



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE NAKLİ İÇİN  
TOPLANAN AFEREZ ÜRÜNLERİNDE CD34+  
HÜCRELERİN MUTLAK SAYIMINDA “SINGLE  
PLATFORM” İSHAGE PROTOKOLÜ İLE  
VOLÜMETRİK ÖLÇÜMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Nazlı KOZAN TOPCU**

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP**

**ANABİLİMDALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Klara DALVA**

**ANKARA**

**2019**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hematopoietik Kök Hücre Nakli İçin Toplanan Aferez Ürünlerinde CD34+ Hücrelerin Mutlak Sayımında “Single Platform” ISHAGE Protokolü ile Volümetrik Ölçümlerin Karşılaştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nazlı Kozan Topcu

Tarih:

İmza

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Nazlı KOZAN  
TOPCU tarafından hazırlanan "Hematopoietik Kök Hücre Nakli İçin Toplanan  
Aferez Ürünlerinde CD34+ Hücrelerin Mutlak Sayımında "Single Platform"  
ISHAGE Protokolü ile Volümetrik Ölçümlerin Karşılaştırılması" adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul  
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.08.2019

Prof. Dr. A. Eser ELÇİN  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Dr. Öğr. Üyesi Klara DALVA  
Ankara Üniversitesi  
Raportör

Doç. Dr. M. Sinan DAL  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi  
Ankara Onkoloji EAH  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

<b>Etik Beyan</b>	<b>ii</b>
<b>Kabul ve Onay Sayfası</b>	<b>iii</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>iv</b>
<b>Önsöz</b>	<b>vi</b>
<b>Simgeler ve Kısaltmalar</b>	<b>vii</b>
<b>Şekiller</b>	<b>ix</b>
<b>Çizelgeler</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Kök Hücreler	1
1.2. Hematopoietik Kök Hücre	2
1.3. Hematopoietik Kök Hücre Belirleme Yöntemleri	3
1.3.1. Moleküler Teknikler	3
1.3.2. Hücre Kültürleri	5
1.3.3. Akan Hücre Ölçer (AHÖ)	6
1.4. Hematopoietik Kök Hücre Nakli	13
1.5. Aferez	16
1.6. Akan Hücre Ölçer	19
1.7. Single ve Dual Platform Analizler	27
1.8. Floresan Boncuk ve Volümetrik Ölçüm	28
1.9. ISHAGE Protokolü	30
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>36</b>
2.1. Çalışma Yeri ve Hasta Seçimi	36
2.2. Örneklerin Toplanması	36
2.3. Verilerin Toplanması ve Analizi	37
2.3.1. Tam Kan Sayımı	37
2.3.2. CD34+ Hücre Sayımı	37

2.3.3. İstatistiksel Analiz	41
<b>3. BULGULAR</b>	<b>42</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>53</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>58</b>
<b>ÖZET</b>	<b>60</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>64</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>68</b>



## ÖNSÖZ

Her şey bir hayalle başladı, azimle devam etti. Bu uzun yolda bana eşlik eden ve hayalime ortak olanlara sonsuz teşekkürlerimle...

Başta danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Klara Dalva'ya sabırla beni eğitip bilgilerini esirgemediği için,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji Anabilim Dalı Akım Sitometri Laboratuvarı çalışanları Sema Meriç, Aydın Öztürk, Şenay İpek, Fatma Maden Taşkır, Nihal Okur başta olmak üzere tüm Hematoloji Laboratuvarı çalışanlarına beni kendilerinden biri olarak gördükleri ve yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

2016'dan bugüne birlikte çalıştığım Doç. Dr. Mehmet Sinan Dal ve Doç. Dr. Merih Kızıl Çakar Hocalarım, sizlerden öğrendiklerim aklımda ve cebimde, verdiğiniz destekler için sonsuz teşekkürlerimle.

Üç kişi başladığım yolda beş kişiye çıkan sevgili ailem, sizlerin desteği olmadan olmazdı.

Ve sevgili eşim, bıkmadan her türlü desteği sağlayıp iyi günde kötü günde yanımda olduğun için sonsuz teşekkürlerimle.

Nazlı KOZAN TOPCU

## SİMGELER VE KISALTMALAR

7-AAD	7-Aminoaktinomisin D
ABCG2	ATP-bağlayıcı Kaset Geni 2
AHÖ	Akan Hücre Ölçer
ALDH	Aldehit Dehidrojenaz
APKHN	Allojenik Periferik Kök Hücre Nakli
BAAA	BODIPY-amino Asetaldehit
CAFC	“Cobblestone Area-Forming Cell Assay”
CD	Başkalaşım Kümesi (Cluster of Differentiation)
CFC	Koloni Oluşturan Hücre (Colony-forming cell)
CV	Varyasyon Katsayısı
DEAB	Dietilaminobenzaldehit
DPT	“Dual Platform” Teknolojisi
HKH	Hematopoietik Kök Hücre
ISHAGE	Uluslararası Hematoterapi ve Doku Mühendisliği Derneği
ISCT	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
ECP	Ekstrakorporeal Fotoferez
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FACS	Çok Renkli Floresan Destekli Hücre Ayırma (Fluorescence-activated Cell Sorting)
FITC	Floresan İzotiyosiyonat
FMT	Fotomultiplier Tüp
FSC	Forward Scatter
FP	Floresan Proteinleri
GCSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GFP	Yeşil Floresan Protein
GKK	Göbek Kordon Kanı
GVHD	“Graft Versus Host” Hastalığı
HKPH	Hematopoietik Kök ve Öncül Hücre
Kİ	Kemik İliği

KKN	Kordon Kanı Nakli
LF	Lökoferez
LTC-IC	Uzun Süreli Kültür Başlatan Hücre
$\mu$ L	Mikrolitre
mAB	Monoklonal Antikor
MFI	Ortalama Floresan Yoğunluğu
NOD-SCID	Obez Olmayan Diabetik/Ciddi Kombine Bağışıklık Yetmezliği
OPKHN	Otolog Periferik Kök Hücre Nakli
PE	Fikoeritrin
PK	Periferik Kan
PKKH	Periferik Kan Kök Hücreleri
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSC	“Side Scatter”
SP	“Side Population”
SPT	“Single Platform” Teknolojisi
TA	Terapötik Aferez
TKS	Tam Kan Sayımı
TPD	Terapötik Plazma Değişimi

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> HKH gelişim aşamasına özgü gen ağı haritası	4
<b>Şekil 1.2.</b> Hematopoietik öncü hücrelerde pozitif, olgun hücrelerde zayıf/negatif olan ALDH aktivitesi ve hematopoietik farklılaşmada gözlenen değişikliklerin modeli	7
<b>Şekil 1.3.</b> ALDH aktivitesi için Aldagen'in Aldefluor® kitine ait bilgi sayfasından uyarlanan şekil	8
<b>Şekil 1.4.</b> Saflaştırılmamış insan kemik iliğinin SP analizi	10
<b>Şekil 1.5.</b> Hidrodinamik odaklama	21
<b>Şekil 1.6.</b> Tipik bir akan hücre ölçer düzeninin şematik taslağı	21
<b>Şekil 1.7.</b> Hücrenin ışık saçılım özellikleri	22
<b>Şekil 1.8.</b> Frekans dağılım grafikleri	24
<b>Şekil 1.9.</b> Single platformlu ISHAGE protokolü ile canlı CD34+ hücrelerinin sayımı	34
<b>Şekil 2.1.</b> NAVIOS Cihazı ile yapılan sayımlarda CD34+ hücre sayımı için uygulanan ardışık kapılama stratejisi	39
<b>Şekil 2.2.</b> CYTOFLEX Cihazı ile yapılan sayımlarda CD34+ hücre sayımı için uygulanan ardışık kapılama stratejisi	40
<b>Şekil 3.1.</b> Cihazlara göre WBC sayılarının dağılımını gösteren box plot grafikleri	45
<b>Şekil 3.2.</b> Dual ve Single platform olarak her iki yöntem ile elde edilen mutlak CD34+ hücre sayılarını gösteren box-plot grafikleri	45
<b>Şekil 3.3.</b> PK ve LF örneklerinde farklı platform ve yöntemlerle elde edilen mutlak CD34+ hücre sayılarına ait dağılım grafiği ve lineer regresyon analizleri	46
<b>Şekil 3.4.</b> Farklı yöntemlere ait sonuçların korelasyonunu içeren korelasyon matrisi	47
<b>Şekil 3.5.</b> Dağılım grafiği a. Single Platform BC Navios-BC Cytoflex karşılaştırması b. Dual Platform BC Navios-BC Cytoflex karşılaştırması	48
<b>Şekil 3.6.</b> Dağılım grafiği a. Single Platform BC Navios-BC Cytoflex karşılaştırması b. Dual Platform BC Navios-BC Cytoflex karşılaştırması	50
<b>Şekil 3.7.</b> İki platformun karşılaştırılmasına ait Bland-Altman grafikleri	51
<b>Şekil 3.8.</b> İki cihazın karşılaştırılmasına ait Bland-Altman grafikleri	52

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Hematopoitik kök hücre yüzey belirteçleri ve sinonimleri/fonksiyonları	12
<b>Çizelge 1.2.</b> Mobilizasyon rejimleri	18
<b>Çizelge 3.1.</b> Hastalara ait temel özellikler	42
<b>Çizelge 3.2</b> Lökosit ve CD34+ Hücre Sayılarına ait Tanımlayıcı İstatistikler	45
<b>Çizelge 3.3.</b> Her iki cihaz için Passing-Bablok sonucu elde edilen eğim ve kesim değerleri	48
<b>Çizelge 3.4.</b> Her iki cihaz için Passing-Bablok sonucu elde edilen eğim ve kesim değerleri	50



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kök Hücreler

Kök hücreler; birçok dokuda bulunabilen, kendini yenileyebilme özelliğine sahip, farklı hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir (Hatzimichael ve Tuthill, 2010; Nemeth ve ark., 2014; Victor Hoffbrand ve A. Victor Hoffbrand, 2015).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olmak üzere üçe ayrılmaktadır.

*Totipotent potansiyele sahip olan hücreler, fertilizasyon sonrasında oluşup vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahiptir.*

*Pluripotent potansiyele sahip olan hücreler vücuttaki tüm hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip olmasına rağmen tek başlarına bütün organizmayı oluşturacak potansiyele sahip değildirler.*

*Multipotent potansiyele sahip olan hücreler ise blastokist aşamasından sonra endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarını oluşturmaktadır.*

Multipotent hücrelerin en önemli temsilcileri hematopoietik kök hücre ve mezenkimal kök hücrelerdir (Hatzimichael ve Tuthill, 2010; Nemeth ve ark., 2014).

## 1.2 Hematopoietik Kök Hücre

1961'de Till ve McCulloch tarafından yapılan çalışma sonucunda fare kemik iliği hücrelerinin kendi kendilerini yenileyebilme kapasitelerinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma hematopoietik kök hücre varlığına ilk işaret niteliğindedir (Tsuruta Toshihisa, 2012).

Hematopoietik kök hücre (HKH); kemik iliğinde ve diğer dokularda bulunan, kendini yenileme (daha fazla kök hücre üretmek için bölünme) ve her türlü kan hücresini üretme özelliklerine sahip bir hücre tipidir (Spangrude ve Slayton, 2009). Bu iki özelliğe ek olarak, HKH'ler hücre döngüsünde bir uyku hali (G0 fazı) durumuna girme yeteneğine sahiptir ve bir yandan kendilerini çeşitli stres türlerinden korurken bir ömür boyu kan hücresi üretimine devam edebilirler (Tsuruta Toshihisa, 2012). HKH nadir görülür, muhtemelen kemik iliğindeki her 20 milyon çekirdekli hücre arasında 1 tane bulunur çünkü hücrelerin çoğu uyku halindedir (Victor Hoffbrand ve A. Victor Hoffbrand, 2015). HKH'lerin, endosteal niş içinde ya da kemik iliği içinde vasküler nişteki sinüzoidal damarların etrafında yerleşim gösterirler (Nemeth ve ark., 2014). HKH'lerin çeşitli kan hücre soylarını üreterek spesifik hücre hatlarına farklılaşma kararlarını verdikleri sürece "hematopoiez" adı verilmektedir (Hatzimichael ve Tuthill, 2010). Hematopoiez asimetric hücre bölünmesiyle kendini yenileyebilen ancak ayrı hücre soyları meydana getiren pluripotent bir kök hücreyle başlar (Victor Hoffbrand ve A. Victor Hoffbrand, 2015). Hematopoiezin sağlam doğası, her gün ölen olgun hücreler için sürekli bir yenileme kaynağı sağlamak için çok az sayıda kök hücrenin kitlesel ekspansiyonunu gerektirir (Ye ve ark., 2017).

HKH'ler, tüm hematopoietik soyları in vivo olarak çoğaltma ve bireyin ömrü boyunca bu hücrelerin üretimini sürdürme yetenekleriyle tanımlanır. HKH'ler için güvenilir doğrudan belirteçlerin yokluğunda kök hücrelerin tanımlanması ve sayılması, fonksiyonel uzun vadeli, in vivo repopülasyon deneylerine bağlıdır. Herhangi bir dokuda çok düşük sayıda HKH bulunması ve özgün bir HKH

fenotipinin olmayışı bu hücrelerin saflaştırma ve karakterizasyonunu oldukça zor bir hedef haline getirmiştir (Nemeth ve ark., 2014).

## **1.3 Hematopoietik Kök Hücre Belirleme Yöntemleri**

### **1.3.1. Moleküler Teknikler**

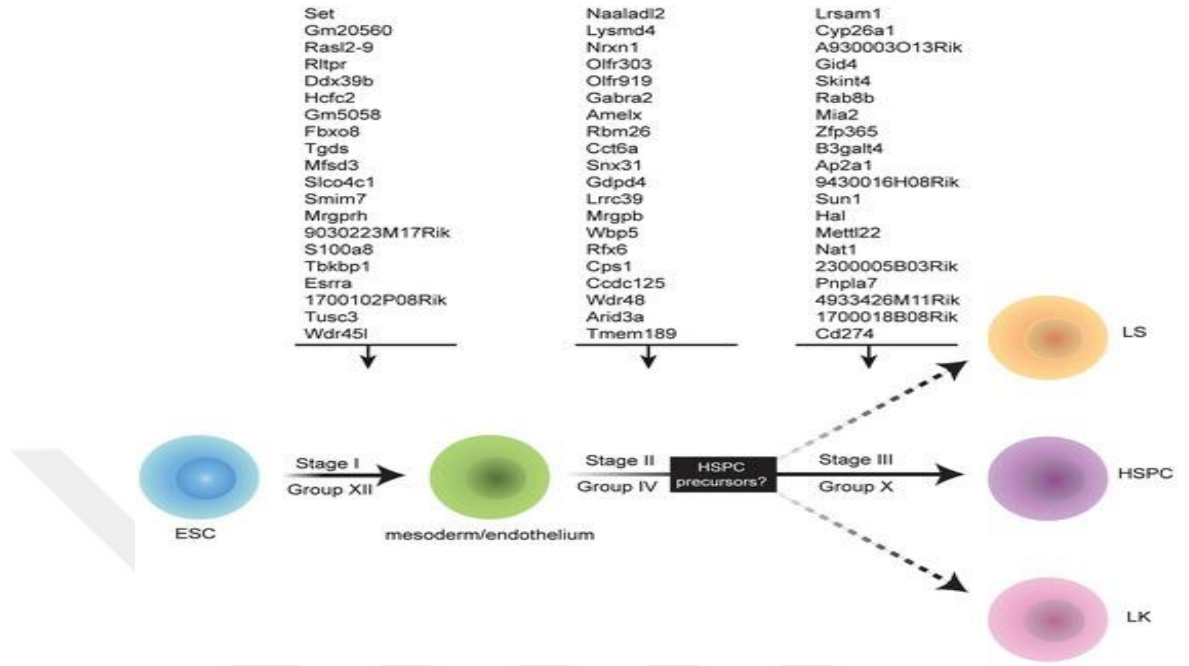
#### **Gen Ekspresyonu**

Hematopoezin transkripsiyonel düzenlemesi birçok farklı organizmada araştırılmıştır ve HKH miyeloid, lenfoid veya eritromegakaryositik soyları farklılaştırıp farklılaştırmadığını belirten birçok transkripsiyon faktörü belirlenmiştir. Yıllar süren çalışmalarda HKH'yi ve soylarını kontrol eden kritik yolların, tüm vücutta ve filogenez boyunca diğer kök ve progenitör (öncül) hücre tipleri ile paylaşıldığı ortaya koyulmuştur (Krause, 2002).

Yapılan çalışmalar pluripotent kök/öncül hücrelerin, soya özgün olan birçok genin düşük seviyeli transkripsiyonuyla çeşitli farklı soyları farklılaştırmak için öncül olduğunu göstermektedir (Krause, 2002). Hücrelerin çoğu spesifik bir fenotip paylaşmasına rağmen, RT-PCR analizlerinde bu hücrelerde ifade edilen genlerin çeşitlilik gösterdiği ortaya konmuştur (Krause, 2002).

Pluripotent hematopoietik hücrelerin, daha önce belirli soylara özgü olduğu düşünülen genleri ifade ettiği düşünülmektedir. Bunu destekleyen iki görüş mevcuttur. Birincisi, kök hücre düzenini (veya pluripotensi) korumak için birlikte çalışan bir dizi genin olabileceğidir. İkincisi, kök hücreleri daha çok farklılaşmış bir soydan benzersiz kılan şeyin, bu soya özgü olduğu düşünülen birçok farklı genin kök hücrelerde çok düşük düzeyde ifade ediliyor olmasıdır (Krause, 2002).

Yüksek verimli dizileme ve biyoinformatik analizler ile hematopoietik kök ve progenitör hücre (HKPH) tanımlanması için gerekli olan 351 yeni gen dizisi de dahil olmak üzere on iki gen grubu belirlenmiştir (Han ve ark., 2016).



Şekil 1.1. HKH gelişim aşamasına özgü gen ağı haritası (Han ve ark., 2016).

Popülasyona özgü gen gruplarına ilişkin analiz, EKH (embriyonik kök hücre)'nin HKPH'ye farklılaşmasının gelişim aşaması haritasında önerildiği gibi, tanımlayıcı HKPH'lerin olgunlaşmasından önce bir HKH öncesi aşamasının varlığını göstermektedir (Han ve ark., 2016). Bu analizler, tanımlayıcı HKPH'lerin farklılaşması için kritik olan aşamaya özgü gen ağlarını tanımlar (Han ve ark., 2016).

### Reporter Gen Yerleştirme

Floresan proteinleri (FP) modern biyomedikal araştırmalarda devrim yaratmıştır. 1990'larda yabancı tip yeşil floresan proteinin (green fluorescent protein, GFP) orijinal saflaştırılmasından, klonlanmasından ve ekspresyonundan bu yana, biyomedikal alanda çalışan bilim insanlarının, spesifik floresan tespit teknolojilerine göre seçilebilen veya uyarlanabilen eksitasyon ve emisyon özellikleriyle maviden uzun kırmızıya kadar değişen ifade edilebilir geniş bir belirteç spektrumuna erişimi mümkündür. GFP, akan hücre ölçer (AHÖ) ile yapılan çeşitli kök hücre araştırmalarında rahatça kullanılabilir (Telford ve ark., 2012).

Yeşil Floresan Protein, Shimomura ve arkadaşları (1962) tarafından Aequorea deniz anasından gelen ünlü kemilüminesans protein olan aequorine eşlik eden bir protein olarak keşfedilmiştir. Hücrelerde ve organizmalarda gen ekspresyonunun ve protein hedeflemenin bir belirteci olarak kullanıma başlanmıştır. GFP'nin ekspresyon seviyesi ve saptanabilirliği birçok faktöre bağlıdır. Genin kopyaları ne kadar fazlaysa ve transkripsiyonunu gerçekleştiren promotörler/arttırıcılar ne kadar güçlüyse, hücre başına o kadar fazla protein üretilir (Tsien, 1998, Divisions ve ark., 2016).

### 1.3.2. Hücre Kültürleri

Hematopoez muhtemelen en iyi anlaşılan kök hücre farklılaşma sistemidir. Çok renkli floresan destekli hücre ayırma (fluorescence-assisted cell sorting, FACS) yoluyla analiz edilen hücre yüzey belirteçlerinin bir kombinasyonu ile birçok kök ve progenitör hücre tipi, tanımlanabilmiştir (Ye ve ark., 2017). FACS teknolojisi ile, daha sonraki saflaştırma işlemlerinde kullanılacak, lenfoid, miyeloid ve eritroid öncü hücrelere özgü olan çeşitli işaretler tanımlanmıştır. Ek olarak, kendini yenileme potansiyeline sahip hücre popülasyonlarını içeren HKH'ler hiyerarşisi, yüzey antijen ekspresyonuna dayalı olarak fraksiyonlarına ayrılmıştır (Spangrude ve Slayton, 2009).

Hematopietik sistemde, hücresel farklılaşma yollarının ve genetik düzenleyici ağı karakterizasyonu için yoğun çaba sarf edilmiştir (Ye ve ark., 2017). HKH tarafından ifade edilmeyen proteinler için negatif seçim, ifade edilen proteinler için pozitif seçim kombinasyonunun kullanıldığı bir yöntemin, HKH'nin tanımlanması ve izole edilmesi için son derece faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Spangrude ve Slayton, 2009).

#### a) In Vitro Hücre Kültürleri

Kemik iliği veya periferel kandan alınan örneklerdeki HKH sayısını ölçmek için rutin olarak in vitro koloni oluşturma testleri kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu analizlerin, nakil üzerinde farklı fonksiyonları olan farklı ilkel kök hücre sınıflarını ayırt edemediği kabul edilerek, diğer analizler geliştirilmiştir. Uzun yıllar kök

hücrelerin sayılarını ve davranışlarını analiz etmek için uzun süreli kültür başlatan hücre (LTC-IC) ve Cobblestone area-forming cell assay (CAFC) yöntemleri kullanılmıştır (Spangrude ve Slayton, 2009).

Diğer bir yöntem olan koloni oluşturan hücre (Colony-Forming Cell, CFC) tayini, PKKH (Periferik Kan Kök Hücreleri) için bir alternatif olarak kullanılmıştır, ancak bu analizi gerçekleştirmek, 10-14 günlük bir süre gerektirmesi sebebiyle sınırlı olarak uygulanabilmekte; aferez programlarını planlamayı uygunsuz hale getirmektedir. Ek olarak, CFC tayinleri subjektiftir ve ne metodoloji ne de reaktiflerde bir standardizasyon yoktur (Keeney ve ark., 2004). Koloni oluşturan birimlerin hücre kültürüyle belirlenmesi tarihsel bir yöntem olsa da , çok yoğun işgücü gerektiren uzun bir süreç gerektirdiğinden günlük pratikte kullanımı neredeyse tamamen terk edilmiştir (Mortazavi ve ark., 2012) .

#### **b) In Vivo Hücre Kültürleri**

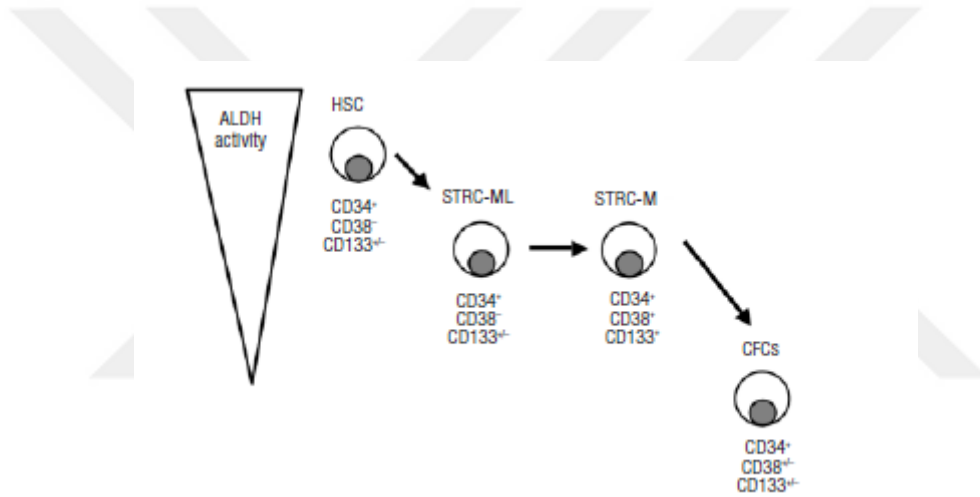
Araştırmacılar, insanlardaki HKH yamanma davranışını çalışırken görülen zorlukları, ksenojeneik transplant modelleri geliştirerek aşmıştır. İnsan HKH'sinin yamanma (engrafman) özelliklerini ve kendini yenilemesini in vivo olarak ölçmek için, HKH alıcısı olarak immün yetmezlikli fareler kullanan birçok model geliştirilmiştir. Obez olmayan diyabetik-ağır kombine immün yetmezlikli (non-obese diabetic-severe combined immuno deficiency, NOD-SCID) ve bileşik mutant X'e bağlı SCID-rekombinaz aktive edici gen taşıyan fare modelleri, fare kemik iliğinde insan hücrelerinin yamanmasını takip etmeyi sağlayan standart testler olarak kullanıma girmiştir (Spangrude ve Slayton, 2009).

#### **1.3.3. Akan Hücre Ölçer (AHÖ)**

##### **a. Enzim Aktivitesi Ölçümü Aracılı İşaretleme (ALDH)**

Aldehit dehidrojenaz (ALDH) enzimleri sitozol, hücre çekirdeği, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunabilir (Ma ve Allan, 2011). Aldehitler uzun ömürlü,

yüksek oranda reaktif elektrofilik bileşiklerdir ve mutajenik, kanserojenik ve sitotoksik zarar verici etkileri yanı sıra fizyolojik süreçlerde hayati bir öneme sahiptirler. ALDH enziminin hematopoietik progenitör hücrelerde yüksek bir aktiviteye sahip olduğu daha önceki çalışmalar ile gösterilmiştir (Şekil 1.2) (Keeney ve ark., 2004). ALDH, normal HKH'lerin korunmasında önemli bir role sahiptir ve şimdilerde çeşitli kök hücre ve HKH tiplerini tanımlamak ve izole etme fırsatı veren bir belirteç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Ma ve Allan, 2011). Ayrıca, ortaya çıkan kanıtlar, ALDH1'in sadece kök hücreler için bir belirteç olmadığını, aynı zamanda kendini koruma, farklılaşma ve ekspansiyon ile ilgili önemli fonksiyonel roller oynayabileceğini göstermektedir (Ma ve Allan, 2011).

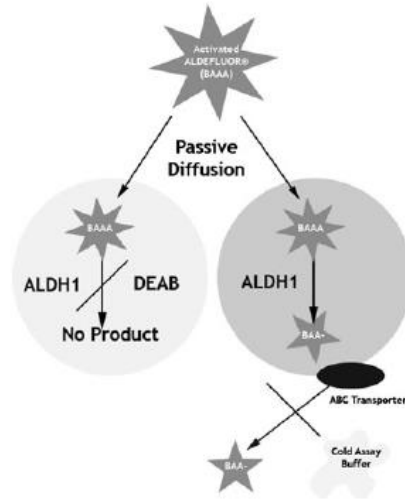


**Şekil 1.2.** Hematopoietik öncü hücrelerde pozitif, olgun hücrelerde zayıf/negatif olan ALDH aktivitesi ve hematopoietik farklılaşmada gözlenen değişikliklerin modeli. Bütün LTRC-ML (HKH), ALDH+ olan hücreler gibi görünmektedir, STRC'ler bazı ALDH- hücreleri içermektedir (Christ ve ark., 2007). \*LTRC (uzun süreli kendini yenileyebilenler), STRC (kısa süreli kendini yenileyebilenler)

Hücre içi enzimlerin aktivitesi ölçülerek HKH'ler ve öncü hücreleri tanımlamak mümkündür. ALDH enzim aktivitesinin, hematopoietik öncü hücrelerde pozitif, olgun hücrelerde negatif ya da çok zayıf pozitif olduğu gösterilmiştir. ALDH aktivitesini değerlendirmenin potansiyel yararı, daha olgunlaşmamış, uzun süredir çoğalan kök hücreleri tespit edebilmesidir (Z ve ark., 2010). Bir yüzey molekülü olan klasik HKH belirteci CD34'ün aksine, ALDH aktivitesi fonksiyonel bir belirteci temsil eder. Hematopoietik kök hücre greftlerindeki SSC<sup>lo</sup> ALDH<sup>br</sup> hücrelerinin sayısının, otolog ve allojenik hematopoietik kök hücre naklinde ve dondurarak

saklanmış greftlerin hematopoietik naklinden sonra yamanma kinetikleri ile iyi korele olduğu gösterilmiştir (Z ve ark., 2010) .

ALDH aktivitesini değerlendirmek için hücrenin pasif diffüzyon yoluyla yüksüz ALDH substratı olan BODIPY-aminoasetaldehit (BAAA)'yi alması sağlanır. Hücre içinde BAAA, ALDH etkisiyle negatif yüklü BAA-'ya dönüşür ve ALDH aktivitesi yüksek olan hücrelerin yüksek floresan ışması yapmalarına neden olur. Başka bir tüpte bir ALDH inhibitörü olan, dietilaminobenzaldehit (DEAB), negatif kontrol olarak BAAA ile birlikte hücreye yüklenir ve DEAB, ALDH etkinliğini ortadan kaldıracığı için hücrelerde floresan ışma gözlenmez (Şekil 1.3) (Christ ve ark., 2007; Ma ve Allan, 2011).



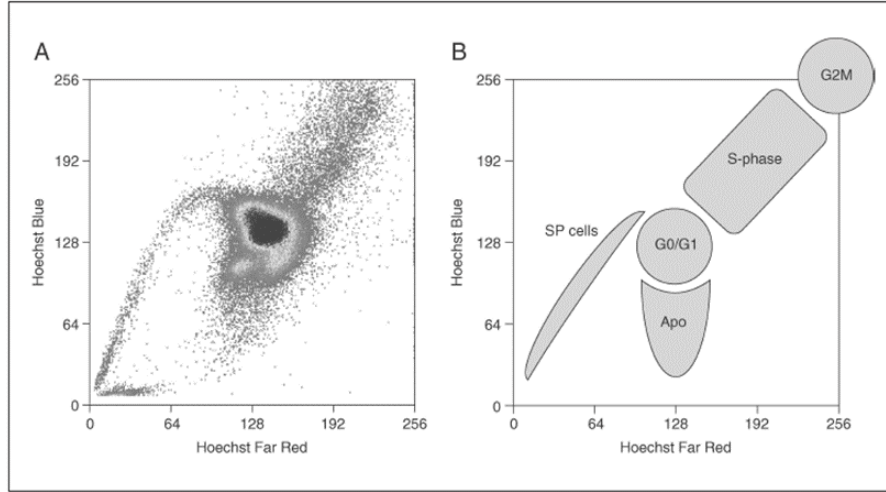
**Şekil 1.3.** ALDH aktivitesi için Aldagen'in Aldefluor® kitine ait bilgi sayfasından uyarlanan şekil. (Ma ve Allan, 2011)

#### **b. “Side Populating” (SP) Hücrelerin Belirlenmesi**

Side Populating (SP) hücrelerin yabancı molekülleri hücreden uzaklaştırma özellikleri, bu özelliği taşıyan kök hücre ve progenitör hücrelerin , diğer somatik hücrelerden ayırt edilmesini sağlar (Nemeth ve ark., 2014). Çok yakın bir geçmişte, UV ışıkla uyarıldığında kırmızı ve mavi ışığa yapabilen Hoescht-33342, kemik iliğinin yaklaşık %0,07'sini oluşturan ve uzun süreli HKH'yi yeniden oluşturmak için yüksek oranda zenginleştirilmiş SP olarak adlandırılan küçük bir kemik iliği hücre alt

kümesini tanımlamak için kullanılmıştır (Nemeth ve ark., 2014; Petriz, 2007; Spangrude ve Slayton, 2009). Bir hücre karışımındaki tüm hücreler Hoescht-33342 gibi DNA ya doğrudan bağlanabilen ve uyarıldığında floresan ışımaya yapan boyaları tutar. Ancak yalnızca bir tür zara bağlı aktif taşıyıcı olan özel ATP bağlayıcı kaset içeren pompaları (ABCG2) ifade eden kök hücreler boyaları uzaklaştırabilecek yeteneğe sahiptir. Bu hücreler akan hücre ölçerle analiz edildiğinde ışımaya yapmayan veya zayıf ışımaya yapan bir hücre grubu olarak diğer hücrelerden ayrılırlar. Çeşitli dokularda SP hücreleri, kök hücreden zengin bir fraksiyonu temsil eder. Bu yöntem oldukça hassastır ve heterojen bir hücre popülasyonundaki nadir hücreleri tespit edebilmek mümkündür (Nemeth ve ark., 2014).

SP analizlerinde en çok kullanılan problemler Hoescht-33342 ve rodamin-123 (Rh-123) 'tür. Bu problemler canlı hücreye girebilir ve DNA, RNA veya organel zarları gibi belirli hücre içi bileşenlere bağlanabilme özelliğine sahiptir. Kök hücreleri tanımlamak ve izole etmek için işaretli antikolar, FACS ile kombinasyon halinde kullanılabilirler (Spangrude ve Slayton, 2009). UV ile uyarıldığında floresan veren bir DNA probu olan Ho342, çift sarmallı DNA'nın AT'den zengin bölgelerine bağlanabilen bir boyadır. Maksimum absorpsiyonu 346 nm ve maksimum emisyonu 460 nm'dir. Biri mavi ve biri kırmızı iki emisyon dalga boyuna sahip Ho342 kullanılırken, numunede SP hücreleri varsa Ho342 ile boyanmış hücrelerin küçük bir fraksiyonu G0/G1 hücrelerden sola doğru uzanan donuk bir kuyruk oluşturur (Petriz, 2007). Ho342, sessiz hücrelerin kemik iliğindeki diğer hücrelerden ayrılmasını sağlar. Araştırmacıların, ABCG2 çoklu ilaç taşıyıcısı tarafından Ho342'nin diferansiyel akışına dayanan aktif bir biyolojik süreci incelemesini sağlayan, canlı hücreleri kullanan bir sistemdir. UV lazer gücü ve ayarları, filtre ayarları, numune toplama, hücre canlılığı, Ho342 konsantrasyonu ve bir bütün olarak boyama prosedürü, "side popülasyonun" optimal çözünürlüğü için çok önemlidir (Petriz, 2007). ABCG2 ekspresyonu bazı kök hücre tiplerinde de bildirilmiştir ve primitif kök hücre özelliklerine sahip hücreleri temsil eden SP fenotipinin kilit bir belirleyicisidir. Hematopoietik SP, öncelikle CD34 negatiftir, diğer olgun hematopoietik hücre belirteçlerinden yoksundur (Lineage, lin negatif) (Petriz, 2007).



**Şekil 1.4.** Saflaştırılmamış insan kemik iliğinin SP analizi. (A) SP hücreleri içeren bir insan kemik iliği numunesinin eşzamanlı emisyonu Hoechst Blue ile Hoechst Red arasındaki temsili noktasal grafik. (B) Olayların dağılımını gösteren şematik noktasal grafik. (Petritz, 2007)

İlginç bir şekilde, ABCG2'nin ekspresyonu embriyonik kök hücrelerde de gözlenen bir özelliktir ki bu da bu proteinin ekspresyonunun kök hücrelerin genel bir özelliğini temsil edebileceğini öne sürmektedir (Spangrude ve Slayton, 2009). Boyayı dışlayan kök hücrelerin tespitinin aktif hücre metabolizma gerektirmesi ve DNA'nın araya giren boyaların varlığından olumsuz etkilenmesi bu yöntemin izole edilmiş SP hücrelerinin daha ileri fonksiyonel kök hücre analizi için kullanılmasına uygun olmadığını göstermektedir (Nemeth ve ark., 2014).

### c. İmmünofenotipleme ile Hücre Yüzey Profilinin Belirlenmesi

1970'li yıllarda monoklonal antikor teknolojilerinin geliştirilmesiyle tıbbın birçok alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanan immünofenotipleme, floresan olan ya da olmayan boyalar ile işaretli antikorlar yardımıyla hücre yüzeyi ve hücre içi belirteçlerin saptanması yöntemidir. Hücre antijenleri "Cluster of Differentiation-CD" terminolojisi kullanılarak tanımlanırlar. Farklı bir hücre topluluğunun tanımlanmasında o hücreye özgün olan antijenleri taşıyan hücrelerin bunlara özgün antikorlar aracılığı ile işaretlenmesini takiben oranlarının (%) belirlenmesi ve floresan işaretlerin kullanılması durumunda floresan sinyal yoğunluğunu ölçerek (Mean Fluorescent Intensity, MFI) antijen yoğunluğunu göstermek ile mümkün olabilmektedir. Ölçülen floresan sinyallerin şiddeti, sadece hücre üzerindeki antijen

sayısı ile değil, kullanılan florokrom ile de yakından ilişkilidir (Kanev ve ark., 2016).

İmmünofenotiplemenin avantajları;

1.Hücreler büyüklük (FSC) ve granüler (SSC) yapılarına göre sınıflandırılabilir.

2.Ölü hücreler ilgi alanı dışında bırakılabilir.

3.Yüzey antijenlerinden zayıf/güçlü ifade edilenler belirlenebilir.

4.Hücresinin fenotipi, gelişiminin hangi aşamasında olduğu çok sayıda florokrom kullanarak (2, 3.. renkli) yapılan analizlerle belirlenebilir.

5. Hematolojik malinitelerde farklı hücreye özgün antijenleri eşzamanlı ifade eden bifenotipik hücreler belirlenebilir (Kanev ve ark., 2016).

Her ne kadar bir takım yüzey proteinleri HKH tarafından ifade edilsede, hiçbir türde HKH'yi mutlak biçimde tanımlayan tek bir belirteç yoktur. Bu durum herhangi bir zenginleştirme şemasının, çeşitli belirteçlerin pozitif veya negatif ifade edilmelerine göre uygulanan bir seçim yaklaşımını gerektirir (Spangrude ve Slayton, 2009).

Bir HKH popülasyonunun tanımlanması, hücre yüzey belirteçlerinin farklı kök hücrelerde farklı ifade edilmesi prensibine dayanır (Ali ve ark., 2017; Tsuruta Toshihisa, 2012). Uzun süreli (LT) yeniden yapılanma aktivitesine sahip HKH'leri (LT-HKH'ler, CD150+CD48-CD34-) izole etmek için CD34, CD150, Flt3 ve CD48 de dahil olmak üzere ek belirteçler kullanılmaktadır (Ali ve ark., 2017).

**Çizelge 1.1.** Hematopoietik kök hücre (HKH) yüzey belirteçleri ve sinonimleri /fonksiyonları.

Belirteç	Açıklama
CD34	Hematopoietik öncül hücre antijeni
CD90	Thy-1, HKH farklılaşması
CD93	C1Rqp, Hücrelerarası adezyon reseptörü
CD105	Endoglin, TGF-B, Tümör anjiyogenez belirteci
CD110	TPO, C-Mpl, Thrombopoietin reseptörü
CD111	Nectin-1, hücre adezyon molekülü
CD117	C-Kit, Kök hücre faktörü (SCF)
CD133	Prominin-1, Transmembran proteini
CD135	Flk-2, Hematopoiezi düzenleyen Sınıf III Tirozin Kinaz Reseptörü
CD150	SLAM, Lenfosit Aktivasyon Sinyal Molekülü
CD184	CXCR4, Stromal Kökenli Faktör-1 (SDF-1)
CD202b	Angiopoietin-1 (Ang -1) reseptörü
CD243	MDR-1, Çoklu ilaç direnci, Detoksifiye edici ajan
CD271	NGFR, Sinir Büyüme Faktörü
CD309	VEGFR2, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
CD338	ATP-bağlayıcı kaset (ABCG2)
Ly-6A/E (Sca-1)	Kök Hücre Antijeni

Çok çeşitli karmaşık in vitro ve in vivo hematopoez modelleri, sürekli çoklu soy oluşumundan sorumlu hücrelerin, CD34+ hücrelerinin (ve öncüllerinin) en primitif alt kümelerinde yer aldığını göstermiştir. Kemik iliğindeki CD34+ hücrelerinin bu alt kümeleri, soy bağlılığı (lineage commitment) ile ilişkili antijenleri çok düşük seviyelerde ifade eder (lin-) ve CD34parlak+, Thy-1 (CD90)+, CD133+, CD38/CD71/HLA-DR zayıf+/negatif olan fraksiyonda bulunur (Keeney ve ark., 2004).

Farede CD34 ve CD38 ifadesi, HKH'nin aktivasyon durumunu yansıtır. Yapılan bir çalışmada transjenik fare modelinde insan CD34 ifadesinin analizi, insan ve fare genlerinin farklı şekilde düzenlendiğini göstermiştir. Sadece CD34 hücreleri kullanılarak yapılan insan kemik iliği kaynaklı kök hücre nakli araştırmalarının fare modelindeki verilere rağmen makul olduğu düşünülmektedir. Fare modelinden gelen

ilk veriler, CD34+ kök hücre nakli alan hastalarda önemli bir HKH alt kümesinin tanımlanmamış olduğu şeklinde yorumlanabilse de, CD34 ifadesinin insanlardaki HKH'nin önemli bir çoğunluğunu temsil eden bir özellik olduğunu bilmek önemlidir (Spangrude ve Slayton, 2009).

Kan hücresi üretiminin günlük hızı, hematopoez sürecini kontrol eden kök hücrelerin ne büyük bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Bu aşırı proliferasyon ve farklılaşma ihtiyacı, insanlarda uzun ve başarılı bir nakil geçmişiyle birlikte değerlendirildiğinde, HKH'yi her türlü kök hücre terapisi için altın bir standart haline getirmektedir (Spangrude ve Slayton, 2009).

#### **1.4 Hematopoietik Kök Hücre Nakli**

HKH nakli (HKHN), hematopoietik sistemin yeniden yapılanmasını sağlamak amacıyla kişinin kendinden veya doku grubu uyumlu kişilerden kök hücrelerin toplanarak uygun koşullarda alıcıya nakledilmesidir. HKHN, doğuştan ya da kazanılmış, benin veya malin birçok hastalığın tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Anormal veya sağlıklı kemik iliği veya kötü işleyen bir bağışıklık sistemi olan hastalarda, hematopoietik ve bağışıklık işlevi, kök hücrelerin otolog veya allojenik bir vericiden toplanarak hastaya infüze edilmesiyle yeniden yapılandırılabilir (Allied ve Professionals, 2016).

Her yıl lenfoma, lösemi, immün yetmezlik hastalıkları, doğumsal metabolik bozukluklar, hemoglobinopatiler, miyelodisplastik ve myeloproliferatif sendromların tedavisi için 25.000'den fazla HKHN gerçekleştirilmekte (Hatzimichael ve Tuthill, 2010) ve yüksek doz kemoterapileri takiben kan hücrelerinin yeniden yapılandırılması ile hematolojik maliniteler ve solid tümörler için sıklıkla hayat kurtarıcı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Hatzimichael ve Tuthill, 2010; Hopman ve DiPersio, 2014). Kök hücrelerin infüzyonu, eğer mevcutsa altta yatan maliniteyi ortadan kaldırmak için ve bir allojenik nakil durumunda kök hücre yamanmasına olanak sağlamak amacıyla immün sistemi baskılamak için alıcının kemoterapi,

immünoterapi, radyasyon terapisi veya bunların bir kombinasyonunu aldıktan sonra gerçekleştirilir. Kök hücre kaynağı olarak granülosit koloni uyarıcı faktör (Granulocyte Colony Stimulating Factor, GCSF) ile mobilize edilmiş Periferik KKH kullanımı, hem otolog hem de allojenik hücre nakillerinde büyük ölçüde kemik iliğinin (Kİ) yerini almıştır (Hopman ve DiPersio, 2014).

“Otolog hematopoietik kök hücre nakli” terimi, otolog kemik iliği nakli (autologous bone marrow transplantation, aBMT), otolog periferik kan kök hücre nakli (autologous peripheral blood stem cell transplantation, aPBSCT) ve otolog hematopoietik hücre nakli (autologous haematopoietic cell transplantation, AHCT) terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılır (Spangrude ve Slayton, 2009). “Otolog” işlem için kullanılan kök hücreler, hastanın kendi hücreleri iken; “allojenik” nakillerde verici, hasta ile doku uyumu olan farklı bir bireydir. Bazı allojenik durumlarda "singeneik" terimi, hücre vericisinin hastanın tek yumurta ikizi olması durumunda kullanılır (Allied ve Professionals, 2016).

1980'lerin sonunda, kemik iliği veya periferik kan numunelerinin hemen hemen tüm CFC aktivitesinin ve yamanma potansiyelinin, CD34 antijenini taşıyan hücrelerin küçük bir popülasyonunda yer aldığı kanıtlanmış ve çok sayıda klinik araştırma, CD34+ hücre nakillerinin güvenli olarak terapötik etkisi olduğunu tespit etmiştir (Keeney ve ark., 2004). Allojenik kök hücre nakilleri için (APKHN),  $\geq 4,2-4,5 \times 10^6$ /kg'lık bir CD34+ hücre dozu, akut veya kronik graft-versus-host hastalığına (graft-versus-host disease, GVHD) karşı risk artışı olmaksızın uyumlu akraba dışı donör ortamında artmış bir genel sağ kalımla ilişkilendirilirken, daha yüksek dozlar ( $> 8-14 \times 10^6$  hücre/kg) artan GVHD riski ile ilişkilendirilmiştir. Aynı şekilde, daha yüksek CD34+ hücre dozları ( $> 9,1 \times 10^6$ ) da HLA uyumlu kardeşlerden alınan Allo-KHN'nin yoğunluğunun azalmasından sonra artmış kronik GVHD riskiyle ilişkilendirilir (Hopman ve DiPersio, 2014). İnfüze edilen CD34+ hücrelerinin sayısı hem nötrofil hem de trombosit yamanmasının önemli bir belirleyicisidir. Otolog kök hücre nakli (OPKHN) için, hızlı ve sürekli iyileşmeye yol açan optimal bir CD34+ hücre dozunun  $> 5 \times 10^6$ /kg olduğu düşünülmektedir. Öte yandan,  $2 \times 10^6$  CD34+ hücre/kg, özellikle trombositlerde daha aşağısında tutarlı ve hızlı çoklu soy

yamanmasının gerçekleşmeyebileceği minimum eşik olarak kabul edilir (Hopman ve DiPersio, 2014). Kök hücre mobilizasyonunun başarısı hem verilen CD34+ hücre sayısına, hem uygulanan kemoterapinin türüne, hem de otolog kök hücre toplanmasından önce uygulanan ve T hücreleri baskılamayı hedefleyen tüm vucüt ışınlaması veya ona benzer ilaç uygulamalarına bağlıdır (Hopman ve DiPersio, 2014).

HKH kaynağının seçimi, vericinin mevcudiyetine ve nakil endikasyonuna bağlıdır. Uygulanan geniş çaplı sitotoksik tedavi, ilik veya periferik kanın malin hücrelerle tutulumu genellikle otolog HKH'lerin kullanımını olanaksızlaştırır. Allojenik nakiller için HLA uyumlu kardeş vericiler tercih edilir, ancak hastaların %30'undan azının uygun bir vericisi vardır. Kardeş vericisi olmayan hastaların, gönüllü kayıtları aracılığıyla fenotipik olarak HLA uyumlu, akraba dışı bir verici bulma şansı %30-40'tır. Kordon kanı HKH'lerinin gelişimi, pediatrik ve yetişkin hastalar için allojenik donör bulma şansını arttırmıştır. Otolog, sinjeneik veya allojenik HKH'ler, malin hematolojik ve hematolojik olmayan hastalıklar için miyeloablatif kemoradyoterapi sonrası hematopoietik iyileşmeyi destekler. Sinjeneik veya allojenik HKH'ler, kemik iliği fonksiyon bozuklukları (örneğin, aplastik anemi) ve doğumsal hematopoietik veya immünolojik kusurların (örneğin, talasemi ve şiddetli kombine immün yetmezlik sendromu) düzeltilmesi için kullanılmaktadır (Hatzimichael ve Tuthill, 2010).

Otolog veya allojenik transplantasyon için HKH ürünleri Kİ, periferik kan veya göbek kordon kanından (GKK) temin edilebilir.

- **Kemik İliği:** Kİ, epidural veya genel anestezi altında posterior iliak kretlerden toplanır. İlik, hasattan hemen sonra infüze edilebilir, ancak 4 °C'de; 24 saat boyunca kök hücre canlılığı kaybı olmadan saklanabilir, bu da nakil programları arasında HKH'lerin ulusal ve uluslararası transferine olanak sağlar (Hatzimichael ve Tuthill, 2010).

- **Periferik kan kök hücreleri:** Periferik kan kök hücreleri (PKKH'ler), APKHN için yaygın olarak kullanılır ve otolog HKH'ler için HKHN bileşeni olarak hemen hemen Kİ'nin yerini almıştır. PKKH, Kİ'den elde edilen kök hücrelerden daha hızlı tutunur. Nötrofil ve trombosit sayılarının kalıcı ve daha hızlı hematopoietik düzelmesi, hematopoietik hücre yamasında bulunan CD34+ hücre sayılarının yüksek olması ile ilişkilendirilir ( $5 \times 10^6/\text{kg}$ 'a kadar). Tam otolog iyileşme için bazı araştırmacılar, alıcının vücut ağırlığının  $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ 'ını, periferik kan CD34+ hücrelerinin minimum dozu olarak kabul eder. Otolog nakil için kullanılan hücre dozu kalıcı ve hızlı bir yamanma sağladığından, allojenik HKH'ler de periferik kandan toplanarak kullanılabilir (Hatzimichael ve Tuthill, 2010).
- **Göbek kordonu kanı:** Allojenik HKHN'de, özellikle etnik azınlıklar için HLA uyumlu bir vericinin eksikliği nakil olma şansını sınırlar. Verici yetersizliğine bir çözüm de kordon kanı bankalarının gelişmesidir (Hatzimichael ve Tuthill, 2010). Kordon kanı nakli (KKN), GVHD görülme sıklığını azaltan, kolay ve güvenli temin, viral bulaş olasılığının düşük olması ve nispeten olgunlaşmamış bağışıklık hücreleri gibi önemli avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, KKN'leri, hematolojik iyileşmeyi geciktiren, enfeksiyon riskini, nakil sonrası erken dönem mortaliteyi artıran diğer HKHN hücre kaynaklarından daha az hücre içermektedir. Kordon kanı, Kİ veya periferik kana göre daha büyük bir kök hücre çeşitliliği göstermektedir (Hatzimichael ve Tuthill, 2010).

## 1.5 Aferez

Terapötik aferez (TA), kanser hastalarında altta yatan patolojik sürece katkıda bulunduğu düşünülen belirli bir molekülü, antikor veya hücresel ögeyi uzaklaştırmak veya manipüle etmek amacıyla bazı hastalık komplikasyonlarını tedavi etmek için kullanılır. Kanserli hastaları tedavi etmek için en yaygın kullanılan aferez yöntemleri arasında terapötik plazma değişimi (TPD), lökosit aferez,

ekstrakorporeal fotoferez (extracorporeal photopheresis, ECP), trombosit aferezi ve eritrosit aferezi bulunur. Kanın hastadan ayrıldığı, bir bölümünün daha sonra çıkarıldığı veya başka şekilde manipüle edildiği ve geri kalanının hastaya geri verildiği bir işlemdir. TA prosedürleri arasında TPD (plazmanın bir kolloid veya kristalloid çözeltisiyle değiştirildiği) ve plazma solütlerini (plazmaferez), beyaz kan hücrelerini (white blood cells, WBC'ler; lökosit aferez) veya trombositleri (trombosit aferez) seçici bir şekilde çıkaran ve bertaraf eden yöntemler bulunur. ECP, çıkartılan beyaz kan hücrelerin hastaya tekrar infüze edilmeden önce manipüle edildiği bir lökosit aferez prosedürü türüdür. Aferez prosedürleri, kan bileşenlerini göreceli yoğunluklarına dayalı (kırmızı kan hücreleri en yoğun, plazma en az yoğun olmak üzere ve dönme ekseninden dışa doğru hareket eden ve trombositten zengin plazma, lenfositler ve granülositlerden oluşan ara katmanlar) ve hızla dönen bir ayırma odasının içinde katmanlarına ayırmak için santrifüjlemeyi kullanabilir (Connelly-Smith ve Linenberger, 2015).

Kök hücre mobilizasyonu ve toplanması üzerine yapılan güncel araştırmalar, mobilizasyonu artırarak toplanan kök hücre sayısını optimize etmeye ve HKHN için gerekli CD34+ hücre dozunu karşılamak için ihtiyaç duyulan aferez gün sayısını azaltmak için toplama prosedürünün etkinliğini arttırmaya odaklanmıştır (Kiki, 2017).

HKHN amacıyla kök hücreleri toplamak için uygulanan aferez prosedürü nispeten iyi tolere edilen, kullanışlı bir ayakta tedavi işlemidir. Aferez yoluyla yeterli bir kök hücre toplanması elde etmek amacıyla donörün kan dolaşımında bulunan kök hücre sayısını artırmak için bir “mobilizasyon” işlemi gerekir. Kök hücre toplamının hedefleri, HKHN için gereken CD34+ hücre dozunu elde etmek için alıcının vücut ağırlığı kg başına toplanan CD34+ hücrelerini en az aferez günüyle en üst düzeye çıkarmaktır. Bir kardeş veya akraba dışı bir alıcı için bağış yapan allojenik vericiler, aferezin başarılı olması amacıyla kök hücrelerin periferik kan içine mobilize olması için büyüme faktörlerine (G-CSF, GM-CSF) ihtiyaç duyar (Deneys ve ark., 2017; Ngoma ve ark., 2011).

PKKH mobilizasyonu ayrıca kemoterapiden sonraki iyileşmeyi takiben de gözlenir. GCSF'nin birlikte kullanımı sinerjik bir etki yaratır. PKKH mobilizasyon prosedürü başlatıldığında, aferezin zamanlamasını ve hacmini tanımlamak son derece

önemlidir. Tek başına rekombinant büyüme faktörleriyle mobilizasyon (kemoterapi olmadan) sonrası, PKKH'lerin tepe seviyeleri 4-6 gün sonra görülür. PKKH mobilizasyonunun kinetik paterni, mobilize edici ajana bağlı olarak değişebilir. Örneğin, G-CSF kullanılarak maksimum PKKH mobilizasyonu 4-6 günde gözlenirken, GM-CSF maksimum PKKH mobilizasyonunu 5-6 günde indükler. Öte yandan, pleriksaforun mobilize edici etkisi tek doz enjeksiyondan sonra dakikalar ya da saatler içinde görülürken, 6 saat içinde de maksimum etkisi görülür (Deneys ve ark., 2017).

**Çizelge 1.2.** Mobilizasyon rejimleri (Kindwall-Keller, 2014)

Mobilizasyon rejimleri	Endikasyonlar
GCSF (Filgrastim)	Otolog, Allojenik
Kemoterapi + G-CSF	Otolog
Pleriksafor + G-CSF	Otolog-Multiple Myelom, Otolog-Non-Hodgkin lenfoma
Kemoterapi + G-CSF + Pleriksafor	Otolog-Multiple Myelom, Otolog-Non-Hodgkin lenfoma

Mobilizasyon rejiminin seçimi, toplamının bir allojenik vericiden mi yoksa otolog bir vericiden mi yapıldığına bağlıdır. Allojenik donörler yalnızca büyüme faktörü mobilizasyonu almalı ve kök hücreleri mobilize etmek için asla kemoterapi almamalıdır. Aferez toplama otolog nakil için yapılıyorsa, hastalık durumu, kemoterapinin uygunluğu, altta yatan hastalık sürecinin remisyon durumu ve hasta tercihinin hepsi en uygun mobilizasyon rejiminin seçilmesinde dikkate alınmalıdır (Çizelge 1.2. Mobilizasyon rejimleri) (Kindwall-Keller, 2014). Verici mobilizasyonu tamamladıktan ve aferez toplama prosedürü başlatıldıktan sonra aferez personeli HKHN için gerekli olan CD34+ hücrelerini içeren mononükleer hücre katmanını toplar. Aferez yoluyla kök hücre toplanması nispeten güvenli olsa da, enflamatuar hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kardiyovasküler veya serebrovasküler hastalıklar gibi önceden var olan hastalıklara sahip vericiler, iyi donör olarak düşünülmebilir ve işleme ilişkili komplikasyonlar için artmış bir riske sahiptirler (Kindwall-Keller, 2014).

PKKH ürününün kalitesi, özellikle de hematopoietik öncü hücrelerin (CD34 + hücreleri) sayısı ve canlılığı, başarılı bir yamanmayı öngörmek için önemlidir

(Deneys ve ark., 2017). Yamanma başarısının, vericiler ve alıcılar arasındaki fenotipik benzerlik derecesinden bağımsız olarak CD34+ hücre sayısı ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Bu görüşü, sadece bireysel hastalar için değil, aynı zamanda birçok tesisin tedavi ve sonuç verilerinin toplanması için faydalı olan doğru hücre sayma yöntemlerinin geliştirilmesine borçluyuz. CD34+ hücrelerinin akan hücre ölçeği ölçümü şimdilerde PKKH veya kemik iliği nakli amacıyla hematopoietik öncü/kök hücrelerin mobilizasyonu ve hasadını optimize etmek için en yaygın kullanılan araçtır (Ngoma ve ark., 2011).

Nakil yapılan hastaların bakımı için ilk akan hücre ölçeği altın standardı aslında önceki iki altın standarttan elde edilen verilerin bir senteziydi: CD34 gibi alternatif bir belirteç ile ölçüldüğü üzere mutlak lökosit sayımı için hematoloji analizörü ve progenitor hücrelerin göreceli oranı için akan hücre ölçeği (Ngoma ve ark., 2011).

## 1.6 Akan Hücre Ölçeği

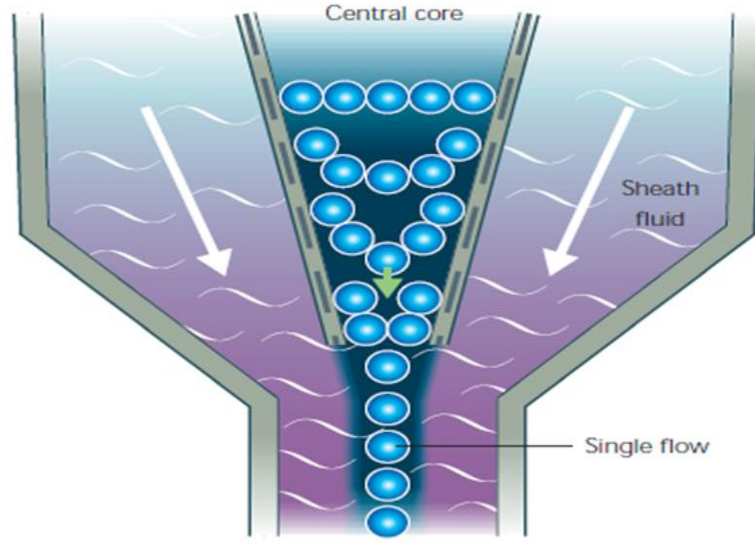
Akan hücre ölçeği, rutin klinik laboratuvarlarda hastalığın teşhisi, prognozu ve izlenmesi amacıyla giderek daha fazla kullanılmaktadır (Gossez ve ark., 2017; Soares ve ark., 2019). Akan hücre ölçeği, hücrelerin fenotiplerini ve özelliklerini sorgulamak için güçlü bir araçtır. Heterojen bir popülasyondaki farklı hücre tiplerinin tanımlanmasını kolaylaştırır. Her hücrede birkaç ölçümü kaydeden çoklu parametrelerdir, bu nedenle heterojen bir popülasyon içinde homojen bir alt popülasyonu tanımlamak mümkündür. Ayrıca hücre tiplerinin ayrımı, membran reseptörleri ve antijenlerin varlığı, membran potansiyeli, pH, enzim aktivitesi ve DNA içeriğini belirlemeye olanak tanır (Macey, 2007).

Akan hücre ölçeği, kök hücre ürünleri üzerindeki bu prosedürlerin nitel ve nicel sonuçlarını doğru bir şekilde izlemek için mükemmel bir teknoloji sunar ve CD34+ hücrelerin akan hücre ölçeği ile sayımı nakil için optimum ürünün belirlenmesinde kritik bir rol oynar (Keeney ve ark., 2004).

Akan hücre ölçer, tekli partiküllerin (genellikle hücrelerin) bir ışık demeti yoluyla bir sıvı akımında algılayıcı bir alandan akarken, çoklu fiziksel özelliklerini eş zamanlı ölçen ve analiz eden bir teknolojidir. Ölçülen özellikler arasında bir parçacığın bağıl büyüklüğü, bağıl granülaritesi veya iç yapısı ve bağıl floresan yoğunluğu vardır. Bu özellikler, hücrenin veya parçacığın gelen lazer ışığını nasıl saçtığını ve floresan yaydığını kaydeden optik-elektronik bir eşleştirme sistemi kullanılarak belirlenir (BD Biosciences, 2000; Macey, 2007) Mikroskopik parçacıkların bağıl ışık saçılımı ve renk ayrımlı floresanı ölçülür. Hücrelerin analizi ve ayrımı büyüklük, granülarite ve hücrenin antikolar veya boyalar şeklinde floresan molekülleri taşıyıp taşımadığına dayalı olarak yapılır (Macey, 2007).

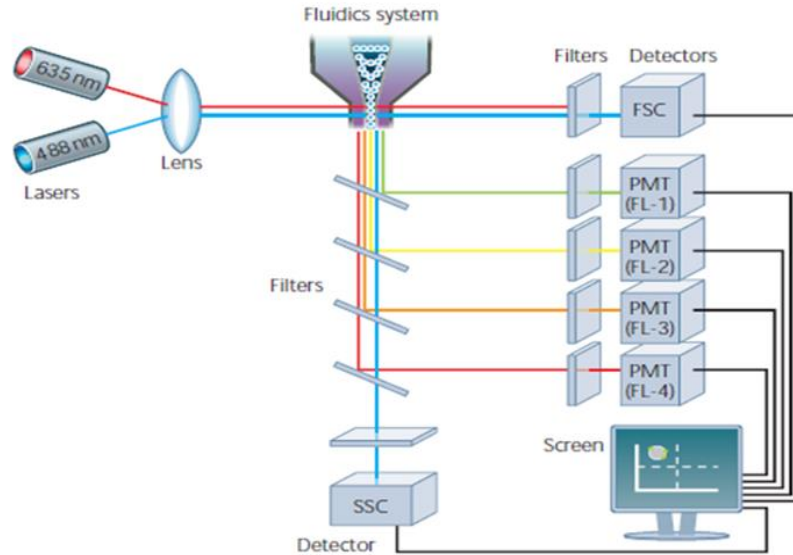
Akan hücre ölçer üç ana sistemden oluşur: akışkanlar, optikler ve elektronikler.

Akışkanlar sistemi bir akımdaki parçacıkları sorgulamak için lazer demetine taşır (BD Biosciences, 2000). Akan hücre ölçerin akışkan sistemi, hücreleri sorgulama noktasına düzenli tek sıra halinde iletmek üzere tasarlanmıştır, böylece tek seferde yalnızca bir hücrenin hidrodinamik odaklanma olarak adlandırılan bir süreçten geçmesi sağlanır. Örnek akış hızı, bir basınç regülatörü kullanarak örnek basıncının sheath basıncına göre ayarlanmasıyla kontrol edilir. Genel olarak, daha yüksek akış hızları daha düşük çözünürlük anlamına gelir ve en uygun şekilde nitel ölçümler için kullanılır (örn., immünofenotipleme). Düşük akış hızları daha yüksek çözünürlük sağlar , çünkü hücrelerin çoğu lazerin merkezinden geçer ve tipik olarak daha yüksek netliğin kritik olduğu uygulamalarda kullanılır (örn., DNA analizi) (Rowley, 2019).



**Şekil 1.5.** Hidrodinamik odaklama, partiküllerden tek sıralı bir akım üretir (Rahman, 2009). \*Central core: Merkezi odaklama, Sheath fluid: Hücreleri saran akışkan, Single flow: Tek hücre akışı

Optik sistem örnek akışındaki parçacıkları aydınlatmak için kullanılan lazerlerden ve ortaya çıkan ışık sinyallerini uygun detektörlere yönlendiren optik filtrelerden oluşur (BD Biosciences, 2000, Rowley, 2019) (Şekil 1.6) .

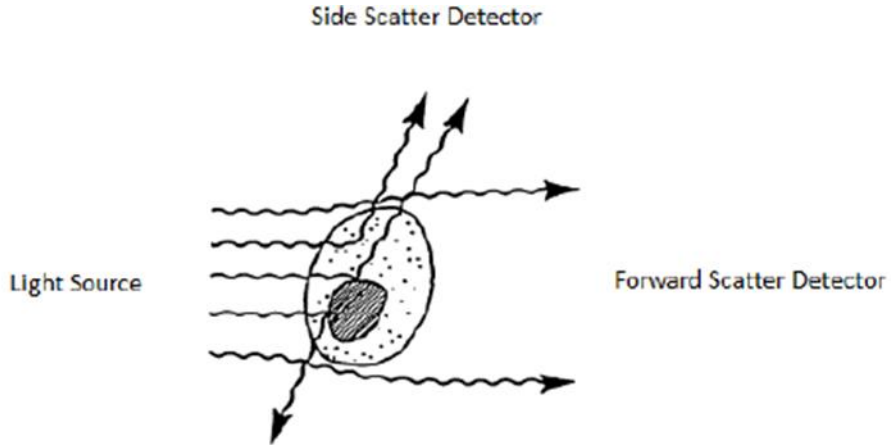


**Şekil 1.6.** Tipik bir akan hücre ölçer düzeninin şematik taslağı (Rahman, 2009).

\*Fluidic system: Akışkan sistemi, Lens: lens, Filters: Filtreler, Lasers: Lazerler, Detector: Algılayıcı, Screen: Ekran

Hidrodinamik odaklanma, parçacıklar ve hücreler sorgu noktasına varmadan önce örneklem merkezinden tek bir dosya olarak geçebilsinler diye, parçacıkları sıraya dizer. Bu noktada, ışık kırılır ya da bütün yönlerde saçılır. Yönü değiştirilen ışığın büyüklüğü, büyük ölçüde parçacığın fiziksel özelliklerine, özellikle de iç karmaşıklığı ve büyüklüğüne bağlıdır. Hücrenin şekli, yüzey biçimi, zarı, çekirdeği ve tanecikli yapı gibi özelliklerin hepsi ışığın saçılmasını etkilemektedir (Rowley, 2019) (Rahman, 2009).

Işık saçılımı, iki açıda toplanmıştır: İleri Saçılım (FSC) ve Yana Saçılım (SSC). İleri saçılım, lazerin yörüngesinin yönünde veya ileri yönde kırılan ışığın bir ölçümüdür. Bu ölçüm hücrenin yüzey alanı veya büyüklüğü ile orantılıdır. Hücrenin granüler yapıda olması veya iç karmaşıklığıyla orantılı olarak yana yayılım, lazer yörüngesinden yaklaşık 90-derecede toplanmıştır ve öncelikli olarak kırılan ve yansıyan ışığın bir ölçümüdür (Şekil 1.7). İleri saçılım ve yana saçılım verileri, büyüklük (FSC) ve iç karmaşıklık (SSC) yardımı ile, örneklemeleri sınıflandırmak için kullanılabilir (Rowley, 2019).

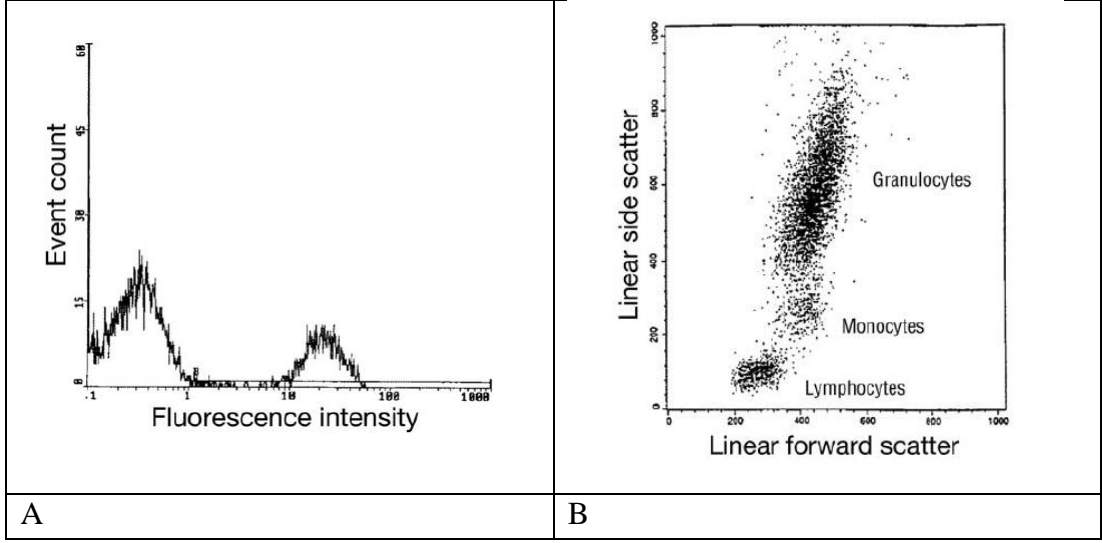


**Şekil 1.7.** Hücrenin ışık saçılım özellikleri.

Elektronik sistem, algılanan ışık sinyallerini bilgisayar tarafından işlenebilen elektronik sinyallere dönüştürür. Ayırma özelliğine sahip bazı cihazlar için,

elektronik sistem aynı zamanda parçacıkları yüklemek ve saptırmak için ayırma kararlarını verebilir (BD Biosciences, 2000).

Akan hücre ölçer elektronik sistemi, iki tür fonksiyon göstermektedir; ışık sinyallerini elektronik sinyallere çevirir (voltaj) ve veri analizi yapar. Fotodiyot, ışığa daha az hassastır ve öncelikli olarak daha sağlam ileri saçılım sinyallerini saptamada kullanılır. FMTler çok daha zayıf sinyalleri belirlemede kullanılır ve bu yüzden de floresan ışığı ve yayılmış yana saçılımı saptamak için kullanılmaktadır. Akan hücre ölçerde, parçacıklar bir sıvı akımında lazerle kesişmeye taşınır. 0,2-150 mikrometre büyüklüğünde olan herhangi bir sıvı içindeki homojen dağılmış parçacıklar veya hücreler analiz için uygundur (BD Biosciences, 2000). Bir parçacık/ hücre lazer ışının yörüngesine girip, ışığı ya da floresanı saçmaya başladığında; elektronik bir sinyal veya voltaj atımı oluşturulur (BD Biosciences, 2000; Macey, 2007; Rahman, 2009; Rowley, 2019).—(Soares ve ark., 2019). Floresanın miktarı ve yoğunluğu bilgisayar sistemi tarafından kaydedilir ve bir görsel gösterim biriminde tek parametrelili (Şekil 1.8A), çift parametrelili (Şekil 1.8B), veya çok parametrelili olabilen bir frekans dağılımı olarak gösterilir (Macey, 2007). Veriler toplandıktan ve dijital hale aktarıldıktan sonra, AHÖ bilgisayar yazılımı kullanılarak ayrıştırılmaya hazır hale gelir. Veriler üzerinde tamamlanan analizin derinliği, büyük oranda araştırmacının amaçları ile belirlenmektedir. FSC- SSC çizimi ile tek bir örneklemin basit morfolojik sınıflandırması olabileceği gibi, çeşitli hücre yüzey belirteçleri kullanılarak (floresan boyama) bir örnekleme çoklu alt grupların belirlenmesi (bir grubun seçilmesi yoluyla) de olabilmektedir (BD Biosciences, 2000; Macey, 2007; Rahman, 2009; Rowley, 2019).



**Şekil 1.8.** Frekans dağılım grafikleri. A. Zayıf floresan ve güçlü floresan hücrelerin tipik dağılımı gösteren tek parametrelili floresan ve hücre sayısı histogramı. B. Periferik kandan lökositlerin öne saçılım ve yana saçılım analizinin çift parametrelili histogramı. Lenfositlerin, monositlerin ve granülositlerin karakteristik dağılımı gösterilmektedir.

\*Event count: olay sayısı, Fluorescence intensity: Floresan yoğunluğu, Linear side scatter: Doğrusal yana saçılım, Linear forward scatter: Doğrusal öne saçılım.

İdeal olarak, lazer ışınından tekrar tekrar geçen aynı parçacık, aynı ışık saçılımı veya floresan titreşimleri üretmelidir. Başka bir parçacık, tutarlı ancak farklı bir titreşim kümesi üretebilir. Pratik olarak, parçacıklar aynı olsa bile cihaz içinde her zaman titreşimlerde bir miktar değişime neden olan bazı farklılıklar vardır. Kullanıcı, farklı ticari firmalardan temin edilebilen floresan kürecikler gibi iyi bir tek tip test örneği üzerinde varyasyon katsayısını (coefficient of variation, CV) hesaplayarak cihaz farklılıklarının büyüklüğünü değerlendirir. CV için temel denklem şu şekildedir:

$$CV = (SD/ORTALAMA) \times 100$$

SD, standart sapmadır ve bu parçacıklar için ölçülen parametrenin ortalama değeridir (Gauss dağılımı için bu, en yüksek sayıya sahip kanal olacaktır.). Çoğu cihaz, kullanıcı için CV'yi hesaplar. Kullanıcı CV'nin normal olduğunu biliyorsa, CV'deki herhangi bir artış, cihaz ayarının değişiyor olduğunu ve histogramların genişlemesine neden olabileceğini gösterecektir. Bununla birlikte, eğer kürecikler iyi bir CV'ye sahipse (<2%) ve bir test örneği geniş bir histograma sahipse, olgu özgün olabilir. Örneğe etki etmemesi koşuluyla, test edilecek biyolojik örneğe floresan kürecikler eklenebilir (Macey, 2007).

Tüm akan hücre ölçer sistemleri, parçacıklar üzerinde aynı anda birden fazla sinyali analiz etme ve bunları 3 boyutlu histogramlar olarak çizme yeteneğine sahiptir. Birçok sinyal kombinasyonu kullanılabilir. Her bir florokrom geniş bir emisyon spektrumuna sahiptir. Birden fazla florokrom kullanıldığında, bunların emisyon spektrumlarının parçaları muhtemelen aynı dalga boylarında olacaktır. Buna “spektral örtüşme” denir. Bu durum iki farklı florokromun emisyon spektrumlarının birbirinden çıkarılmasıyla düzeltilebilmektedir. Bu da “kompensasyon” olarak adlandırılır (Macey, 2007).

Çok az sayıda hücrenel bileşen içsel olarak floresandır ve floresan olanlar (örn., piridin ve flavin içeren nükleotitler) sadece sınırlı bilgi sağlar, bu nedenle hücreler genellikle, aksi taktirde görülemeyecek bileşenlerin varlığını açığa çıkarabilen (florokromlar, floroforlar veya fluorlar olarak adlandırılan) floresan problemleriyle boyanır. Farklı spektral özelliklere, daha yüksek kuantum verimlerine ve daha fazla stabiliteye sahip birçok boya geliştirilmiştir. Mevcut kullanımdaki florokromlar, yüksek moleküler ağırlıklı siyanobakteriyel veya alg proteinleri (örneğin, fikoeritrin [PE]) ve yeni floresan özelliklerine sahip bir maddeyi üretmek için kovalent olarak başka bir (genellikle düşük moleküler ağırlıklı) floresan boya ile birleştirilerek oluşturulan "ikili boyalar"dır. Böylesi güçlü bir teknik oluşturan floresan tespitle akan hücre ölçerin kombinasyonu birkaç farklı parametrenin dakikada binlerce hücrede aynı anda ölçülmesini mümkün kılar. Floresan boyamanın oluşabileceği birkaç farklı mekanizma vardır. Bazı boyalar belirli maddeler için bir afiniteye sahiptir ve hücreler içindeki belirli yerlerde veya organellerde yüksek konsantrasyonlarda birikir. Florokromlar sıklıkla protein ligandlarına (örn., antikolar) konjuge olur (birleşir) ve bu konjugatlar, uygun reseptörü (veya antijeni) ifade eden hücrelere belirgin olarak ve/veya diğerlerinden daha yüksek miktarlarda bağlanır (BD Biosciences, 2000; Macey, 2007; Rahman, 2009; Rowley, 2019).

FITC, bir proteine konjuge edilen ilk florokromdur ve şu anda en yaygın olarak bulunan mAb konjugatıdır. Bununla birlikte, multiparametrik akan hücre ölçerde idealin altındadır, çünkü 488 nm lazerler tarafından nispeten zayıf şekilde eksite edilir ve PE gibi 488 nm'de eksite olan diğer florokromların emisyonunu kirlüten

uzun bir emisyon spektrumuna sahiptir. Pozitif fraksiyonu eksik değerlendirmesinin muhtemel olduğu, aktivasyonla ilişkili moleküller gibi zayıf bir şekilde ifade edilen antijenler inceleniyorsa, bu onu ikinci seçenek florokrom yapar (Macey, 2007; Rahman, 2009; Rowley, 2019).

PE, akan hücre ölçer için mükemmel bir florokromdur çünkü son derece stabildir. Yüksek bir sinyal-gürültü oranı ile sonuçlanan yüksek bir kuantum verimine sahip olduğu için zayıf ifade edilen antijenlerin tespitini artırır. Bununla birlikte, çok büyük bir moleküldür ve bazı permeabilizasyon (geçirileme) protokollerinde hücre içi antijenlerin tespiti için uygun olmayabilir. 488 nm'lik bir lazer çizgisi tarafından yeterince eksite edilmesine rağmen, PE yeşil lazerler tarafından optimal biçimde eksite edilir ve uygun dalga boyuna sahip uygun katı hal lazerleri mevcuttur. (Macey, 2007; Rahman, 2009; Rowley, 2019).

Nükleik asitleri boyayan florokromlar için akan hücre ölçerde üç yaygın kullanım vardır: DNA ölçümü, membran bütünlüğünün değerlendirilmesi ve hücre parçaları veya çekirdeksiz hücrelerden çekirdekli hücrelerin hızlı bir şekilde ayırt edilmesi. Hali hazırda mevcut boyaların hiçbiri spesifik olarak sadece RNA veya DNA'ya bağlanmaz (Macey, 2007). 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) tercihen, DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanan bir boyadır (moleküler ağırlık 1270). Genellikle canlı hücrelerden dışarı atılır ve ölü hücrelerin DNA'sını etiketlemek için kullanılabilir. 488 nm'lik bir lazer tarafından eksite edilebilir, ancak kuantum verimliliği düşüktür (0.035). Temel avantajı, iki renkli immünofloresan bağlamında geçirgenlik veya DNA içeriği ölçümü gerektiğinde FITC ve PE işaretli antikolarla eş zamanlı olarak kullanılabilmesidir, bununla birlikte dezavantajı ise, Hoechst boyalarının verdiği gibi daha geniş DNA dağılımları meydana getirmeleridir (Macey, 2007; Rahman, 2009).

Tekil antijenlerin tespiti için uygun bir florokrom seçilmesinin yanı sıra, belirli bir antikor klonu sonuçları etkileyebilir. Belirli bir antijene özgü mAb'ların hepsi aynı epitopa bağlanmayacaktır. Bunun antijenin saptanması üzerinde bir etkisinin

olmadığı birçok durum vardır, ancak bazı durumlarda, sonuçlar epitopa özgü olabilir. Buna iyi bir örnek, CD34+ hücrelerinin akan hücre ölçer ile saptanmasıdır. CD34 molekülü üzerindeki üç farklı epitopa bağlanan, bazıları fiksasyona duyarlı ve hepsi kendi mAb'leri için farklı bağlanma gücüne sahip anti-CD34 mAb'ler üretilmiştir. Class III anti-CD34 mAb'lerin dolaşımdaki mobilize HKH'in tespiti için en güvenilir olduğu gösterilmiştir, ancak Class III mAb'lerde bile paraformaldehit içeren eritrosit parçalama reaktiflerinin kullanımı floresan yoğunluğunu azaltır ve CD34+ hücrelerinin oranının eksik değerlendirilmesine yol açar (Macey, 2007).

## 1.7 Single ve Dual Platform Analizler

Mutlak hücre sayılarını belirlemek için farklı akan hücre ölçer tabanlı yöntemler vardır. İlk teknoloji, CD4 T hücre sayısının bir hematolojik analizörle belirlenen mutlak lenfosit sayısından elde edildiği ve ardından CD4 T hücre yüzdesinin (toplam lenfositler arasında) akan hücre ölçer ile belirlendiği dual platform yaklaşımıdır. Her ne kadar standardizasyon ve kalite kontrolde kayda değer bir ilerleme sağlanmış olsa da (örneğin, kalıntıları dışlamak için CD45 seçilimi), çoklu teknolojilerin kombinasyonu artmış değişkenliğe yol açmaktadır. Özellikle farklı hematolojik analizörleri kullanan laboratuvarlar arası çalışmalarda kısıtlayıcıdır. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için, single platform teknolojisi (SPT) geliştirilmiştir. SPT, hematoloji analizörüne gerek olmadan tek bir cihazla lenfosit alt gruplarının mutlak sayısını ölçer. Bu, volumetrik sayıma ve en yaygın olarak da mikro boncukları sayan dahili kalibratörün kullanımına dayanabilir. Birçok çalışma, boncuk bazlı SPT sayma yöntemlerinin uygulanmasının, dual platformlarla karşılaştırıldığında mutlak hücre sayımında laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası farklılığı önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Gosseze ve ark., 2017). Kan ve kemik iliği progenitör hücre nakli merkezlerinde kök hücreler genellikle boncuk bazlı yöntemlerle sayılır (Mortazavi ve ark., 2012).

Single platformda, örneğe bilinen sayıda floresan boncuk eklenir ve bilinen sayıda floresan boncuk kullanılır, kullanımı rutin dual platformlu yöntemlerden daha kolaydır (Naithani ve ark., 2017). Single platformlu metodoloji, çeşitli farklı tipte floresan sayma boncukları kullanan çok sayıda cihazda doğrulanmıştır (Whitby ve ark., 2012).

Dual platformda, geleneksel hematoloji analizöründen ve bir akan hücre ölçerden gelen veriler birleştirilir ve iki ölçümde, örneklerin hazırlanması gerek ve ölçülen CD34 değerinde büyük farklılığa yol açabilir (Naithani ve ark., 2017).

Single platform analizi maliyetlidir. Dual platformlu analizde kontroller yapmaya gerek olmadığından daha az maliyetlidir. Dual platformlu analiz kaynak tasarrufu da sağlar (Naithani ve ark., 2017).

## **1.8 Floresan Boncuk ve Volümetrik Ölçüm**

Ticari amaçlı boncuklar şu amaçlarla kullanılır;

- Işık saçılım ve maksimum floresan kanal varyasyon katsayılarının izlenmesi
- Işık saçılım ve maksimum floresan kanaldaki sapmanın izlenmesi
- Cihazın hassasiyetinin izlenmesi
- Spektral üst üste binmenin ayarlanması için kompenzasyonun kolaylaştırılması (Barnett, 1999)

Boncuklar sadece taze, normal numunenin analizine ihtiyaç duyulan ayarların en uygun hale getirilmesi ve son akan hücre ölçer kurulumu için kılavuzluk sağlamaktadır. CD34 sayımı için hem single hem de dual platformlu metodolojiler önerilmiştir. Dual platformlu prosedürlerde, toplam hücre sayımı bir hematolojik hücre sayacı tarafından gerçekleştirilir ve CD34 yüzdesi akan hücre ölçer olarak belirlenir. Bu yöntemlerin en büyük dezavantajı, iki aletin kullanımıyla toplamsal

hatalı ölçümlerden kaynaklanan azalmış tekrarlanabilirliktir. Bu nedenle, single platformlu prosedürler, CD34 sayımı için tercih edilen yöntemlerdir. Single platformlu prosedürlerin çoğu, bilinen bir floresan boncuk konsantrasyonunun eklenmesine ve bir örnekte hem küreciklerin hem de CD34+ hücrelerin eş zamanlı sayımına dayanır. Boncuklar ek bir adımda tüm tüplere eklenir. Önceden hazırlanmış bilinen bir floresan boncuk konsantrasyonu içeren ticari tüplerin kullanımı (örn., Trucount tüpleri, Becton-Dickinson, San Jose, CA) hatalı ölçümü önemli ölçüde azaltsa da bu farklılık tamamen ortadan kalkmaz. Boncuk bazlı yöntemlerin kısıtlılıklarından biri de her tüpe boncuk eklemenin genel toplamsal hatalı ölçümüdür. Alternatif olarak, single platformlu prosedürler bilinen bir örnek hacmindeki CD34+ hücrelerin sayılmasıyla gerçekleştirilebilir, bu da boncuk ihtiyacını ortadan kaldırır (Mortazavi ve ark., 2012). Akan hücre ölçer analizinde, sayısı bilinen floresan sayım boncuklarının dahil edilmesiyle doğrudan mutlak CD34+ hücre sayısı elde edilebildiği için, tam kan sayım cihazından çekirdekli hücre sayımı ihtiyacı ortadan kalkar. Sayılan boncuk ve sayılan CD34+ hücre sayısı arasındaki oran değerlendirilerek mutlak CD34+ hücre sayısının doğrudan hesaplanması sağlanır (Sutherland ve Keeney, 2016).

Sonraki yöntem, gerçek volümetrik yöntem olarak adlandırılır. Gerçek volümetrik yöntemler daha ekonomik, daha az zaman ve daha az iş gücü gerektirir. Bazı çalışmalarda, lenfosit altkümelerinin sayımı için gerçek volümetrik yöntem diğer boncuğa dayalı single platformlu yöntemlerle karşılaştırılmış ve yöntemler arasında nispeten iyi bir korelasyon bulunmuştur (Mortazavi ve ark., 2012). Günlük kullanımı da daha kolay olan volümetrik yöntemde, birim hacimdeki CD34+ hücre sayısı ifade edilir (Gisselø ve ark., 2002)(Gisselø ve ark., 2002). Gerçek volümetrik yöntemin, özellikle daha düşük CD34+ hücreleri sayımıyla ISHAGE yönteminin yerini alabileceği düşünülmektedir. Sistemik hata olasılığı dışlanamadığından, böyle bir durumun dikkatlice yapılması gereklidir. Bu nedenle, CD34 sayımı için gerçek volümetrik yöntemi kullanmayı düşünen laboratuvarların sonuçlarını kendi ortamlarında ISHAGE yöntemiyle karşılaştırmaları ve olası sistemik hataları düzeltmeleri tavsiye edilmektedir. Ayrıca, daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip

daha fazla sayıda çalışmanın yapılması ve birkaç farklı sayım yönteminin karşılaştırılması önerilmektedir (Mortazavi ve ark., 2012).

Boncuk kullanımında:

$$CD34 + hücre/\mu L = \frac{\text{Sayılan } CD34 + \text{ hücre sayısı} \times \text{Boncuk Kons(mikrolitrede)}}{\text{Sayılan Boncuk Sayısı}} \times \text{Dil. Faktörü}$$

Volümetrik ölçümde:

$$CD34 + hücre/\mu L = \frac{CD34 + hücre/mL \times \text{Toplam Hacim}}{1000 \times \text{Örnek Hacmi}} \times \text{Dil. Faktörü}$$

Bulunan sonuçları  $\mu L$  deki  $CD34+$  hücre sayısına çevirmek için  $mL$ deki hücre sayısı 1000'e bölünmüştür.

## 1.9 ISHAGE Protokolü

Siena ve ark., periferik kan örneklerinde  $CD34+$  hücrelerinin yüzdesini ölçmek için bir akan hücre ölçer yöntemini tanımlayan ilk kişilerdir (Siena ve ark., 1991). Akan hücre ölçer 1 saatten daha kısa bir zamanda sonuç verebildiğinden, aferezin optimal zamanlamasını ve gerekli aferez prosedür sayısını belirlemek için periferik kan  $CD34+$  hücre içeriğinin seri değerlendirmesi kullanılabilir (Keeney ve ark., 2004).  $CD34+$  hücrelerinin akan hücre ölçer sayımı için birkaç protokol önerilmiş olup; mutlak  $CD34+$  hücre sayımı için piyasada çeşitli kitler mevcuttur (Gisselø ve ark., 2002). Single platformlu akan hücre ölçer ölçümlerinin ortaya çıkmasından bu yana, orijinal dual platform standardı, mutlak hücre sayımları üretmek için boncuklar veya volümetrik yöntemler kullanan tek platformlu metotları geliştirmek amacıyla yoğun işgücü gerektirmesi nedeniyle eleştirilmiştir. Keeney ve ark., ISHAGE dual platform kılavuzlarını başarıyla single platform kullanımına uyarlamıştır (Keeney ve

ark., 1998). Birkaç çalışma, single platformlu yaklaşımın laboratuvar içi ve laboratuvar arası farklılıkların azalması nedeniyle canlı CD34+ hücrelerini ölçmek için mümkün olan en yüksek güvenilirliği sağladığını göstermiştir. Bu nedenle, bu yaklaşım çeşitli ulusal ve uluslararası kılavuzlara ve bir dizi laboratuvar teknik kullanım kılavuzlarına dahil edilmiştir (Ngoma ve ark., 2011).

CD34+ hücrelerinin sayımında çeşitli yaklaşımlar uygulanmış olsada, çoklu kurumsal kalite kontrol programlarında görülen düşük performans, CD34 molekülünün bilimine ve onu ifade eden hücrelere dayalı bir fikir birliği yönteminin gerekliliğini ortaya koymuştur. Sutherland ve ark., ileri ve yan ışık saçılması ve CD34 ve CD45 boyanmasının yoğunluğunu içeren dört parametreyi kullanan hassas ve doğru çok parametrelili bir akış metodolojisi geliştirmiştir (Sutherland DR ve ark., 1994). Bu yönteme özgü olan şey, çeşitli hematopoietik kök hücre kaynakları üzerinde kullanım için uygun olan kümelenme analizi ile birlikte “Boolean” kapılama stratejisinin kullanılmasıdır. Bu yöntem, artık Uluslararası Hematoterapi Derneği ve Graft Mühendisliği (the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering, ISHAGE) protokolü, şimdilerde ise Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (the International Society for Cellular Therapy, ISCT) protokolü olarak bilinen CD34+ hücre sayımı klinik kılavuzunun temelini oluşturmuştur (Sutherland, D Robert ve ark., 1996). Farklı kapılama stratejilerinin etkilerinin bağımsız ve çok merkezli çalışmalarında, test edilenlerden yalnızca ISHAGE protokolünün hem PK hem de PKKH koleksiyonları için medyan CD34+ hücre değerinin  $\pm\%10$ 'u içindeki tüm merkezlerden tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Akan hücre ölçer analizinde bilinen sayıda floresan boncuklar çalışmaya dahil edilerek ve sayılan küreciklerle CD34 + hücreleri arasındaki oran değerlendirilerek, tek bir cihaz platformunun kullanımıyla mutlak bir CD34+ hücre sayımı yapılabilir. Bu, hematoloji analizörü tarafından gerçekleştirilen bir çekirdekli hücre sayımı ihtiyacını ortadan kaldırır (Keeney ve ark., 2004).

ISHAGE protokolü duyarlıdır, 100,000 CD45+ çekirdekli beyaz kan hücresi başına 10 ila 20 CD34+ hücresi tespit edebilmektedir. Yöntem, uygun pan-CD45, CD34 antikorları olduğunda ( CD45 için tüm izoformları ve glikoformları CD34 için

tüm CD34 glikoformları tespit eden) oldukça özgündür ve CD34 için uygun konjugatların (PE işaretli) seçilmesi kuraldır (Sutherland ve Keeney, 2016).

İlk olarak 1996'da tanımlanan ISHAGE protokolü, bir Boolean kapılama stratejisi ve spesifik olarak doğrulanmış anti-CD45 ve anti-CD34 konjugatları kullanarak CD34+ kök hücrelerinin doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde sayılmasını sağlamak için tasarlanmıştır. Daha sonra mutlak sayım ve canlılık değerlendirmesini içerecek şekilde geliştirilmiştir (Whitby ve ark., 2012). Canlı hücreler, yalnızca ışık saçma özelliklerine dayalı olarak ölü hücrelerden güvenilir bir şekilde ayırt edilemediğinden, CD34 hücrelerinin sayımında, özellikle de kordon kanı, kemik iliği veya manipüle edilmiş örnekler (örn., gece boyunca bekletilmiş, seçim sonrası veya erime sonrası) değerlendirildiğinde, canlılık boyalarının dahil edilmesine duyulan ihtiyaç açıktır (Keeney ve ark., 2004; Sutherland, D Robert ve ark., 1996). Canlılık boyası olan 7-AAD'nin tek platformlu ISHAGE yöntemine dahil edilmesi, nekrotik hücrelerin analizden dışlanmasına olanak tanımıştır. Amerikan Patologlar Koleji'nin (the College of American Pathologists, CAP) güncel önerilerine göre 4 saatten eski aferez örneklerinin, CD34 + hücre canlılığı açısından test edilmesi gerekmektedir (Keeney ve ark., 2004).

CD34 hücre sayım yöntemlerinin temelleri genel olarak bir fikir birliği mevcuttur, ve CD34 ve CD45, single platformlu metodoloji ve uygun olduğunda canlılık boyası kullanımı olarak özetlenebilir (Keeney ve ark., 2004). CD34 ve CD45 boyanma ve öne ve yan açılı ışık saçılımından oluşan dört parametrenin mevcut maksimum bilgisini kullanan hassas ve doğru bir çoklu parametre akış metodolojisi tasarlanmıştır. Bu dört parametre, çeşitli hematopoitik kök hücre kaynaklarında kullanılabilir olan bir “sıralı” veya “Boolean” kapılama stratejisinde birleştirilmiştir. Sıralı kapılamanın amacı, ilgili popülasyonu seçmek ve eşzamanlı olarak, antikörlerin spesifik olmayan bir şekilde bağlanabildiği kalıntılar ve olgun hücrelerden gelen etkileşimi en aza indirmektedir. SSC özelliklerine karşı CD45 boyanmasına dayanan bir kapılama stratejisi, WBC'yi kırmızı hücrelerden, trombositlerden ve diğer kalıntılardan ayırmadaki faydası nedeniyle birincil kapılama olarak önerilmektedir. Çekirdekli kırmızı hücreler ve tamamen olgun plazma

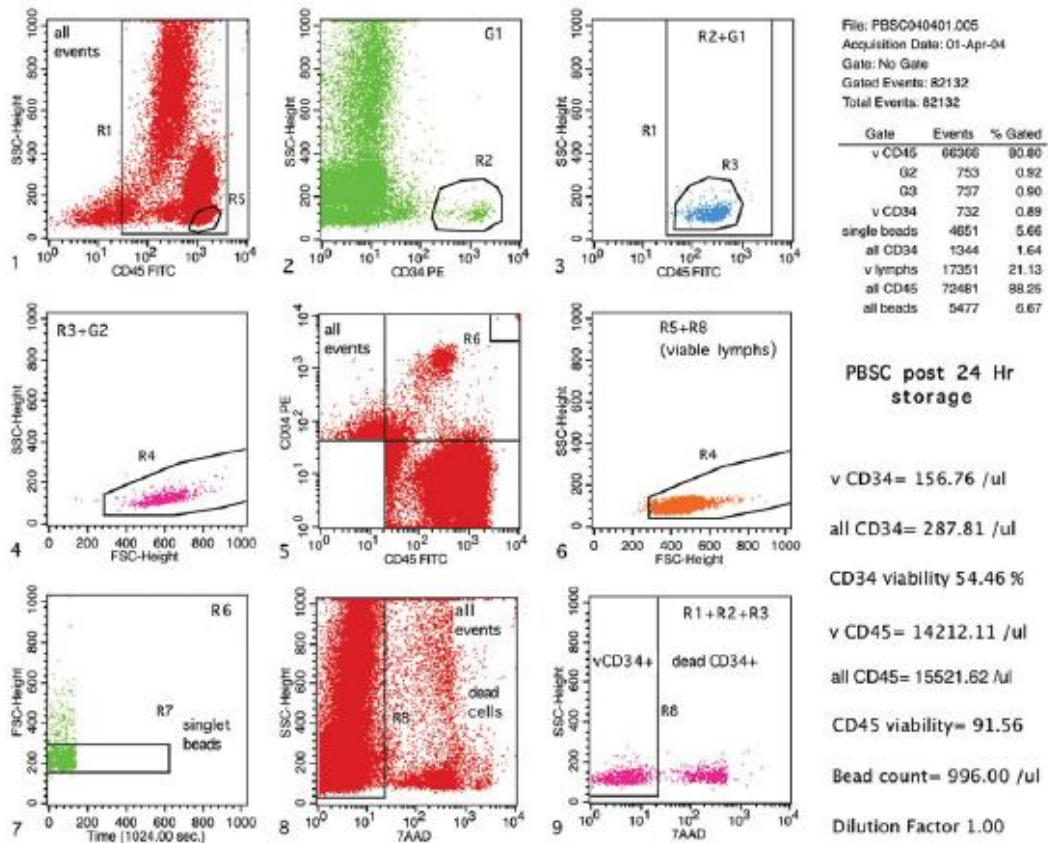
hücreleri CD45-FITC ile saptanabilir bir şekilde boyanmamasına rağmen, bu hücreler genellikle PKKH preparatlarında önemli sayıda bulunmaz ve bu nedenle, mutlak CD34+ hücre değerinin hesaplanmasında kararlı bir payda oluşturmak için CD45+ tüm hücrelerin kullanımını etkilemez. Bu ilk kapıdan CD34+ hücreleri, CD34 ifade edenler, karakteristik düşük ila orta CD45 antijen ifade edenler ve karakteristik ışık saçma özelliklerine sahip olanlar şeklinde ardışık bir seçim yöntemi ile tanımlanır (Sutherland, D Robert ve ark., 1996).

ISHAGE protokolü ayrıca "lyse no wash" yöntemine dayanmaktadır. Örnek hazırlıkları sırasında hücre popülasyonlarının seçici olarak kaybına neden olabilecek bir santrifüjleme aşaması yoktur. Geliştirildiği zaman "dual" platforma dayandığından toplam lökosit sayısı için CD34+ hücre yüzdesi, akan hücre ölçer ile tayin edilirken lökosit sayıları hematoloji analizöründen elde edilmekteydi. Son sayıma ise iki değer çarpımı ile ulaşılmaktaydı. Sayım boncuklarının eklenmesiyle tam kan sayım cihazına ihtiyaç olmayan tek basamaklı "single" platform bir test haline geldi (Naithani ve ark., 2017).

ISHAGE protokolüne göre analiz yapılırken;

- İlk kapı (R1), SSC'ye karşı CD45 boyanması grafiği ile oluşturulur. Bu yaklaşım, liste modu veri dosyasının analizi sırasında hematopoyetik örneklerde, özellikle de "lyse-no-wash" yöntemleriyle hazırlananlarda sıklıkla bulunan kırmızı hücrelerin, trombositlerin ve diğer kalıntıların dışlanmasına olanak tanırken sadece lökositlerde ifade edildiği bilinen CD45i ifade eden hücrelerin seçimini sağlar.
- Bölge 1'de (R1, histogram 1) yeterli sayıda veri elde edilerek blast bölgesi R4'te (histogram 4) en az 100 CD34+ hücresi gösterilmesi hedeflenir. Bu hedefe ulaşmak için gerekirse sayılan hücre sayısı artırılmalıdır.
- Elde edilen hücreler daha sonra sırayla SSC'ye (histogram 2) karşı CD34 boyanması grafiği üzerine gösterilir ve R2, düşük ila orta şiddette SSC ile birlikte zayıf ve parlak CD34+ verilerini içerecek şekilde ayarlanır.

- Hem R1 hem de R2 tarafından kapılanan veriler daha sonra bir SSC'ye (histogram 3) karşı CD45 floresan grafiği üzerinde gösterilir ve gerçek CD34+ hücreleri, düşük CD45 boyanması (lenfositlere ilişkin) ve düşük ila orta SSC karakterize bir küme oluşturur. Kapı R3'ün boyutunu ve konumunu belirleyen bu kümedir. Bu kapılanmış kümeden (R3) dışlananlar trombosit agregatları, spesifik olarak boyanmayan lenfositler, monomyeloid hücreler ve kalıntılardır.
- 1., 2. ve 3. bölgelerde kapılanan hücreler daha sonra seçilen verilerin genelleyici bir lenf blast bölgesine (R4) düştüğünü doğrulamak için bir FSC grafik üzerinde gösterilir. R4 kapısının optimum pozisyonu, grafik 1'deki R5'ten kapılanan lenfositleri gösteren bir kopya grafik 6 (çift bağlantılı bir R4 kapısı içeren) kullanılarak ayarlanır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Single platformlu ISHAGE protokolü ile canlı CD34+ hücrelerinin sayımı (Sutherland ve Keeney, 2016).

Bu alışmada SPY için standart kabul edilen floresan boncuk yöntemine dayalı hücre sayısı belirleme basamağı ile daha yeni bir yöntem olan volümetrik hücre sayımının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın amacı CD34+ sayımında standart olarak kabul edilen ISHAGE protokolü, single platform CD34+ hücre mutlak değeri tespiti ile boncuk kullanmadan yapılan volümetrik ölçüme dayalı CD34+ hücre sayım değerlerini karşılaştırmaktır. Böylece yanlış boncuk pipetleme, uzun sayımlarda boncukların tüpün st fazında toplanması, boncukların seri numaralarındaki farklılıklar, sayımı yapan kullanıcının deneyimi gibi hata kaynakları saf dışı bırakılarak güvenilir bir CD34+ hücre sayımının mümkün olup olmayacağı değerlendirilmiştir. Volümetrik yöntemle CD34+ hücre sayımı, bunu yapabilecek cihazlar mevcut olsa da bu amaç için henüz yaygın olarak kullanılmaması sebebiyle kısıtlı olarak yapılabilmektedir. Ülkemizde bu yöntemi uygulayan bir merkez bulunmamaktadır. Boncuklarla CD34+ hücre sayımında analitik hataları raporlayan çok sayıda yayın mevcuttur. Bu çalışmada volümetrik yöntemin boncuk ile yapılan ölçümlerle karşılaştırılıp güvenilirliğinin ortaya konması ve rutin çalışmalarda kullanıma uygunluğunun test edilmesi hedeflenmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1 Çalışma Yeri ve Hasta Seçimi

Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı Akan Hücre Ölçer Laboratuvarı'nda, Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (29.04.2019/08-618-19 sayılı karar) ile Helsinki bildirgesine uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışma protokolünü kabul eden tüm katılımcılara aydınlatılmış onam formu imzalatıldı.

Çalışmaya Mayıs-Ağustos 2019 arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda tedavi gören 18 yaş üstü otolog veya allojenik nakil planlanan tüm hastalar altta yatan hastalığa bakılmadan dâhil edildi. Tüm hasta ve vericilerde rutin mobilizasyon protokolüne uygun bir mobilizasyon rejimi uygulanarak HKH'lerin periferik kana mobilizasyonu uyarıldı.

### 2.2 Örneklerin Toplanması

Çalışma kapsamındaki tüm hastalar ve HKH vericilerinden CD34+ hücre sayısının belirlenmesi için lökoferez öncesi periferik kan (PK) örneği alındı. Ayrıca, rutin aferez protokolüne göre hazırlanan lökoferez (LF) ürününden CD34+ hücre sayımı için ayrı bir tüpe örnekleme yapıldı. Aferez işlemi Spectra Optia Apheresis System cihazı kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde uygulandı.

Tüm örnekler K<sub>3</sub>EDTA içeren tüplere alındı. Örnekler, CD34+ sayımı gerçekleşene kadar (en geç 30 dakika içinde çalışıldı) oda sıcaklığında (25 °C) tüpler kendi eksenleri etrafında yavaşça döndürülerek saklandı. Veri toplama ve analizler örnekler alındıktan sonraki 1 saat içinde tamamlandı.

## 2.3 Verilerin Toplanması ve Analizi

### 2.3.1. Tam Kan Sayımı

PK ve LF örneklerinde, CD34+ hücre sayımı öncesi örneklerin seyreltilmesi gerekliliğinin ve gerekliyse seyreltme oranının belirlenmesi için Sysmex XN-1000 (Kobe, Japan) tam kan sayım cihazı ile lökosit sayımı gerçekleştirildi. CD34+ hücre sayımından önce kullanılacak örnekte lökosit sayılarının 25000 hücre/ $\mu$ L den yüksek olmaması hedeflendi.

### 2.3.2. CD34+ Hücre Sayımı

#### Ölçüm için Kullanılan Reaktifler

Ölçüm için BC Stem Kit (Cat. IM3630) kullanıldı. Bu kit içerisinde aşağıdaki malzemeler bulunmaktadır:

- CD45-FITC (Klon J33) /CD34-PE (Klon 581) reaktifi
- CD45-FITC (Klon J33) / İzoklonik Kontrol-PE
- 7-AAD canlılık boyası
- Floresan boncuk (Stem-Count Fluorospheres)
- 10x NH<sub>4</sub>Cl Lizis solüsyonu

#### Reaktiflerin Hazırlanması

- Çalışma gününde Stok “NH<sub>4</sub>Cl lysing” solüsyonu steril distile su ile 1:10 seyreltilerek taze çalışma lizis çözeltisi hazırlandı.
- Floresan Boncuklar, kullanılmadan 1 saat önce buzdolabından çıkarılıp viyalin kendi etrafında dönmesi sağlanarak oda ısısına gelmeleri ve homojenize olmaları sağlandı
- Diğer reaktifler kullanıma hazır olup bir ön hazırlık işlemi bulunmamaktadır.

## Örneklerin Hazırlanması

- Yapılan kan sayımı sonucu elde edilen lökosit sayısına göre örneğin dilüsyon gerekliliği belirlendi.
- Lökosit değeri 1000-40 000 hücre/ $\mu$ L arasında olan örnekler doğrudan çalışmaya alınırken, lökosit sayısı 40000 hücre/ $\mu$ L üzerinde olan örnekler, lökosit sayısı 25 000-30 000 hücre/ $\mu$ L olacak şekilde %10 oranında FSC içeren RPMI ile seyreltildi. Seyreltilen örnekler bir rotator da döndürülerek örneklerin tamamen karışması sağlandı.
- Her bir örnek için iki tüp hazırlanarak birinci tüpe 20  $\mu$ L CD45-FITC/Izoklonik Control-PE, ikinci tüpe 20  $\mu$ L CD45-FITC/CD34-PE reaktifi eklendi.
- Tüplere 100er  $\mu$ L lökosit değeri ayarlanmış örnek dağıtıldı.
- Her iki tüpe 20  $\mu$ L 7-AAD canlılık belirleme boyası eklendikten sonra tüpler vortekslendi ve karanlıkta oda ısısında 20 dakika bekletildi.
- İnkübasyonu tamamlanan tüplere hazırlanan eritrosit lizis solüsyonundan 2 mL eklenerek tüpler vortekslendi ve karanlıkta oda ısısında 10 dakika bekletildi.
- Oda ısına getirilmiş olan ve homojenize olmaları için dikkatle karıştırılan Floresan Boncuk reaktifi her iki tüp için 100  $\mu$ L olacak şekilde eklenerek tüpler vortekslendi.

## Akan Hücre Ölçer ile Hücre Sayımı

Örneklerdeki CD34+ hücre sayılarının belirlenmesinde boncuk kullanılarak yapılan ölçümler için Beckman Coulter Navios (Miami,USA), volümetrik ölçümler için Beckman Coulter Cytoflex (Miami,USA) cihazları kullanıldı.

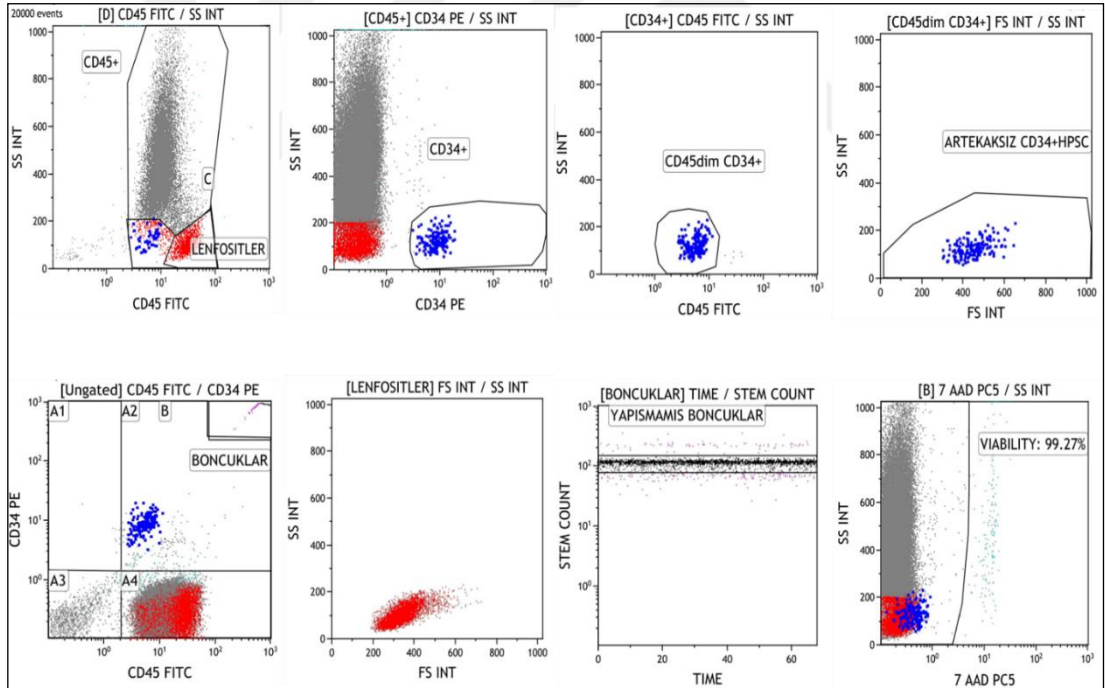
Örnekler için verilerin toplanmasından önce her iki cihazın üretici önerilerine göre günlük bakım işlemleri gerçekleştirilerek kalite kontrol çalışmaları tamamlandı.

Her iki cihaz için kontrol boncukları ile tüm parametreler için elde edilen değerler üreticinin belirttiği CV değerlerinin altındaydı (Sırasıyla BC Navios için <math><2\%</math>'nin, BC Cytoflex için ise <math><5\%</math>). CD34+ hücre sayımı yapılırken tüm örnekler için en az 75000 CD45+hücrenin verilerinin toplanması sağlandı.

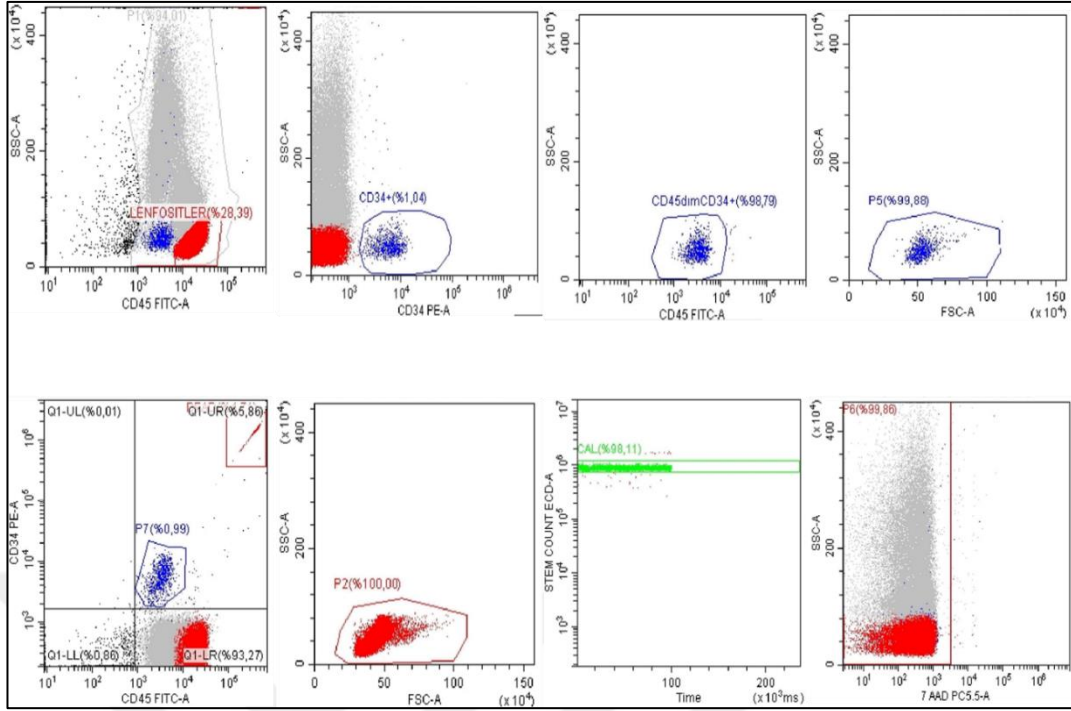
## CD34+ Hücre Sayımının Analizi

### “Single” Platform ile CD34+ Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücre sayımı ve analiz ISHAGE protokolüne göre otomatik kapılama stratejisi kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2)



**Şekil 2.1.** NAVIOS Cihazı ile yapılan sayımlarda CD34+ hücre sayımı için uygulanan ardışık kapılama stratejisi: Sırasıyla 7AAD negatif olan canlı hücreler seçilir; bunların arasında CD45+ olan lökositler belirlenir, CD45+ hücreler arasında CD34+ olanlar seçilir, CD34+ olanların arasında CD45 ifadesi lenfositlerden daha az olanlar işaretlenir ve yapılan son seçim ile bu hücrelerin Lenfositten küçük olan partiküllerden arındırılması sağlanır.



**Şekil 2.2.** CYTOFLEX Cihazı ile yapılan sayımlarda CD34+ hücre sayımı için uygulanan ardışık kapılama stratejisi.

Hesaplamalar, Navios cihazı için cihaz üzerindeki programla, Cytoflex cihazı için ise CytExpert yazılımları kullanılarak yapılmıştır.

CD34+ hücre mutlak sayım değerleri boncuk veya belirlenen hacimdeki hücre verilerinin sayısı kullanılarak hücre/ $\mu$ L olarak aşağıdaki formüllere göre hesaplandı.

Boncuk kullanımında:

$$CD34 + hücre/\mu L = \frac{\text{Sayılan } CD34 + \text{ hücre sayısı} \times \text{Boncuk Kons (mikrolitrede)}}{\text{Sayılan Boncuk Sayısı}} \times \text{Dil. Faktörü}$$

Volümetrik ölçümde:

$$CD34 + hücre/\mu L = \frac{CD34 + hücre/mL \times Toplam Hacim}{1000 \times Örnek Hacmi} \times Dil. Faktörü$$

“Dual Platform” ile CD34+ Hücre Sayısının Belirlenmesi

Bu uygulamada boncuk sayım değerleri dikkate alınmadan; “Single” platform analizlerde elde edilen CD34+ hücre yüzdesi Sysmex XN-1000 cihazı ile elde edilen lökosit sayısı ile çarpılarak CD34+ hücre sayısı belirlenmiştir.

“Dual Platform” ile CD34+ Hücre Sayısının Belirlenmesi

$$CD34 + hücre oranı = \frac{CD34 + hücre sayısı}{CD45 + Lökosit sayısı}$$

$$CD34 + hücre/\mu L = CD34 + hücre oranı \times Lökosit Sayısı$$

### 2.3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamındaki tüm istatistiksel analizler R 3.5.2 (R Working Group, Viyana, Avusturya) kullanılarak gerçekleştirildi (R Core Team, 2016). Tüm değişkenler için tanımlayıcı istatistikler hesaplandı. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  olması anlamlı kabul edildi. Yöntemler arası sonuçların karşılaştırılması için Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak Passing-Bablok regresyon analizi gerçekleştirildi. Her iki yöntem arasındaki uyumun değerlendirilmesi için mutlak CD34+ hücre sayıları için Bland-Altman grafiği oluşturuldu. (Bland ve Altman, 1986; Passing ve Bablok, 1983; Stöckl ve ark., 2004).

### 3. BULGULAR

Çalışmaya katılan 17 HKH vericisinden, aferez öncesi alınan 31 periferik kan (PK) ve 23 lökoferez (LF) örneğinde (toplam 54 örnek) CD34+ hücre sayısı “single” ve “dual” platform ISHAGE protokolüne göre ve volümetrik yöntemle belirlendi.

Çalışmada yer alan tüm hasta ve vericilere mobilizasyon işlemi için cilt altı G-CSF uygulaması yapıldığı ve olguların üçü hariç lökoferez işleminin mobilizasyonu takiben 4. ve 5. günlerde gerçekleştiği görülmüştür. Geri kalan üç kişinin LF işlemi 7, 12 ve 14. günlerde yapılmıştır. Çalışmaya katılan hasta ve vericilere ait temel özellikler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastalara ait temel özellikler

Demografik Bilgiler	
Cinsiyet – n	10 Erkek / 7 Kadın
Yaş – median	48
Teşhis – n (%)	
Multiple myelom	6 (%35)
Hodgkin lenfoma	4 (%24)
AML	2 (%12)
Non-Hodgkin lenfoma	1 (%6)
Diğer	4 (%24)
Nakil Tipi – n (%)	
Otolog	13 (%76)
Allojenik	4 (%24)

Hem PK hem de eş zamanlı LF örneği olan toplam olgu sayısı 11’dir. Bu hastalara ait 46 örnek toplanmıştır.

Tüm PK ve LF örnekleri için Sysmex XN-1000, BC Navios ve BC Cytoflex cihazları kullanılarak her üç cihazda elde edilen lökosit sayıları, dual platform olarak elde edilen mutlak CD34+ hücre sayıları ve single platform olarak elde edilen mutlak CD34+ hücre sayıları ile CD34+ hücre yüzdelere ait tanımlayıcı istatistik bilgileri

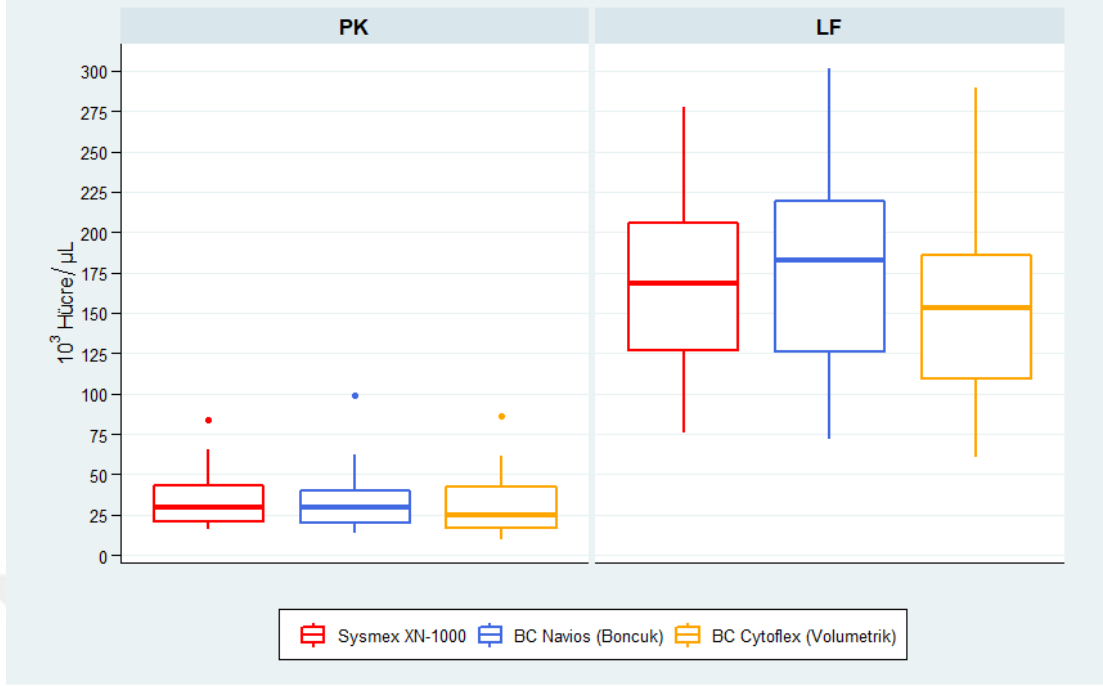
Çizelge 3.2’de verilmiştir. PK ve LF örneklerinde lökosit ve mutlak CD34+ hücre sayıları arasında yapılan Wilcoxon Testi sonucunda her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.01$ ).



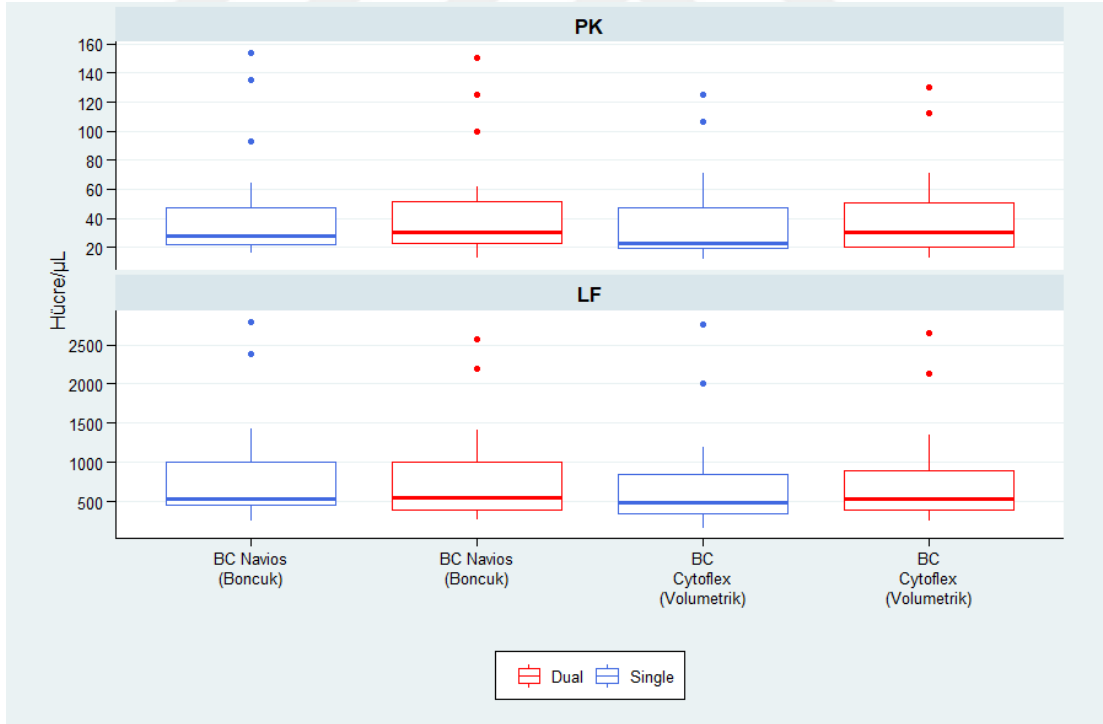
**Çizelge 3.2** Lökosit ve CD34+ Hücre Sayılarına ait Tanımlayıcı İstatistikler

PL*	Test	Cihaz	Örnek	n	Ort.	Med.	SD	IQR	Q1	Q3	Aralık	
Single	WBC	Sysmex XN-1000	PK	23	34 600	29200	18300	24500	19400	43900	15700 - 83800	
			LF	23	169000	169000	55900	84000	124000	208000	76100 - 277000	
		BC Navios (Boncuk)	PK	23	34300	29200	20600	21300	19800	41100	13700 - 98700	
			LF	23	176000	182000	63200	99300	121000	220000	71700 - 302000	
		BC Cytoflex (Volümetrik)	PK	23	31500	24800	19000	26400	17100	43500	9530 - 86500	
			LF	23	149000	153000	57100	83000	105000	188000	60400 - 290000	
	CD34	BC Navios (Boncuk)	PK	23	43,7	28	36,8	27	21	48	16 - 154	
			LF	23	810	535	646	601	406	1010	251 - 2800	
		BC Cytoflex (Volümetrik)	PK	23	36,7	22,8	30	32,3	18,8	51,1	11,6 - 125	
			LF	23	689	482	615	612	333	945	159 - 2760	
		CD34 %	BC Navios (Boncuk)	PK	23	0,14	0,11	0,07	0,12	0,08	0,19	0,04 - 0,26
				LF	23	0,46	0,37	0,27	0,33	0,25	0,57	0,18 - 1,09
BC Cytoflex (Volümetrik)	PK		23	0,12	0,11	0,07	0,11	0,07	0,18	0,04 - 0,24		
	LF		23	0,45	0,32	0,28	0,31	0,29	0,6	0,15 - 1,04		
Dual	CD34	BC Navios (Boncuk)	PK	23	44,5	30,4	35,5	33,1	23	56,1	12,4 - 151	
			LF	23	782	542	600	654	374	1030	267 - 2580	
		BC Cytoflex (Volümetrik)	PK	23	40,6	30,4	30,7	35,4	19,8	55,2	12,4 - 130	
			LF	23	754	537	597	545	385	930	250 - 2640	

\*PL: Platform, PK: Periferik Kan, LF: Lököferez örneği

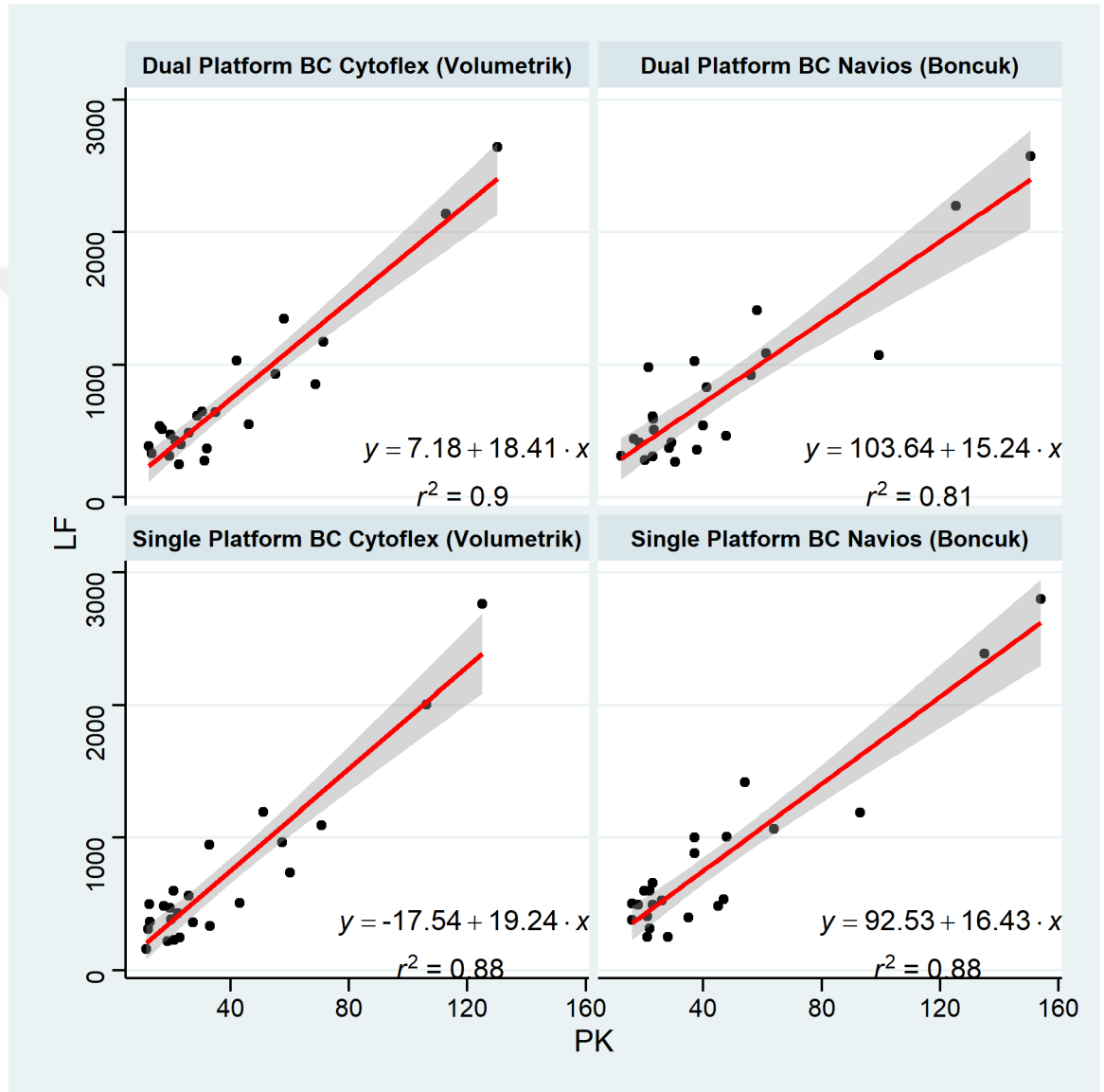


Şekil 3.1. Cihazlara göre WBC sayılarının dağılımını gösteren box plot grafikleri



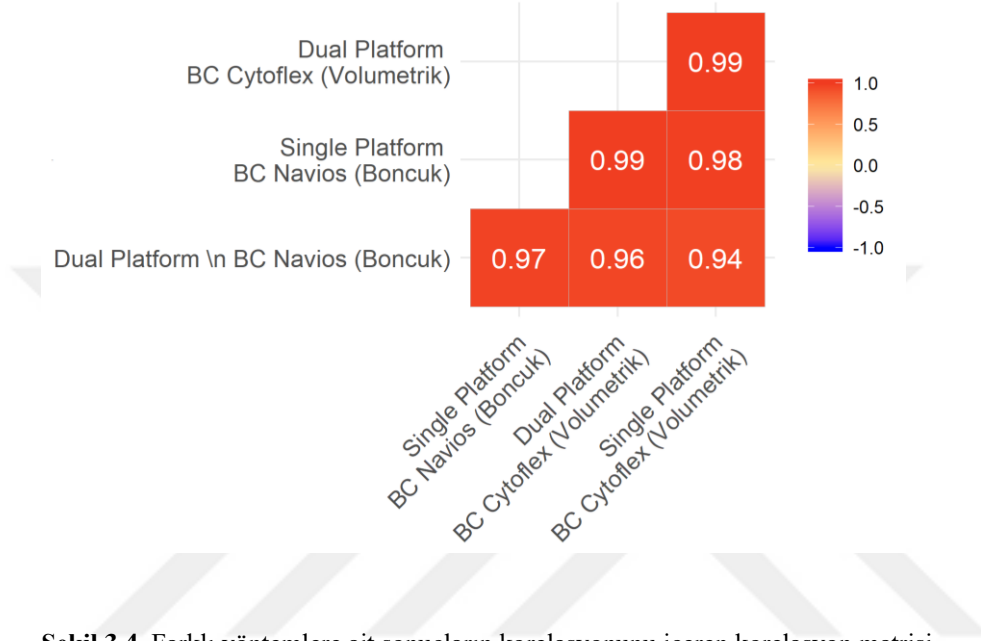
Şekil 3.2. Dual ve Single platform olarak her iki yöntem ile elde edilen mutlak CD34+ hücre sayılarını gösteren box-plot grafikleri

PK örneklerinde elde edilen mutlak CD34+ hücre sayıları ile LF örneklerinde elde edilen mutlak CD34+ hücre sayıları arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere yapılan Pearson korelasyon analizi sonucunda tüm platform ve yöntemler için istatistiksel açıdan  $p < 0,01$  düzeyinde pozitif korelasyon saptanmıştır.



**Şekil 3.3.** PK ve LF örneklerinde farklı platform ve yöntemlerle elde edilen mutlak CD34+ hücre sayılarına ait dağılım grafiği ve lineer regresyon analizleri.

Mutlak CD34+ hücre sayımı için farklı platform ve yöntemlerin karşılaştırması için yapılan korelasyon analizine ait sonuçlar korelasyon matrisi Şekil 3.4'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre yöntemler arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptanmıştır (Tüm karşılaştırmalar için  $p < 0.01$ ).

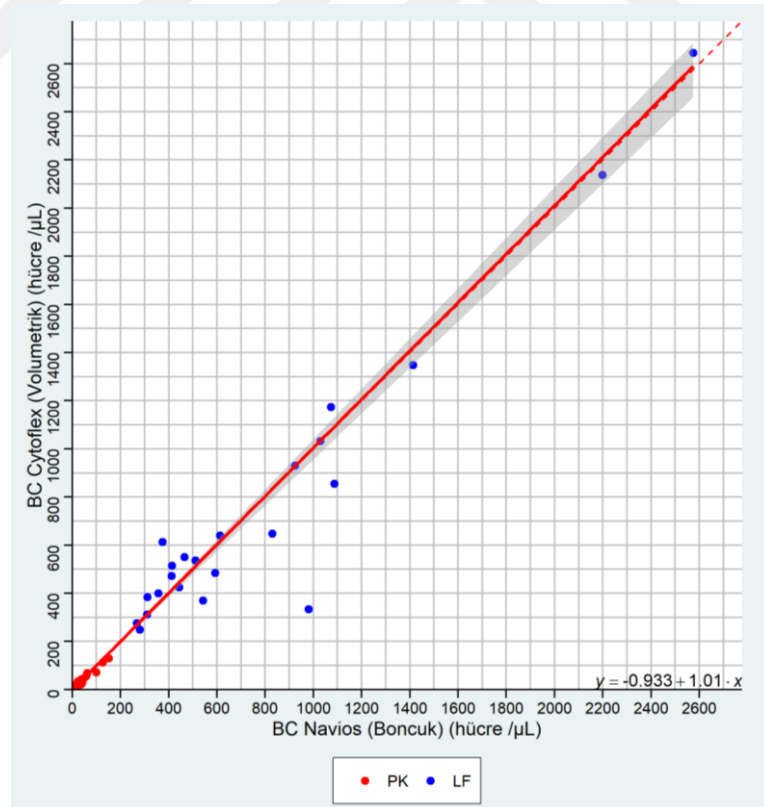
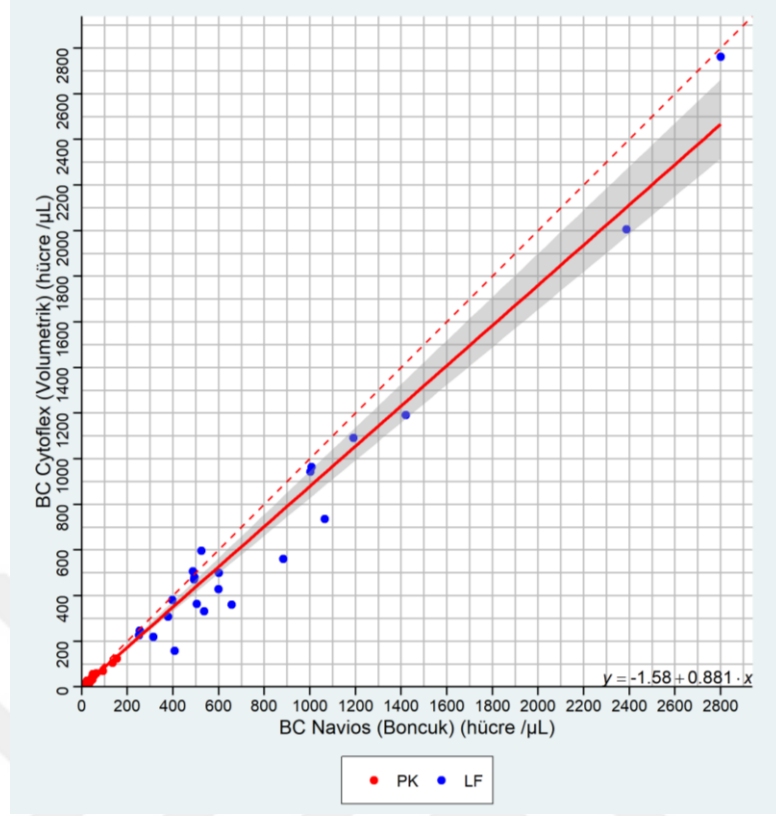


Şekil 3.4. Farklı yöntemlere ait sonuçların korelasyonunu içeren korelasyon matrisi

Her iki platform için BC Navios ve BC Cytoflex ile elde edilen mutlak CD34+ hücre sayısı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan Passing-Bablok regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılar Çizelge 3.3'te verilmiştir. Her iki yönteme ait dağılım grafiği verilmiştir.

Çizelge 3.3. Her iki cihaz için Passing-Bablok sonucu elde edilen eğim ve kesim değerleri

Platform	Değer	Güven Aralığı
Dual		
	Kesim	-0.933 -6.73-2.17
	Eğim	1.01 0.953-1.05
Single		
	Kesim	-1.58 -6.11-1.66
	Eğim	0.881 0.81-0.958

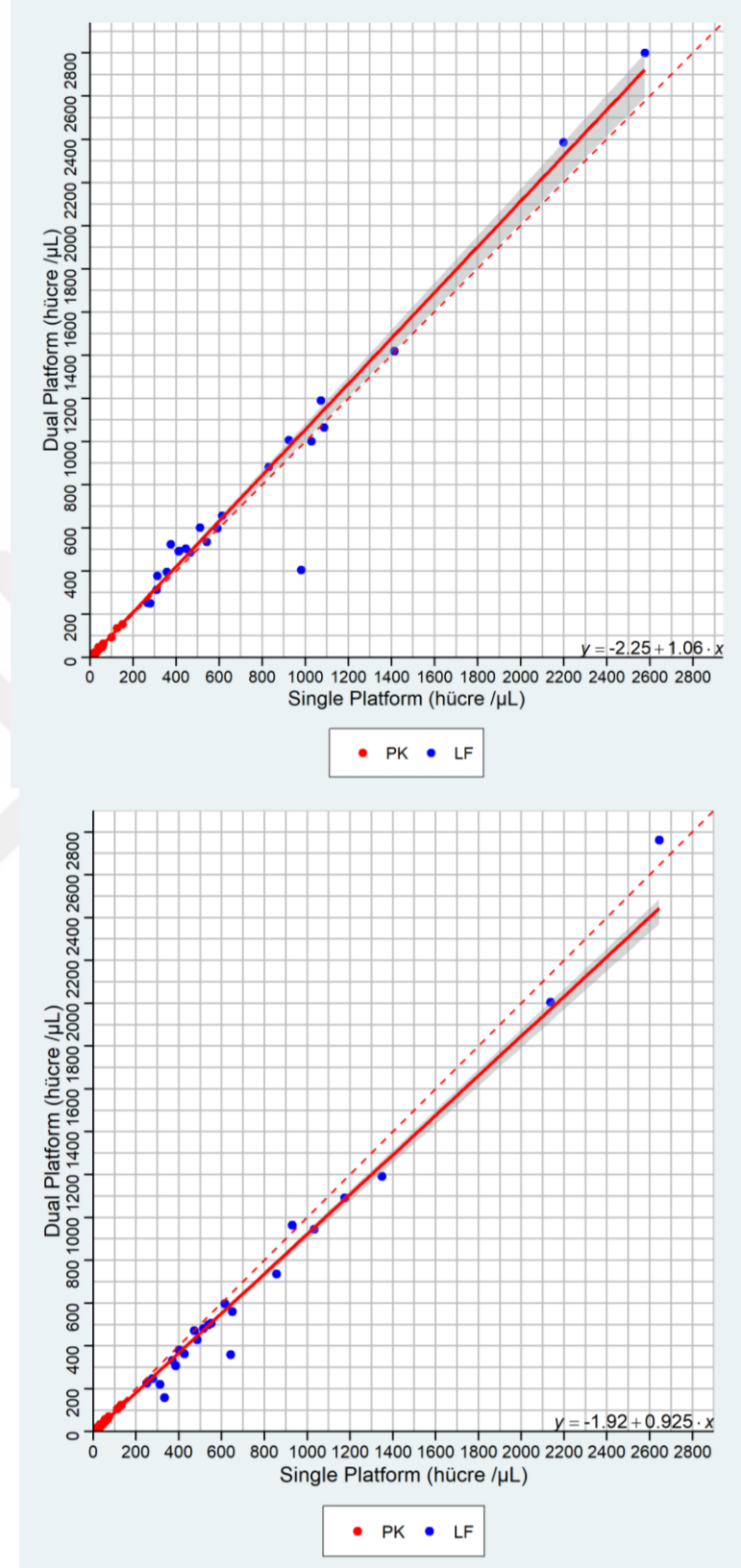


Şekil 3.5. Dağılım grafiği a. Single Platform BC Navios-BC Cytotflex karşılaştırması b. Dual Platform BC Navios-BC Cytotflex karşılaştırması

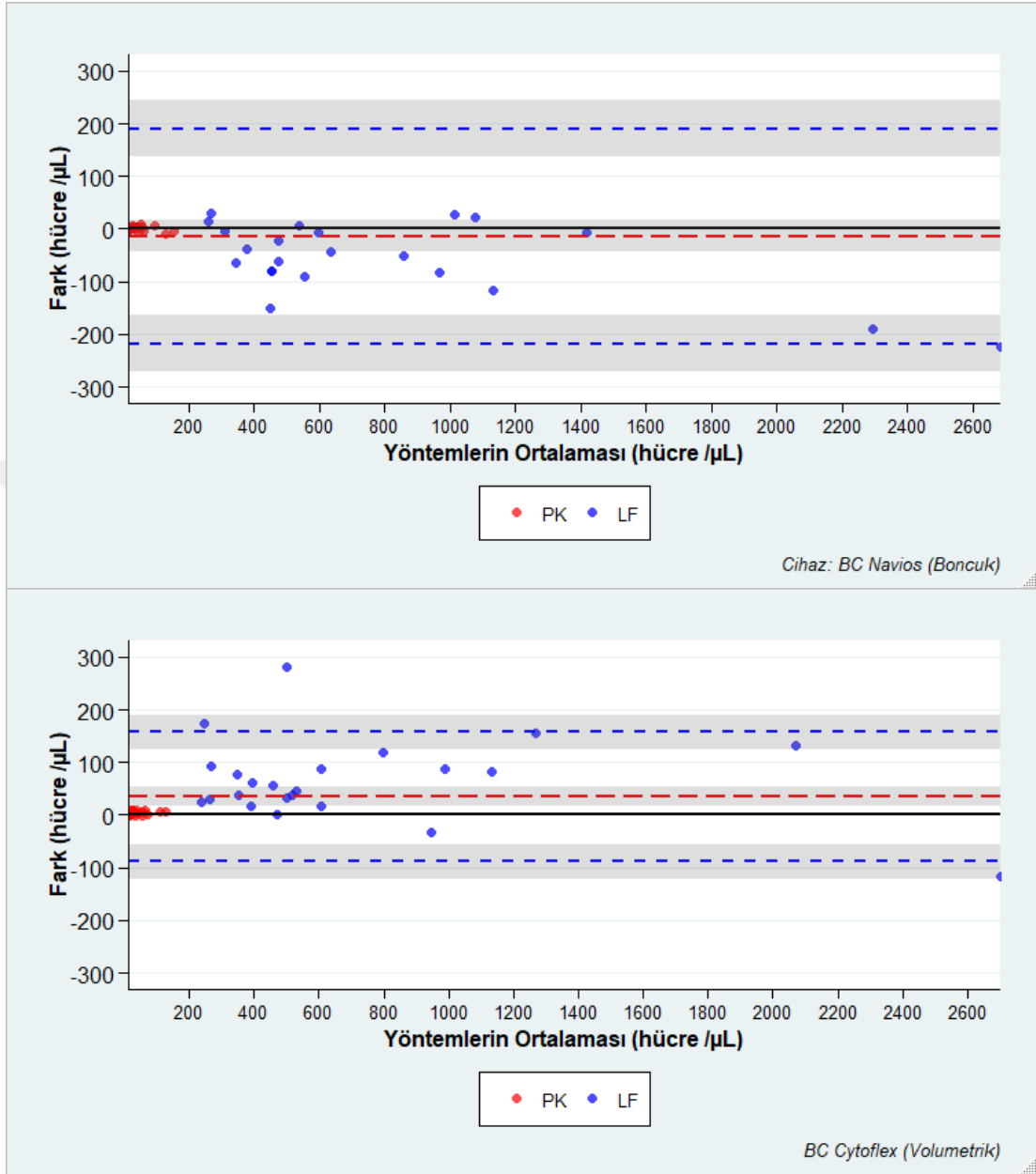
Her iki cihaz için dual ve single platform analizi ile elde edilen mutlak CD34+ hücre sayısı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan Passing-Bablok regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılar Çizelge 3.4'te verilmiştir. Her iki platforma ait dağılım grafiği Şekil 3.6'da verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Her iki cihaz için Passing-Bablok sonucu elde edilen eğim ve kesim değerleri

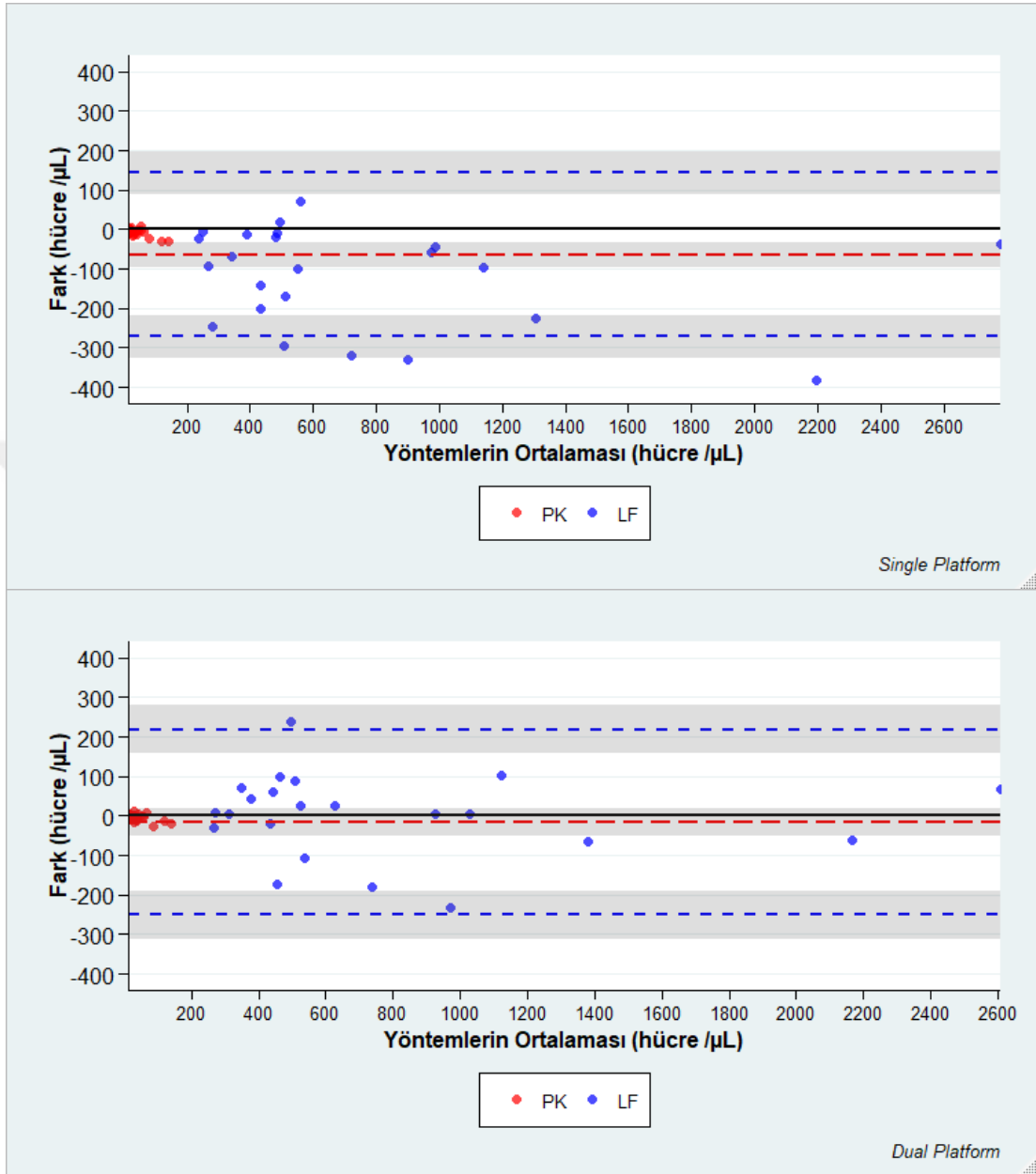
Cihaz	Değer	Güven Aralığı
BC Cytoflex (Volumetrik)		
Kesim	-1.92	-4.52-0.642
Eğim	0.925	0.887-0.946



Şekil 3.6. Dağılım grafiği a. Single Platform BC Navios-BC Cytoflex karşılaştırması b. Dual Platform BC Navios-BC Cytoflex karşılaştırması



Şekil 3.7. İki platformun karşılaştırılmasına ait Bland-Altman grafikleri



Şekil 3.8. İki cihazın karşılaştırılmasına ait Bland-Altman grafikleri

## 4. TARTIŞMA

HKH sayısının belirlenmesi için akan hücre ölçer kullanarak yapılan immüfenotipleme ile hücrelerin yüzey antijenlerinin ortaya konması en sık kullanılan yöntemdir. Yapılan birçok çalışma sonucu klinik uygulamalarda yamanmayla ilişkisi gösterilmiş olan CD34 hücre yüzey antijenini taşıyan hücre sayılarının belirlenmesi yeterli kabul edilmektedir. Akan hücre ölçer ile CD34+ hücreler, floresan boncuk kullanarak (single platform) ya da kullanmadan tam kan sayımı (TKS) sonuçları üzerinden (dual platform) sayılabilmektedir. Boncuk kullanımı veya TKS gerektirmeyen “volümetrik” sayım, standart boncuk kullanımına alternatif bir yöntem olarak son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada düşük ve yüksek lökosit sayılarındaki örneklerin dahil edilebilmesi amacıyla PK ve LF örneklerinde hem dual hem de single platform kullanarak ve volümetrik yöntem ile elde edilen CD34+ hücre sayıları arasındaki ilişki ortaya konmuştur.

PK örneklerinde CD34+ hücre sayımı yapılması, lökoferez başarısı hakkında bilgi vermektedir Lökoferez işlemi için genelde periferik kandaki CD34 + hücre mutlak sayım değerinin 10 hücre/ $\mu$ L'den yüksek olması istenir (Chapple ve ark., 2000). Bu konuda 2018 yılında Lemos ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada elde edilen  $R = 0.596$  değerine daha yüksek bir korelasyon saptanmıştır ( $R = 0.9$ ). Çalışmamızda PK ve LF örnekleri için hesaplanan korelasyon katsayıları single ve dual platform, boncuk ve volümetrik yöntemler için birbirine yakındır (Şekil 3.3).

CD34+ hücre sayımının standartlaştırılması ve basitleştirilmesi için harcanan çabalara rağmen, farklı yöntemler arasındaki tekrarlanabilirlik düşüktür. Yapılan çalışmalar, boncuk bazlı single platform protokolünün, dual platform ISHAGE yöntemine göre daha tekrarlanabilir ve daha az zaman alıcı olduğunu göstermiştir. Volümetrik yöntem daha ekonomik, daha kolay uygulanabilir ve daha az zaman alıcı olduğu için, CD34+ hücre sayımında tercih edilen alternatif bir yaklaşımdır (Mortazavi ve ark., 2012).

Naithani ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınlanan çalışmasına ve daha önceki yayınlanmış verilere benzer olarak, çalışmamızda single ve dual platformda elde edilen CD34+ hücre sayıları birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Passing-Bablok regresyon analizine göre sonuçlar arası uyum hem boncuk ile ölçüm hem de volümetrik ölçüm için yüksek  $R^2$  değerine sahiptir. Bununla birlikte single platform ölçümler, sadece akan hücre ölçer cihazının kullanılması ve tam kan sayımı gerektirmemesi nedeniyle daha az belirsizlik içermekte ve kullanıcı açısından daha kolay çalışma imkânı sağlamaktadır. Ancak dual platform ölçümlerinin maliyetinin daha düşük olduğu bilinmektedir. Her ne kadar dual platform ölçüm için tam kan sayım cihazı gerekliliği olsa da HKH nakli olan merkezlerde bu durum bir kısıt oluşturmamaktadır.

Boncuklar ile yapılan “single platform” sayımlarda pre-analitik hata riskleri bulunması nedeniyle volümetrik yöntemler öne çıkmakla birlikte bu yöntemlere ait performans bilgileri sınırlıdır. Mortazavi ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada boncuk kullanımı ve volümetrik yöntem karşılaştırılmış ve çalışmada gözlemlenen biaslar incelendiğinde; volümetrik ölçümlerde klinik karar verme süreci üzerinde ihmal edilebilir bir etkiye sahip olan tüplerin iç çapları ve elektriksel sensörleri içeren volümetrik ekipmanlarının ayarlanmasındaki ufak farklılıkları içeren sistematik hataların yüksek CD34+ hücre sayısından dolayı önem taşıdığı görülmüştür. Boncuk bazlı protokoller ise ilave pipetleme adımları içerdiğinden rastgele hatalara yatkındırlar (Mortazavi ve ark., 2012). Saravia ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınlanan çalışmasında her iki yöntem karşılaştırılması metrolojik yönden gerçekleştirilmiş ve iki yönteme ait belirsizlik hesaplanarak yöntemler arasındaki uyum değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 7 ülkeden 30 katılımcıya akan hücre ölçer ile belirlenmek üzere 6 vial CD34 referans materyali (CD34+ Cell Enumeration System Suitability RS, Catalog # 1084292, United States Pharmacopeia, MD) gönderilmiştir. Tüm katılımcılar bu referans materyalleri 0.5 mL ve 1.5 mL distile su ile çözüp hazırlayarak düşük ve yüksek konsantrasyon olmak üzere üçer örnek hazırlamıştır. Bu örneklerde hem boncuk kullanarak hem de volümetrik yöntem ile CD34+ hücre sayısı belirlenmiştir. Çalışmada yapılan Deming regresyon analizi ile her iki yöntem arasında mutlak uyum saptanmıştır. Bununla

birlikte volümetrik yöntem için elde edilen belirsizlik düzeyleri boncuk kullanılan yöntemle göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu durum ile uyumludur. Regresyon analizleri ve Bland-Altman grafikleri incelendiğinde daha düşük mutlak CD34+ hücre sayısına sahip örneklerde iki yöntem arasındaki biasın daha düşük olduğu görülmektedir.

Boncuk bazlı single platform protokollerinde çeşitli kritik adımlara bağlı olarak hassasiyet gösterilmesi bazı dezavantajlar ortaya çıkarabilmektedir (Örn. Pipetleme yöntemi, boncukların zamanla stabilitesinin bozulması, cihazla ilişkili akışkanların kararlılığı, cihaz kalibrasyonunun düzenliliği, vb.). Ayrıca boncuk bazlı single platform protokollerinin çeşitli klinik laboratuvarlarda daha geniş kullanımına sınırlama gibi görülebilen kalite gereklilikleri (özellikle teknik uzman, analiz ayarları, akışkan kararlılığı, zaman tüketimi açısından) mevcuttur(Gossez ve ark., 2017). Bu nedenle boncuk bazlı protokollere göre volümsel ölçümler büyük avantajlar sağlamak ve volümetrik ölçümlerin günlük kullanımı, çeşitli kritik adımlara dayalı hassasiyete sahip boncuk bazlı protokollere göre daha basit görünmektedir. Periferik kan veya aferez numuneleri gibi yüksek viskoziteye sahip materyallerde geleneksel pipetlemenin kesinliği ve tekrarlanabilirliği sudakinden daha azdır. Örnek bölmenin kesinlik ve tekrarlanabilirliğini geliştirmek için tercihen kalibre edilmiş otomatik pipetler yardımıyla “reverse pipetleme” tavsiye edilmektedir. Böylece örneğin küçük bir kısmı pipetin üst kısmında kalacağından viskozite ile istenilen hacimden sapmalar ve hava kabarcığı oluşumu önlenmiş olur. Doğru pipetleme, sonucun pipetlenen örnek miktarı ve pipet ile eklenerek sayımı gerçekleştirilecek boncukların sayısından direkt olarak etkilendiği single platform analizlerinde kritik bir önem taşır (Örn. CD34+ hücre sayımı)(Sutherland ve Keeney, 2016). HKHN'nin kalitesini değerlendirmek için istatistiksel olarak güvenilir CD34+ hücre sayıları elde etmek önem taşımaktadır(D. Robert Sutherland, Michael Keeney, 2003).

Bir başka önemli konu, akan hücre ölçer kullanarak yapılan CD34+ hücre sayımı öncesi eritrositleri parçalamak için uygulanan “lisis” işlemleridir. Örnek hazırlama metotları incelendiğinde ya lyse–no-wash (yıkama yapılmayan parçalama)

ya da lyse-and-wash (yıkama yapılan parçalama) adımlarını içerdiği; single platform protokolünün ise hücre kayıplarını önlemek için sadece lyse-no-wash yöntemini kullanılmaktadır. Bazı örnek tiplerinde canlılık ölçümünün öneminden dolayı, amonyum klorür bazlı bir lizis solüsyonu kullanılarak eritrositlerin ortamdan uzaklaştırılması ve yıkama esnasında meydana gelebilecek hücre kaybı veya boncukların kümeleşmesinin önlenmesi hedeflenir(D. Robert Sutherland, Michael Keeney, 2003; Sutherland ve Keeney, 2016). Çalışmamızda da lyse-no-wash yöntemi kullanılarak hücre kaybı önlenmiş ve bu sebeple her iki yöntem için oluşabilecek hataların önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada hava kabarcığı oluşumunu engellemek için nazikçe vortekslemek gerektiği önerilen birçok farklı ticari markaya ait boncukların vorteks işlemine farklı hassasiyette oldukları bulunmuştur. Aynı çalışmada birçok boncuğun zamanla tüpün dibine çöktüğünü, bir ticari üründe ise aksine yüzdüğü görülmüştür(Scarpata ve ark., 2001). Bu durum akan hücre ölçer kullanarak CD34+ hücre sayımını doğrudan etkilemektedir. Çalışmamızda BC Stem-Kit içerisinde bulunan floresan boncuk reaktifini kullanılmıştır. Okuma öncesi eklenen boncuklardan kaynaklanacak hataların önüne geçmek için üretici ve literatür önerilerine göre sayım boncuklarının aşırı vorteksinden kaçınılarak hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilmiş, boncukların çökmemesi ya da yüzmemesi için okuma işleminin en kısa sürede tamamlanması sağlanmıştır.

Akan hücre ölçerde ISHAGE protokolüne uygun olarak CD45 taşımayan partikülleri ve FSC eşik değerinin altındaki verileri dışlamak, CD45 zayıf ifade eden hücreleri seçmek için yapılan hücre seçimleri, apoptotik hücreleri, hücre içi parçacıkları, trombositleri ve eritrositleri dışlamış olur. Apoptotik hücreler ve hücre içi partiküller, otomatik hücre sayımında lökosit olarak sayılabildiği için, toplam CD34+ hücre sayısının olduğundan düşük ölçülmesine neden olabilmektedir(Gisselø ve ark., 2002). Analiz esnasında boncuklar en küçük lökositten bile küçük oldukları için, CD34+ hücreleri seçerken kullanılan stratejiden bağımsız olarak verdikleri floresana uygun bir kanalda seçilmeleri ve seçilen boncuklar arasında küme yapmış olanların seçim dışı bırakılması gerekmektedir (Şekil 2.1. Grafik 7) (D. Robert

Sutherland, Michael Keeney, 2003).Yapışık boncukların varlığı ya da seçime dahil edilmesi hücre sayılarını doğrudan etkileyerek hatalı sayımlara sebep olmaktadır.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

HKHN, kemik iliği ve kan kanserleri, lenfatik sistem bozuklukları, immünolojik ve metabolik hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanımı gün geçtikçe arttığı için, klinik önemi de aynı oranda artmaktadır. Uygun kök hücre dozunun bulunması, yamanmanın en önemli göstergelerinden biridir. Hematopoietik kök hücrelerin hücre yüzeyinde bulunan CD34 antijeninin sayımı yapılarak kök hücre nakil zamanı ve dozunun belirlenmesi sağlanmaktadır. Geçmişten bugüne birçok yöntem geliştirilmiş olmasıyla birlikte son yıllarda kullanılan en yaygın yöntem akan hücre ölçer yardımıyla mutlak CD34+ hücre sayısının belirlenmesidir. Dünyada birçok merkezde CD34+ hücre sayımı için floresan boncuk kullanarak (single platform) ölçümü gerçekleştirirken birçok ülke de tam kan sayımı (TKS) sonuçları üzerinden (dual platform) ölçüm yapmaktadır. Bir yöntemin diğerine üstün olup olmadığı günümüzde hala netlik kazanmamakla birlikte, her iki yöntem için de ISHAGE protokolü kullanılarak nakil için gerekli hücre sayılarına erişilip erişilmediğinin değerlendirilmesi herkes tarafından kullanılan standart bir yöntemdir. Floresan boncuk kullanımı gerektirmeyen daha yeni bir yöntem olan volümetrik ölçümle CD34+ hücre sayımı ise henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında ISHAGE protokolü kullanılarak floresan boncuk kullanımı ile single platform CD34+ hücre sayım değerleri ile boncuk kullanılmadan yapılan volümetrik ölçüme dayalı CD34+ hücre sayım değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen verilerle özellikle PK örneklerinin klinik kararları etkilemeyecek kadar benzer olduğu görülmüştür. Bu durum pre-analitik hata riskleri bulunduran single platform ölçümlerin yerine rutin çalışmalarda volümetrik ölçümlerin kullanıma uygun olabileceğini düşündürmekle birlikte özellikle daha geniş sayıda LF örneğiyle yapılacak çalışmalar ile bu verilerin desteklenerek sınırlı olan literatürün de genişleyeceği düşünülmektedir. Ayrıca hücre konsantrasyonlarının mutlak ölçümlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha geniş hasta grupları ile farklı laboratuvar ve farklı volümetrik akan hücre ölçer cihazlarının

kullanıldığı çalışmalarla sonuçların desteklenmesi volümetrik ölçümlere olan güveni de arttıracaktır.



## ÖZET

### **Hematopoitik Kök Hücre Nakli İçin Toplanan Aferez Ürünlerinde CD34+ Hücrelerin Mutlak Sayımında “Single Platform” ISHAGE Protokolü ile Volümetrik Ölçümlerin Karşılaştırılması**

Kök hücreler kendini yenileyebilme ve birden fazla dokuya farklılaşma özelliği gösteren hücrelerdir. Hematopoitik kök hücreler (HKH) farklılaşabilme yeteneklerine göre multipotent olarak sınıflandırılan ve tüm olgun kan hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Hematopoitik Kök Hücre Nakli (HKHN), hematopoitik sistemin yeniden yapılanmasını sağlamak için kişinin kendisinden veya doku grubu uyumlu kişilerden kök hücreleri toplandıktan sonra uygun koşullarda alıcıya nakledilmesidir. Bu amaçla uygun koşullarda dolaşımdan toplanan kök hücreler “aferez ürünü” olarak adlandırılmaktadır. HKHN başarılı olabilmesi için aferez ürünlerinin belirli bir kök hücre sayısına sahip olması gerekmektedir ve bu sayı, klinik uygulamaların başarısında önemli bir etkiye sahiptir. HKH sayısının belirlenmesi için çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla akan hücre ölçer kullanarak hücrelerin yüzey antijenlerinin immünfenotipleme ile ortaya konması en sık kullanılan yöntemdir. Yapılan birçok çalışma sonucu HKH yüzey antijenleri Lin-CD34+ CD38- CD90+ olarak kabul edilmekle birlikte klinik uygulamalarda yamanmayla ilişkisi gösterilmiş olan CD34 hücre yüzey antijeninin saptanması yeterli kabul edilmektedir. Günümüzde CD34+ hücre sayımı için doğru ve hızlı sonuç veren standardize edilmiş yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile CD34+ hücreler, floresan boncuk kullanarak (single platform) ya da kullanmadan tam kan sayımı (TKS) sonuçları üzerinden (dual platform) sayılmaktadır. Bu çalışmada tavsiye edilen yöntem olan ve boncuklar ile yapılan “single platform” sayımlarda preanalitik hata riskleri bulunması sebebiyle boncuk kullanımı veya TKS gerektirmeyen alternatif bir yöntem olan “volümetrik” sayım arasındaki performansın karşılaştırılması ve volümetrik ölçüm güvenilirliğinin değerlendirilerek

doğrulanması hedeflenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre her iki yöntem ile elde edilen mutlak CD34+ hücre sayıları arasında uyum olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hematopoietik Kök Hücre, CD34, ISHAGE Protokolü, Volumetrik Ölçüm.



## SUMMARY

### **Detection of CD34+ Cell Content of Apheresis Products: Comparison of “Single Platform” CD34 Cell Count and Volumetric Measurement of CD34 Positive Cells.**

Stem cells are characterized by self-renewal and differentiation into highly specialized cells. Hematopoietic stem cells (HSCs) classified as multipotent cells according to their potency, and they can differentiate into all mature blood lineages. Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) is the transplantation of the stem cells into the recipient under appropriate conditions after collecting the HSCs to ensure reconstruction of the patient's hematopoietic system. It can be autologous or allogeneic. The cell products collected from the circulation of the donor which contain the mobilized Hematopoietic Stem Cells are named as apheresis products. The success of the HSCT is correlated with the number of stem cells on the apheresis product. Different analytical methods have been developed for the determination of the numbers of HSCs. Immunophenotyping using cell-surface antigens and counting by Flow cytometry (FCM) is one of the most-used analytical technique to determine HSC numbers. According to many studies, HSC surface antigens were accepted as CD34+, Lin-, CD38- and CD90+. However, determination of CD34 cell surface antigen, which is associated with engraftment, is considered sufficient for clinical applications. Now, standardized methods are used to achieve accurate and rapid results for CD34+ cell count. CD34+ cells are determined with using a fluorescent bead (single platform) or determined according to complete blood count results without using the beads (dual platform). It is known that methods which are using beads have some preanalytical error risk. In this study, it is aimed to compare the performance between the volumetric count, which is an alternative method for single platform analysis without using beads or CBC and to verify the reliability of the volumetric measurement. According to our study, similar results were obtained for absolute CD34+ counts by both methods.

**Keywords:** Hematopoietic stem cell, CD34, ISHAGE Protocol, Volumetric Measurement.



## KAYNAKLAR

- ALİ, M. A. E., FUSE, K., TADOKORO, Y., HOSHII, T., VE UENO, M. (2017). Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness- monitoring system based on NS- GFP transgene expression. *Scientific Reports*, **5**: 1–12.
- ALLIED, O., VE PROFESSIONALS, H. C. (2016). HAEMATOPOIETIC STEM CELL MOBILISATION AND APHERESIS : A PRACTICAL GUIDE FOR NURSES AND OTHER ALLIED HEALTH CARE PROFESSIONALS., 1st Ed.
- BARNETT, D. (1999). Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34 + haematopoietic stem cells. *Clin. Lab. Haem.*, 301–308.
- BD BIOSCIENCES. (2000). *Introduction to Flow Cytometry-A Learning Guide*. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.bio.umass.edu/micro/immunology/facs542/facsprin.htm>
- BLAND, J. M., VE ALTMAN, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet (London, England)*, *1*(8476), 307–310.
- CHAPPLE, P., PRINCE, H. M., WALL, D., FILSHIE, R., HAYLOCK, D., QUINN, M., VENTER, D. (2000). Comparison of three methods of CD34+ cell enumeration in peripheral blood: Dual-platform ISHAGE protocol versus single-platform, versus microvolume fluorimetry. *Cytotherapy*, *2*(5), 371–376.
- OLIVER CHRIST, KAI LUCKE, SUZAN IMREN, KAREN LEUNG, MELISA HAMILTON, ALLEN EAVES, CLAY SMITH, CONNIE EAVES, *Haematologica Sep 2007*, *92* (9) 1165-1172
- CONNELLY-SMITH, L. S., VE LINENBERGER, M. L. (2015). Therapeutic apheresis for patients with cancer. *Cancer Control*, *22*(1), 60–78.
- D. ROBERT SUTHERLAND, MICHAEL KEENEY, AND J. W. G. (2003). Enumeration of CD34 + Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Current Protocols in Cytometry*, 1–23.
- DENEYS, V., FABRY, A., VAN HOOYDONK, M., SONET, A., ANDRÉ, M., BOURGEOIS, M., VE BOTSON, F. (2017). Efficiency of autologous stem cell collection: Comparison of three different cell separators. *Transfusion and Apheresis Science*, *56*(1), 35–38.
- DIVISIONS, S., BERNITZ, J. M., KIM, H. S., MACARTHUR, B., SIEBURG, H., BERNITZ, J. M., ... MOORE, K. (2016). Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Article Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell*, *167*(5), 1296-1309.e10.
- GISSELØ, C. G., ROER, O., HOFFMANN, M. H., HANSEN, M. B., TAANING, E., VE JOHNSEN, H. E. (2002). Assessing agreement between CD34 enumeration by flow cytometry and volumetric analysis. *Bone Marrow Transplantation*, *29*(8), 699–703.

- GOSSEZ, M., MALCUS, C., DEMARET, J., FRATER, J., POÏTEVİN-LATER, F. F., VE MONNERET, G. (2017). Evaluation of a novel automated volumetric flow cytometer for absolute CD4+ T lymphocyte quantitation. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 92(6), 456–464.
- HAN, T., YANG, C., CHANG, K., ZHANG, D., IMAM, F. B., VE RANA, T. M. (2016). *Identification of novel genes and networks governing hematopoietic stem cell development*. 1–15.
- HATZİMİCHAEL, E., VE TUTHİLL, M. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*, 3, 105–117
- HOPMAN, R. K., VE DİPERSİO, J. F. (2014). Advances in stem cell mobilization. *Blood Reviews*, 28(1), 31–40.
- KANEV, M. O., DİLEK, F., VE MURANLI, G. (2016). *Flow sitometri ve kullanım alanları Flow cytometry and its uses*.
- KEENEY, M., CHİN-YEE, I., WEİR, K., POPMA, J., NAYAR, R., VE SUTHERLAND, D. R. (1998). *Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34 2 Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines*. 70(January), 61–70.
- KEENEY, M., GRATAMA, J. W., VE SUTHERLAND, D. R. (2004). Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 58(1), 72–75.
- KİKİ, I. (2017). What is the role of apheresis technology in stem cell transplantation? *Transfusion and Apheresis Science*, 56(6), 788–794.
- KİNDWALL-KELLER, T. (2014). Peripheral stem cell collection: from leukocyte growth factor to removal of catheter. *Journal of Clinical Apheresis*, 29(4), 199–205.
- KRAUSE, D. S. (2002). *Regulation of hematopoietic stem cell fate*. (21)3262–3269.
- MA, I., VE ALLAN, A. L. (2011). *The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells*. 292–306.
- MACEY M.G. (2007) PRINCİPLES OF FLOW CYTOMETRY. IN: MACEY M.G. (EDS) *Flow Cytometry*. Humana Press .
- MORTAZAVİ, S., ARDALAN, F. A., NODEHİ, S. R. S., KARDER, F. F., VE MİRALİAKBARİ, N. (2012). True volumetric method for flow cytometric enumeration of CD34 + stem cells and its agreement with a standard bead-based single-platform protocol. *Cytotherapy*, 14(5), 621–629
- NAİTHANİ, R., DAYAL, N., ve DİXİT, G. (2017). Single Versus Dual Platform Analysis for Hematopoietic Stem Cell Enumeration Using ISHAGE Protocol. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 33(3), 370–374

- NEMETH, K., KÁRPÁTI, S., VE KARPATÍ, S. (2014). Identifying the Stem Cell. İçinde *The Journal of investigative dermatology* (C. 134).
- NGOMA, A., SAÍTO, S., OHTO, H., IKEDA, K., YASUDA, H., KAWABATA, K., ... NOLLET, K. E. (2011). CD34+ cell enumeration by flow cytometry: a comparison of systems and methodologies. *Archives of Pathology ve Laboratory Medicine*, 135(7), 909–914.
- PASSÍNG, H., VE BABLOK. (1983). A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie*, 21(11), 709–720.
- PETRÍZ, J. (2007). Flow cytometry of the side population (SP). *Current Protocols in Cytometry*, Chapter 9, Unit9.23.
- R CORE TEAM. (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- RAHMAN, M. (2009). INTRODUCTION TO FLOW CYTOMETRY. Abd Serotec, A Bio-Rad Company
- ROWLEY, T. (2019). *Flow Cytometry - A Survey and the Basics. Mater Methods* 2012;2:125
- SCARPATÍ, B., AVANZO, G. D., BRANDO, B., VE GO, W. (2001). The “ Vanishing Counting Bead ” Phenomenon : Effect on Absolute CD34 % Cell Counting in Phosphate-Buffered Saline-Diluted Leukapheresis Samples. 160, 154–160.
- SIENA, S., BREGNÍ, M., BRANDO, B., BELLÍ, N., RAVAGNANÍ, F., GANDOLA, L., ... GIANNÍ, A. M. (1991). Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*, 77(2), 400–409. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702334>
- SOARES, R., MARTÍNS, V. C., MACEDO, R., CARDOSO, F. A., MARTÍNS, S. A. M., CAETANO, D. M., ... FREÍTAS, P. P. (2019). Go with the flow: advances and trends in magnetic flow cytometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(9), 1839–1862.
- SPANGRUDE, G. J., VE SLAYTON, W. B. (2009). Isolation and Characterization of Hematopoietic Stem Cells. İçinde *Handbook of Stem Cells* (Second Edi, C. 2).
- STÖCKL, D., RODRÍGUEZ CABALEÍRO, D., VAN UYTFANGHE, K., VE THÍENPONT, L. M. (2004). Interpreting Method Comparison Studies by Use of the Bland–Altman Plot: Reflecting the Importance of Sample Size by Incorporating Confidence Limits and Predefined Error Limits in the Graphic. *Clinical Chemistry*, 50(11), 2216 LP – 2218.
- SUTHERLAND, D ROBERT, L., KEENEY, M., NAYAR, R., VE CHIN-YEE, I. A. N. (1996). The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy*, 5(3), 213–226.

- SUTHERLAND, D. R., VE KEENEY, M. (2016). *Standardized Flow Cytometry Assays for Enumerating CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Stem Cells*. 182–198.
- TELFORD, W. G., HAWLEY, T., SUBACH, F., VERKHUSHA, V., VE HAWLEY, R. G. (2012). Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods*, 57(3), 318–330.
- TSIEN, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509–544.
- TSURUTA TOSHİHİSA. (2012). *Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy* (D. Taner, Ed.). 87
- VİCTOR HOFFBRAND, P. A. H. M., ve A. Victor Hoffbrand, P. A. H. M. (2015). *Hoffbrand's Essential Haematology* (7th Editio). Wiley.
- WHİTBY, A., WHİTBY, L., FLETCHER, M., REİLLY, J. T., SUTHERLAND, D. R., KEENEY, M., VE BARNETT, D. (2012). ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 82 B(1), 9–17.
- YE, F., HUANG, W., VE GUO, G. (2017). Studying hematopoiesis using single-cell technologies. *Journal of Hematology ve Oncology*, 10(1), 27.
- Z, E. G. Ü. N. D. Ü., DEMİREL, G. Ü. L., BAL, C., VE LBAS, Z. G. U. (2010). *Evaluation of mobilized peripheral stem cells according to CD34 and aldehyde dehydrogenase expression and effect of SSC lo ALDH br cells on hematopoietic recovery*. (July), 1006–1012.

# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

Adı: Nazlı

Soyadı: KOZAN TOPCU

Doğum yeri ve tarihi: Ankara / 1985

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Prof. Dr. Ahmet Taner Kışlalı Mah. Tolga 86

Sitesi B Blok No.6 Çayyolu/Çankaya/ANKARA +90 (535) 7912169

## II- Eğitimi

2004-2009 Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı dili: İngilizce

## III- Ünvanları

2009 Biyolog

2016 Klinik Araştırma Koordinatörü

## IV- Mesleki Deneyimi

2016-Halen Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji EAH  
Klinik Araştırma Koordinatörü

2011 – 2016 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi  
Hematoloji Anabilim Dalı Akım Sitometri Laboratuvarı  
(Gönüllü Deneyim)

2008 T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Ankara Grup  
Başkanlığı – Biyoloji İhtisas Dairesi (Stajyer Öğrenci)

2007 T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Yüksek İhtisas EAH  
(Stajyer Öğrenci)

2006 Türkiye Atom Enerjisi Kurumu Sarayköy Nükleer Araştırma  
ve Eğitim Merkezi (Stajyer Öğrenci)

## V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

## VI- Bilimsel İlgi Alanları

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

## VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri

- 2018 S.B. Onaylı İyi Klinik Uygulamalar Eğitimi, Ankara
- 2016 TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, Laboratuvar Uzmanlık Eğitimleri (GMP, GLP, GHP ve ISO 22716:2007), Ankara
- 2015 5th Turkish-US Cytometry Workshop, Ankara
- 2015 Atlas Biyoteknoloji, 5. Uygulamalı Hücre Kültürü ve Moleküler Biyoloji Araştırmaları Kursu, Ankara
- 2014 ANKÜSEM, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ankara
- 2012 Beckman Coulter Akış Sitometri Çalıştayı, Ankara
- 2011 XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya
- 2011 II. TÜBA Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, Ankara
- 2011 2. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, İzmir
- 2010 I. TÜBA Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu, Ankara
- 2010 Kocaeli Ü. KOUSEM ve KOGEM, IX. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygula. Kursu, Kocaeli
- 2010 Kocaeli Üniversitesi KOGEM ve BD, Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi, Kocaeli