



# TÜRK AFEREZ DERNEĞİ

## MOBİLİZASYONDAN İNFÜZYONA KÖK HÜCRE -KÖK HÜCRE SAYIMI VE CANLILIK



**Bio. Utku SEYİS**  
Kalite Kontrol Sorumlusu  
Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı

- İnsan sağlığı için üretimi yapılan her ürünün, üretiminin tüm aşamalarında ve hasta uygulamalarında yüksek kalite standartlarına sahip olması gerekmektedir.
- Üretilen bu ürünler için önceden saptanmış özellikleri taşıyıp taşımadığının ve ne ölçüde güvenilir olduğunun incelenmesi için kullanılan kalite kontrol standartları geliştirilmiştir.

# AMAÇ

- Toplanan/dondurulan ürünlerde aranması gereken kalite standartlarına değineceğiz.

## Quality Standards



# AMAÇ (BEKLENTİLER)

- CD 34 nedir? ve Sayımı Nasıl Yapılır? (ISHACE, FLOW)
- Hücre Sayımı ve Canlılık Nasıl Ölçülür? (CBC, Thoma Lamı, Tripan Mavisi)
- Mobilizasyonda Toplama Öncesi CD 34 Sayısı ne olmalıdır?
- Otolog ve Allogeneik Nakillerde Yeterli Engrafman Nasıl Sağlanır?
- DMSO İçeren Üründen Sayım Nasıl Yapılır? (Dondurulmuş Üründen Çözümleme sonrası)

# Hematopoetik Kök Hücre

- Hematopoetik kök hücre, üzerinde en çok çalışılan ve tedavide yaygın olarak kullanılan erişkin kök hücrelerdir.
- Kendi kendine yenileyebilme ve bütün matür kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri vardır.
- Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilebilirler.
- Yüzey belirteçleri başlıca, **CD34**, CD14, CD45 ve CD133'dür.\*

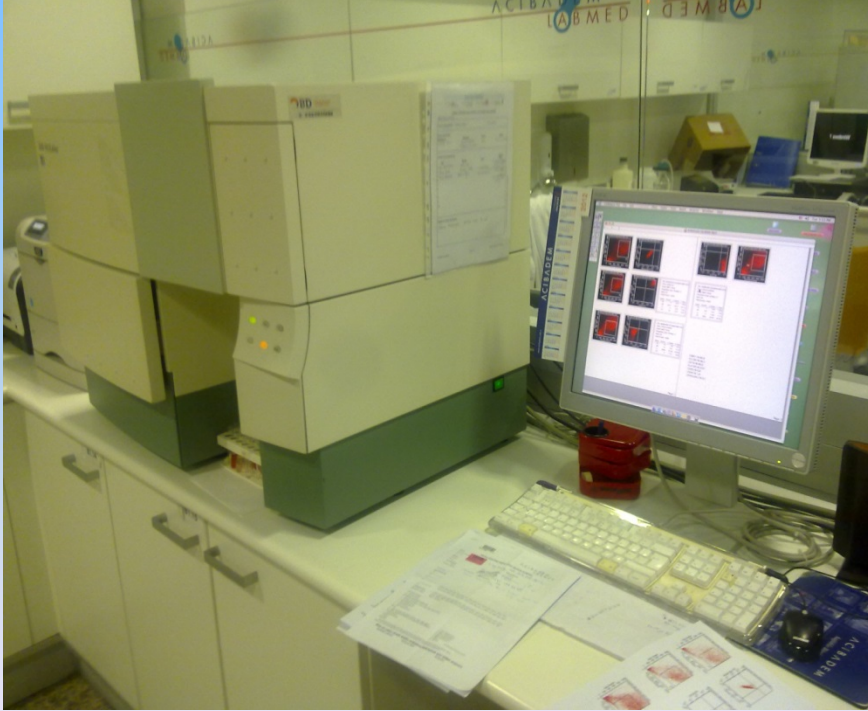
• \*Dieterlen-Lièvre F, Pardanaud L, Bollerot K, Jaffredo T. Hemangioblasts and hemopoietic stem cells during ontogeny. C R Biol 2002;325:1013-20

• \*Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest 2002;109:337-46.

- CD 34 Hematopoetik kök hücre yüzey belirtecidir.
- CD34 Endotel hücrelerde de bulunur, ancak kök hücrede CD 45 (+) Endotel hücrede CD45 (–) tir.

# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

- Topladığımız ürünün etkin bir tedavi için yeterliliğinin hesaplanmasında kullanılan CD34 miktarı, hücre sayısı, canlılık nasıl ölçülür ve hesaplanır?

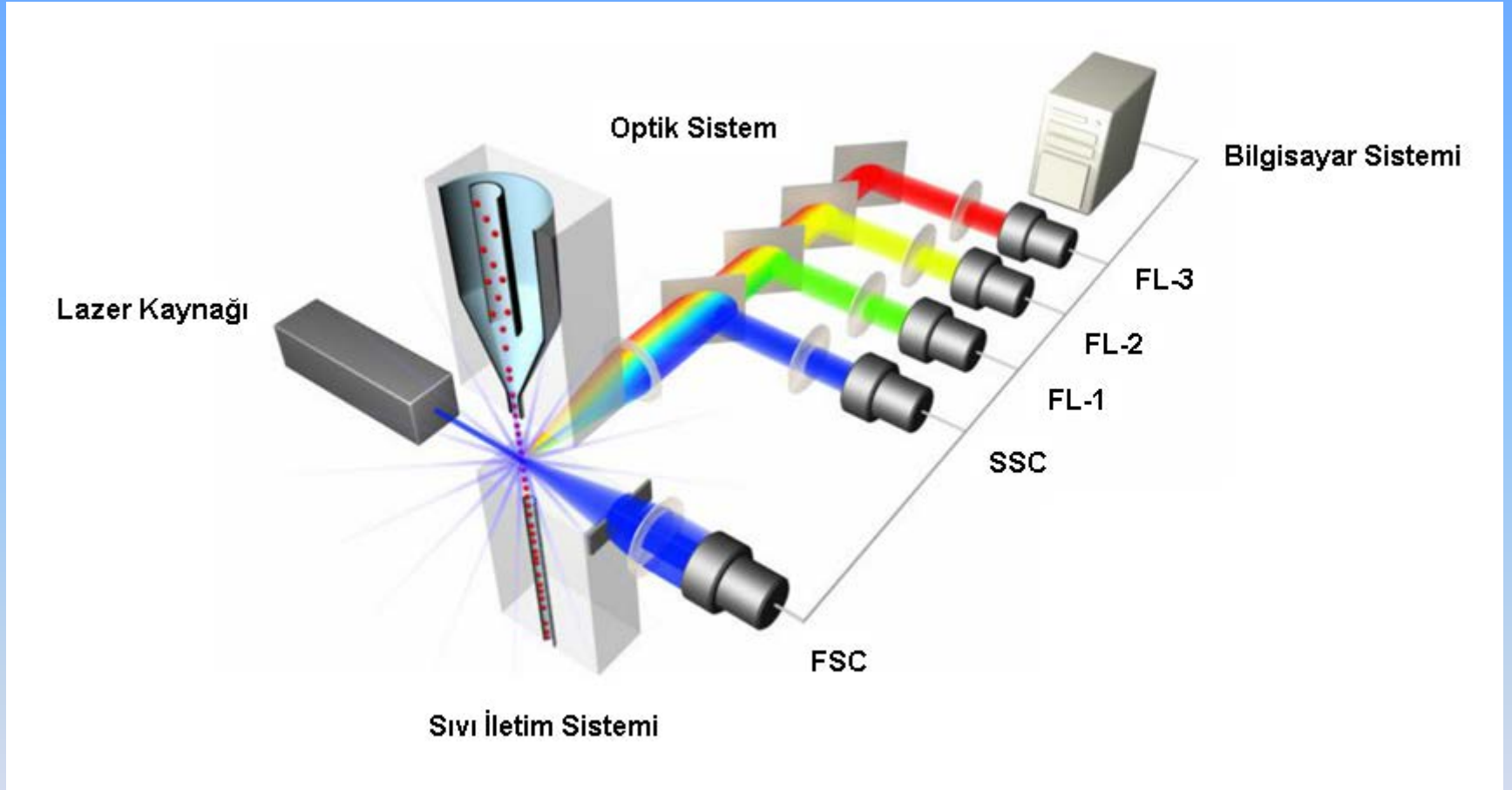


# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

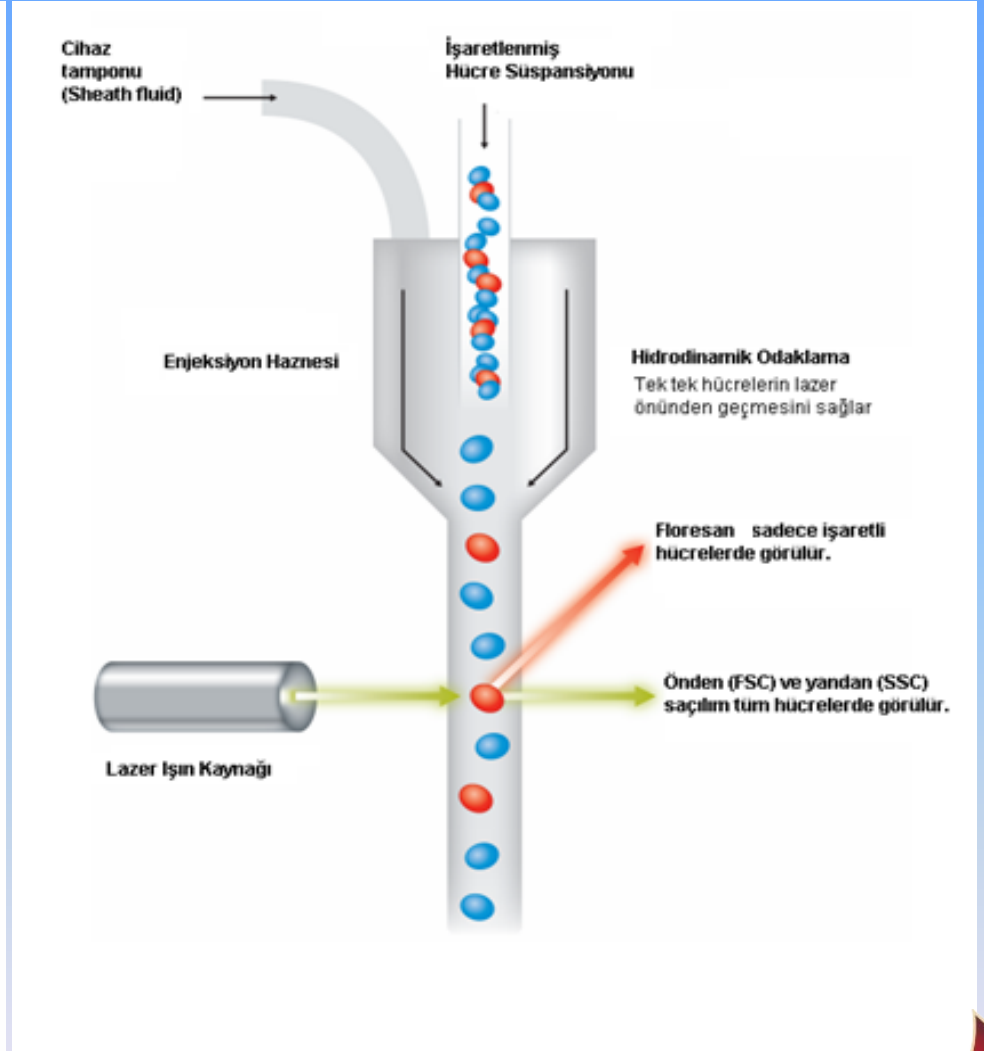
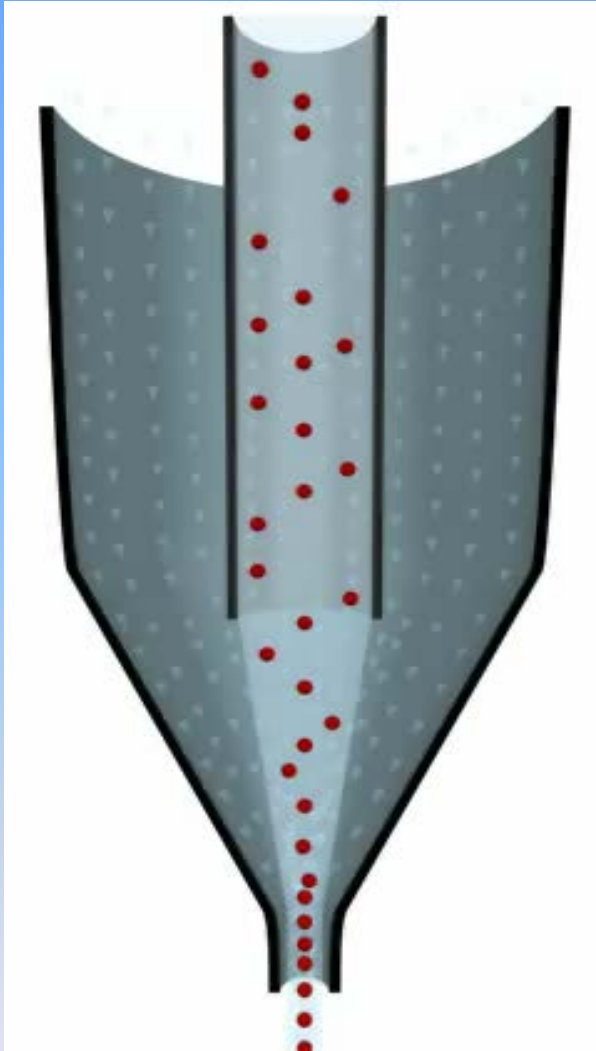
- CD34+ hücreler akım sitometri kullanılarak ölçülebilir.
- En kısa zaman dilimi içinde kök hücreyi tespit etmek için yaklaşık bir saat süren bir teknik,
- Akım (Flow) :Süspansiyon halindeki hücreler sıvı iletim sistemiyle çekilerek lazer kaynağı önünden tek tek geçer;
- Sitometri (Hücresayar) :Büyükölük, sitoplazmik yoğunluk, hücre içi ve hücre dışı antijenler dedektörler vasıtasıyla tespit edilir.
- Süspansiyon halindeki hücreleri bir akış kanalından, belli bir hızda tek tek geçerken sınıflandıran sistem.



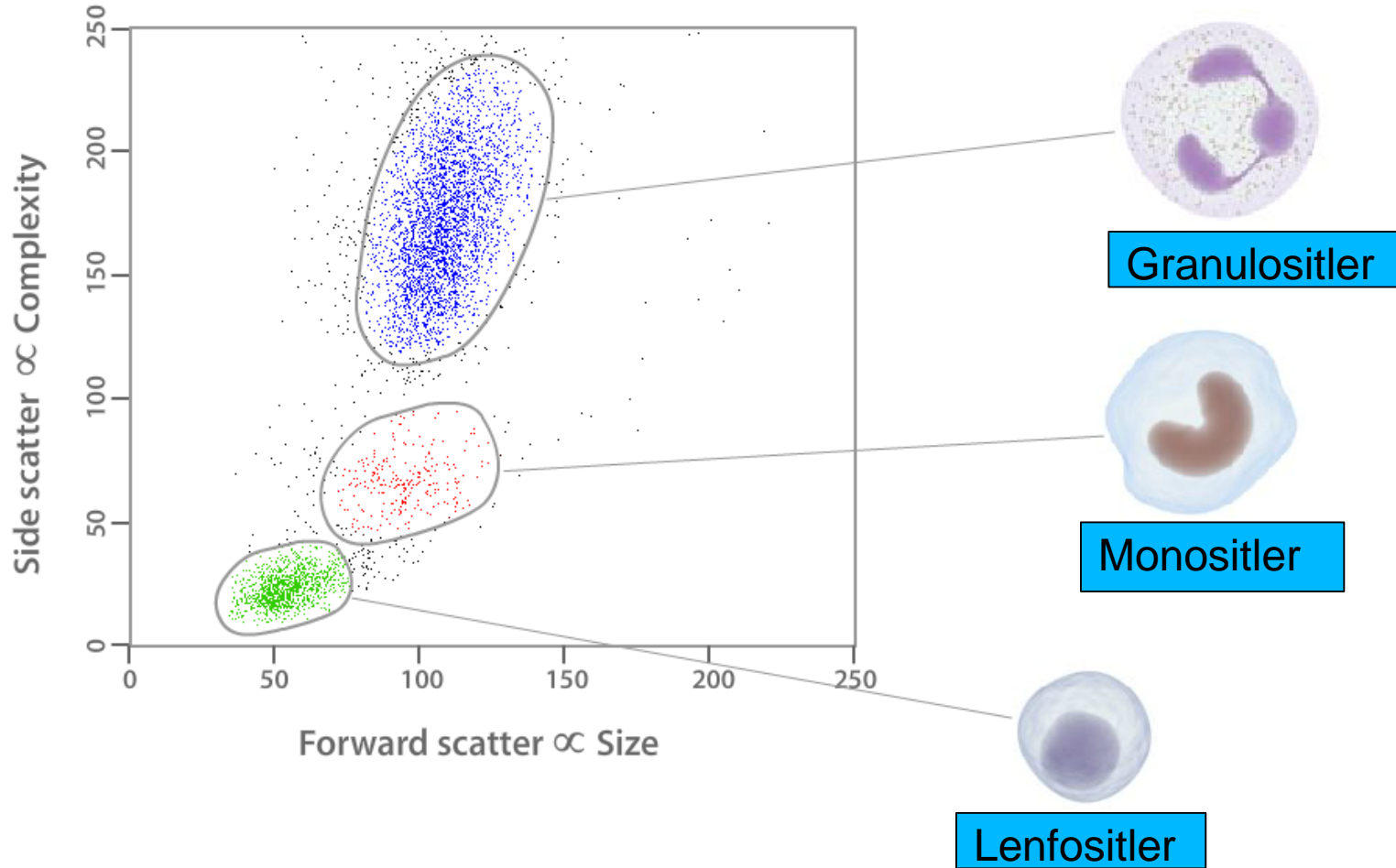
# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık



# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

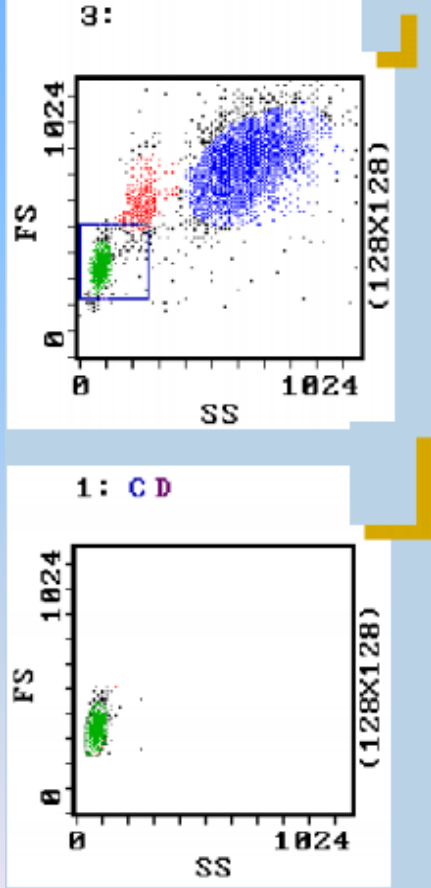


# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık



# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

- **Kapılama (Gating):** Görüntülenmek istenen hücre popülasyonunun saptanması



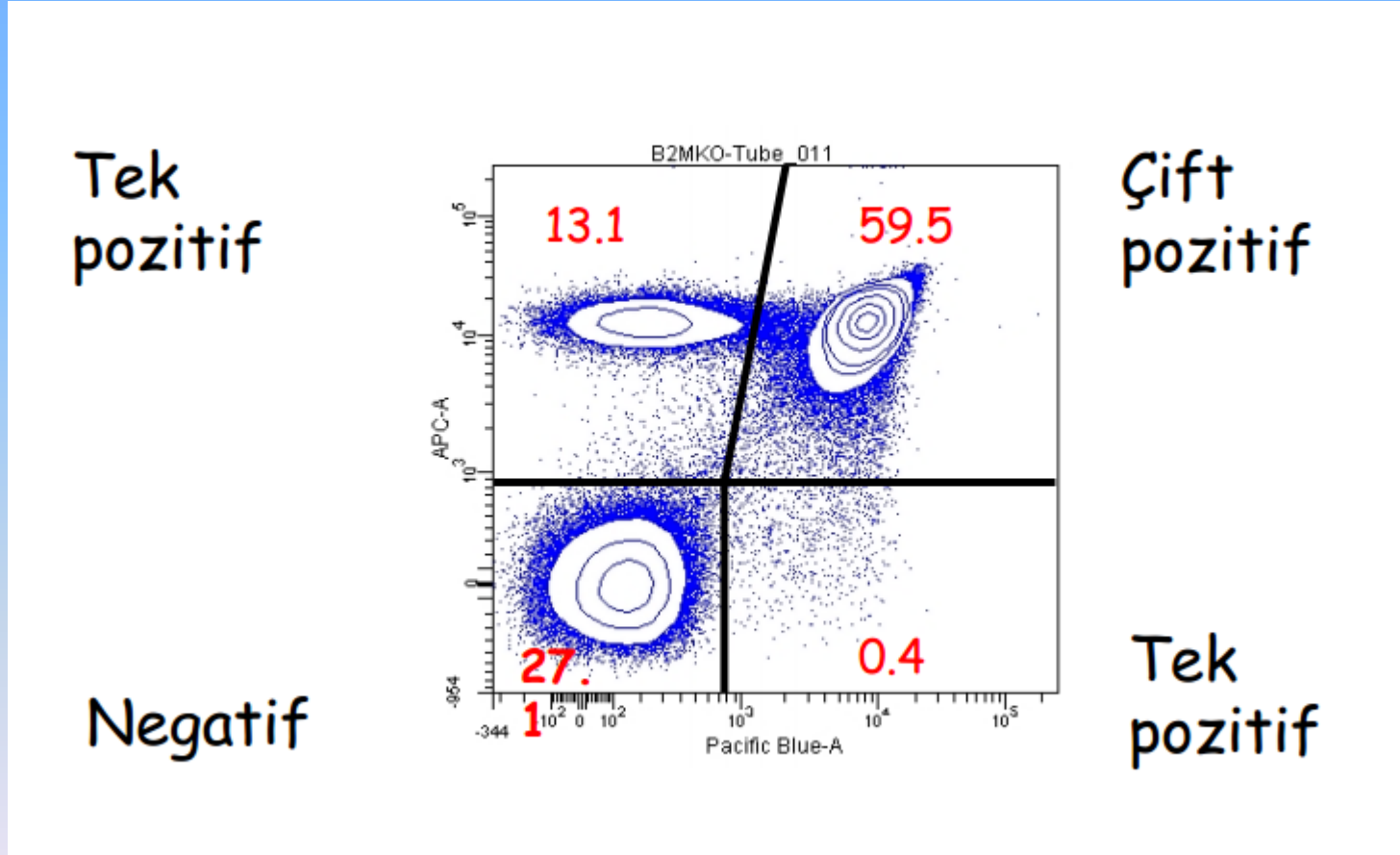
FSC : Hücre Büyüklüğü

SSC : Hücre Yapısı

ör : Lenfositler

# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

- **Kadran:** Negatif ve pozitif populasyonların belirlenmesi için kullanılır



# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık



## Kit contents (50 tests/kit)

- CD34 PE/ CD45 FITC
- 7-AAD Viability Dye
- NH<sub>4</sub>Cl Lysing Solution
- Trucount Tubes

- ✓ FDA onaylı IVD testi
- ✓ ISHAGE yönergelerine uygun
- ✓ Tek tüp denemesi
- ✓ Örneklem türleri ve antikoagülanlar
- ✓ BD Trucount Tüpü

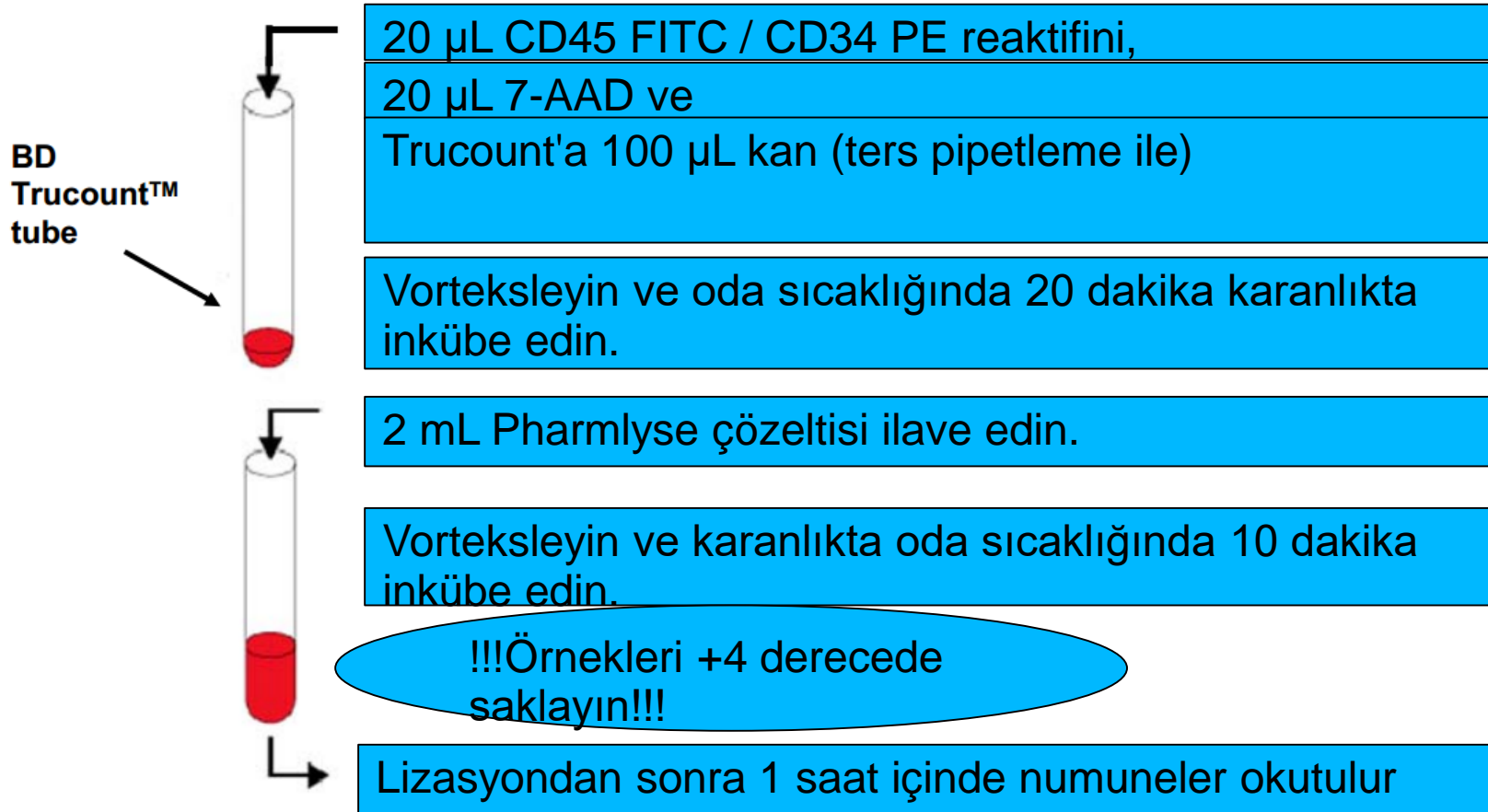


# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

## BD SCE Kit Sample Preparation\*

\* Dilute samples with  
> 40,000 WBC/uL in  
PBS with 0.5% BSA.

### A FEW SIMPLE STEPS IN A SINGLE TUBE



# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

- CD 34 kök hücre sayımı ISHAGE yöntemi ile yapılır.

## SCE Template in BD CellQuest Pro Software

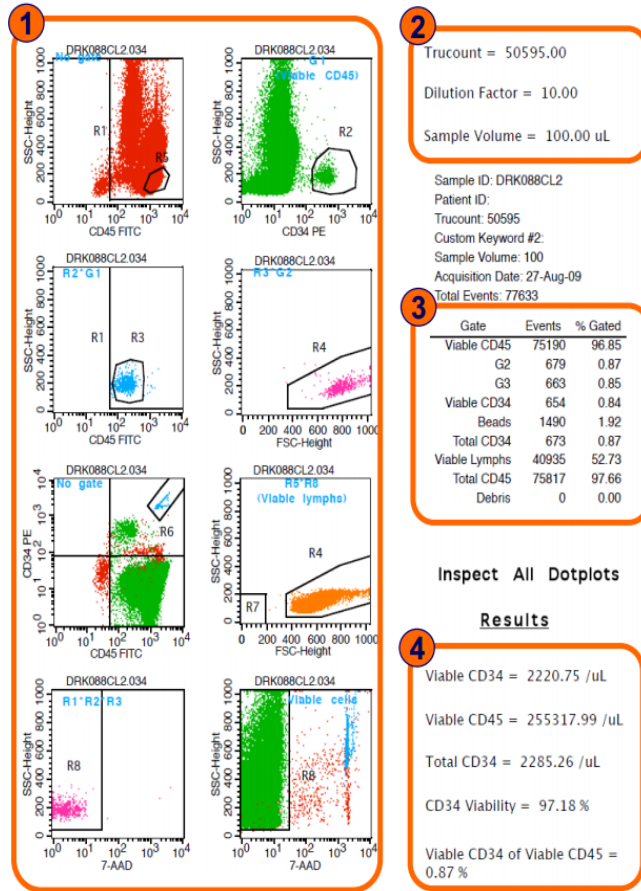
1 Kapılar her örnek için kontrol edilir ve düzeltilir

2 Değerleri girin.  
- Trucount  
- Seyreltme faktörü  
- Numune hacmi

3 Kapılar ve İstatistikler sağlanır ve isteğe bağlı ek analiz.

4 Otomatik olarak sonuçları sağlanır

Expression editors and automatic results are not available in BD CellQuest software.



Bu çalışmada kullanılan markırlar;

CD34 ( kök hücre markırı)

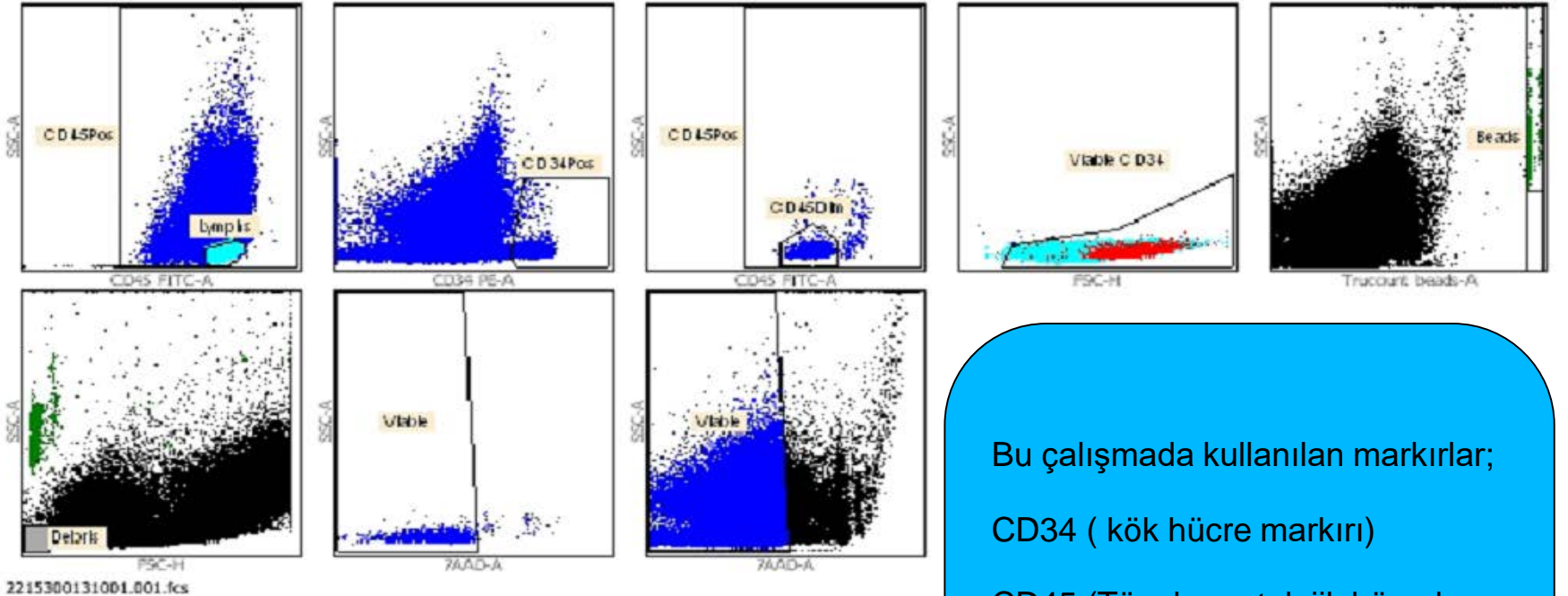
CD45 (Tüm hematolojik hücrelere bağlanır),

7AAD ( Cansız hücrelere bağlanak canlılığı verir)



# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

- CD 34 kök hücre sayımı ISHAGE yöntemi ile yapılır.



CD34+ Viable Abs Cnt (cells/ $\mu$ l)	4530.20
CD45+ Viable Abs Cnt (cells/ $\mu$ l)	244258.30
CD34+ Viable Events	4378
CD45+ Viable Events	236052
Bead Events	2445
Viable CD34+ % Viable CD45+	1.85
CD34 Viability (%)	98.18
Viable CD34+ CV (%)	1.51

Bu çalışmada kullanılan markırlar;

CD34 ( kök hücre markırı)

CD45 (Tüm hematolojik hücrelere bağlanır),

7AAD ( Cansız hücrelere bağlanak canlılığı verir)

# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

## – Hücre canlılığı

- 1) Akım sitometri yöntemi; 7AAD
- 2) Işık mikroskobu; Thoma Lamı, Tripan Mavisi
- 3) Florasan mikroskobu; Akridin-Oranje ve Propidyum İyodit
- $\text{Canlılık (\%)} = (\text{Canlı hücre} / \text{Total hücre}) \times 100$
- Canlılık yüzdesi özel şartlarda %75 kabul edilse de % 90 ve üzeri olmalıdır.

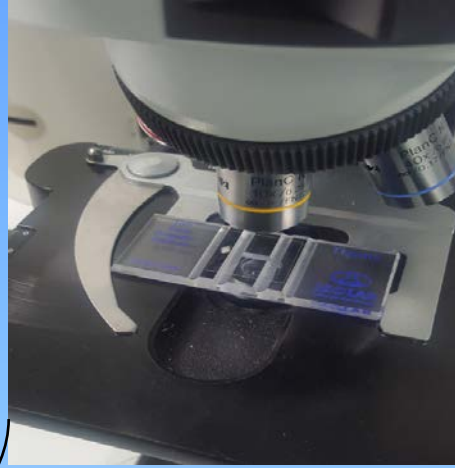
# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık

## – Hücre Sayısı

- 1) CBC cihazlarında veya dilüsyon yapılarak Thoma lamında yapılır.



# CD 34, Hücre Sayımı ve Canlılık



## Yeterlilik Hesaplama:

• Toplam Canlı Hücre Sayısı (WBC) x CD34 Yüzdesi

100

= Toplam CD 34 sayısı/Hasta Kilosu

= ..... X 10<sup>6</sup> CD34/kg

# **Kök Hücreler Ne Zaman Toplanmalıdır? Mobilizasyonda Toplama Öncesi CD34 Ne Kadar Olmalıdır?**

# Kök Hücreler Ne Zaman Toplanmalıdır?

## Mobilizasyonda Toplama Öncesi CD34 Ne Kadar Olmalıdır?

- Kök hücre toplamadan önce hasta ya da donöre büyüme faktörleri verilerek kök hücrelerinin periferik kanda mobilizasyonu sağlanır. Mobilizasyon ortalama 5 gün önce başlatılır ve günde iki kez hastaya ya da donöre Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) nötrofil yapımını artırmak için yapılır.
- G-CSF başladıktan sonra 4-5-6. günler ideal günlerdir, ancak beklenen pik günü 5. gündür. Bazı durumlarda 7.gün de toplama işlemi yapılabilir ancak 7. günden sonra toplamanın bir efektifliği yoktur.
- Toplama işlemi yeterli olmayacak ise 1,5-2 ay ara verildikten sonra bir kez daha toplama yapılabilir.

# Kök Hücreler Ne Zaman Toplanmalıdır?

## Mobilizasyonda Toplama Öncesi CD34 Ne Kadar Olmalıdır?

- Kök hücrelerin yeterli olduğunu gösteren parametreler, lökosit sayısı (10.000 m<sup>3</sup>) ve **CD34 sayısı (>20/ µl)** dir. Günlük olarak bu parametrelerin değerlerine bakılarak kök hücre toplama tarihine karar verilir.\*

- \*Arslan Ö (2004) Lokoferaz. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı. Çeşme. Roche Sanayi A.Ş., 54-59.
- \*Ural AU (2004) Kemik iliği toplanması. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı. Çeşme. Roche Sanayi A.Ş., 50-53
- \*Ündar L (2004) Kan ve ilik işlenmesi, kryopreservasyonu, depolanması ve transportasyonu. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı. Çeşme. Roche Sanayi A.Ş., 60-64.

# Kök Hücreler Ne Zaman Toplanmalıdır?

## Mobilizasyonda Toplama Öncesi CD34 Ne Kadar Olmalıdır?

- Son yıllarda lökosit sayıları yerine aferez öncesinde perifer kanda sirküle eden CD34+ hücre sayıları baz alınarak başarılı toplama işlemleri bildirilmiştir. Siena ve arkadaşları perifer kanda CD34+ hücreler görülmeye başladığı zaman aferez yapıldığında yüksek sayıda CD34+ hücre toplandığını bildirmişlerdir \*
- Haas ve arkadaşları ise aferez öncesi perifer kanda sirküle eden **CD34+ hücre sayıları 50 /  $\mu$ l** ye ulaştığında toplama yapılması ile bir defada **> 2.5 x 10<sup>6</sup> CD34+ hücre/kg** elde edilebileceğini göstermişlerdir \*\*

- \*Siena S, Bregni M, Brando B et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. Blood 1991, 77:400-409.
- \*\*Haas R, Mohle R, Fruhauf S et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. Blood 1994, 83:3787-3794.



# Kök Hücreler Ne Zaman Toplanmalıdır?

## Mobilizasyonda Toplama Öncesi CD34 Ne Kadar Olmalıdır?

- Passos-Coelho ve arkadaşları ise aferez öncesi perifer kanda sirküle eden CD34+ hücre yüzdesinin **% 0.5** ve üstünde olduğu zaman toplama yapıldığında yeterli sayıda CD34+ hücre elde edildiğini göstermişlerdir \*
- Demirer ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada aferez öncesi perifer kanda CD34+ hücre sayılarının **34 /  $\mu$ l** ye ulaştığında toplama yapılması ile bir defada  **$> 2.5 \times 10^6$  CD34+ hücre/kg** elde edilebileceğini göstermişlerdir \*\*
- **Kök hücrelerin kemik iliğine yerleşmesi için 1-2 bazen 3 aferez gerekli olabilmektedir.**

\*Passos-Coelho JL, Braine HG, Davis JM, et al. Predictive factors for peripheral- blood progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization. J Clin Oncol. 1995, 13:705-714

\*\*Demirer T, İlhan O, Ayla M, et al. Monitoring of peripheral blood CD34+ cell counts on the first day of apheresis is highly predictive for efficient CD34+ cell yield. Therapeutic Apheresis, October, 2002, Vol:6 (5), pp 384-389.

# Kök Hücre Toplanması Yeterli Olduğu Kabul Edilebilecek Minimal Sayı Ne Olmalıdır?

# Kök Hücre Toplanması Yeterli Olduğu Kabul Edilebilecek Minimal Sayı Ne Olmalıdır? (Engrafman)

- Hazırlama rejimine bağlı gelişen aplazi sonrasında, kan hücrelerinin normale dönmesi ile kan değerlerinin düzelmesine engrafman adı verilir.
- Engrafman verilen hücrelerin hastanın iliğinde yerleştiğini gösterir.

# Kök Hücre Toplanması Yeterli Olduğu Kabul Edilebilecek Minimal Sayı Ne Olmalıdır? (Engrafman)

- Kök hücrelerin kullanımının ilk yıllarında hangi hücrenin graftın tutması yönünde bir ölçü olacağı uzun zaman tartışma konusu olmuştur.
- İlk yıllarda bazı merkezler mononükleer hücre sayılarını (MNH) esas almışlar ise de sonra CD34+ hücre sayısına yoğunlaşmışlar, zamanla yapılan çalışmalar CFU-GM (Colony forming unit granulocytemacrophage) sayısı üzerine popüler olmuştur ancak sonradan yine durum CD34+ hücreler üzerine kuvvetlenmiş ve yoğunlaşmıştır. \*

- \*Rowley SD, Zuehlis M, Braine HG et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. Blood 1987, 70:271-275.
- \*Bender JG, To LB, Williams S et al. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. Journal of Hematotherapy 1992, 1:329-341.

# Kök Hücre Toplanması Yeterli Olduğu Kabul Edilebilecek Minimal Sayı Ne Olmalıdır? (Engrafman)

- CFU-GM assay lerinin çok zor ve zaman alıcı olması nedeni ile bir çok enstitü bu yöntemi bırakarak CD34+ hücre sayısına geçmişlerdir. Yapılan bir çok çalışma CD34+ hücrelerin sayısının CFU-GM kadar hatta ondan çok daha iyi bir indikatör olduğunu göstermiştir \*

- \*Weaver CH, Birch R, Schwartzberg L et al. CD34 content of peripheral blood progenitor cells (PBPC) is the single most powerful predictor of recovery kinetics in patients receiving myeloablative high-dose chemotherapy and PBPC infusion. Blood 1994, 84: (Supplement 1, Abstr:1388).
- \* Haas R, Mohle R, Fruhauf S et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. Blood 1994, 83:3787-3794.

# Kök Hücre Toplanması Yeterli Olduğu Kabul Edilebilecek Minimal Sayı Ne Olmalıdır? (Engrafman)

- Schwartzberg ve arkadaşları 52 hastada yaptıkları bir çalışmada  $2.5 \times 10^6$  CD34+ hücre /kg sayısının gerek nötrofil gereksede trombositlerin hızlı tutmasını sağladığını göstermiş ve bu sayısının eşik değer (threshold) olduğunu bildirmişlerdir \* (Birçok merkez bu eşik değeri kullanmaktadır)
- Başarılı bir engrafman için verilecek CD34 hücre sayısının  $>2 \times 10^6$  / kg olması gerekir. \*\*

- \*Schwartzberg L, Birch R, Blanco R et al. Rapid and sustained hematopoietic reconstitution by peripheral blood stem cell infusion alone following high-dose chemotherapy. Bone Marrow Transplant 1993, 11:369-374.
- \*\*Arat M (2004) Engrafman, tanımı ve belirlenmesi ve kimerizm tayini. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı. Çeşme. Roche Sanayi A.Ş., 107-113, 2004.
- \*\*Arslan Ö (2004) Lokoferez. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı. Çeşme. Roche Sanayi A.Ş., 54-59
- \*\*Dilek İ, Arslan Ö, Gürman G (1998) Allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu. Van Tıp Dergisi, 5(3): 183–187.

# Kök Hücre Toplanması Yeterli Olduğu Kabul Edilebilecek Minimal Sayı Ne Olmalıdır? (Engrafman)

- $2.5 \times 10^6$  CD34+ hücre /kg başarı %60-65,  $>5 \times 10^6$  CD34+ hücre /kg başarı %95 Seattle dan Bensinger ve arkadaşları\*
- CD34 sayısının yüksek olması her zaman iyi anlama gelmez. Allogeneik nakillerde fazla verildiğinde T-Lenfosit miktarı da artar. Bu da GVHD reaksiyonuna sebep olur. Dolayısıyla etkin olan en düşük doz tercih edilmelidir. Klinik tecrübe bu aşamada çok önemlidir.
- Otolog nakillerde ise fazla CD34 tümör hücrelerinin de miktarını artıracak için tercih edilmez dolayısıyla minimal rakamlar arasında tercih yapılmalıdır.
- Full Match Allogeneik nakillerde  $2.5 \times 10^6$  CD34+ hücre /kg iyi bir rakamdır. Ancak threshold  $1,2 \times 10^6$  CD34+ hücre /kg

\*Bensinger WJ, Appelbaum FR, Rowley S et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. J. Clin Oncol 1995;Vol:13, No: 10, pp 2547-2555.

# Transplant Hedefleri

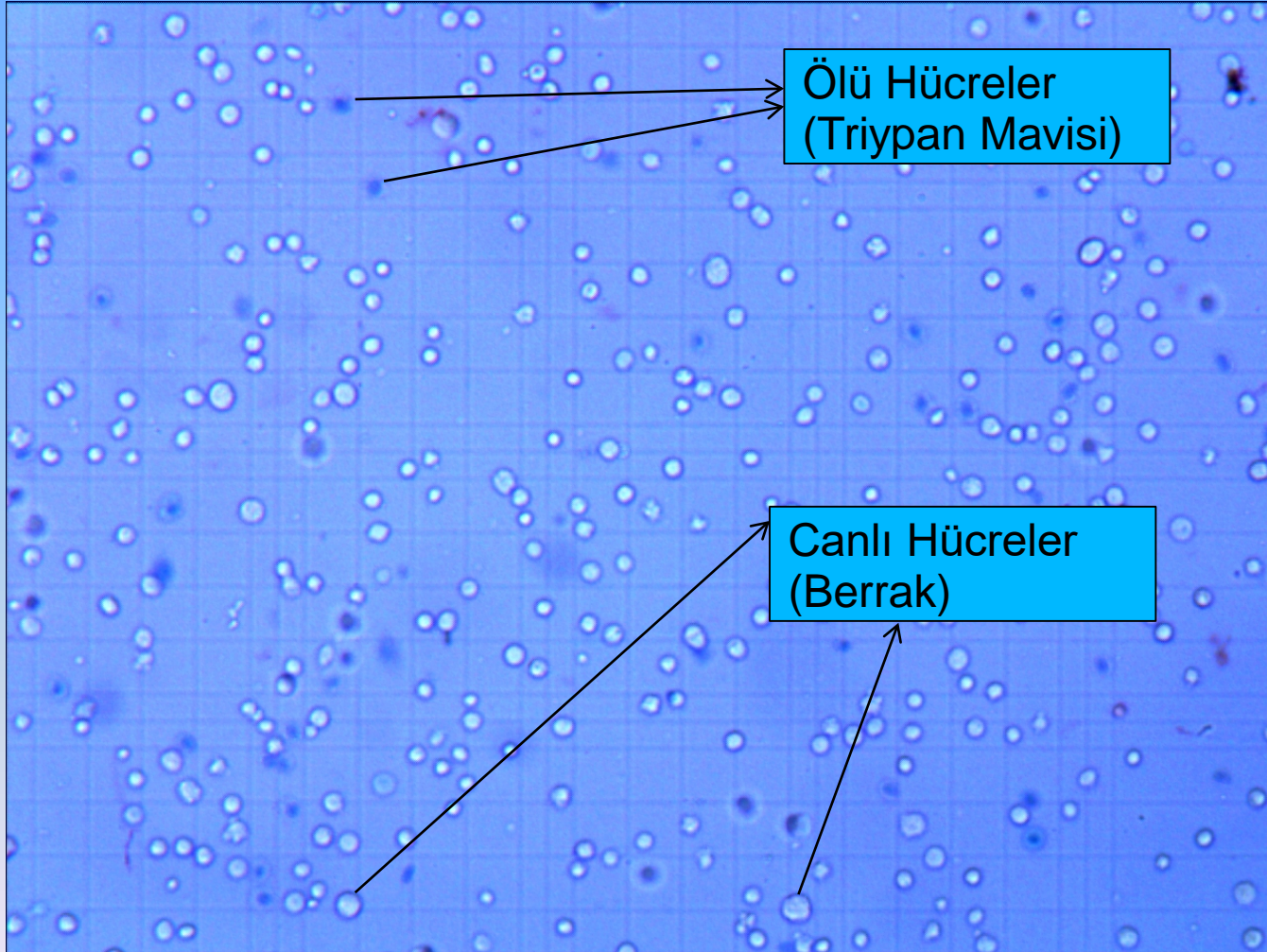
	Otolog CD34/kg	Allogeneik CD34/kg
Kemik İliği	$1-5 \times 10^6$	$2,5-8 \times 10^6$
PBSC	$2 \times 10^6$	$3-7 \times 10^6$



# DMSO İeren Üründen Sayım (Dondurulmuş Üründen Çözümleme sonrası)

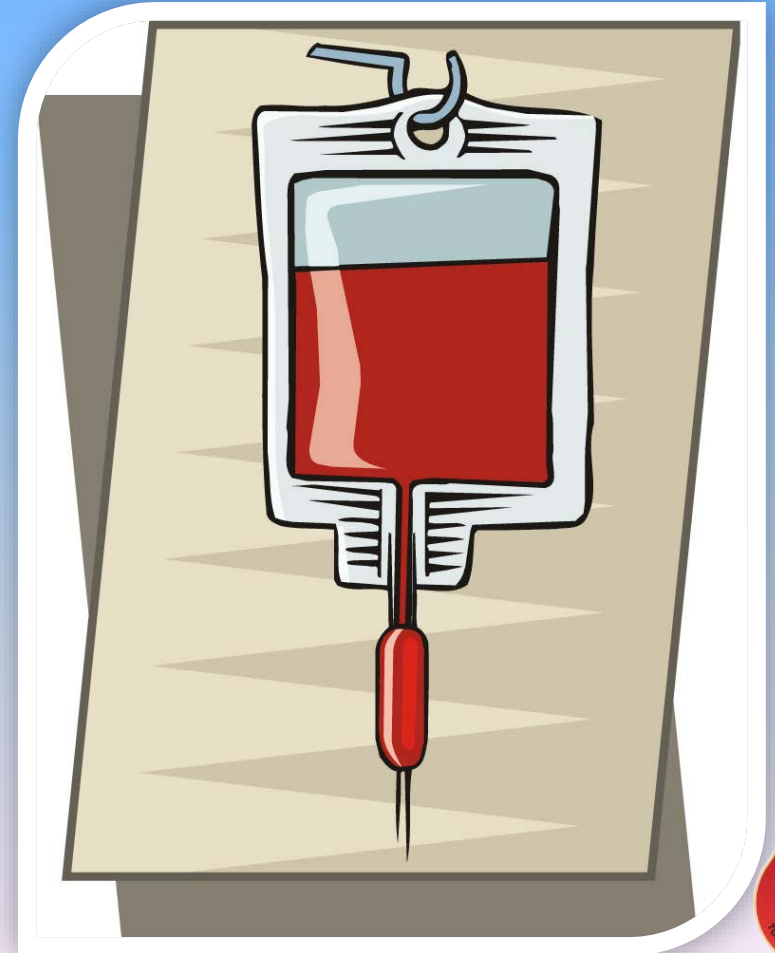
- Yaşayan ve ölü hücrelerin oranını belirlemek amacıyla yapılan testler ürünün fonksiyonel kapasitesini ve tedavi potansiyelini değerlendirmede çok önemlidir.
- Çözümleme sonrası yeniden yapılacak olan CD 34 sayımı, hücre sayımı ve canlılık için DMSO, mevcut yıkama yöntemleri ile uzaklaştırılmalıdır.
- CD34 (Flow sitometri), hücre sayımı (CBC cihazı veya dilisyon yapılarak thoma lamında) sayılır.
- Canlılık; 7AAD (Flow Sitometri), Tripan Mavisi
- Tripan Mavisi: Hücreler tripan mavisi boyası ile karıştırılır ve mikroskopik olarak işaretlenir. Canlı hücreler boyaya geçirgen olmadığı için berrak, yuvarlak olarak izlenir. Ölü hücreler tripan boyasını dışlayamaz ve mavi boyayı alır. Canlılık belirleme işlemi yaklaşık 5 dk da tamamlanır.

# DMSO İçeren Üründen Sayım (Dondurulmuş Üründen Çözümleme sonrası)



# UYGULAMA

- Ürünün uygulanmadan önce stabilite ve sterilite testlerinin yerinde tekrar yapılması önerilir.
- Bu süreçteki sorumluluk kullanıcıya aittir.



# TEŞEKKÜRLER

Bio. Utku SEYİS



**Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı ve Kordon Kanı Bankası  
2017**



[www.aferez.org](http://www.aferez.org)