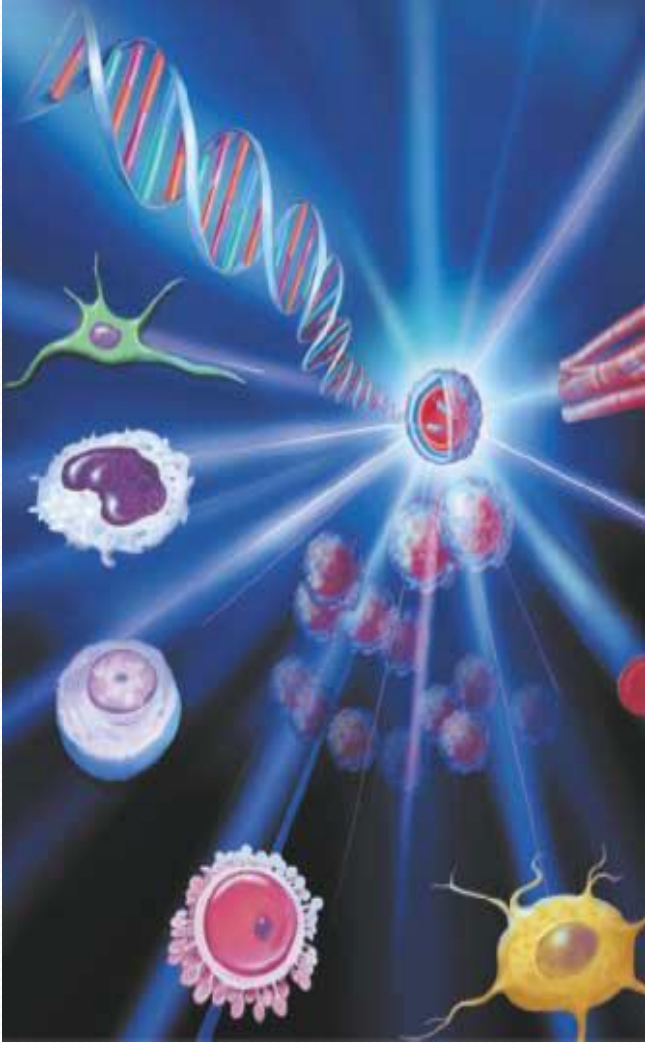




# KÖK HÜCRE MANÜPÜLASYONLARI

**Bio. Zerrin ERTAŞ**  
**Gülhane Eğitim ve Araştırma**  
**Hastanesi**

# KÖK HÜCRE NEDİR?



- Kök hücre, öncül bir hücredir.
- -Sınırsız bölünebilme,  
-Kendini yenileme,  
-organ ve dokulara dönüşebilme  
yeteneğine sahiptir.

# **KÖK HÜCRE**

## **GELİŞİMİNİN TARİHÇESİ**

- ❖ 1960'lı yıllarda ameliyatla alınan kök hücreler,
- ❖ İlerleyen yıllarda vücutta dolaşan kandaki kök hücreler,
- ❖ 80'li yılların başında, yeni doğan bebeklerin kordon kanında da kök hücreler,  
tedavide kullanılmaya başlanmıştır.
- ❖ 1998 yılında ABD'li bilim adamı James Thomson ve ekibi, ilk defa “insan embriyonik kök hücrelerini” laboratuvarda embriyondan ayıştırdılar ve çoğalttılar.



# KÖK HÜCRE KAYNAKLARI

# **NAKİLLER İÇİN KULLANILAN KÖK HÜCRENİN OLASI 3 KAYNAĞI VARDIR**

- **KEMİK İLİĞİ**
- **PERİFERİK KÖK  
HÜCRE**
- **KORDON KANI**

# KEMİK İLİĞİNDEN KÖK HÜCRE TOPLANMASI



- Genel anestezi
- Sınırlı kök hücre toplanır
- Yüksek enfeksiyon riski
- Engraftman süresi uzun

# PERİFERİK KANDAN KÖK HÜCRE TOPLANMASI



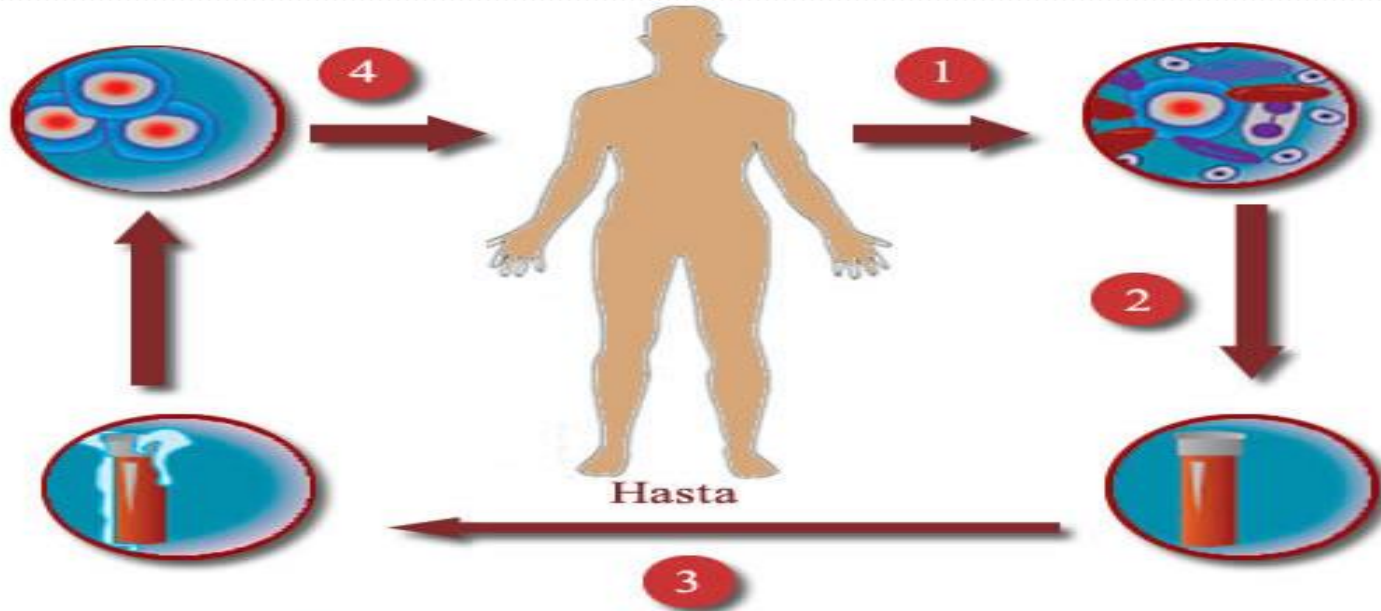
- Toplama işlemi kolaydır
- Genel anestezi gerektirmez
- Yüksek sayıda hücre toplanır
- Engraftman süresi kısadır
- GCS-F yan etkisi mevcut

# KÖK HÜCRE NAKİL ÇEŞİTLERİ

- OTOLOG KÖK HÜCRE NAKLİ
- ALLOGENİK KÖK HÜCRE NAKLİ



# OTOLOG KÖK HÜCRE NAKLİ



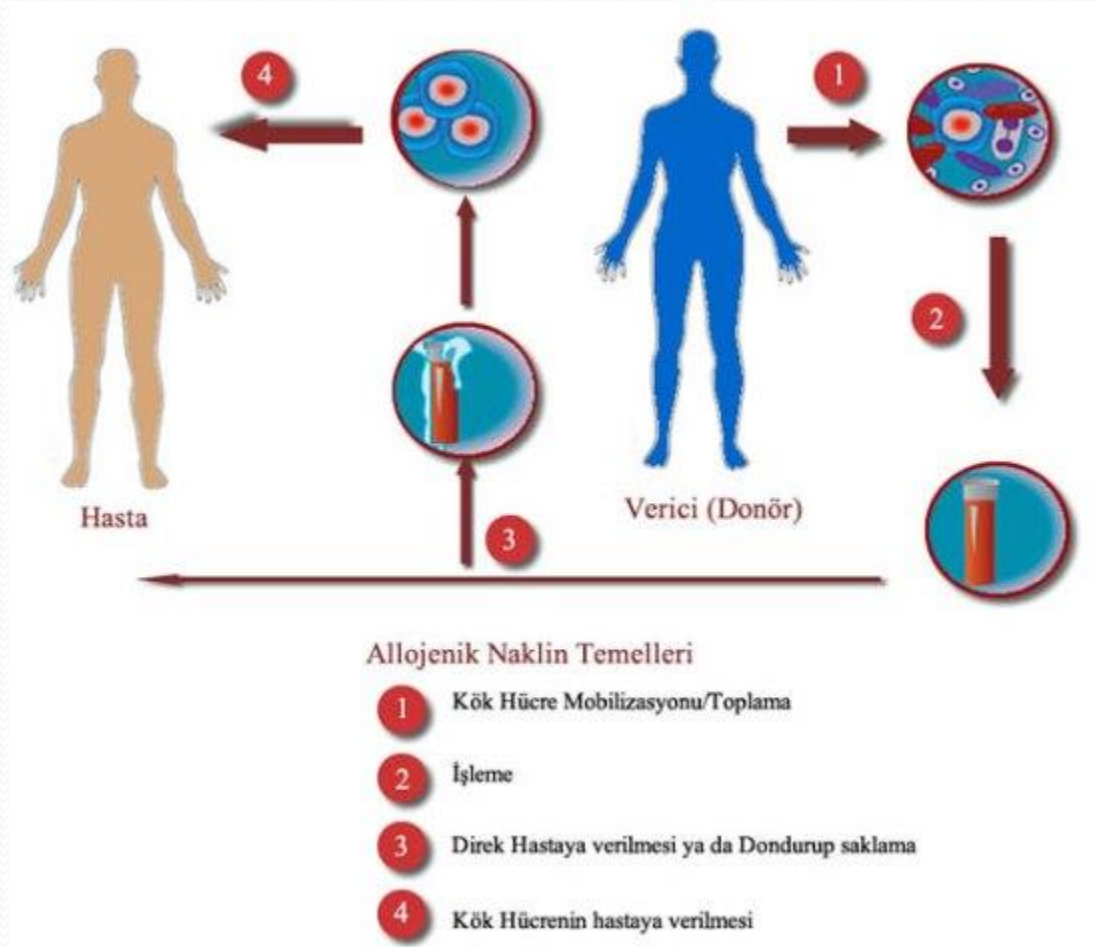
## Otolog Naklin Temelleri

- 1 Toplama
- 2 İşleme
- 3 Dondurup saklama
- 4 Hastaya geri verme



- \* Normal koşullarda hücre manipülasyonuna gerek yoktur.
- \* Eğer manipülasyon ihtiyacı varsa bu “volüm azaltma” nedeniyle olabilir.

# ALLOJENEİK KÖK HÜCRE NAKLİ



# ALLOGENEİK NAKİLLERDE HANGİ KÖK HÜCRE KAYNAĞININ KULLANILACAĞI

- Kan grubu uyumu
- Vericinin sağlık durumu
- Verici tercihine göre belirlenir.



**\* Yüksek doz kemoterapinin etkinliğinden faydalanmanın yanı sıra GVT etkisi oluşturmak asıl hedeftir.**

**\*Hücre manipülasyonuna gereksinim var.**

# ALLOJENEİK KÖK HÜCRE NAKLİNDE KARŞILAŞILAN SORUNLAR

## ÜRÜN KAYNAKLI SORUNLAR


- Hemoliz
- Eritrosit engraftmanında  
gecikme
- Graft reddi riski
- GVHH

## ÇÖZÜM


- Plazma azaltımı
- Eritrosit azaltımı
- Hücre sel manipölasyonlar
  - Pozitif seleksiyon
  - Negatif seleksiyon


# KORDON KANINDAN KÖK HÜCRE NAKLİ




- 
- Doğum esnasında bebeğin göbek kordonundan elde edilir.
  - Allojenik kök hücre nakli için kullanılmak üzere kordon kanı bankalarında saklanır
  - Doku uygun akraba veya akraba dışı vericisi olmayanlarda tercih edilmektedir.
  - Ürün hacminin az olması kısıtlayıcı bir özelliktir.



- 
- Göbek kordonu HKH'leri içinde bulunan eritrositlerin sayısı kriyoprezervasyon öncesinde ürünün hacmini standardize etmek amacıyla genellikle azaltılır.
  - Kordon kanında eritrositlerin azaltılması, diferansiyel sedimentasyon ve yoğunluk gradient santrifüjü ile gerçekleştirilir.

- 
- İlk başlarda göbek kordonu ürünleri belirgin bir işleme tabi tutulmadan yalnızca kriyoprezervasyona tabi tutulurdu.
  - Daha sonra saklama alanlarındaki sınırlamalar nedeni ile bir çok laboratuvar plazma ve eritrositlerin hacmini azaltmak amacıyla işleme tabi tutmaya başladı.

- 
- HKH(GK) ürünleri tipik olarak 20 mL'lik hacimlerde dondurularak saklanmaktadır.
  - Bu şekilde saklanan ünitelerde bulunan segmentler gerekli olduğunda doğrulama amacıyla yapılan ileri testleri mümkün kılmaktadır.



Elde yapılan işlemlerde

- plazma santrifüj ile eksiltilirken .
- Eritrositler HES sedimantasyon ile eksiltilmektedir

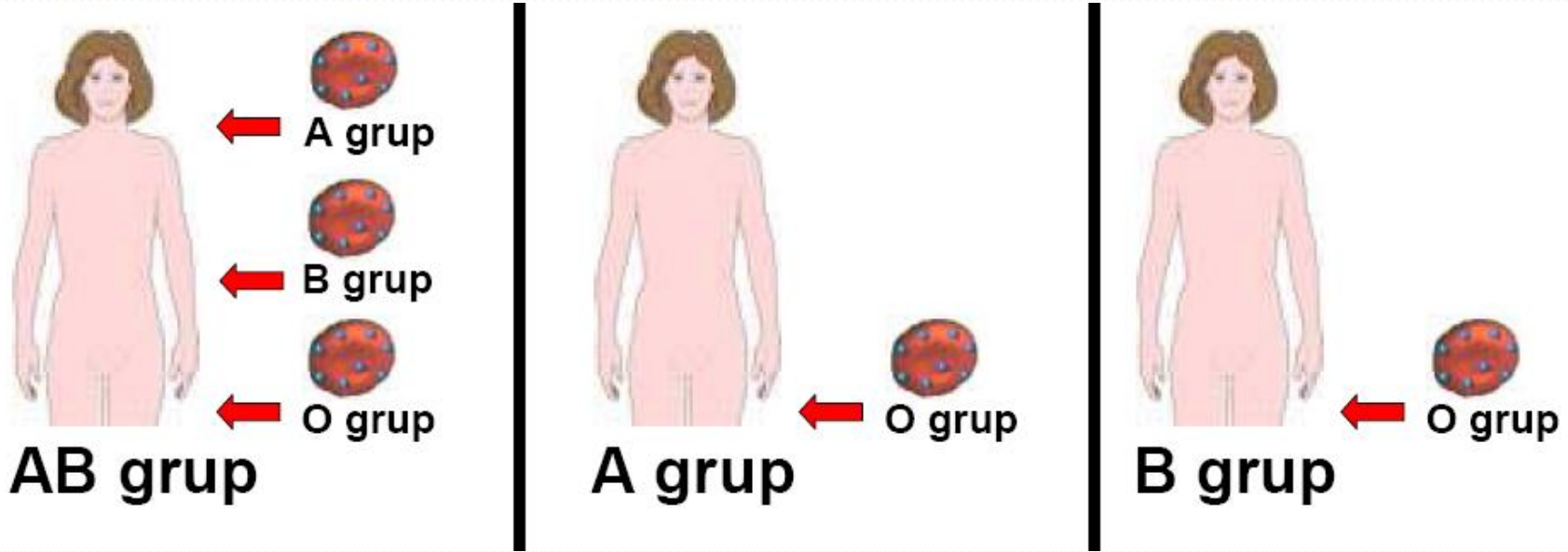


Kordon kanındaki MNH zenginleřtirmesini gerçekleřtirmek  
için piyasada otomatik cihazlarda bulunmaktadır.

# PLAZMA / ERİTROSİT DEPLESYONU

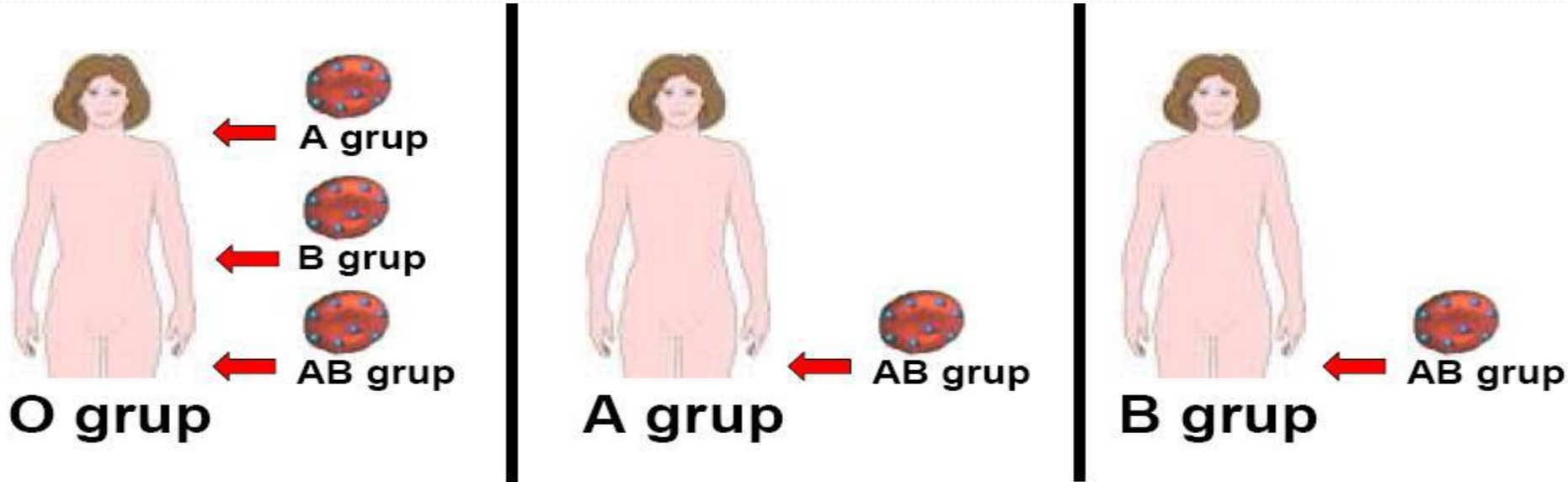
- Hematopoietik Kök Hücre Nakil Ürünlerinde;
- Alıcı ve donör arasında ABO uyumsuzluğu (%40-50)
  - Major uyumsuzluk → % 20-25
  - minör uyumsuzluk → % 20-25
  - çift yönlü uyumsuzluk → % 5

# MİNÖR UYUMSUZLUK



- Burada sorun verici plazmasında bulunan antikorların alıcı eritrositlerinde akut ama düşük şiddetli hemolize neden olmasıdır.
- Bu tabloda geç hemoliz donör B lenfositlerinden salgılanmaya devam eden antikorlar nedeniyle oluşsa da karakteri kronik ve düşük şiddetlidir.
- **Üründen Plazma azaltımı yapılmalıdır.**

# MAJOR UYUMSUZLUK



- Buradaki sorun ise alıcı plazmasında bulunan antikorların verici eritrositlerinde erken dönemde oluşturacağı akut ve şiddetli hemolizdir.
- Bu tablodaki sorun; bazen de donör kaynaklı eritrositlerin ortaya çıkması ile alıcı serumunda devam eden alıcı antikorlarının geç dönemde meydana getireceği kronik hemoliz ve eritrosit engraftmanındaki gecikmedir.
- Üründen Eritrosit azaltımı yapılmalıdır..



# MİNÖR + MAJOR UYUMSUZLUK



**A grup**

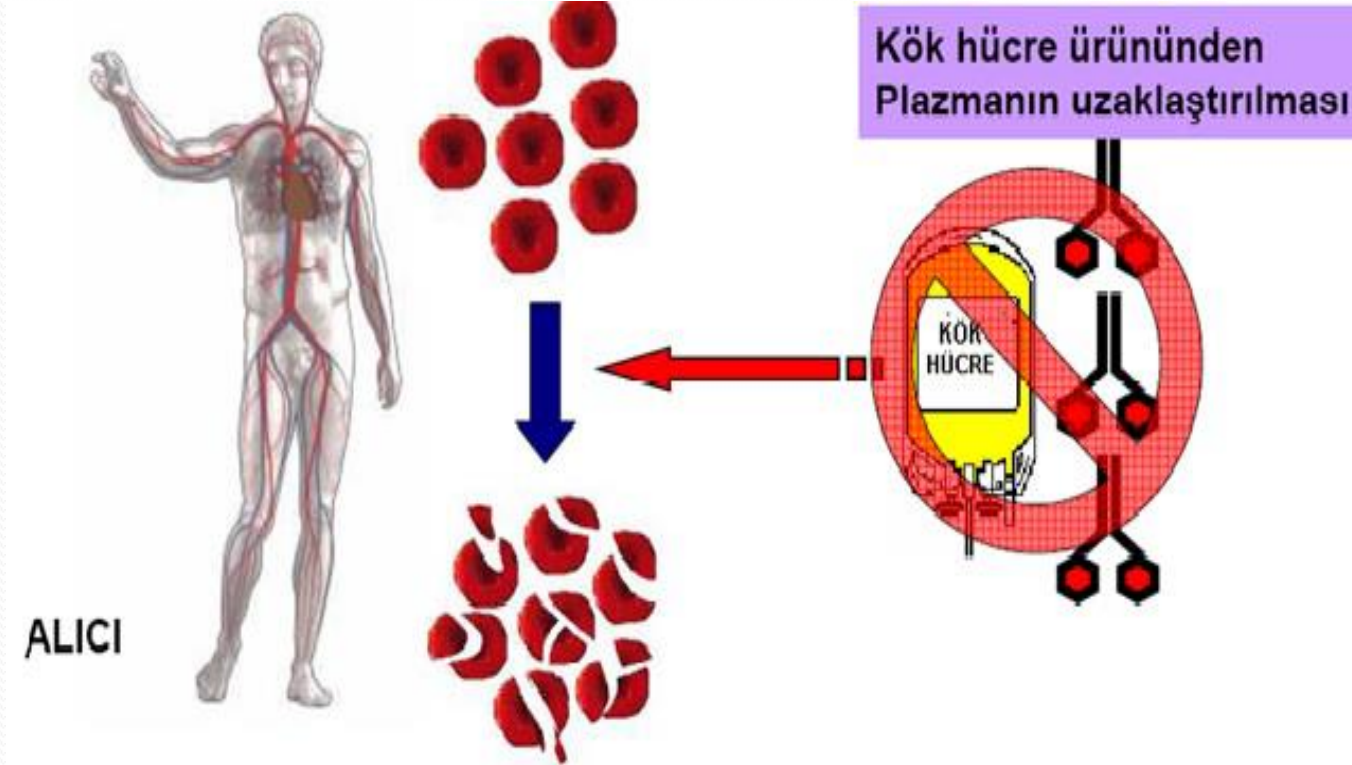



**B grup**




- Buradaki sorun ise alıcı ve verici plazmasında karşılıklı antikorların varlığıdır. Bu nedenle alıcı ve verici grup eritrositlerde akut ve kronik dönemde hemoliz kaçınılmazdır
- Üründen hem plazma hem de eritrosit azaltımı yapılmalıdır.

# PLAZMA DEPLESYONU



- 
- Minör ABO grubu uyumsuzluklarında ve,
  - Minör + Major ABO grubu uyumsuzluklarında, uygulanmaktadır



Alıcıya sunulan yabancı bir ABO izohemaglutinin söz konusudur.

( İzohemaglutinin; Alıcı kan grubu antijenlerine karşı vericide bulunan antikorlardır.)

İzohemaglutinin titresi

1:128 > ise plazma azaltması mutlaka yapılır

1:60 > ise tablo klinik olarak tartışılmalıdır.

# PLAZMA DEPLESYONU YÖNTEMLERİ

- 1) HES + Santrifüj
- 2) HES + 2 saat Bekleme
- 3) Hücre işlemcisi

# HES + Santrifüj

- Ürün volümününün %20 si kadar HES (%6lık) ürün Üzerine eklenir,
- Ürün ile HES'in homojen karışımı sağlanır.
- Torba 2500 rpm de 15 dk santrifüj edilir.
- Buffy coat hattına kadar plazma uzaklaştırılır.



# **HES + 2 SAAT BEKLEME**

- **Ürün volümünün %20 si kadar HES ürün Üzerine eklenir,**
- **Ürün ile HES'in homojen karışımı sağlanır.**
- **Torba 120 dk boyunca asılı olarak bekletilir.**
- **Buffy coat hattına kadar plazma uzaklaştırılır.**

# 3- HÜCRE İŞLEMCİSİ

- Manuel olarak herhangi bir işlem yapılmaz.
- Cihazlardan özel programlar seçilerek otomatize işlem yapılır.

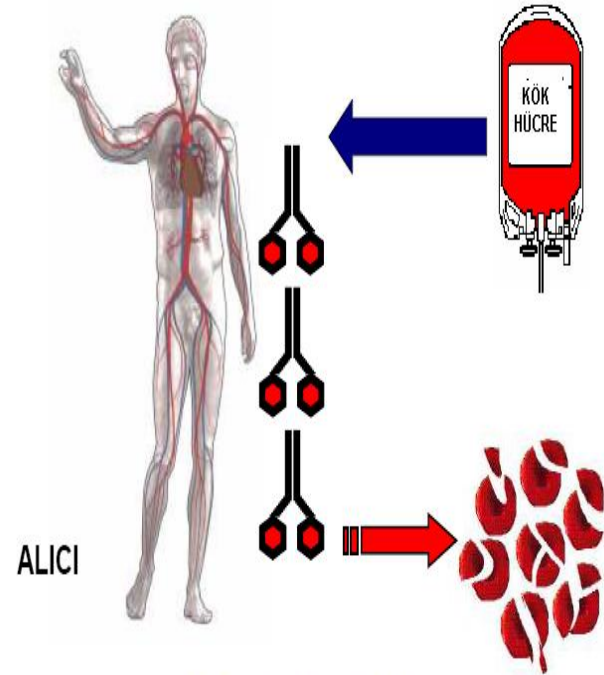




# ERİTROSİT DEPLESYONU

- Majör ABO grubu uyumsuzluklarında,
- Minör + Major ABO grubu uyumsuzluklarında,
- Alıcıya ve/veya vericiye sunulan yabancı bir ABO kan grubu antijeni söz konusudur.
- Hematokrit oranı % 3-5 den küçük olmalı.

Yüksek oranda eritrosit içeren  
kök hücre ürünleri



Major/çift yönlü uyumsuzluklarda oluşur

# **ERİTROSİT DEPLESYONU YÖNTEMLERİ**

- 1- HES + Santrifüj**
- 2- HES + 2 saat bekleme**
- 3- Dansite gradient**
- 4- Otomatize Sistemler**

# 1- HES + Santrifüj

- Ürün volümününün %20 si kadar HES (%6lık) ürün Üzerine eklenir,
- Ürün ile HES'in homojen karışımı sağlanır.
- Torba 2500 rpm de 15 dk TERS santrifüj edilir.
- Renk değişim hattına 1cm kalana kadar eritrosit uzaklaştırılır.

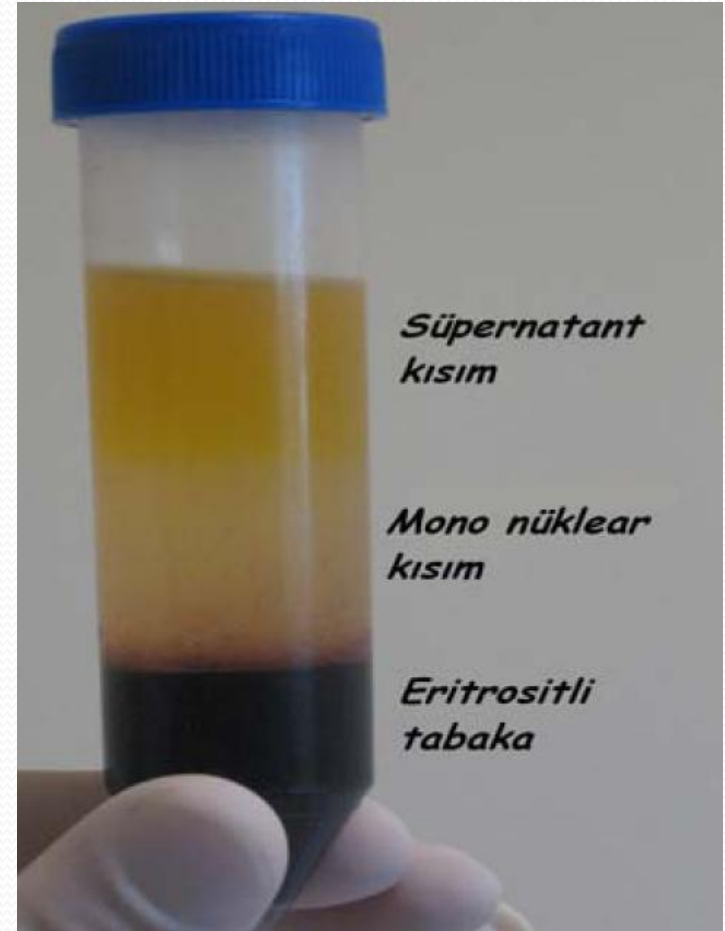


## **2- HES + 2 saat bekleme**

- **Ürün volümünün %20 si kadar HES ürün  
Üzerine eklenir,**
- **Ürün ile HES'in homojen karışımı sağlanır.**
- **Torba 120 dk boyunca TERS ve asılı olarak  
bekletilir.**
- **Renk değişim hattına 1cm kalana kadar  
eritrosit uzaklaştırılır.**

# 3- Dansite gradient

- Ürün hacminin yarısı kadar ficol üzerine yavaşça yayılır.
- 1200 rpm de 25 dk santrifüj edilir.
- Eritrosit hattına kadar buffy coat tabakası toplanır.
- Yıkama gerektirdiğinden çok fazla tercih edilmez.



# 4- Otomatize Sistemler

- Aferez cihazları

# ALLOJENEİK KÖK HÜCRE NAKLİNDE KARŞILAŞILAN SORUNLAR

## ÜRÜN KAYNAKLI SORUNLAR

- Hemoliz
- Eritrosit engraftmanında  
gecikme
- Graft reddi riski
- GVHH

## ÇÖZÜM

- Plazma azaltımı
- Eritrosit azaltımı
- Hücre sel manipölasyonlar
  - Pozitif seleksiyon
  - Negatif seleksiyon

# GREFT REDDİ

## NEDENLERİ

- Alıcı bağışıklığının yeterince baskılanamaması
- Vericiden gelen CD34 sayısının ve kalitesinin düşük olması



# **GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞI**

- Vericinin T lenfositlerinin alıcının hedef organlarına saldırması durumudur.
- Allogeneik hematopoetik kök hücre naklinde izlenen en sık ve önemli komplikasyondur.



# **GRAFT VERSUS HOST HASTALIĞI**

## **İnsidans ve Şiddeti;**

- **HLA uyum derecesi,**
- **HKH kaynağı**

## **Önlem;**

- **Hücresel Manüplasyonlar**

# HÜCRESEL MANÜPLASYONLAR

## Pozitif seleksiyon

- CD34 Seleksiyonu

## Negatif seleksiyon

- CD 3 Depleasyonu
- CD3 / CD19 Depleasyonu
- TCR Alfa Beta Depleasyonu
- TCR Alfa Beta / CD 19 Depleasyonu
- TCR Alfa Beta / APC Depleasyonu

- Allojenik transplantlarda GVHH 'yi önlemek için T hücreler ayrılarak negatif seleksiyonla T lenfosit yönünden fakirleştirilir
- Alternatif olarak da kök hücre pozitif seleksiyonla seçilerek T lenfositler de dahil olmak üzere istenmeyen hücreler uzaklaştırılmış olur.
- Bunların dışında otolog nakillerde bazen tümör hücrelerinin arındırılması için toplanan hücreye bazı işlemler uygulanır.

- Allogenik nakillerde nihai hedef engraftman yetersizliği riskini arttırmadan GVHH'nı azaltmaktır.
- **İşlem başarısı ;**
  - ✓ ayırma tekniklerine ,
  - ✓ infüze edilen total CD34 (+) hücre sayısına
  - ✓ kalan lenfositlerin sayısına ve içeriğine bağlıdır.

- T lenfosit sayısının ,hastanın vücut ağırlığının  $1 \times 10^4/\text{kg}$  ‘dan daha az olacak şekilde azaltılması ,HLA-haplotip uyumsuz transplantlarda bile şiddetli GVHH ‘yi önleybilmektedir.
- HLA uyumlu olan akraba veya akraba dışı transplantlarda minmal CD34 dozu olan  $2 \times 10^6/\text{kg}$  ‘a ulaşması gerekmektedir.
- HLA haploidantik transplantlarda greft yetmezliğini önlemek için  $10 \times 10^6/\text{kg}$  veya daha fazla CD34 hücre dozuna ihtiyaç dalmaktadır


- Ex-vivo lenfosit deplesyonu veya CD34 (+) seleksiyonu için kullanılan en yaygın yöntem ;  
spesifik lenfositlere veya kök hücre epitoplarına karşı yönelen monoklonal antikorların kullanıldığı ve manyetik boncuklarla işaretlenmenin yapıldığı immünomanyetik ayırma tekniğidir.



Bu metotla;

- Çok sayıda ve yüksek derecede saflaştırılmış CD34(+) hücreler,
- İstenildiği kadar düşük sayıda T hücreleri
- T-ve B- hücreleri
- Lenfosit alt kümeleri ile kombine olan diğer kök hücre kompozisyonlarının  
Üretilmesine de olanak sağlanmaktadır.





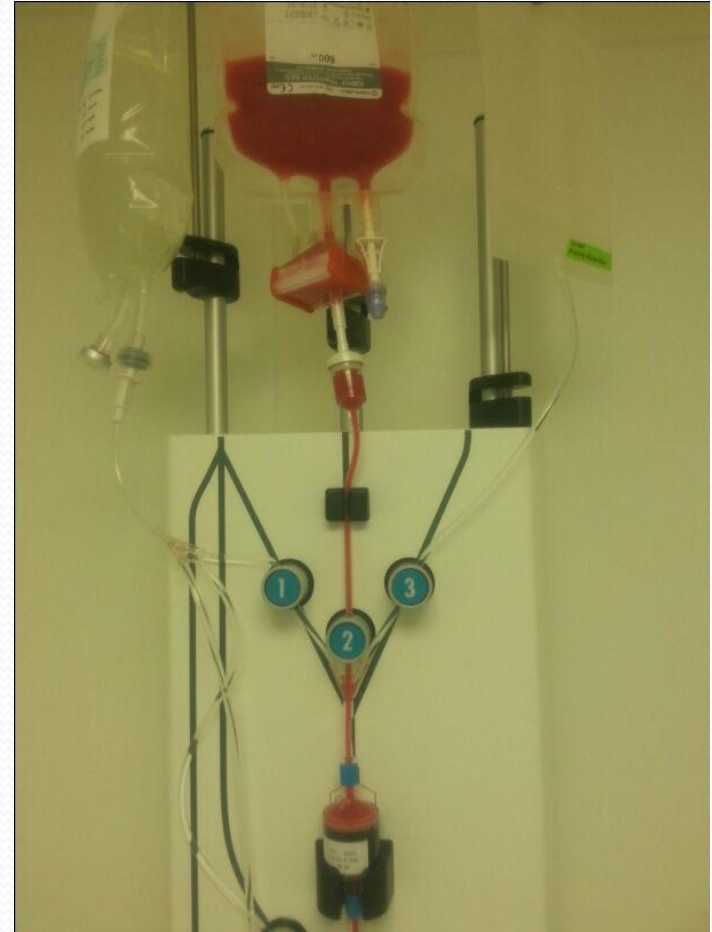
T lenfosit sayılarının veya alt tiplerinin kritik sayının altına düşmesinin sonucu olarak;

- İmmün yapılanmada gecikme
  - GVT etkisinde kayıp
- gibi olumsuz etkiler olabilir

# CD 34 SELEKSİYONU

## Avantajları;

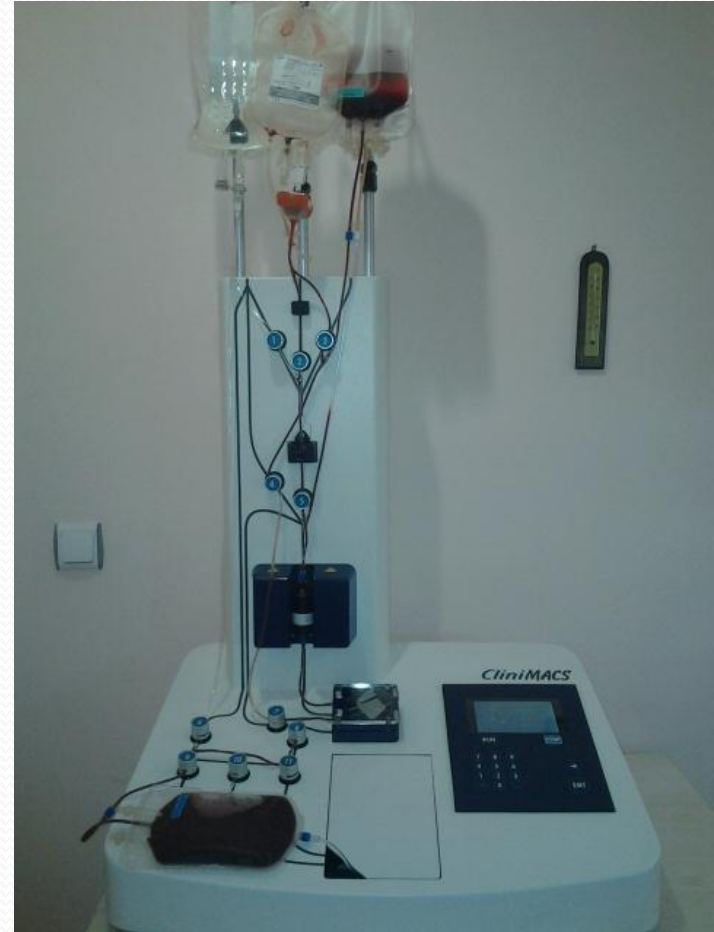
- Kök hücre sayısı yüksek,
- GVHH riski düşük



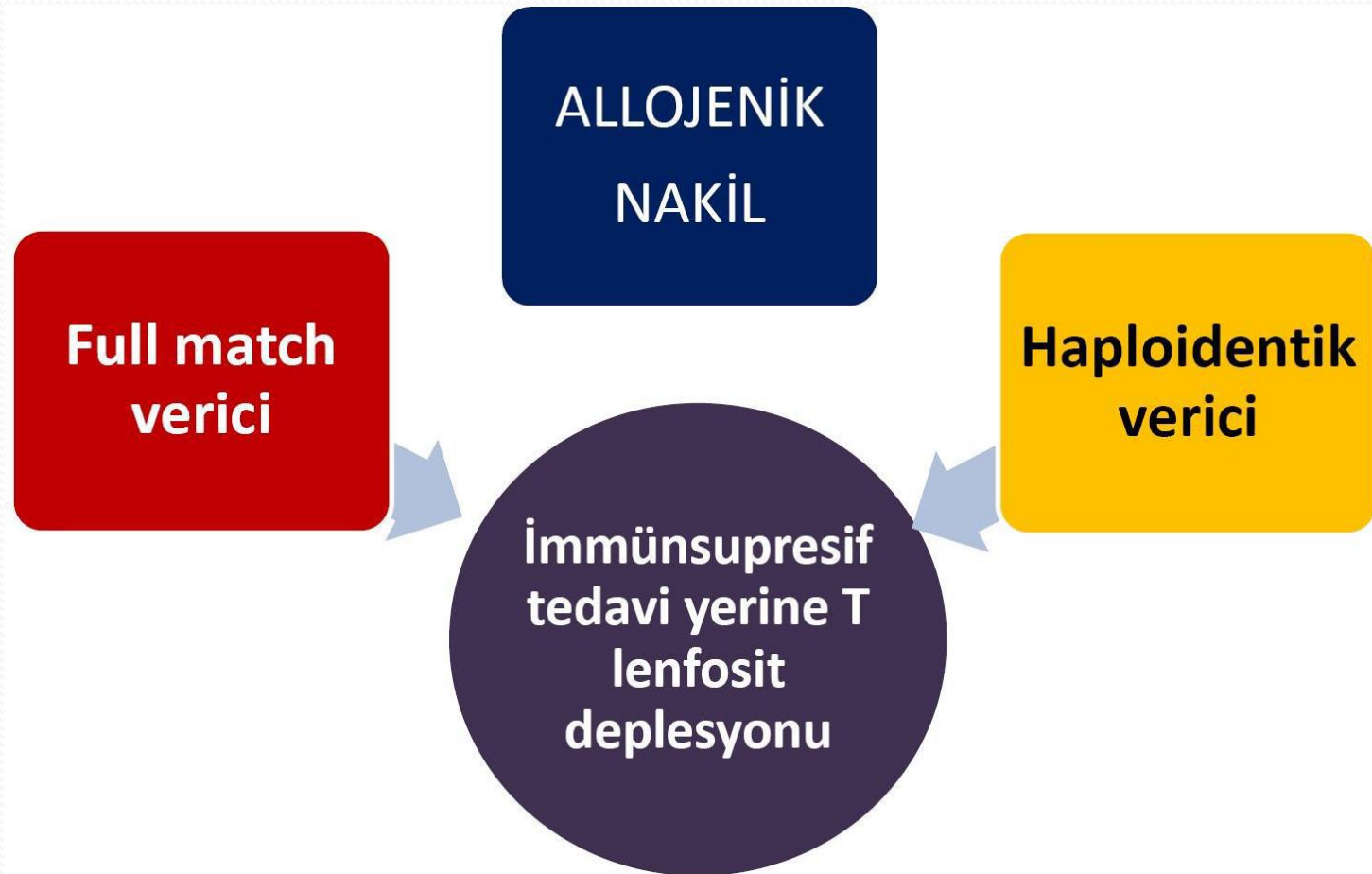
# CD 34 SELEKSİYONU

## Dezavantajları

- Engrafman yetmezliği olabilir.
- T hücre sayısı düşük ( $<10.000/\text{kg}$ ),
- Geç İmmün yapılanma, ağır enfeksiyonlar ve yüksek mortalite
- Yüksek relaps sıklığı



# T LENFOSİT DEPLESYONU



# T LENFOSİT DEPLESYONU

- T Lenfositler GVHH neden olan hücrelerdir.
  - Alfa beta TCR pozitif T lenfositler: GVHH sorumlu tip
  - Gama Delta TCR pozitif T lenfositler: GVT 'den sorumlu tip
- Ex-vivo ortamda T Lenfositler Üründen ayrılarak uzaklaştırıldığı takdirde GVHH önlenebilmektedir.
- Toplanan üründe 50.000 /kg dan az T hücresi kalana kadar depleksyon yapılması GVHH riskini ortadan kaldırmak için yeterlidir.

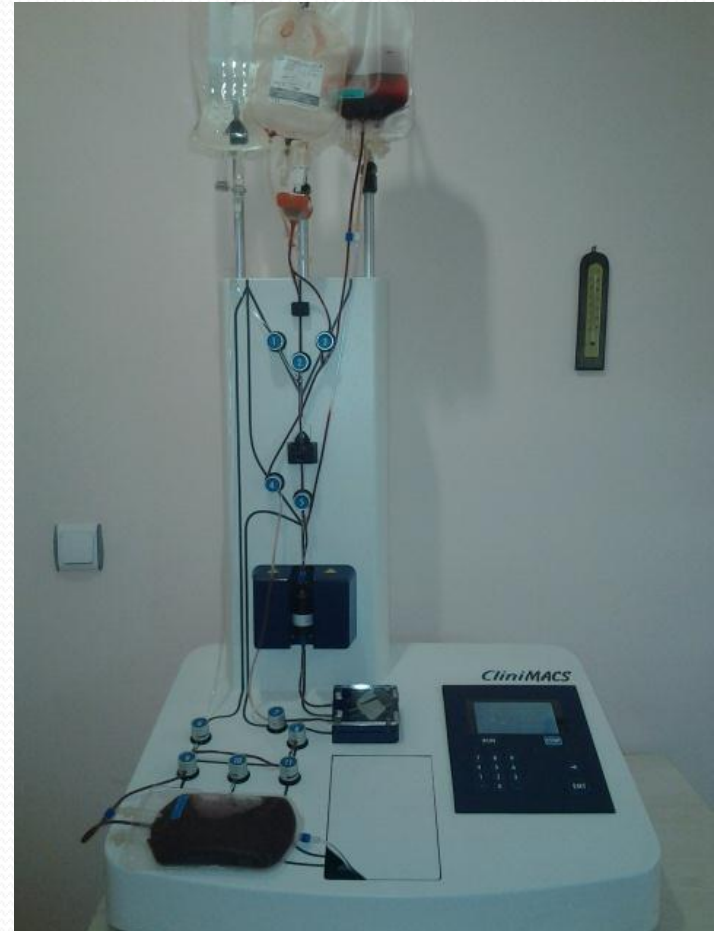
# T LENFOSİT DEPLESYONU

## Avantajları

- GVHH riski düşük

## Dezavantajları;

- Engrafman gecikmesi veya olmaması
- GVT etkisinin ortadan kaybolması
- İmmün düzelmenin gecikmesi



# CD3/CD19 HÜCRE DEPLESYONU

## Avantajları;

- T Lenfosit depleksyonuna göre daha az GVHH riski

## Dezavantajları;

- Engraftman yetmezliği ve Kronik GVHH riski vardır.

# TCR ALFA BETA DEPLESYONU

## Avantajları;

- Gama delta+ T hücreler mevcuttur (Alloreaktif değildir, anti-enfeksiyöz ve anti-tümör etki)
- GVT etkisi yüksek
- Engrafman oranı yüksek

## Dezavantajları;

- GVHH riski azda olsa var



# TCR ALFA BETA/CD19 DEPLESYONU

## Avantajları;

- T hücre sayısı düşük
- GVT etkisi yüksek
- GVHH riski düşük

## Dezavantajları;

- Engrafman oranı TCR Alfa-Beta depleksiyonuna göre düşük
- Kronik GVHH riski var.

# TCR ALFA BETA /APC DEPLESYONU

## Avantajları;

- APC lerin deplesyonu  
(T ve B lenfositlerin aktivasyonundan sorumlu temel hücreler)
- T hücre sayısı düşük
- GVT etkisi yüksek
- GVHH riski yok
- Engrafman oranı yüksek

## Dezavantajları;

- Kronik GVHH riski var.

# SONUÇ

MANİPÜLASYON ŞEKLİ	ENGRAFMAN YETERSİZLİĞİ	GVT	GVHH
CD34	++	+	-/ cGVHH
CD3 / CD19	++	++	-/ cGVHH
TCR ALFA BETA / CD19	+	+++	-/ cGVHH
TCR ALFA BETA	-	+++	-
TCR ALFA BETA / APC	-	+++	-/ cGVHH

TEŞEKKÜRLER