt olarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Bunun en iyi örneği, hematopoietik kök hücrelerin otolog ve allojeneik transplantasyonda kullanımlarıdır. Hematopoietik kök hücreler kemoterapi ve/veya radyoterapi ile miyeloablasyon sağlanan hastalara verildiğinde adezyon molekülleri sayesinde kemik iliğine yerleşir ve yeni kan hücrelerini oluşturur, yani engraftman özelliği gösterir. Allojenik kemik iliği transplantasyonu ile lösemiler, kemik iliği yetmezlikleri, miyelodisplastik sendromlar tedavi edilirken, yüksek dozda kemoterapi uygulanmasına imkan sağlayacak otolog kemik iliği transplantasyonu ile çoğu solid ve hematolojik tümörlerin tedavisi mümkün olmaktadır. Kemik iliğindeki hematopoietik kök hücreler pluripotent özellikte olup en azından 10 farklı fonksiyonel (nötrofil, monosit/makrofaj, bazofil, eozinofil, eritrosit, trombosit, mast hücreleri, dentritik hücreler, B ve T lenfositler) hücre tipini oluşturabilir (Bellantuono, I. 2004).

Hematopoietik kök hücrelerinin, kemik iliğinde varlığını gösteren en önemli bulgu, miyeloablasyona uğratılmış kişiye verilen kemik iliğinin hematopoietik yapılandırılmayı sağlamasıdır. Hematopoietik kök hücrelerin hematopoietik yapılandırılmayı sağlamasının en önemli sebebi, hematopoietik kök hücrelerin kendi kendini yenileme yeteneklerinin olması ve daha olgun hücre gruplarına farklılaşmasındandır (Herzog ve ark 2003).

1.11. Normal İnsan Kan ve Kemik İliği Hücre Kültürlerindeki Koloni Tipleri

Bütün hematopoietik koloniler, tek tek hücrelerin bölünerek ve farklılaşarak morfolojik olarak tanımlanabilir progenitör oluşmasıyla gelişir. Koloni çalışmalarında rutin olarak kullanılan koşullar altında progenitörlerin hemen hepsi bölündükçe farklılaşır ve sonuç olarak belirli ve önceden tahmin edilebilen bir inkübasyon süresi sonunda bütün hücreler olgunluğa ulaşır ve bundan sonra koloni boyutu daha fazla artmaz. Bu, her koloni tipinin değerlendirilmesi açısından en iyi zamandır; çünkü

olgun hücreler zaman içinde lizis (parçalanma)e uğramaya başlayacaklardır. Koloni gelişiminin bu özelliği, progenitör gelişiminin değişik safhalarının oluşturdukları kolonilerin boyutlarına göre birbirlerinden ayrılmasını sağlar. Örneğin koloni daha büyük (koloninin içindeki hücre sayısı daha çok) olduğunda proliferatif kapasite daha büyüktür ve koloninin orijin aldığı progenitör daha primitiftir.

1.12. Eritroid Koloniler

Metilsellüloz besi yerlerinde eritropoietik progenitörler olgunlaştıklarında değişken sayıda hemoglobine eritroblast kümelerinden oluşan koloniler oluştururlar. Normalde ortamda yeterli miktarda eritropoietin yoksa, bu kümeler gelişim göstermez; ancak eritroid progenitör proliferasyonunun erken aşamaları başka faktörler tarafından da stimule edilmektedir. Bu nedenle eritropoietin yokluğunda bile BFU-E 'den büyüme, gelişme durmadan önce önemli miktarda hücre ortaya çıkabilir. Hemoglobine eritroblast kümelerinin son sayısı koloninin boyutunu tahmin etmek açısından uygun bir ölçek oluşturur ve eritroid progenitör hücre farklılaşmasının değişik aşamalarından köken alan kolonilerin tanımlanmasına izin verir. Ancak bu kümelerin birbirinden ayrı varlıklar olarak görünmeleri kültür şartlarındaki değişikliklerden kolayca etkilenir. Bunlardan bir tanesi ortamda çözülmüş olan metilsellülozun son konsantrasyonudur. Ortam daha viskoz olduğunda eritroblast kümelerinin büyük bir hücre kümesi halinde kalma eğilimi artar. Tersine ortam daha az viskoz olduğunda bu kümelerin daha çok sayıda küçük kümelere parçalanma eğilimleri artar.

Ortamda bulunan büyüme faktörlerinin tipleri ve konsantrasyonları eritroid koloni morfolojisini şiddetle etkileyen diğer bir parametredir. Eritroid kolonilerinin skorlama sayımında koloniyi yapan kümelerin sayısının yanı sıra koloninin içindeki toplam hücre sayısı da bir kriter olarak dikkate alınmalıdır.

1.13.CFU-E (Eritroid Koloni Oluşturan Üniteler)

CFU-E, en küçük ve hızlı olgunlaşan eritroid kolonilerinin oluşumuna yol açan progenitörlere verilen isimdir. Olgunlaştığında CFU-E' den orijin alan koloniler maksimum yaklaşık 100-200 eritroblast içeren 1-2 kümeden oluşur. Skorlamada geçerli olması için her kümenin en azından 8 eritroblast içermesi gerekir. Eritroblastlar metilsellüloz içinde hemoglobinin içeriklerine bağlı olarak verdikleri belirgin kırmızı-portakal rengi ile tanınırlar. Orijinal süspansiyonda CFU-E' den orijin alan kolonilerin çoğu, kültürdeki 10-12 gün içerisinde olgunluğa ulaşmış olur.

Bu süreden sonra koloni içindeki hücrelerde lizis başlayabilir. Eğer koloni skorlaması 14 ve daha ileri günlerden sonra yapılırsa kolonilerin görüntü olarak lizise uğramış kahverengi eritroblastlar içereceği akılda tutulmalıdır.

1.14. BFU-E

BFU-E terimi, CFU-E' den daha primitif olan eritroid progenitör sınıfını tanımlamakta kullanılır. BFU-E' nin ayırıcı özelliği CFU-E' ye oranla daha büyük, çoklu kümeli koloniler oluşturmasına imkan veren daha yüksek proliferatif kapasitesidir. Burst terimi, boyut olarak büyümüş ancak daha önce renksiz olan eritroid kolonilerinde hemoglobinin aniden belirmesi nedeniyle kullanılmıştır. Eritroid BFU'lar bazen üzüm salkımı morfolojisi şeklinde tanımlanır. Boyut olarak 3 küçük küme ya da 1 büyük küme ve 200 eritroblast içeren kolonilerdir. On altı ya da daha fazla küme ve on bin ya da daha fazla hücre içeren kolonilere kadar ulaşırlar. Rekombinant growth (büyüme) faktör kombinasyonları içeren metilsellüloz ortamında yetiştirilen eritroid koloniler skorlanırken hücre kümelerini birbirinden net olarak ayırmak oldukça zordur. Bu nedenle koloni boyutunun belirlenmesi daha sık olarak kolonideki hücre sayısının bir tahminine dayanmaktadır.

1.15. Olgun BFU-E

Olgun BFU-E' ler CFU-E' lerin en yakın öncülleri olan BFU-E' leri tanımlamakta kullanılır. Olgun BFU-E ler en az üç en fazla sekiz eritroblast kümeleri içeren ve mature koloni olarak boyutu 100-500 hücre arasında olan orta boydaki eritroid kolonileri oluşturma yetenekleri ile tanımlanır. Olgun BFU-E ler tarafından oluşturulan koloniler genellikle inkübasyondan sonra 10-12 gün içinde tam olarak hemoglobinize olurlar ve 16-18'inci günden sonra skorlandıklarında lizise uğramış kahverengi eritroblast içerdikleri gözlenir.

1.16. Primitif BFU-E

Primitif BFU-E'ler dokuz ya da daha fazla hemoglobinize eritroblast kolonileri içeren progenitör olarak tanımlanır (500'ün üzerinde hücre içeren koloniler). Bu koloniler, en çok lökosit conditioned ortam içeren metilsellülozda 18 günlük inkübasyondan sonra ya da rekombinant büyüme faktörleri kullanıldığında 14-16 gün sonra değerlendirilir. Daha erken dönemlerde kolonilerin pek çoğu hemoglobinize olmaya başlamıştır ve bu nedenle yanlışlıkla granülopoietik kolonilerle karıştırılabilir. Bazı nadir durumlarda boyut olarak çok büyümüş eritroid koloniler 18'inci günden sonraya kadar bile tam olarak hemoglobinize olmayabilir. Primitif BFU-E' ler bazen çok erken eritroid progenitör hücre farklılaşması ile ilgili özelliklerin araştırılmasının kolay olması açısından 9-16 eritroblast kümesi oluşturanlar ve 16' dan fazla eritroblast kümesi oluşturanlar olmak üzere daha alt gruplara ayrılabilir.

1.17. Granülopoietik Koloniler

Granülositler, makrofajlar ve her ikisinin klonojenik progenitörleri bu hücrelerden minimum 20-50 adet içeren koloni oluşturma yeteneklerine göre tanımlanır. Geliştirilen skorlama kriteri her labaratuvarında ayrı ayrıdır. Granulopoietik progenitörler yarıkatı ortamda geliştirilen ilk klonojenik hematopoietik hücrelerdir ve o dönemde CFU-C (colony forming unit-culture) olarak adlandırılmıştır. Çünkü o

dönemde ek farklılaşma potansiyellerinin olup olmadığını belirlemek mümkün değildi. Daha sonraları CFU-C' lerin büyük çoğunluğunun granülosit veya makrofaj farklılaşma yolu ile sınırlı olan progenitör popülasyonunu temsil ettiği anlaşıldığından CFU-G (granülosit koloni oluşturan üniteler), CFU-M (makrofaj koloni oluşturan üniteler), CFU-GM (granülosit, makrofaj -koloni oluşturan üniteler) terimleri kullanıma girmiştir.

Önceleri in-vitro olarak elde edilen granülopoietik kolonilerinin hemen hepsi nötrofil ve/veya makrofaj kolonileriydi ancak daha sonraları eozinofil ve bazofil (mast hücreleri) kolonileri tanımlanabilmiştir. Eozinofil ve bazofiller tipik olarak makrofajlarla karışmış olarak görülmezler ve ortamda bir miktar farklı görünüşleri vardır. Lökosit-kondisyone ortam içeren metilsellüloz besiyerleri aynı kültürde hem eritroid hem de granülopoietik progenitör üretmek için kullanılır. Bu nedenle skorlama yapmadan önce kültürler 18 günlük olana kadar beklemek gerekir, aksi halde erken dönemdeki hemoglobine olmamış eritroid koloniler nedeniyle granülosit ve makrofaj kolonilerinin sayısını olduğundan fazla saymak mümkündür.

Genellikle nötrofil ve makrofaj kolonileri homojen morfoloji göstermekte olup koloninin merkezinde daha konsantre, hücre çeperinde ise daha az yoğun bir hale yer alır. Nötrofiller küçük hücrelerdir. Makrofajlar daha büyük olma eğilimindedir bazıları ise çok büyük hücrelere dönüşür. Rutin çalışmalarda bazofil koloniler nadiren gözlenir. Eozinofil kolonilere özellikle periferik kanda bulunan progenitörlerden elde edilen kültürlerde daha sıklıkla rastlanır. Granülosit ve makrofaj kolonilerini boyutlarına göre ayırmak daha zordur. Eğer yeterince yüksek bir cut off değeri belirlenirse (örneğin 500-1000 hücre) değişik özellikleri olan granülopoietik progenitörler ayırt edilebilir.

1.18. Multi-Lineage Koloniler

CFU-GEMM (Koloni-oluşturan üniteler granülosit, eritrosit, makrofaj, megakaryosit) *multiple-lineage* hücreleri içeren ve sıklıkla eritroid hücrelerin de dahil olduğu kolonileri oluşturan progenitörlere verilen isimdir. Bu tür koloniler lökosit üretmesi için uygun ortam içeren besiyerlerinde minimum 18 günden sonra,

rekombinant büyüme faktörü kullanılan kültürlerde ise 14-16 günden sonra değerlendirilebilir.

1.19. Koloni Kültür Ortamı ve Hesaplama Prosedürleri

İnsan kanı ve kemik iliğinde bulunan hematopoietik progenitörler uygun metilsellüloz bazlı ortamda kültüre edildiklerinde koloniler oluşturur. Belirli eritroid progenitörler CFU ya da BFU olarak adlandırılır ve ayrıca her kolonideki olgun hücreler tip (lineage) ve sayısına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

CFU-E (Colony-forming unit-eritroid) 1-2 küme içinde 8-200 eritroblast oluşturur.

BFU-E (Burst-forming unit-eritroid) 3 ya da daha fazla küme ya da bunlara eşit sayıda eritroblast oluşturur.

CFU-GM (Colony-forming unit-granülosit ve makrofaj) 20 ya da daha fazla granülosit ve makrofaj oluşturur.

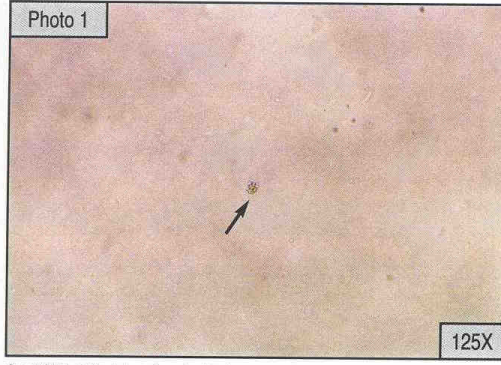
CFGEMM (Colony-forming unit-granülosit, eritroid, makrofaj, megakaryosit) Adı geçen ilk iki türden de bazı hücreler içeren 20 ya da daha fazla hücre oluşturur.

Lökosit conditioned ortam stimulan (uyaran) olarak kullanıldığında CFU-E ve olgun BFU-E' den ortaya çıkan koloniler inkübasyondan sonra 10-12 gün içinde diğer tip koloniler de 18 gün sonra skorlanmalıdır. Rekombinant büyüme faktörleri kombinasyonları içeren metilsellüloz kültürlerinde koloni büyümesi daha hızlı olur. Bu kültürlerde bütün kategorilerdeki koloniler inkübasyondan sonra 14-16 günler arasında skorlanabilir. Ayrıca bu koşullar altında bazı granülopoietik koloniler çok büyük boyuta ulaşır ve bu nedenle 16 günden sonra bazı CFU-E orijinli kolonilerin tanımlanmasına engel olabilir. Ancak kültürler çok erken skorlandığında bazı eritroid koloniler halen hemoglobine olmamaları nedeniyle yanlışlıkla granülopoietik olarak skorlanabilir.

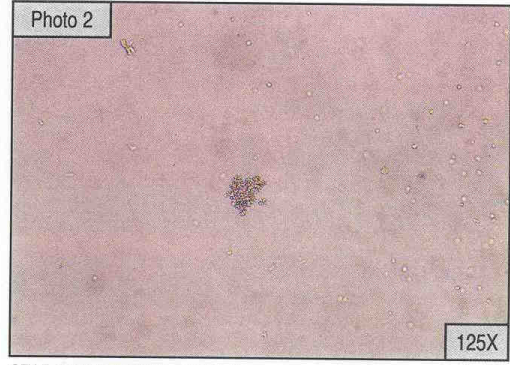
Koloni sayıları ve türlerinin saptanması en iyi şekilde yüksek kaliteli düz alan objektifleri olan ve 20-30X, 80X ve 150X büyütme sağlayan invert mikroskop

kullanılarak sağlanır. Sayımı kolaylaştırmak için her petri kutusu önce kapağı kapalı olarak 60mm gridli doku kültürü petri kutusu içine konur, böylece 35mm lik petri kutusunun içindeki birbirini izleyen satır ve sütunlar izlenebilir.Fotoğrafta görüldüğü gibi gridle 60mm lik petri kutusu renkli keçe kalem kullanılarak 4 kadrana oluşturacak şekilde + işareti ile bölünür. Ancak sayımda kültür petri kutusu + işaretinin kesişme noktasına yerleştirildiğinde kültür yarıya veya dörtte bir bölünerek sayım yapılacak alan küçültülür.

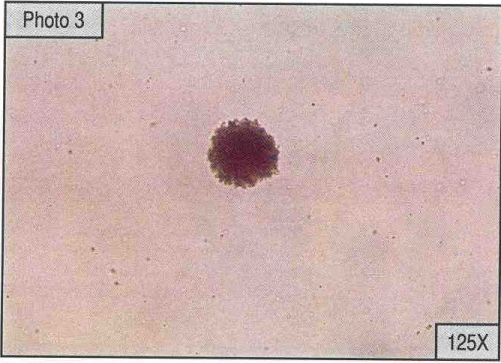
Koloni sayısı yüksek olup gerektirdiğinde kullanılan petri kutusu bölmesinin sayım sırasında bütün kutuyu temsil ettiğinden emin olmak için öncelikle bütün kutuyu küçük büyütmede gözden geçirmek gereklidir.Bu alandaki deneyim göstermiştir ki, kültür petri kutusunun kutuyu sağa sola değil yukarı aşağı olarak hareket ettirilerek vertikal olarak tarandığında sayımı daha kolay olmaktadır. Her çalışma en az iki kere değerlendirilmelidir.Daha sonra petri kutusundaki metilsellüloz kültür vasatının hepsindeki belirli bir bölümü ya da hepsindeki ortalama koloni sayısı orjinal hücre süspansiyonundaki değişik türdeki progenitör hücrelerinin ortalama sayılarını hesaplamada kullanılacaktır. Bu hesap son elde edilen metilsellüloz vasatında birim hacme düşen hücre sayısına dayanmaktadır. Bir laboratuvarında sayım kriterinin tutarlı olmasını sağlamak için düzenli olarak değişik çalışanlar tarafından yapılan sayımların çapraz karşılaştırmaları yapılmalıdır. Ayrıca her zaman kültür vasatlarını çalkalamamaya dikkat edilmelidir; çünkü metilsellüloz, katı olmayan visköz bir sıvıdır ve kültür vasatı kaba hareketlerle manipüle edildiğinde koloni formasyonu bozulacaktır.



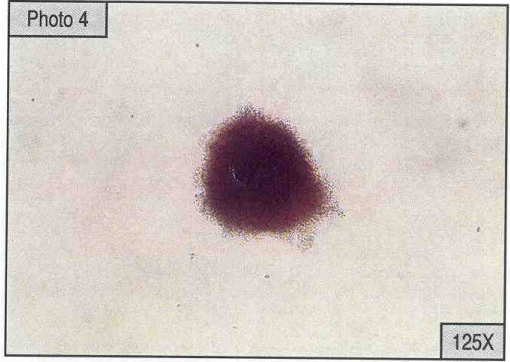
Small CFU-E. Contains >8 erythroblasts.



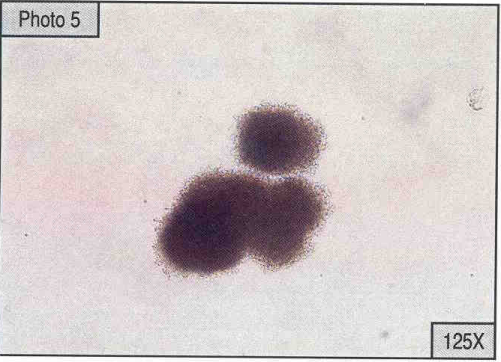
CFU-E. Approximately 200 erythroblasts.



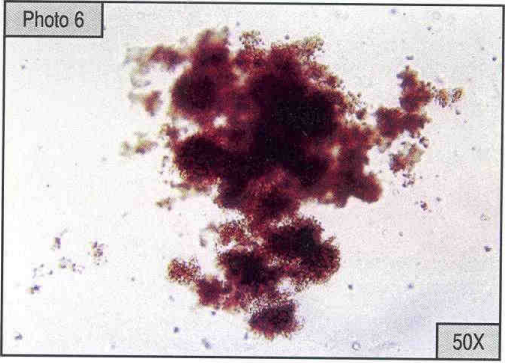
Small BFU-E.



BFU-E.



BFU-E.



Large BFU-E.

Şekil 2 A: İnsan hemopoetik hücre kolonilerinin tanılayıcı görüntüleri

Fotograf 1: 8 eritroblasttan daha büyük bir küme içeren CFU-E kolonisi

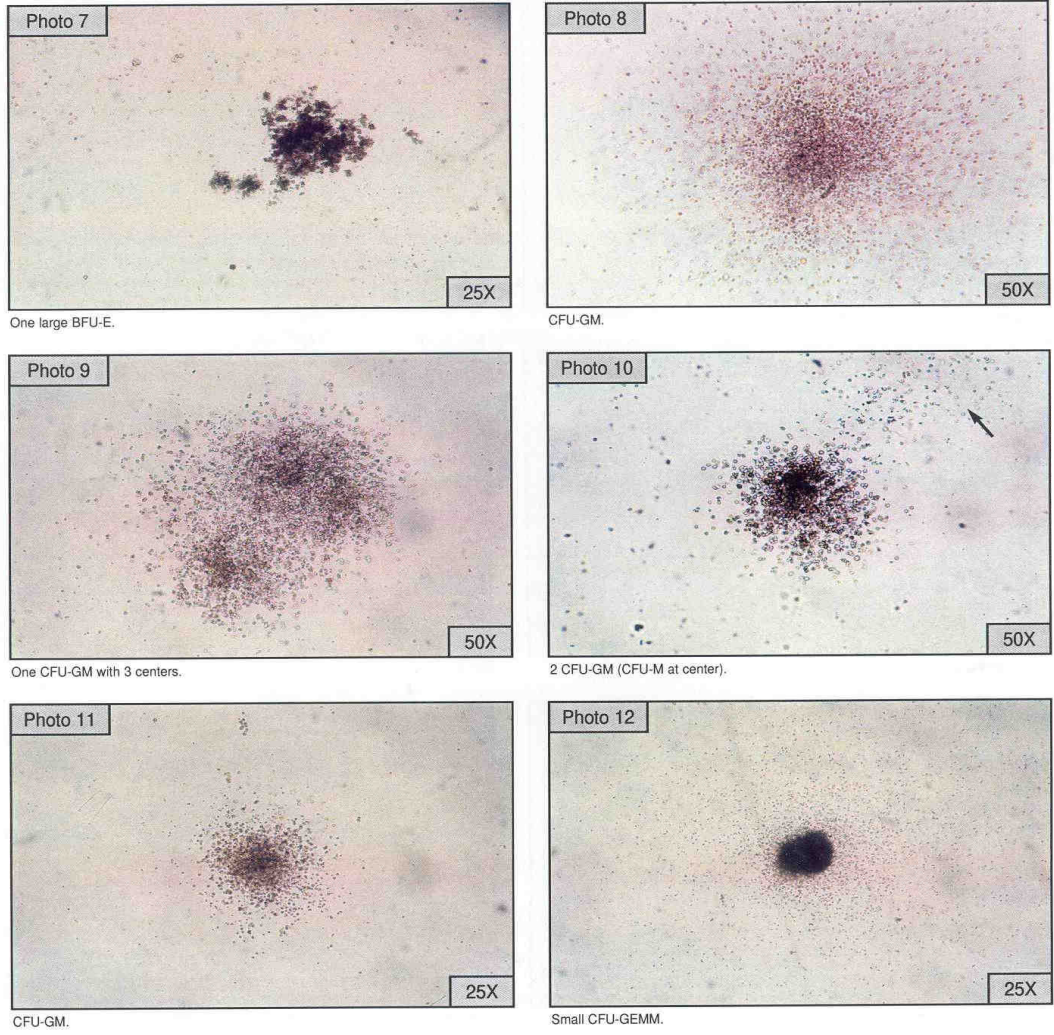
Fotograf 2: 20 hücreden büyük küme içeren CFU-E kolonisi

Fotograf 3: 200 hücreden fazla küme içeren BFU-E kolonisi

Fotograf 4: BFU-E kolonisi

Fotograf 5: 3-8 küme içeren BFU-E kolonisi

Fotograf 6: 16 kümeden fazla BFU-E kolonisi (binlerce eritroblast)



Şekil 2 B: İnsan hemopoetik hücre kolonilerinin tanılayıcı görüntüleri

Fotograf 7: Çoklu kümeler içeren BFU-E kolonisi

Fotograf 8: CFU-GM kolonisi

Fotograf 9: Üç ayrımlanabilir küme içeren CFU-GM kolonisi

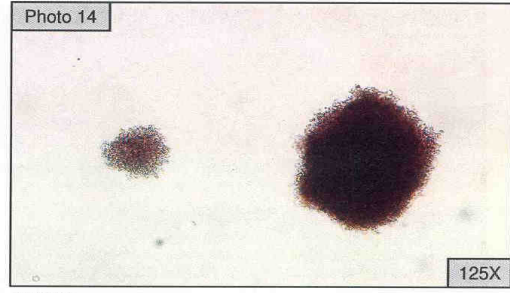
Fotograf 10: İki CFU-GM kolonisi

Fotograf 11: CFU-GM kolonisi

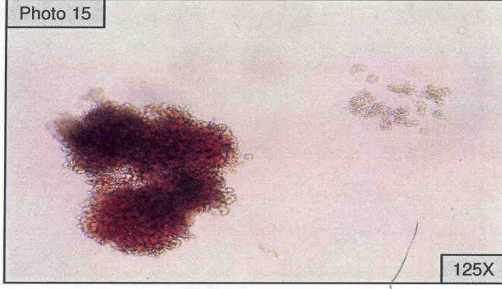
Fotograf 12: CFU-GEMM kolonisi



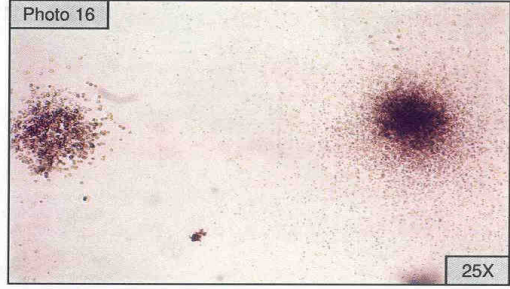
Large CFU-GEMM and BFU-E.



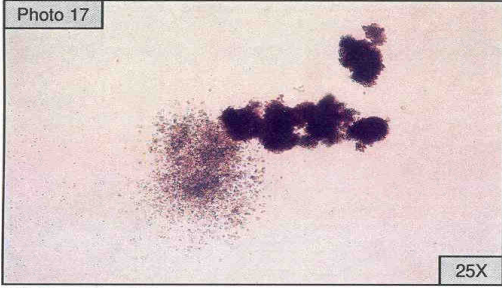
Two BFU-E.



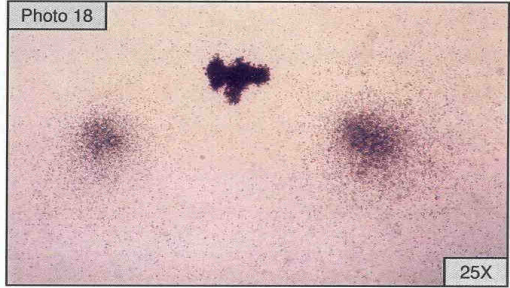
Two BFU-E.



CFU-M (left); small erythroid (center low); CFU-G (right).



CFU-GM and large BFU-E.



CFU-GM (left); BFU-E (center); CFU-GM (right).

Şekil 2 C: İnsan hemopoetik hücre kolonilerinin tanılayıcı görüntüleri

Fotograf 13: CFU-GEMM ve BFU-E kolonileri

Fotograf 14: İki BFU-E kolonisi

Fotograf 15: İki BFU-E kolonisi

Fotograf 16: İki CFU-GM ve bir küçük eritroid koloni

Fotograf 17: CFU-GM ve büyük BFU-E (>16 küme) kolonileri

Fotograf 18: Üç farklı koloni: CFU-GM (solda), BFU-E (orta) ve CFU-GM (sağ) kolonileri

Stem Cell Technologies

1.20. AMAÇ

Bu çalışmada amacımız transplantasyon için toplanan gerek otolog gerekse allojeneik periferik kan ürünlerinde:

- 1) CD34+ hücre sayısı ile invitro koloni oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesi,
- 2) Transplantasyon sonrası engraftman kinetikleri üzerine grafttaki CD34+ hücre sayısı ve koloni oluşturma birimlerinin etkisinin olup olmadığının gösterilmesi,
- 3) Periferik kan öncü hücrelerin infüzyon gününe kadar dondurulup infüzyon için eritildikten sonra koloni oluşturma yetenekleri ve engraftman kinetikleri üzerine etkilerinin yeniden değerlendirilmesidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Aferez Ünitesinde Mart 2006-Ağustos 2006 tarihleri arasında allojeneik (n=21) ve otolog periferik hematopoetik hücre (n=27) toplanan ve Kök Hücre Transplantasyon Ünitesinde hematopoetik hücre transplantasyonu yapılan toplam 48 hasta çalışmaya alınmıştır. Hasta özellikleri tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Hasta Özellikleri

	Allojeneik Periferik Kök Hücre Nakli	Otolog Periferik Kök Hücre Nakli
Ortanca yaş (dağılım)(yıl)	35 (16-62)	43 (21-66)
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	9/12	11/16
Tanı, n	AML, 13 ALL, 4 KML, 1 MDS, 1 HDL, 1 PNH, 1	HDL, 6 HL, 9 MM, 11 PNET, 1
Hazırlık Rejimi	Bu-Cy, 13 Cy-TBI, 5 Bu-Cy-ATG, 1 Flu-Bu-ATG, 1 Flu-Mel, 1	BEAM, 6 ICE, 6 RICE, 1 CVB, 1 Mel200, 11 Mel140, 1 Bu-Mel, 1
Transplantasyon sonrası immunproflaksi	CsA-Mtx(6), 18 CsA-MMF, 3	-

Kısaltmalar: AML: Akut myeloblastik lösemi, ALL: Akut lenfoblastik lösemi, KML: Kronik miyelositer lösemi, MDS: Miyelodisplastik sendrom, HDL: Hodgkin dışı lenfoma, HL: Hodgkin lenfoma, PNH: Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri, MM: Multiple myeloma, PNET: Primitif nöroendokrin tümör, Bu: Busulfan; Cy: Cyclophosphamide; TBI: Total beden ışınlaması; ATG: Antitimosit globulin; Flu: Fludarabine; Mel: Melphalan; BEAM: BCNU, Etoposide, Cytosine arabinoside, melphalan; ICE: Ifosfamide, Carboplatin, Etoposide; R: Rituximab; CVB: Cyclophosphamide, etoposide and BCNU; CsA: Cyclosporine-A, Mtx(6): Kısa dönem Methotrexate, MMF: Mycophenolate mofetil.

2.1. Periferik Hematopoetik Hücre Mobilizasyonu ve Toplanması

Allojeneik grupta hastaların HLA uyumlu kardeş vericilerinden imzalı gönüllü olur formu alındıktan sonra 10 mcg/kg/gün 2 eşit dozda cilt altı 5 gün G-CSF uygulanmıştır. Beşinci gün sabah G-CSF uygulanmasından 2 saat sonra kliniğimiz aferez ünitesinde aferez yöntemi ile fenwal amicus version 2.51 kullanılarak çoğunlukla bir günde, yalnızca bir olguda iki günde CD34+ hücre toplanmıştır. Allojeneik kök hücreler aynı gün hastalara santral venöz katater ile gerekli ön-medikasyon sonrası infüze edilmiştir.

Otolog grupta mobilizasyon için tüm hastalara bir hasta dışında kemoterapi ve takiben G-CSF 10 mcg/kg/gün uygulandı. Lökosit sayısı $1 \times 10^9/L$ geçtiğinde perifer CD34 sayımı yapıldı. 10/mclyi geçtikten sonra aferez yöntemi ile ortanca 2 aferez seansında (1-4 seans) hedeflenen $2 \times 10^6/kg$ CD34+ kök hücre toplandı. Otolog kök hücrelerin saklanması için dondurulacak ürün miktarına göre uygun kryoprezervasyon torbası seçilir, toplam karışım hacminin %10'u olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) eklenir, ürün ve %10 DMSO hacminden sonra toplam torba hacmini tamamlamak için otolog plazma eklenir, torbaların havası ekstraktör ile çıkartılarak çelik kasetler içerisinde nitrojen tanklarının buhar fazında 24 saat süreyle saklanır veya programlı dondurucuyla $-100^\circ C$ 'ye kadar dondurularak daha sonra sıvı nitrojen bölümüne alınarak $-196^\circ C$ 'de infüzyon gününe kadar saklanır.

2.2. Otolog Kök Hücrelerin Eritilmesi

Dondurulmuş kök hücreler içerisinde steril distile su bulunan benmaride $37^\circ C$ 'de kriyoprezerve edilmiş (dondurulmuş) ürün torbaları koruyucu bir torba içine koyularak hasta başında çözülmesi sağlanır. Çözünen üründen hücre canlılığı (viyabilite)na bakılır.

2.3. Hematopoetik Hücrelerin İnfüzyonu:

Hem allojeneik hem de otolog grupta hematopoetik hücreler hastalara gerekli ön-medikasyonu takiben santral venöz kateter ile infüze edildi. Otolog grupta transplantasyon sonrası +5.günde hastalara 5 mcg/kg/gün dozunda G-CSF intravenöz veya cilt altı yolla nötrofil sayısı 3 gün üst üste $0.5 \times 10^9/L$ üzerinde oluncaya kadar verilir.

2.4. Kültür Yöntemi ve Koloni Oluşturan Birimlerin Sayımı:

2.4.1. Gereken malzemeler:

- 1- Methocult Besiyeri (H3434, Stem Cell Technologies)
- 2- Amonyum klorit solusyonu (07800, Stem Cell Technologies)
- 3- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) ve %2 Fetal Bovine Serum (07700, Stem Cell Technologies)
- 4- Künt uçlu iğneler (28110 Stem Cell Technologies)
- 5- Daha önce test edilmiş kültür ekim kapları (27100, Stem Cell Technologies)
- 6- Gridded scoring dishes (27500, Stem Cell Technologies)
- 7- 15 ve 50 ml'lik falkon tüp
- 8- Steril pastör pipeti
- 9- Santrifüj
- 10- 100 ve 1000 mikrolitrelik otomatik pipetler
- 11- Steril pipet ucu
- 12- 100mm'lik petr kutusu

- 13- Distile su
- 14- %5 CO₂, %95 nem içeren inkübatör
- 15- Laminar Flow Hood

2.4.2. Kök Hücre Kültür Protokolü

- 1- Üründen 1cc tüpe alınır
- 2- Üzerine 3cc NH₄CL(amonyum klorit) eklenir.
- 3- Buzda 3 dakika vortekslenir.
- 4- Karışım üzerine 4cc FBS (%2 Fetal Bovine Serum içeren Iscove's Dulbeccos Medium9 1:1 oranında konur.
- 5- 1000g'da 20 dakika santrifüj edilir.
- 6- Süpernatant atılır, pellet üzerine 5cc FBS eklenip 1 dakika vortekslenir.
- 7- 300g'da 10 dakika santrifüj edilir.
- 8- Süpernatant atılıp 2cc FBS eklenip vortekslenir.
- 9- Hücre süspansiyonu ve FBS'den 1:40 olacak şekilde yeni bir steril tüpte dilüsyon hazırlanır. (Örneğin 800mikrolitre FBS içine 20 mikrolitre hücre süspansiyonu şeklinde)
- 10- Hazırlanan dilüsyondan bir ependorfa steril pipetle 200mikrolitre örnek alınır tam kan sayımı yapılır.WBC sayısı $1,0 \times 10^3$ olacak şekilde ayarlanır.
- 11- Steril tüpten 300mikrolitre çekilip yarı-katı besiyeri içine verilir.
- 12- 3 cc enjektör ucuna takılan 16 gauge küt iğne ucu ile tamamı enjektöre çekilip 35mm'lik 2 petr kutusuna eş ekim yapılır.Bu eş ekimde her bir petr kutusuna 1,1cc ekilir.

13- 100mm'lik petr içine hücre ekilen 2 petr kutusu ve distile su bulunan 3. bir petr yerleştirilir. Distile su içeren petr kutusunun ağzı açık olacak şekilde 100mm'lik petr kapağı kapatılır.

14- 37C'de inkübatöre konur.

15- Hasta ve/veya donörün adı, tarih ve ekilen hücre WBC'si ve hacmi hücre kültür defterine kaydedilir.

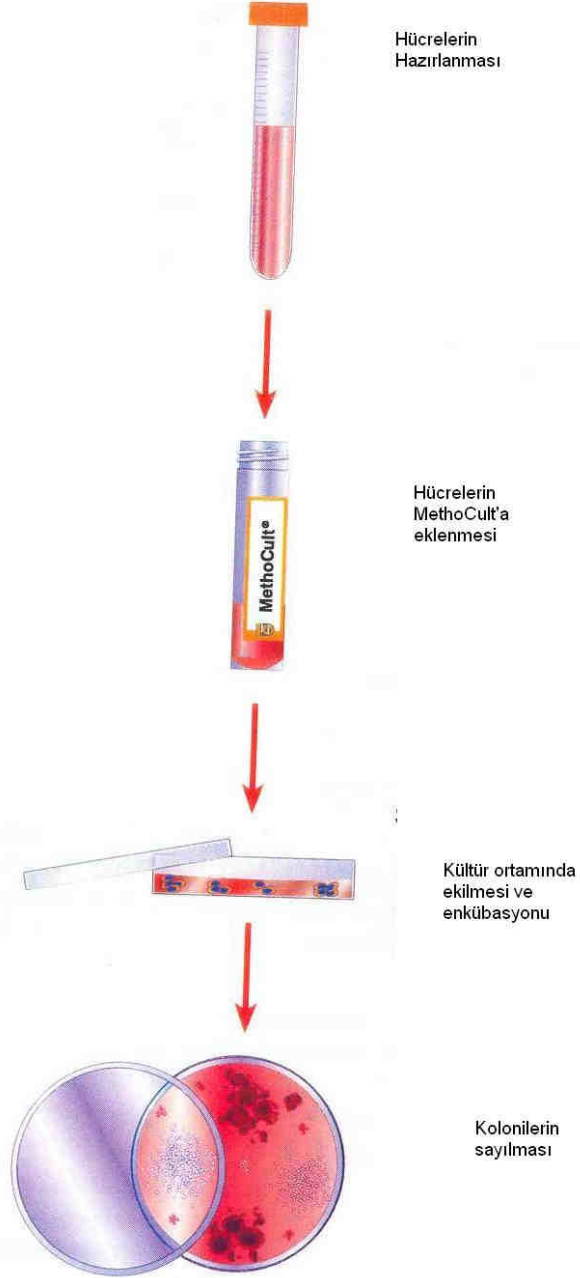
16- 14-18 gün sonra değerlendirme yapılır.

Değerlendirmede 2 petri kutusundaki hücrelerin sayımının ortalaması ile koloni sayısının tespiti şeklinde olur. Bu koloni sayısının CFU birimine hesaplanması aşağıdaki formülle olur:

$$\frac{\text{WBC} \times 10^6/\text{ml} \times \text{Hacim}(\text{ml})}{\text{Dilüe ürün WBC} \times 10^6/\mu\text{l} \times \text{Dilüe ürün hacim}/\mu\text{l}} \times \text{CFU} \times 10^4$$

İnfüzyon esnasında verilen koloni oluşturan birimler hastanın vücut ağırlığına (kg) bölünerek hesaplanır.

METHOCULT ORTAMINDA İNSAN HEMATOPOİETİK CFC ÖLÇÜMÜ



Şekil 3:

Stem Cell Technologies

2.5. Engraftman Kinetikleri:

Mutlak n6trofil sayısı ardışık 3 g6n $0,5 \times 10^9/L$ ve $1,0 \times 10^9/L$ ge7tiği ilk g6n n6trofil engraftmanı ve trombosit transf6zyonu ihtiyacı olmaksızın trombosit sayısının ardışık 3 g6n $20 \times 10^9/L$ ve $50 \times 10^9/L$ ge7tiği ilk g6n trombosit engraftmanı olarak kabul edilmiştir.

2.6. İstatistik:

Sayısal değişkenler ortanca ve dağılım aralığı olarak hesaplandı. İki grup arasındaki karşılaştırmalar parametrik olmayan Wilcoxon ve Mann-Withney U testi kullanılarak yapıldı. İkidenden fazla gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek y6nl6 Anova testi ile analiz edildi. Korelasyon analizleri i7in Pearson iki değişkenli korelasyon analizi kullanıldı. İstatistiksel olarak p değeri 0,05 altında ise anlamlı kabul edildi. T6m istatistiksel değerlendirmeler SPSS 11.5 hazır bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Graft Kalitesi:

Allojeneik hematopoetik hücre transplantasyonu (Allo-HHT) grubunda hastalara ortalama 149 ml (83-298 ml) hacminde, ortalama $4,94 \times 10^6/\text{kg}$ ($1,14-10,43 \times 10^6/\text{kg}$) CD34+ hücre infüze edilmiştir. Otolog-HKN grubunda ise ortalama 62 cc hacimde, ortalama $5,5 \times 10^6/\text{kg}$ ($1,07-15,40 \times 10^6/\text{kg}$) CD34+ hücre infüze edilmiştir. İnfüze edilen graftın içeriği ayrıntılı olarak tablo-2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: İnfüze edilen graftın kalitesi

	Allojeneik grup	Otolog grup
Ortalama lökosit sayısı ($\times 10^6/\text{kg}$) (Dağılım)	309,43 (190,70-410,28)	253,48 (100,05-334,29)
Ortalama çekirdekli hücre sayısı ($\times 10^8/\text{kg}$) (Dağılım)	6,58 (3,98-15,60)	2,54 (0,76-10,38)
Ortalama mononükleer hücre sayısı ($\times 10^8/\text{kg}$) (Dağılım)	4,59 (1,72-10,32)	1,41 (0,42-8,53)
Ortalama CD34 ⁺ hücre ($\times 10^6/\text{kg}$) (Dağılım)	4,94 (1,14-10,43)	5,50 (1,07-15,40)
Ortalama CD3 ⁺ hücre ($\times 10^7/\text{kg}$)	21,10 (0,90-5,50))	-

3.2. Kültür Özellikleri

Allojeneik grupta ortalama 182 mcl (72-429 mcl) graft kültüre ekildi. Ortalama 17 gün (14-18 gün) sonra koloni oluşturan birimler sayıldı. Kültürdeki ortalama CFU-E 4,00 (4-16), BFU-E 76,0 (1-268), CFU-GM 76,00 (5-156) ve CFU-GEMM 4,00 (1,00-12,00) idi.

Otolog grupta ortalanca 200 mcl (69-600 mcl) graft kültüre ekildi. Ortanca 16 gün (14-18 gün) sonra koloni oluşturan birimler sayıldı. Kültürdeki ortalanca CFU-E 4,00 (0-30), BFU-E 56,0 (0-196), CFU-GM 68,00 (1-192) ve CFU-GEMM 4,00 (0-20,00) idi.

Ayrıca otolog grupta 13 hastada kriyoprezerve edilen graft infüzyon için eritildiğinde ortalanca 300 mcl (165-476 mcl) kültüre ekim yapıldı. Ekim sonrası ortalanca 17 günde (16-19 gün) koloni oluşturan birimler değerlendirildi. Ekim öncesi hücre canlılığı ortalanca % 80'di. Ortanca CFU-E 4,00 (0-8,00), ortalanca BFU-E 24,00 (4-112), ortalanca CFU-GM 40,00 (0-128,00) ve ortalanca CFU-GEMM 4,00 (0-12,00) idi.

Otolog grupta bu 13 hastada graftının kültür özellikleri kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında koloni oluşturan birimlerin kriyoprezervasyon sonrası eritildikten sonra koloni oluşturma birimlerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı (Tablo 3).

Tablo 3: Graftın kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon-eritme işlemi sonrası koloni oluşturan birimlerin karşılaştırılması

	Kriyoprezervasyon		<i>p</i>
	Öncesi	Sonrası	
Ortanca CFU-E (dağılım)	4 (0-30)	4 (0-8)	0,043
Ortanca CFU-E x10 ⁴ /kg	0,27 (0,0-0,46)	0,32 (0,0-3,05)	0,018
Ortanca BFU-E (dağılım)	100 (7-196)	24 (4-112)	0,012
Ortanca BFU-E x10 ⁴ /kg	6,75 (0,57-12,62)	1,28 (0,32-9,29)	0,006
Ortanca CFU-GM (dağılım)	96 (1-128)	40 (0-128)	0,002
Ortanca CFU-GM x10 ⁴ /kg	5,85 (0,09-10,28)	2,89 (0,0-6,97)	0,002
Ortanca CFU-GEMM (dağılım)	8 (0-20)	4 (0-12)	0,002
Ortanca CFU-GEMM x10 ⁴ /kg	0,44 (0,0-2,34)	0,21 (0,0-0,46)	0,005

3.3. İnfüze Edilen Graftta Koloni Oluşturan Birimler

Kültürdeki koloni oluşturan birimler graftın lökosit miktarı ve hacmine göre değerlendirilerek, grafttaki toplam koloni miktarları hesaplandı (Tablo 4).

Tablo 4: İnfüze edilen grafttaki koloni oluşturan birimlerin miktarı

	Allojeneik Grup	Otolog Grup
Ortanca CFU-Ex10 ⁴ /kg	0,91 (0,53-2,70)	0,47 (0,0-3,05)
Ortanca BFU-Ex10 ⁴ /kg	14,00 (0,40-59,10)	5,93 (0,0-20,01)
Ortanca CFU-GMx10 ⁴ /kg	14,19 (2,01-40,11)	5,85 (0,09-26,68)
Ortanca CFU-GEMMx10 ⁴ /kg	0,88 (0,16-2,69)	0,65 (0,0-2,34)

3.4. CD34+ Sayısı ve Koloni Oluşturan Birimler Arasında İlişki

CD34+ hücre sayısı ile tüm koloni oluşturan birimler arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki saptandı (p<0,05). Koloni oluşturan birimler kendi aralarında pozitif yönde anlamlı ilişki gösterdi.

3.5. Engraftman Kinetikleri

Otolog grupta 2 hasta transplantasyon sonrası erken dönemde engraftman olmadan enfeksiyon nedeni ile öldükleri için, 25 hasta üzerinden değerlendirme yapılabilmektedir. Ortanca nötrofil engraftmanları (> 0,5x10⁹/L ve > 1x10⁹/L) 10.günlerde (8-14 ve 9-15.gün), ortanca trombosit engraftmanları (> 20x10⁹/L ve > 50 x10⁹/L) 11.gün (9-17.günler) ile 14.günde (9-23.günler) gerçekleşmiştir.

Allojeneik grupta 2 hasta transplantasyon sonrası hematolojik toparlanma olmaksızın ciddi enfeksiyon nedeni ile ölmüştür. Bu nedenle değerlendirmeler 19 hasta üzerinden yapılabilmektedir. Ortanca nötrofil engraftmanları (> 0,5x10⁹/L ve > 1x10⁹/L) 14.gün (10-22) ile 15.gün (11-34.gün), ortanca trombosit engraftmanları (>

20x10⁹/L ve > 50 x10⁹/L) 15.gün (11-34.günler) ile 15.günde (12-27.günler) gerçekleşmiştir.

3.6. Engraftman Kinetikleri ve Graftdaki CD34+ Hücre Sayısı ile İlişki

Engraftman ile verilen CD34+ hücre sayısı arasında korelasyon analizi yapıldığında hem otolog hem de allojeneik grupta bir ilişki saptanmadı. Ayrıca ortanca CD34+ hücre sayısı veya persentile göre gruplandırıldığında engraftman sürelerinin benzer olduğu görüldü.

Otolog grupta infüze edilen CD34+ hücre sayısı ile engraftman kinetikleri arasında bir korelasyon analizinde bir ilişki saptanmadı. Ancak, CD34+ hücre sayısını persentile göre (dağılımına göre <% 25, % 25-% 75, > % 75) 3 gruba ayırdığımızda, CD34+ hücre sayısı 3,2x10⁶/kg üzerinde ise engraftman sürelerinin kısaldığı, istatistiksel olarak nötrofil >1,0x10⁹/L de istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (Tablo 5).

Tablo 5: Grafttaki CD34+ 10e6/kg hücre sayısı ve engraftman kinetikleri

Engraftman	<3,20 (n=6)	3,20-7,64 (n=13)	>7,64 (n=6)	p
Nöt>0,5x10 ⁹ /L	11,5 (10-13)	10,0 (9-12)	10,0 (8-14)	0,095
Nöt>1,0x10 ⁹ /L	12,5 (10-14)	10,0 (9-12)	10,0 (9-15)	0,048
Tro>20x10 ⁹ /L	12,0 (10-17)	11,0 (9-15)	9,5 (9-15)	0,223
Tro>50x10 ⁹ /L	16,5 (10-23)	14,0 (10-17)	12,5 (9-22)	0,236

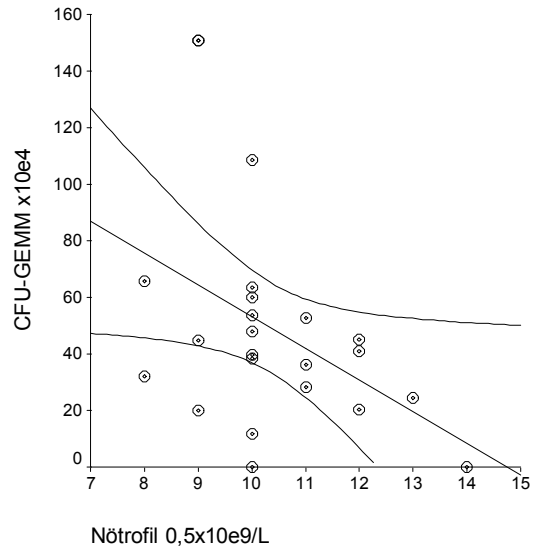
3.7. Engraftman Kinetikleri ve Koloni Oluşturan Birimler ile İlişkisi

Hem nötrofil hem trombosit engraftmanı ile infüze edilen üründeki koloni oluşturan birimler arasında bir ilişki olup olmadığı değerlendirildiğinde:

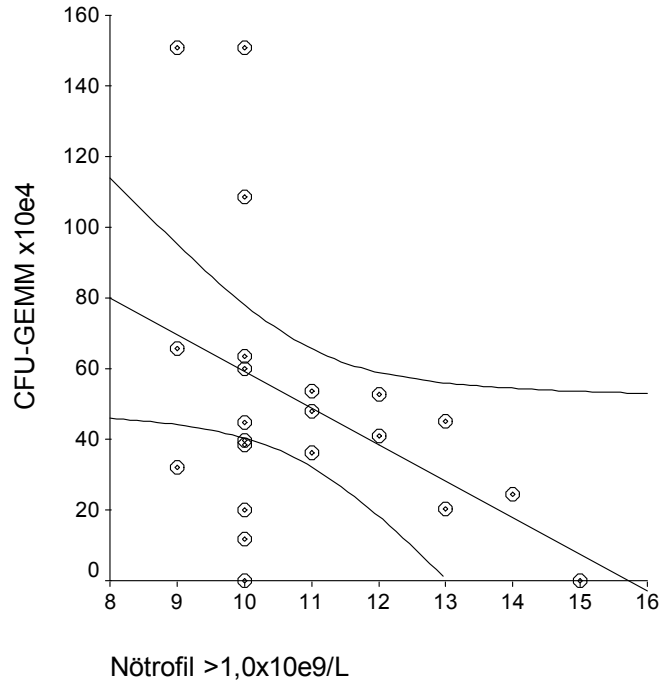
Allojeneik grupta istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 6). Otolog grupta CFU-GEMM ile nötrofil engraftmanları (Grafik 1,2) ve BFU-E ile trombosit $> 50 \times 10^9/L$ arasında negatif yönde bir ilişki saptandı (Tablo 6, Grafik 3). Otolog grupta CFU-GM sayısı ortancanın üzerinde ise nötrofil engraftman süresini kısalttığı görüldü [10 güne (9-13 gün) karşı 11 gün (9-15 gün), $p=0,06$].

Tablo 6: Engraftman kinetikleri ile koloni oluşturan birimler arasında ilişki

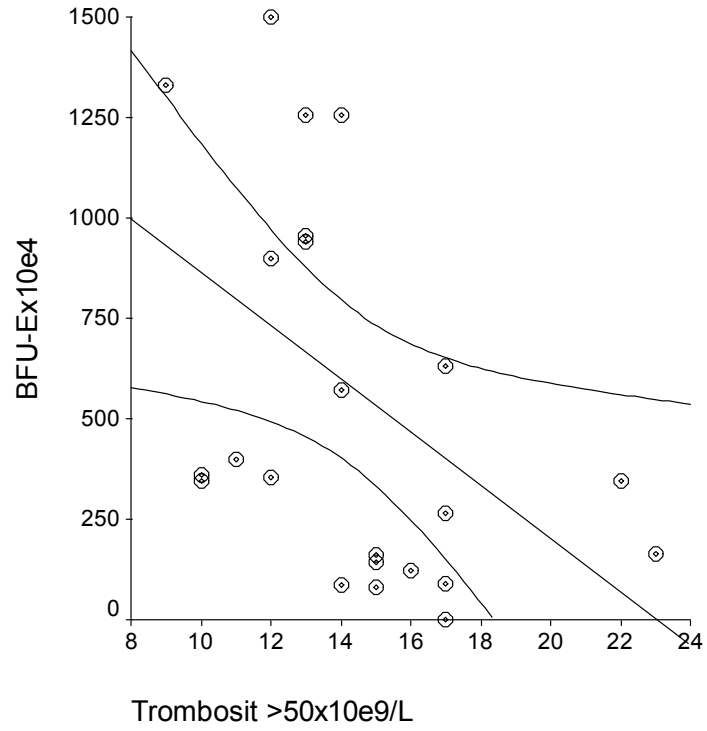
Engraft.	Allojeneik Grup				Otolog Grup			
	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM
Nöt>0,5	r= -0,280 p=0,260	r= +0,085 p=0,729	r= -0,124 p=0,614	r= +0,045 p=0,861	r= -0,031 p=0,824	r= -0,307 p=0,144	r= -0,224 p=0,305	r= -0,425 p=0,043
Nöt>1,0	r= -0,151 p=0,549	r= +0,072 p=0,771	r= +0,050 p=0,838	r= +0,150 p=0,553	r= +0,153 p=0,465	r= -0,254 p=0,232	r= -0,215 p=0,324	r= -0,422 p=0,051
Tro>20	r= +0,05 p=0,836	r= -0,073 p=0,774	r= +0,220 p=0,381	r= +0,073 p=0,792	r= -0,071 p=0,735	r= -0,233 p=0,274	r= -0,089 p=0,685	r= -0,178 p=0,429
Tro>50	r= -0,360 p=0,171	r= +0,281 p=0,292	r= +0,304 p=0,253	r= +0,014 p=0,958	r= -0,028 p=0,893	r= -0,447 p=0,029	r= -0,290 p=0,180	r= -0,322 p=0,143



Grafik 1: Nötrofil engraftmanı ($0,5 \times 10^9/L$) ile CFU-GEMM arasında ilişki ($r^2=0,181$ $p=0,043$)



Grafik 2: Nötrofil engraftmanı ($1,0 \times 10^9/L$) ile CFU-GEMM arasında ilişki ($r^2=0,178$ $p=0,051$)



Grafik 3: Trombosit engraftmanı ile BFU-E arasında ilişki ($r^2=0,1995$ $p=0,029$)

Otolog grupta 13 hastada kriyoprezervasyon sonrası infüzyon için eritilen grafttaki koloni oluşturan birimler ile engraftman kinetikleri karşılaştırıldığında herhangi bir ilişki saptanmadı.

Tablo 7: Kriyoprezervasyon sonrası eritildikten sonra kültüre edilen grafttaki koloni oluşturan birimler ile engraftman kinetikleri arasında ilişki

Engraftman	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM
Nöt>0,5	$r=-0,342$ $p=0,232$	$r=-0,163$ $p=0,579$	$r=-0,198$ $p=0,498$	$r=-0,124$ $p=0,674$
Nöt>1,0	$r=-0,267$ $p=0,356$	$r=+0,039$ $p=0,895$	$r=-0,011$ $p=0,970$	$r=+0,21$ $p=0,943$
Tro>20	$r=-0,260$ $p=0,370$	$r=-0,319$ $p=0,266$	$r=-0,270$ $p=0,351$	$r=-0,220$ $p=0,451$
Tro>50	$r=-0,388$ $p=0,170$	$r=-0,290$ $p=0,315$	$r=-0,418$ $p=0,137$	$r=-0,049$ $p=0,867$

4. TARTIŞMA

Hastaya infüze edilen grafttaki progenitör hücre miktarının transplantasyon sonrası yeniden hematolojik yapılanmadaki önemi bilinmektedir (Zimmerman, T ve ark, 1995; Pecora, A.L, 1999; Schulman, K.A, 1999). Eğer progenitör hücre miktarı düşük ise trombosit ve daha az oranda da granüosit toparlanması gecikmektedir (Weaver, C.H, 1995). Grafttaki progenitör hücre sayısının tayininde çeşitli yöntemler kullanılır (To, L.B, ve ark, 1997). Transplantasyonun yapıldığı ilk dönemlerde mononükleer hücre (MNH) sayısı kullanılmaktaydı. Ancak MNH sayısının engraftmanı yeterli oranda öngörmediği gösterildikten sonra, kültür ortamlarında CFU-GM sayıları progenitör hücre miktarını belirlemede kullanılmıştır. Bu yöntemin zaman alıcı olması nedeni ile günümüzde, kök hücre belirleyici ve bir hücre yüzey antijeni olan, ayrıca akım sitometri yöntemi ile aynı günde tayin edilebilen, CD34+ hücre sayısı kullanılmaktadır. Hematolojik toparlanma için gerekli CD34+ miktarı $2-5 \times 10^6/\text{kg}$ olmalıdır (Bender, J.G, ve ark, 1992) . Engraftman kinetikleri ve CD34+ hücre miktarı arasında pozitif yönde bir ilişki olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada allojeneik periferik kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda hematolojik iyileşme ile CD34+ hücre dozu arasındaki ilişki araştırılmış ve CD34+ hücre dozuyla daha hızlı hematolojik iyileşme arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (İlhan, O ve ark., 1999). Aynı grubun yaptığı diğer bir çalışmada CD34+hücrelerin alt popülasyonu olan CD41+ ve CD42+hücre ile trombosit engraftmanı arasındaki ilişki araştırılmış ve infüze edilen CD41+,CD42+ hücre sayısı arttıkça trombosit engraftman süresinin kısaldığı görülmüştür.(Demirer, T ve ark 2001). Diğer yandan bir çalışmada hematolojik hastalığı olmayan bireylerin ve hematolojik hastalığı olanların kemik iliklerinde kantitatif olarak CFU-F/CFU-GM oranına bakılmış ve hematolojik hastalığı olanlarla olmayanlar arasında fark olmadığı görülmüştür (Yüksel, K.M, 2005). Çalışma grubumuzda da CD34+ hücre sayısı ile engraftman kinetikleri arasında otolog grupta pozitif yönde bir ilişki saptandı; ancak allojeneik grupta CD34+ hücre sayısı ile engraftman kinetikleri arasında böyle bir ilişki gösterilemedi. Bunun nedenleri; allojeneik grupta bazı hastalarda indirgenmiş yoğunlukta hazırlık rejimi kullanımı hastaların biri dışında hepsinde verilen grafttaki CD34+ hücre sayısının $2 \times 10^6/\text{kg}$ 'ın üzerinde olması ile

açıklanabilir. Ayrıca allojeneik grupta hasta sayımızın azlığı nedeni ile hazırlık rejimi doz yoğunluğuna göre ayrı bir istatistiksel analiz yapılmadığı için, bu grupta CD34+ hücre sayısı ile engraftman süreleri arasındaki ilişki konusunda değerlendirme yapmak sağlıklı olmayabilir.

CD34+ ve koloni oluşturan birimler arasında pozitif yönde ilişki birkaç çalışmada gösterilmiştir (Gianni, A.M, ve ark, 1989; Haynes, A ve ark, 1995). Ancak çalışma grubumuzda ters yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır. CD34+ hücre miktarının artışı koloni oluşturan birimlerin azalmasına neden olmuştur. Bu olay farklı CD34+ hücre altgruplarının koloni oluşturma yeteneklerinin de farklı olması, CD34+ hücre miktarının artması ile hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin azalması ile açıklanabilir. Bizim çalışmamıza benzer olarak Jansen ve arkadaşları otolog periferik kanda CD34+ hücre miktarı ile CFU-GM arasındaki ilişkinin negatif yönde olduğunu bildirmektedirler (Jansen, E.M ve ark, 2007).

CD34+ hücre sayısı ve koloni oluşturan birimler hematolojik toparlanmayı belirlemede kullanılabilir; ancak her birinin hematolojik toparlanmayı öngörme değerleri halen sınırlıdır. CD34+ hücre sayısı ile engraftman arasındaki bir ilişkiye benzer olarak otolog grupta CFU-GM'nin özellikle nötrofil engraftmanı üzerinde olumlu etkisi görülmekteyken allojeneik grupta bu etki gösterilememiştir. Ayrıca, otolog grupta CFU-GEMM ile nötrofil engraftmanı arasında negatif yönde, ancak zayıf bir ilişki saptanmıştır. Meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada infüze edilen üründeki BFU-E miktarı ile nötrofil ve trombosit engraftmanı arasında ilişki saptanmıştır (Cooper, B.W ve ark, 1997). Ayrıca bu çalışmada BFU-E miktarının, CFU-GM miktarına göre hematolojik toparlanmayı daha iyi öngörebildiği de bildirilmektedir. Çalışmamızda da benzer olarak BFU-E ile trombosit engraftmanı arasında orta derecede negatif yönde bir ilişki gözlenmiştir.

Bilindiği üzere kriyoprezervasyon sonrası hücreler eritildiğinde canlılığı azalmaktadır (Humpe, A. 1997). Kriyoprezervasyon ve eritilme işlemi sonrası grafttaki canlı CD34+ hücreler veya CFU-GM'nin engraftmanı belirlemede önemli olduğu Yang H ve ark.ları tarafından gösterilmiştir (Yang, H ve ark, 2005). Otolog grupta 13 hastanın progenitör hücreleri eritildikten sonra, kültüre ekildiğinde koloni oluşturan birimlerin anlamlı oranda azaldığı görüldü. Bu 13 hastada engraftman

kinetikleri ve koloni oluşturan birimler arasında ilişki değerlendirildiğinde, koloni oluşturan birimlerin engraftman sũresine etkisi olmadığı gũrũldũ. Hũcreler dondurulup eritildikten sonra koloni oluşturma yetenekleri azalmasına rağmen, engraftman kinetikleri ũzerine olumsuz bir etkisi olmadı. Ancak, bu grupta hasta sayısı az olduğu için, koloni oluşturan birimlerin engraftman ũzerine bir etkisinin olup olmadığını sũyleyebilmek için hasta sayısının artırılarak yeniden değerlendirme yapılması gerekir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda transplantasyon için mobilizasyon sonrası toplanan gerek otolog gerekse allojeneik periferik kan ürünlerinde CD34+ hücre sayısı ile invitro koloni oluşturma yeteneği ve infüze edilen grafttaki CD34+ hücre sayısı ve koloni oluşturma birimleri ile transplantasyon sonrası engraftman kinetikleri arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırıldı. Periferik kan öncü hücreleri infüzyon gününe kadar dondurulup, infüzyon için eritildikten sonra koloni oluşturma yetenekleri ve engraftman kinetikleri üzerine etkileri yeniden araştırılmıştır.

Sonuçta:

- 1- CD34+ ve koloni oluşturan birimler arasında negatif yönde, anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür.
- 2- Otolog grupta nötrofil engraftmanı ile graftın kalitesi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.
- 3- Fakat, bu grupta hücreler dondurulup, eritildikten sonra hem koloni oluşturma yetenekleri azalmış, hem de engraftman kinetikleri ile bir ilişki gösterilememiştir. Bu nedenle hasta sayısı arttırıldıktan sonra, kriyoprezervasyon ve eritme işlemi sonunda koloni oluşturan birimler değerlendirilerek istatistiksel analizler yapılması daha sağlıklı sonuçlar verebilir.
- 4- Allojeneik grupta ise ne CD34+ hücre sayısı ne de koloni miktarı ile engraftman arasında bir ilişki saptanmıştır. Ancak, allojeneik grupta özellikle indirgenmiş yoğunlukta hazırlık rejimi alan hastaların olması nedeniyle, daha homojen bir hasta grubunda değerlendirme yapmak gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Otolog ve Allojeneik Periferik Kök Hücre Aferezi ile Toplanan Ürünlerden Yapılan Nakillerde Kök Hücre Kültür Koloni Sayısı ile Nakil Sonrası Engraftman Arasındaki İlişki

Çalışmamızda amacımız, otolog veya allojeneik hematopoetik hücre transplantasyonu yapılan toplam 48 hastaya infüze edilen grafttaki CD34+ hücre miktarı ve in vitro olarak değerlendirilen koloni oluşturma birimleri miktarının belirlenmesidir. Ayrıca bu hücre miktarları ile transplantasyon sonrası engraftman kinetikleri arasında bir ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir. Grafttaki ortalama koloni miktarları otolog grupta CFU-E $0,91 \times 10^4$ /kg, BFU-E $14,00 \times 10^4$ /kg, CFU-GM $14,19 \times 10^4$ /kg ve CFU-GEMM $0,88 \times 10^4$ /kg iken, allojeneik grupta ise sırasıyla $0,47 \times 10^4$ /kg, $5,93 \times 10^4$ /kg, $5,85 \times 10^4$ /kg ve $0,65 \times 10^4$ /kg idi. Otolog grupta hücreler dondurulduktan ve transplantasyon için eritilme işleminden sonra 13 hastada in vitro olarak koloni oluşturma yetenekleri değerlendirildi. CD34+ hücre sayısı ile tüm koloni oluşturan birimler arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki saptandı ($p < 0,05$). CD34+ hücre sayısını persentile (ortalama dağılıma) göre 3 gruba ayırdığımızda, CD34+ hücre sayısı $3,2 \times 10^6$ /kg üzerinde ise engraftman sürelerinin kısaldığı, istatistiksel olarak nötrofil $> 1,0 \times 10^9$ /L de istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Allojeneik grupta ise CD34+ hücre miktarı ile engraftman kinetikleri arasında bir ilişki gösterilemedi. Otolog grupta ise sadece CFU-GEMM ile nötrofil engraftmanı arasında negatif yönde zayıf bir ilişki saptandı. Ancak, otolog grupta CFU-GM sayısı ortancaya göre değerlendirildiğinde, infüze edilen CFU-GM ortalama değerinde ise nötrofil engraftman süresini kısalttığı görüldü [10 güne (9-13 gün) karşı 11 gün (9-15 gün), $p = 0,06$]. Otolog grupta kriyoprezervasyon sonrası kök hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri anlamlı oranda azaldı ($p < 0,05$); ancak engraftman üzerine belirgin etkisi saptanmadı. Çalışmamızda yer alan allojeneik hasta grubunda ise koloni oluşturan birimlerin engraftmanı belirlemediği görüldü.

Sonuçta, çalışmamızda koloni oluşturan birimlerin transplantasyon sonrası hematolojik iyileşmeyi belirlemede yetersiz kalması nedeni ile, daha fazla hasta içeren ve tanı ve transplantasyon özellikleri benzer, hastalık tanıları ve hazırlık rejimi

gibi, daha homojen hasta gruplarında benzer çalışmanın yapılmasının, bize bu konuda daha yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Allojeneik ve otolog kök hücre transplantasyonu, koloni oluşturan birimler, hematolojik iyileşme, CD34+hücre, kriyoprezervasyon.

SUMMARY

The Relationship Between the Number of Stem Cell Culture Colony and Engraftment Following Transplantation by Products (Peripheral Stem Cell) Harvested via Autologous and Allogeneic Stem Cell Apheresis

In our study, we aimed at determining the quantity of CD34(+) cell in the graft infused to 48 patients who underwent autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation and in vitro evaluated colony forming units. We also evaluated the correlation with cell quantity and engraftment kinetics following transplantation. Medium colony quantity in the grafts of autologous group were CFU-E $0.91 \times 10^4/\text{kg}$, BFU-E $14.00 \times 10^4/\text{kg}$, CFU-GM $14.19 \times 10^4/\text{kg}$, CFU-GEMM $0.88 \times 10^4/\text{kg}$ and in allogeneic group were $0.47 \times 10^4/\text{kg}$, $5.93 \times 10^4/\text{kg}$, $5.85 \times 10^4/\text{kg}$, $0.65 \times 10^4/\text{kg}$, respectively. In autologous group, in vitro colony-forming ability of cells following freezing and melting for transplantation was studied in 13 patients.

There was a significant negative correlation between CD34(+) cell number and all colony-forming units.

As CD34(+) cell number was allocated into three groups with respect to percentile, engraftment duration was shorter when CD34(+) cell number was over $3.2 \times 10^6/\text{kg}$ and significant in neutrophil count $>1.0 \times 10^9/\text{L}$.

There was no correlation between CD34(+) cell number and engraftment kinetics in allogeneic group. In autologous group, there was a slight significant negative correlation between CFU-GEMM and neutrophil engraftment. Therefore, in autologous group, when CFU-GM number was evaluated with respect to medium, as infused CFU-GM was over medium range, neutrophil engraftment duration was shorter (10 days (9-13 days) vs 11 days (9-15 days), $p=0.06$)

In autologous group, following cryopreservation, colony-forming ability of stem cells was significantly shorter ($p<0.05$), but did not have any significant effect on engraftment. In allogeneic patient population, colony-forming units did not have any effect on the determination of engraftment.

Consequently, in our study, since colony-forming units were insufficient in the determination of hematologic recovery after transplantation, we think additional studies with homogenous higher patient population of similar diagnostic, transplantation features and preparative regimen would be more contributory.

Key Words: Allogeneic and autologous stem cell transplantation, colony-forming unit, hematological recovery, CD34(+) cell, cryopreservation

KAYNAKLAR

- ARAT, M., ARSLAN, O., AYYILDIZ, E., TOPCUOGLU, P., DALVA, K., ILHAN, O. (2004). Peripheral blood stem cell apheresis for allogeneic transplants: İbni Sina experience. *Transfus Apher Sci Jun*; **30**(3): 189-91)
- ARSLAN, Ö., ÖZKALEMTAŞ, F. (2002). Aferez prensipleri, Donör trombosit aferezi. I.Hemaferezis Atölye Çalışması Eğitim Kitabı.1-5.
- BAKANAY, S.M., DALVA, K., ARAT, M., ARSLAN, O., AYYILDIZ, E.,
- BEKSAC, M., ILHAN, O. (2006). Does continuous flow apheresis influence viability in allogeneic hematopoietic stem cell harvest?. *Transfus Apher Sci* **34**(2): 171-178
- BECKER, A., McCULLOCH, E and TILL, J. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454.
- BELLANTUONO I.(2004). Hematopoietic Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(4):607-20.
- BENDER, J.G., TO, L.B., WILLIAMS, S.(1992). Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* **1**:329-341.
- COOPER, B.W., MACKAY, W., GERSON, S.L., LAZARUS, H.M.(1997).
- Erythroid burst-forming units (BFU-E) predict hematopoietic recovery after peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with advanced breast cancer. *Bone Marrow Transplant* **19**, 1089-1094
- DEMİRER, T., İLHAN, O., ARAT, M., GENÇ, Y., ÖZCAN, M., DALVA,

K.,CELEBİ, H., BEKSAÇ, M., AKAN, H., GÜRMAN, G., KONUK, N., UYSAL, A., ARSLAN, Ö., KOÇ, H. (2001). CD41+ and CD42+ hematopoietic progenitor cells may predict platelet engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Apher* **16(2)** 67-73

DEMİRER, T., ILHAN, O., AYLI, M., ARAT, M., DAGLI, M., OZCAN, M.,

HAZNEDAR, R., GENÇ, Y., FEN, T., AYYILDIZ, E., DINCER, S., ARSLAN, O., GURMAN, G., KONUK, N., DALVA, K., UYSAL, A., KOÇ, H., OZET, G., AKAN, H. (2002). Monitoring of peripheral blood CD34+ cell counts on the first day of apheresis is highly predictive for efficient CD34+ cell yield. *Ther Apher Oct*;6(5):384-9)

DUNCAN, N., HEWETSON, M., POWLES, R., RAJE, N., METHA, J. (1996). An economic evaluation of peripheral blood stem cell transplantation as an alternative to autologous bone marrow transplantation in multiple myeloma.*Bone Marrow Transplant* **18**:1175-78.

GIANNI, A.M., BREGNI, M., SIENA, S., VILLA, S., SCIORELLI, G.A.,

RAVAGNANI, F., PELLEGRIS, G., BONADONNA, G. (1989). Rapid and complex hemopoietic reconstitution following combined transplantation of autologous blood and bone marrow cells: a changing role for high-dose chemo-radiotherapy. *Hematol Oncol* **7**:139-48.

GOLDMAN, J.M., CATOVSKY, D and GALTON, D.G.(1978). Reversal of blast-cell crisis in GGL by transfusion of stored autologous buffy-coat cells. *Lancet*:437-438.

GURMAN, G., KAHVECİ, G., AKAN, H., ILHAN, O., KOÇ, H., BEKSAC, M.,

- KONUK, N., UYSAL, A. (1995). Allogeneic peripheral stem cell transplantation as a second transplant for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* **15**(3): 485-6.
- HAYNES, A., HUNTER, A., MCQUAKER, G., ANDERSON, S., BIENZ, N.,
RUSSELL, NH. (1995). Engraftment characteristics of peripheral blood stem cell mobilized with cyclophosphamide and the delayed addition of G-CSF. *Bone Marrow Transplant* **16**:359-63.
- HENON, PR. (1993). Peripheral blood stem cell transplantation. Past, Present and Future. *Stem cells*: **11**:154-72.
- HERZOG, EL., CHAI, L., KRAUSE, DS. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*: **102**(10): 3483-93.
- HUMPE, A., RIGGERT, J., VEHMEYER, K., TROFF, C., HIDDEMANN, W.,
KOHLE, M., WORMANN, B. (1997). Comparison of CD34+ cell number and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion* **37**: 1050-1057.
- IRWING, L. WEISMAN. (2000). Stem cells; Unit of Development, Units of Regeneration and Units of Evolution. *Cell*, Vol **100**, 157-168.
- İLHAN, O. (1997). Hemaferesis. Klinik Hematoloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Antip A.Ş. Bölüm 24.
- İLHAN, O., ARSLAN, Ö., ARAT, M., BEKSAÇ, M., AKAN, H., ÖZCAN, M.,
GÜRMAN, G., KONUK, N., UYSAL, A., KOÇ, H. (1999). The impact of the CD34+ cell dose on engraftment in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transfusion Science* **20**: 69 – 71.

JANSEN, E.M., HANKS, S.G., TERRY, C., AKARD, LP., THOMPSON, J.M.,

DUGAN, M.J., JANSEN, J.(2007). Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit–granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion* **47**: 817-823.

KORBLING, M., PRZEPIORKA, D.,HUH, YQ., ENGEL, H., VAN BÏSSEN,

K.,GÏRAFT, S.,ANDERSSON, B., KLEÏNE, HD., SEONG, D., DEÏSSEROTH, AB., ANDREEFF, M., CHAMPLÏN, R.(1995). Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: Potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood*:**85**: 1659.

McCULLOCH, J. (1997). Introduction to apheresis donations including history and general principles. In.Apheresis: Principles and Practice, Ed: B.C.McLeod, Chicago:American Association of Blood Banks, Chapter 2.

METCALF, D. And MOORE, M.A.S (1971).Hematopoietic Cells (Amsterdam, North-Holland.

PECORA, A. L.(1999). Impact of stem cell dose on hematopoietic recovery in autologous blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* **23**(Suppl. 2), S7-S12.

ROWLEY, SD., ANDERSON, GL.(1993). Effects of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietik pogenitor cells.*Bone Marrow Transplant* **11(5)**:389-93

SCHULMAN, KA., BÏRCH, R., ZHEN, B.(1999). Effect of CD34(+) cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol* **17**, 1227.

SHIMAZAKI, C., OKU, N., ASHIHARA, E., GOTO, H., INABA, T. (1992). Collection of peripheral blood stem cells mobilized by high dose ara-c plus vp-16 aclarubicin followed by recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant*: **15**: 763-767.

SIMINOVITCH, L., McCULLOUGH, E and TILL, J. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*: **62**, 327-336.

THOMSON, J.A (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-47.

TO, L.B., HAYLOCK, D.N., SIMMONS, P.J., JUTTNER, C.A. (1997). The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*, 2233-2258.

TO, L.B., ROBERTS, M.M., HAYLOCK, D.N., DYSON, P.G., BRANFORD, AL., THORP, D. (1992). Comparison of hematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* **9**: 277-84.

TOPCUOGLU, P., AKCAGLAYAN, SOYDAN. E., EKIZ, F., AYYILDIZ, E.,

DALVA, K., OZCAN, M., ARSLAN, O., ARAT, M., ILHAN, O. (2007). How to calculate the quantity of CD34+ cells infused? A single center cohort study based on actual, ideal or adjusted ideal body weight. *Transfus Apher Sci Jun*; **36**(3): 275-80

WEAVER, C.H., HAZELTON, B., BIRCH, B., P, PALMER, C, ALLEN, L.,

SCHWARTZBERG, W. WEST. (1995). An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*; **86**:3961-9.

YANG, H., ACKER, J.P., CABUHAT, M., LETCHER, B., LARRAT, L.,

MCGANN, L.E. (2005). Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant* **35**, 881–887

YÜKSEL, KURT. M.(2005). Hematolojik malignitelerde kemik iliği yetmezliklerinde ve Hematolojik hastalığı olmayan bireylerde kemik iliğinde mezenkimal kök hücre koloni (CFU-F) ve granulosit makrofaj koloni (CFU-GM) oranının belirlenmesi. A.Ü.T.F. Hematoloji Bilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi.

ZİMMERMAN, T.M., LEE, W.J., BENDER, J.G., MİCK, R., WILLIAMS, S.F. (1995). Quantitative CD34 analysis may be used to guide peripheral blood stem cell harvest. *Bone Marrow Transplant* **9**, 439-444.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Tamer
Soyadı : Sarı
Doğum yeri ve tarihi : Kilimli – 21.08.1964
Uyruğu : TC
Medeni Durumu : Evli
Askerlik Durumu : Yaptı
İletişim adresi ve telefonu : Çamlıca Vadi Sitesi F Blok No:16
Ümitköy – 0532 500 27 30

II- Eğitimi

1981 - 1985 : A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Lisans
1978 - 1981 : Kilimli Lisesi
1975 - 1978 : Kilimli Ortaokulu
1970 - 1975 : Kilimli İlkokulu
Yabancı Dil : İngilizce

III- Ünvanları

Biyolog - Perfüzyonist

IV- Mesleki Deneyimi

1988 - 1992 : GATA Kalp Cerrahisi Bölümü
1992 - : Bayındır Hastanesi Kalp Cerrahisi Bölümü

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Biyologlar Derneği
Perfüzyonistler Derneği
Amerikan Perfüzyonistler Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

1. Kocakulak M, Kocum C, Saber R, Ayhan H, Gunaydin S, **Sarı T**, Zorlutuna Y, Bingol N. Investigation of blood compatibility of PMEA coated extracorporeal circuits. *J Bioactive and Compatible Polymers*, **17**: 343-355, (2002).

2. Gunaydin, S., B.Farsak, M. Kocakulak, **T. Sari**, C. Yorgancioglu, Y. Zorlutuna, "Clinical performance and biocompatibility of poly (2-methoxyethylacrylate) coated extracorporeal circuits", *Ann Thorac Surg*, **74**(3): 819-24, (2002).
3. Gunaydin S, **Sari T**, McCusker K, Vijay V, Aydin H, Farsak B, Yorgancioglu C, Sargon M, Kirazli S, Kocakulak M, Akcelik O, Ozisik K, Tezcaner T, Zorlutuna Y. Clinical evaluation of strategic leukofiltration with surface modification: Enhanced preservation or fantasy. *Filtration* 2005, 1(1):47-58
4. Gunaydin S, McCusker K, Vijay V, **Sari T**, Sargon MF, Onur MA, Kocakulak M, Gurpinar A, Tezcaner T, Zorlutuna Y. Clinical Significance of Strategic Leukocyte filtration in different Risk Cohorts Undergoing Cardiac Surgery. *Filtration* 2005 (in press)

Uluslararası Kongre Sunumları

1. Tokmakoglu, H., S. Gunaydin, C. Yorgancioglu, Z. Catav, **T. Sari**, " Topical hypothermia: An unnecessary adjunct to cardioplegia and potential cause of postoperative pulmonary complications", *49th International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery*, Dresden(Germany), PC8.4, Elsevier, 2000
2. Gunaydin, S., **T. Sari**, Z. Catav, C. Yorgancioglu, H. Tokmakoglu, H. Dincer, K. Suzer, " A Simple complementary method for deairing heart following cardiopulmonary bypass", *49th International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery*, Dresden(Germany), PC9.17, Elsevier, 2000
3. Kocakulak, M., S. Gunaydin, S. Piskin, R. Saber, C. Kocum, B. Farsak, N. Bingol, **T. Sari**, C. Yorgancioglu, Y. Zorlutuna, H. Ayhan, " Investigation of blood proteins adsorption on coated and uncoated hollow fiber surfaces in extracorporeal circuits during cardiopulmonary bypass", *23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Istanbul, Turkey, 2001
4. Gunaydin, S., H. Tokmakoglu, **T. Sari**, O. Demirturk, N. Bingol, C. Yorgancioglu, Y. Zorlutuna, "Clinical performance and biocompatibility of albumin-coated extracorporeal circuits", *52nd International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery*, Istanbul, Turkey, CP 3.9, Elsevier,2003
5. Tokmakoglu, H., S. Gunaydin, **T. Sari**, A. Kale, B. Farsak, C. Yorgancioglu, Y. Zorlutuna, "Clinical performance and biocompatibility of biopassive surface coated extracorporeal circuits", *52nd International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery*, Istanbul, Turkey, CP 3.8, Elsevier, 2003
6. Gunaydin, S., H. Tokmakoglu, **T. Sari**, O. Demirturk, N. Bingol, C. Yorgancioglu, Y. Zorlutuna, "Clinical performance and biocompatibility of phosphorylcholine inert surface coated extracorporeal circuits", *52nd International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery*, Istanbul, Turkey, C8.9, Elsevier, 2003

7. Gunaydin S, Farsak B, **Sari T**, McCusker K, Vijay V, Yorgancioglu C, Tezcaner T, Zorlutuna Y., “Improved outcome in strategic leukofiltration with polymethoxyethylacrylate-coated extracorporeal circuits”, *16th Annual Meeting of the Mediterranean Association of Caridology and Cardiac Surgery*, Bodrum, Turkey, Carden Jennings, B37, 2004
8. S.Gunaydin, K.McCusker, V.Vijay, **T.Sari**, M.Kocakulak, M.A.Onur, M.F.Sargon, M.Tok, T.Tezcaner, Y.Zorlutuna. “Clinical performance and biocompatibility of novel polymer and heparin bonded coating technologies” *FECECT Congress, Orosei, (Italy)*, 2005
9. S. Gunaydin, K. Ayrancioglu, **T. Sari**, K. McCusker, V. Vijay, MF. Sargon, M. Kocakulak, Y. Zorlutuna. “Clinical Performance and Biocompatibility of Novel Sruface Modifying Technologies” *4th EACTS /ESTS Joint Meeting Barcelona (Spain)*, 2005

VII- Diğer Bilgiler