

**Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**İç Hastalıkları Anabilim Dalı**  
**Hematoloji Bilim Dalı**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU**  
**DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**PROGRAMLI VE MEKANİK DONDURMA METODLARI İLE**  
**KRİYOPRESERVASYONU SAĞLANAN HEMATOPOETİK**  
**KÖK HÜCRELERİN CANLILIK, KOLONİ OLUŞTURMA**  
**KAPASİTESİ VE CD34(+) HÜCRE SAYISI AÇISINDAN**  
**KARŞILAŞTIRILMASI**

**T 91804**

**Hematoloji Uzmanlık Tezi**  
**Dr. S. Sami Kartı**  
**İstanbul-2000**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. MAHMUT BAYIK**

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hastanesi, Hematoloji-İmmünoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma boyunca bana yön veren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mahmut BAYIK ve Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmanın yürütmesinde katkılarından dolayı Yeşim ELBİR, Sema AKTAŞ, Nebiye SOFU ve Emel EKŞİOĞLU'na teşekkür ederim. Hematoloji ihtisası boyunca bana emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Tevfik AKOĞLU, Prof. Dr. Mahmut BAYIK, Prof. Dr. Ercüment OVALI ve Yrd. Doç. Dr. Siret RATİP'e bundan sonraki meslek hayatımda layık olmaya çalışacağım. Ayrıca ihtisasım boyunca, birlikte çok güzel, mutlu ve huzurlu günler geçirdiğim dostlarım Ercüment OVALI, Siret RATİP, Mustafa ÇETİNER ve Cafer ADIGÜZEL'e saygılarımı ve sevgilerimi sunarım.



**İÇİNDEKİLER****Sayfa No:**

1- Giriş ve Amaç	1
2- Genel Bilgiler	2-5
2.1- Dondurma Tekniği	4
3- Materyal ve Metod	6-11
3.1- Periferal Mononükleer Hücrelerin toplanması	6
3.2- Hücrelerin Dondurulmaya Hazırlanması ve Dondurulması	6-7
3.3- Canlılığın Değerlendirilmesi	7-8
3.4- CD34(+) Hücrelerin Değerlendirilmesi	8-9
3.5- Mixt CFU analizi	9-11
4- İstatistiksel Değerlendirme	11
5- Sonuçlar	12-17
5.1- Hücre Canlılık Sonuçları	12-13
5.2- Koloni Sayım Sonuçları	14-15
5.3- CD34(+) Hücre Sonuçları	16-17
6- Tartışma	18-22
7- Özet	23-24
8- Özet (İngilizce)	25
9- Kaynaklar	26-31

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Otolog ve allojeneik periferik kök hücre transplantasyonu şu anda tüm dünyada yaygın olarak uygulanmaktadır. Başarılı bir kök hücre transplantasyonu için hücre toplama yöntemleri kadar hücre dondurma ve saklama yöntemleri de önemlidir. Yeterli hücre toplandıktan sonra, eğer hücreler uygun yöntemlerle dondurulmaz ve saklanmazsa hücre kaybı çok olacağından transplantasyon başarısız olacaktır. Bu nedenle mobilizasyondan, alıcıya transfüzyona kadar her evre çok önemlidir. Periferik kan kök hücreleri, genellikle programlı dondurucularla kontrollü (Hız-kontrollü programlı dondurma) olarak dondurulmakta ve sıvı azot içinde saklanmaktadır. Fakat bu tekniğin iki dezavantajı vardır: 1- programlı dondurma kompleks ve pahalı ekipman gerektirir, 2- daha çok zaman ve iş gücü gerektirir. Ayrıca kontamine azot tanklarından Hepatit B transmisyonu bildirilmiştir (1). Bu yöntemden çok daha basit bir yöntemle hücrelerin dondurulup saklanabildiğini gösteren çalışmalar vardır(2-5). Mekanik dondurma(MD) bu metod için -80 C'lik bir elektrik dondurucudu gereklidir. MD metodunda daha az dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldığından, çözülme işlemi sırasında kök hücrelerin canlılığı daha iyi korunabilir ve reinfüzyon sırasında alıcıda DMSO'ya bağlı yan etkiler azaldığı düşünülmektedir. Biz bu çalışmada programlı dondurma ve mekanik dondurma yöntemlerini hücre canlılığı, CD34 kaybı ve koloni oluşturma yetenekleri açısından karşılaştırmayı planladık.

## 2.GENEL BİLGİLER

Kriyopreservasyonun amaçları, canlı hücreleri mümkün olduğu kadar yüksek canlılık oranı ve fonksiyonel kapasite ile tekrar resüsite edebilmek ve hastaya verirken de zarara yol açmamaktır. Hücrelerin toplanması ve reinfüzyonu arasında 72 saatten fazla zaman geçecekse, hücrelerin viabilitelerinin ve engrafman potansiyellerinin korunacak şekilde dondurularak saklanması gerekir (6). Hücrelerin dondurularak saklanması genellikle otolog transplantasyonlarda gerekmele beraber, bazen allojeneik transplantasyonlarda da gerekebilir. Hücrelerin 0 ile 4 C'ye kadar soğutulması kısa dönem saklanma (12-36 saat) için yeterlidir (7-10). Fakat şu anda uygulanan tedavi metodlarına göre otolog transplantasyonlarda genellikle, allojeneik transplantlarda da bazen, kök hücrelerin orta veya uzun vadeli saklanması gereklidir. Hücrelerin hasarını önleyen veya minimuma indiren optimal kriyopreservasyon ve saklama metodları henüz tanımlanamamıştır. Soğutma sırasında oluşan buz kristalleri hücre hasarının temel nedenidir. Hızlı soğutma sırasında oluşan hücre içi veya yavaş soğutma sırasında oluşan hücre dışı buz kristalleri, hücre zarının parçalanmasına ve hücre dehidrasyonuna yol açarlar. Kriyoprotektanların kullanılması, buz kristallerinin oluşumunu azaltarak ısı şoku denen olayı önler. Herkes tarafından kabul edilen standart koruyucu karışım bulunmamakla birlikte, DMSO kök hücrelerin dondurulması sırasında kullanılan vazgeçilmez kriyoprotektandır. Hızla değişen çevresel koşullarda hücre membranını geçebilme kabiliyeti ile, bu ajan hücre zarını stabilize eder. Böylelikle DMSO,

donma esnasında intrasellüler buz kristalleri ve geçiş fazı sırasında açığa çıkan ısı ile hücrenin zarara uğramasını engeller. Fakat bu özelliklerinin yanında, proteinlerin hidrofobik rezidülerine bağlanarak proteinlerin denatürasyonuna ve destürüksiyonuna yol açabilir(11). Ayrıca alıcılarda DMSO'ya bağlı serum hiperosmolaritesi (12) ve ciddi kardiyak aritmiler de (13) rapor edilmiştir. DMSO'nun insanlar için akut toksik dozu bilinmemektedir. İki hastada kriyopreserve periferik kök hücre infüzyonundan sonra reversibl ensefalopati bildirilmiştir (14). Her iki vakada da ürün %10 DMSO içermekteydi ve bir hastaya toplam 2254ml, diğerine 1198ml ürün verilmişti. Bu hacimlerin DMSO karşılıkları sırasıyla 249.7g ve 132.7g DMSO yapmaktadır. Raporla hasta kiloları belirtilmemekle beraber bu miktar DMSO, yaklaşık olarak 2g/kg'a karşılık gelmektedir. Bu nedenle ürün içinde infüze edilen DMSO miktarı 1g/kg'ı geçmemelidir. Eğer bu oran geçilecekse, kalan ürün ertesi gün verilmelidir. Bir diğer yöntem ise ürün çözüldükten sonra yıkayarak DMSO'dan arındırmaktır (15), fakat bu yöntem ile hematopoetik kök hücre kaybı çok fazla olduğundan tavsiye edilmemektedir. Bu nedenle hücre süspansiyonuna katılan DMSO, dondurulan hücrenin ısı değişimine bağlı zarara uğramasını engelleyecek kadar çok, çözülme sırasında hücreye ve reinfüzyon sırasında hastaya zarar vermeyecek kadar az olmalıdır. Kemik iliği progenitör hücrelerinin 2 saatin sonunda DMSO'nun zararlarına dirençli olduğunu gösteren çalışmalar (16,17) bulunmasına rağmen, DMSO oda ısısında hücreye toksik olduğu genel olarak kabul edildiğinden, DMSO'nun hücre süspansiyonuna

eklenmesi +4 C'ta, yavaş ve sabit hızla yapılmalıdır. DMSO'ya ek olarak hydroxyethyl starch (HES) eklenmesinin çözülme sırasında clumpingi önlediği ve çözülme esnasındaki hücre dışı hiposmolariteyi engellediği iddia edilmektedir (5,18). Programlı dondurmada değişik oranlarda DMSO kullanılmakla beraber genellikle kabul edilen DMSO oranı %10'dur, mekanik dondurmada da %5-8 oranında DMSO kullanılmıştır. DMSO'in konsantrasyonunun azaltılması yukarıda da bahsettiğimiz gibi çözülme sırasında hücre hasarının azalması anlamına gelebilir, fakat bu iki yöntemi bu açıdan karşılaştıran bir çalışma literatürde yoktur.

### **2.1.Dondurma tekniği**

Geleneksel olarak, dondurma işlemi, sıvı azotun bir bölmeye kontrollü olarak pompalandığı ve dolayısı ile hücre süspansiyonunun ısısının sabit bir hızla düşürüldüğü (genellikle 2 C/dk) bir aletle yapılır. Geçiş fazı esnasında solüsyon tarafından çevreye ısı verildiğinden hücreler zarar görebilir. Bunu engellemek için bu fazda daha fazla sıvı azot pompalamak gereklidir. Mikroişlemci ile kontrol edilen dondurma makineleri olduğu gibi, solüsyonün ısısını dikkatlice gözleyerek azot akışının manuel olarak sağlandığı makineler de vardır. Soğutmanın geç fazları daha çabuk, dakikada 5 C şeklinde olur ve -120 C'a düşünce torbalar azot tankına konur. Hematopoetik kök hücreler sıvı azot tankına konulduğu gibi, buhar fazında da muhafaza edilebilir. Köpek modelinde yapılan bir çalışmaya göre azotun buhar fazında saklanan hematopoetik kök

hücreler, 6 aya kadar transplantasyon potansiyellerini korumuşlardır, fakat 1-2 yıl geçtikten sonra, hücre canlılıklarında ve engrafman kapasitelerinde azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar bu durumu, azot tankının kapağının sık sık açılması sonucu oluşan ani sıcaklık değişimlerine bağlamışlardır (19).

İlk olarak 1991 yılında Makino ve arkadaşları hücre dondurma işinin daha ucuz, basit ve zahmetsiz bir yolunu tarif ettiler (5). Bu yöntem hücre solüsyonlarının direkt olarak -80 C'lık donduruculara konulmasıydı. Daha sonra başka araştırmacılar da bu yöntemi denediler ve gerçekten hücre viabilitesi, CFU-GM oranları ve engrafman özelliklerinin programlı dondurma ile benzer sonuçlarının olduğu görüldü. Katayama Y ve ark %6 HES ve %5 DMSO ve programlı dondurucu olmadan -80 C'de sakladıkları kök hücrelerde çözülmeden 30 ve 60 dakika sonra bakılan hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığını, fakat BFU-E ve CFU-GM oluşturma kapasitelerinin değişmediğini göstermişlerdir (20). Stiff ve arkadaşları da benzer metodlarla yaptıkları kriyopreservasyon ile hücre canlılığının korunduğunu ve engrafmanın sağlandığını gözlemişlerdir (10).



### **3.MATERYAL VE METOD**

#### **3.1.Periferal mononükleer hücrelerin toplanması**

PMNH'ler Cobe spectra, aferez cihazı kullanılarak sağlıklı donörlerden ve hastalardan, hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurulanlar Ekim-1995 ile Temmuz-1996, mekanik dondurma metodu ile dondurulanlar Eylül-1996 ile Mayıs-1999 tarihleri tarihleri arasında toplam 25 kişiden toplandı. Hastaların ve sağlıklı donörlerin demografik özellikleri tablo 1'de gösterilmiştir. Mobilizasyon rejimi olarak 10 g/kg G-CSF kullanıldı. G-CSF'in 4'üncü ve 5'inci günlerinde aferez işlemi yapıldı.

#### **3.2.Hücrelerin dondurulmaya hazırlanması ve dondurulması**

Hücrelerin optimum konsantrasyona getirilebilmesi için değişik miktarlarda otolog plasma kullanıldı. Mekanik olarak dondurulacak ürünlere %3 oranında hydroxyethyl starch (HES) ve %7,5 oranında dimethylsulfoksit (DMSO) eklenirken programlı olarak dondurulacak ürünlere %10 oranında DMSO eklendi. Altı kişinin hücreleri programlı yöntemle, 19 kişinin hücreleri mekanik yöntemle donduruldu, fakat her iki işlemin sonunda da hücreler sıvı azot tankına kaldırıldı. Mekanik dondurma işlemi için hücre solüsyonları 100'er mililitrelik torbalara kondu ve soğukla direk teması önlemek için torbaların tüm yüzeylerine 10 santimetre kalınlığında gazlı bez sarıldı. Torbalar direkt olarak -

80 C'lik dondurucuya kondu ve 24 saat sonra buradan alınarak sıvı azot tankına yerleştirildiler.

**Tablo 1:** Periferik kök hücreleri toplanarak, HKPD\* veya MD\*\* metoduyla dondurularak saklanan hasta ve sağlıklı donörlerin demografik özellikleri

Hasta No	Adı Soyadı	Cinsiyet	Yaş	Kök hücre türü	Saklama metodu	Hastalık	Toplanan MNC/kg	Toplanan CD34(+) hücre/kg	Saklama süresi (ay)
01	AÇ	E	28	Allogeneik	HKPD		4.28x10 <sup>8</sup>	3.42x10 <sup>6</sup>	60
02	EO	K	23	Otolog	HKPD	HL	3.80x10 <sup>8</sup>	3.80x10 <sup>6</sup>	57
03	FE	E	35	Otolog	HKPD	AML	2.08x10 <sup>8</sup>	1.90x10 <sup>6</sup>	55
04	GD	E	23	Otolog	HKPD	AML	8.74x10 <sup>8</sup>	1.04x10 <sup>7</sup>	52
05	GÖ	E	35	Otolog	HKPD	NHL	1.38x10 <sup>8</sup>	0.82x10 <sup>6</sup>	49
06	GŞ	K	35	Otolog	HKPD	KML	1.70x10 <sup>8</sup>	2.04x10 <sup>6</sup>	47
07	SK	K	48	Allogeneik	MD		2.90x10 <sup>8</sup>	2.61x10 <sup>6</sup>	44
08	AD	E	28	Allogeneik	MD		2.09x10 <sup>8</sup>	8.36x10 <sup>6</sup>	42
09	FK	E	56	Otolog	MD	Amiloidoz	3.50x10 <sup>8</sup>	5.60x10 <sup>5</sup>	40
10	AD	E	36	Allogeneik	MD		8.77x10 <sup>8</sup>	2.05x10 <sup>7</sup>	40
11	CH	E	57	Otolog	MD	AML	5.61x10 <sup>8</sup>	8.48x10 <sup>6</sup>	39
12	KK	E	36	Otolog	MD	AML	5.08x10 <sup>8</sup>	4.06x10 <sup>6</sup>	39
13	NM	E	35	Allogeneik	MD		8.30x10 <sup>8</sup>	7.50x10 <sup>6</sup>	37
14	DY	E	24	Allogeneik	MD		8.00x10 <sup>8</sup>	1.02x10 <sup>8</sup>	36
15	OÖ	E	25	Allogeneik	MD		7.80x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>7</sup>	35
16	AB	E	26	Allogeneik	MD		5.7x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>6</sup>	34
17	FÖ	E	36	Otolog	MD	KML	3.6x10 <sup>8</sup>	1.44x10 <sup>6</sup>	33
18	ŞB	E	32	Allogeneik	MD		8.5x10 <sup>8</sup>	5.86x10 <sup>6</sup>	31
19	CY	E	37	Otolog	MD	HL	8.85x10 <sup>8</sup>	9.35x10 <sup>6</sup>	28
20	HA	K	28	Allogeneik	MD		6.86x10 <sup>8</sup>	6.46x10 <sup>7</sup>	27
21	SO	E	58	Otolog	MD	Akciğer Ca	9.9x10 <sup>8</sup>	2.51x10 <sup>7</sup>	23
22	RK	E	24	Otolog	MD	NHL	2.7x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	21
23	AK	E	27	Allogeneik	MD		1.76x10 <sup>9</sup>	1.9x10 <sup>7</sup>	16
24	İÜ	E	24	Allogeneik	MD		6.0x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>6</sup>	15
25	GZ	K	19	Otolog	MD	NHL	1.3x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>7</sup>	14

\*HKPD:Hız kontrollü programlı dondurma

\*\*MD :Mekanik dondurma

### 3.3.Canlılığın değerlendirilmesi

Azot tankından çıkarılan dondurulmuş kök hücre içeren torbalar 37°C suda eritilerek, 1ml hücre süspansiyonu bir tüpe aktarıldı. Torbadaki hücre süspansiyonu oda sıcaklığında bekletildi. Tüpe aktarılan 1 ml'lik süspansiyon RPMI ile sulandırılıp 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan kısım

dökülerek, hücrelerin bulunduğu ortamdan DMSO ve plazma proteinlerinin uzaklaştırılması sağlandı ve tekrar RPMI ile sulandırıldı. Canlılık, akridin oranj ve etidin bromür boyaları kullanılarak bakıldı. Yeşil renk yansıma veren mononükleer hücreler canlı olarak kabul edilerek, bunların toplam mononükleer hücrelere oranı hesaplandı ve böylece canlı hücrelerin yüzdesi bulundu.

Oda sıcaklığında bekletilen torbadan 1. ve 24. saatin sonunda yukardaki işlemler yapılarak tekrar canlılık bakıldı.

### **3.4.CD34(+) Hücrelerin Değerlendirilmesi**

Azot tankından çıkarılan dondurulmuş kök hücre içeren torbalar 37 C suda eritilerek, 1ml hücre süspansiyonu bir tüpe aktarıldı. Torbadaki hücre süspansiyonu oda sıcaklığında bekletildi. Tüpe aktarılan 1 ml'lik süspansiyon PBS ile sulandırılıp 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan kısım dökülerek, hücrelerin bulunduğu ortamdan DMSO ve plazma proteinlerinin uzaklaştırılması sağlandı ve tekrar PBS ile sulandırılan hücreler +4 C'de 30 dakika süre ile, karanlıkta anti-CD34 monoklonal antikorla inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerine PBS eklenerek 5 dk süre ile 500g'de santrifüj edildi.

Anti CD34-FITC (HPCA-2, Kat No: BD, 348053): Fareden elde edilmiş , 1gG1 yapısında, kimopapain dirençli bir epitopa bağlanan, tip III monoklonal antikor. Boyama için 10 l hacminde kullanıldı. 10 l antikor hücrelerin üzerine

konduktan sonra 20 dakika soğukta inkübe edildi ve %1'lik formaldehit ile fikse edildikten sonra BD-FACSort (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) ile değerlendirildi. Bu yöntemle CD34 değerlendirilmesi hücreler dondurulmadan önce ve sonra olmak üzere 2 kez bakıldı.

### 3.5.Mix-CFU analizi

Bu deney için kullanılan malzemeler ve hazırlanışları aşağıda tarif edilmiştir (20-22):

- 1- 1.5 gr daha önce otoklavda magnetik karıştırıcının çubuğu ile birlikte steril hale getirilmiş metilsellüloz, kaynama noktasına getirilmiş 50 cc steril double distile su ile magnetik karıştırıcılı hot plate üzerinde laminar akım odası içinde karıştırıldı.
- 2- Bu karışım 30 dakika daha magnetik karıştırıcı eşliğinde hot plate üzerinde taşmasına mani olacak ısılarda (kaynama noktası sınırlarında) ısıtılmaya devam edildi.
- 3- L-Glutamin ve HEPES içeren 2XIMDM, 50cc double distile steril su içinde çözülüp %7.5 NaHCO<sub>3</sub> ile pH=7.3 olacak şekilde ayarlandıktan sonra filtre edilerek 37 C'ye getirilmiş olan 50cc metilsellülozlu süspansiyon ile karıştırıldı. Bu karışım 2 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edildikten sonra, 24 saat daha bu sefer +4 C'de karıştırılmaya devam edildi.

- 4- Ertesi gün bu mediadan bir miktar örnek kontaminasyon kontrolü için 7 gün süre ile kültür ortamına alınırken, geri kalan %1.5'lik Metilselüloz içeren Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Sigma, Kat No: I 7633) aşağıdaki katkılarla zenginleştirildi:
- a- %30 FCS
  - b- %1 BSA (Sigma, Kat No: A 8412)
  - c- 100Ü/ml Eritropoietin (Eprex, Cilag)
  - d- 10ng/ml IL-3 (Sigma, Kat No: I 1646)
  - e- 10ng/ml GM-CSF (Leucomax, Schering)
  - f-  $2 \times 10^{-5}$  Mol 2- Merkaptoetanol (Sigma, Kat No:M 6250)
- 5- Üstte hazırlanan %1.5'lik Metilselüloz içeren, zenginleştirilmiş IMDM (Mixt-CFU mediası) 1cc'lik aliguotlar halinde çalışma gününe kadar -80 C'de saklandı.
- 6- Çalışma günü, 100 l  $1 \times 10^5$  hücre ve 1cc Mixt-CFU mediası bir enjektör vasıtası ile 24 gözlü bir plağın bir kuyucuğunda kabarcık oluşturulmadan karıştırıldı. Çalışmaya alınan plaklar bağıl nemi %90'nın üzerinde olan, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 C'lik bir ortamda 14 gün süre ile inkübe edildiler.

- 7- İnkübasyonun 10. ve 14. günleri inverted mikroskop altında 5 hücreden oluşan gruplar bir koloni sayılarak, plak başına düşen koloni miktarı hesaplandı (21-24) ve fotoğraflandı.

Oda sıcaklığında bekletilen torbadan 1. saatin sonunda, yukardaki işlemler yapılarak tekrar hücre ekimleri yapıldı.

#### **4.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Hız kontrollü programlı dondurma ve mekanik dondurma grupları kendi aralarında paired non-parametric Wilcoxon's Signed-Rank testi kullanılarak karşılaştırıldı. Hız kontrollü programlı dondurma ve mekanik dondurma gruplarını birbirleri ile karşılaştırmak için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel analizler INSTAT ve SPSS programları ile yapıldı ve  $p<0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. Değerler ortalama±standart sapma şeklinde rapor edildi.

## 5.SONUÇLAR

### 5.1.Hücre Canlılık Sonuçları

Hız kontrollü programlı dondurma ve mekanik dondurma metodları ile dondurulup saklanan periferik kan kök hücrelerinin çözüldükten hemen ve 1 saat sonra bakılan canlılık oranları tablo 2 ve şekil 1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurulan hücrelerde, 0. ve 1. saatlerde canlılık oranları sırası ile  $69.5 \pm 9.3$  ve  $59.5 \pm 8.0$  bulundu. Sıfırncı ve 1. saatler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Mekanik dondurma metodu ile dondurulan hücrelerin, çözüldükten sonra 0. ve 1. saatlerde değerlendirilen canlılık oranları, sırasıyla  $47.3 \pm 22.8$  ve  $27.7 \pm 18.7$  olarak bulundu. Bulunan iki değer arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.0003$ ).

Hız kontrollü programlı dondurma ve mekanik dondurma metodları ile dondurulan hücrelerin çözüldükten hemen sonra bakılan canlılıkları karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $69.5 \pm 9.3$ ,  $47.3 \pm 22.8$ ,  $p=0.0361$ ). Aynı metodlarla dondurulan hücrelerin çözüldükten 1 saat sonra bakılan canlılık değerleri ise ilkinde  $59.5 \pm 8.0$

bulunurken, ikincisinde  $\%27.7 \pm 18.7$  bulunmuştur ki aradaki fark yine belirgin olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.001$ ).

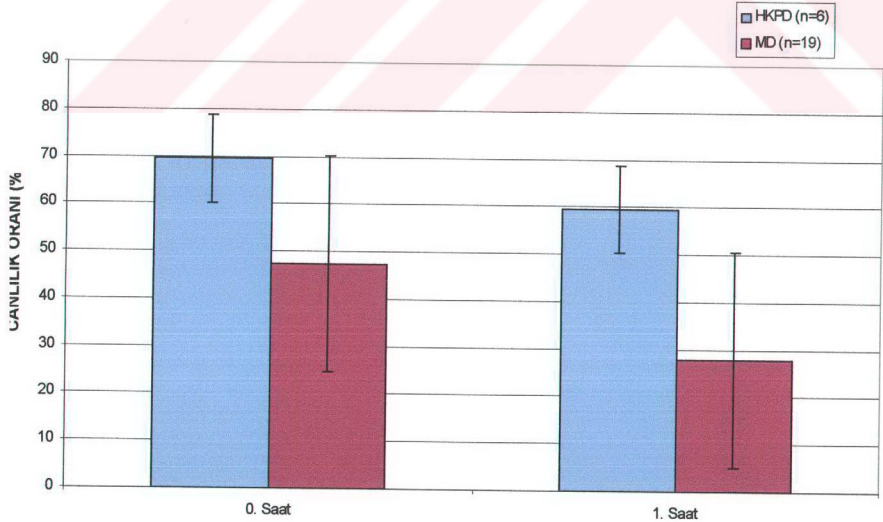
**Tablo 2:** HKPD\* ve MD\*\* Metotları ile Hücre Canlılık Yüzdeleri

	Canlılık (%)		
	0. saat	1. saat	
HKPD (n=6)	69.5±9.3	59.5±8.0	p=0.0625
MD (n=19)	47.3±22.8	27.7±18.7	p=0.0003
	p=0.0361	p=0.001	

\* HKPD : Hız Kontrollü Programlı Dondurma

\*\* MD: Mekanik Dondurma

Hız kontrollü programlı ve mekanik dondurma metodları kullanılarak dondurulup saklanan hücreler, çözüldükten sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletildiklerinde, hücre canlılıkları tüm örneklerde %0 bulundu.



**Şekil 1:** HKPD ve MD Metodları ile dondurulan hücrelerin çözülme sonrası 0. ve 1. saatlerdeki canlılık oranı



## 5.2.Koloni Sayım Sonuçları

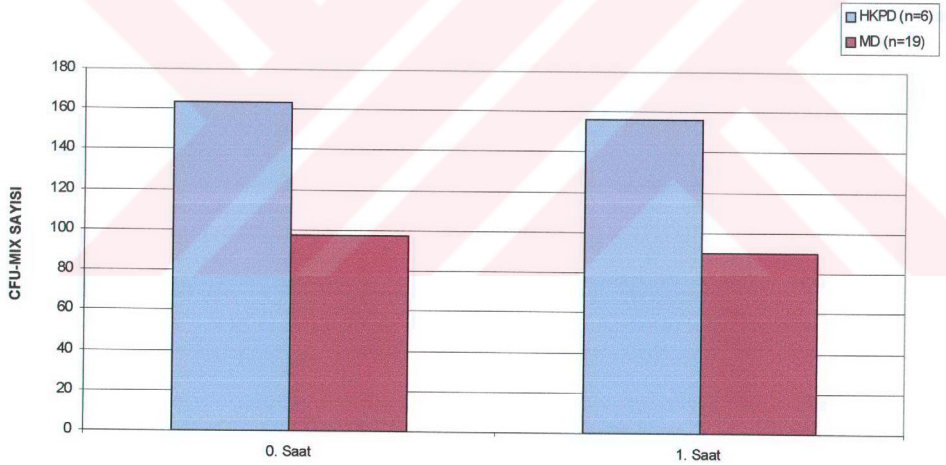
Hız kontrollü programlı ve mekanik dondurma metodları ile dondurularak saklanmış kök hücrelerin çözüldükten hemen ve 1 saat sonra ekildiklerinde 14. Günde  $1 \times 10^5$  hücre başına elde edilen CFU-mix sayıları tablo 3 ve şekil 2'de gösterilmiştir (Resim 1). Buna göre hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurularak saklanmış kök hücrelerin, çözüldükten hemen ve 1 saat sonra ekildiklerinde elde edilen CFU-mix sayısı sırasıyla  $163.7 \pm 21.1$  ve  $156.3 \pm 17.7$  olarak bulundu. Aradaki fark anlamlı bulunmadı ( $p=0.1563$ ). Mekanik dondurma metoduyla dondurularak saklanmış hücreler çözüldükten hemen ve 1 saat sonra ekildiklerinde elde edilen CFU-mix sayısı sırası ile  $97.0 \pm 35.0$  ve  $90.2 \pm 30.8$  olarak bulunmuştur; aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.0002$ ).

İki metodu birbiri ile karşılaştırdığımızda 0. saatlerdeki sayımlar arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $163.7 \pm 21.1$  ve  $97.0 \pm 35.0$ ,  $p=0.001$ ). Birinci saatlerde bakılan ölçümlerde ise hız kontrollü programlı dondurma ve mekanik dondurma metodlarında koloni sayımları, sırası ile  $156.3 \pm 17.7$  ve  $90.2 \pm 30.8$  olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.0001$ ).

**Tablo 3:** : HKPD\* ve MD\*\* Metodları ile  $1 \times 10^5$  Hücre Başına Oluşturdukları CFU-Mix\*\*\* Sayımları

	CFU-mix		
	0. saat	1. saat	
HKPD (n=6)	163.7±21.1	156.3±17.7	p=0.1563
MD (n=19)	97.0±35.0	90.2±30.8	p=0.0002
	p=0.001	p=0.0001	

\* HKPD: Hız Kontrollü Programlı Dondurma \*\* MD: Mekanik Dondurma , \*\*\* CFU-mix: Colony Forming Unit – Pluripotent



**Şekil 2:** HKPD ve MD Metodları ile dondurulan hücrelerin çözülme sonrası ekilen 100.000 hücre başına düşen CFU-Mix sayısı.

### 5.3.CD34(+) Hücre Sonuçları

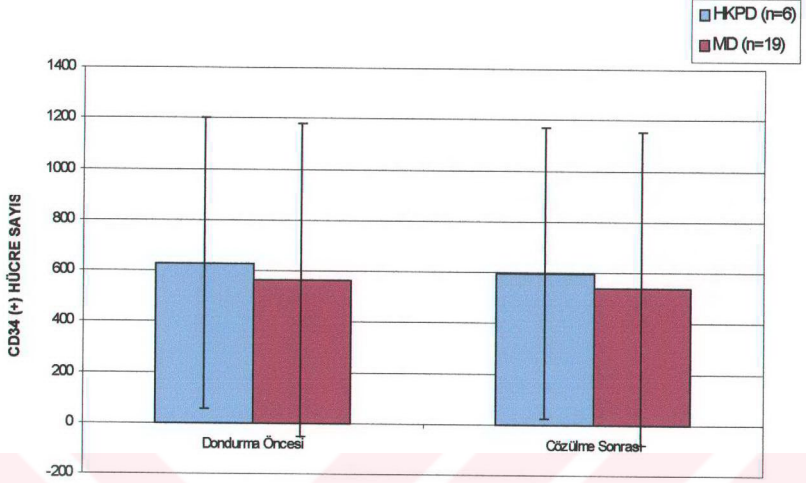
Periferik hematopoetik kök hücreler dondurulmadan önce ve hız kontrollü programlı dondurma ve mekanik dondurma metodları ile dondurulduktan sonra belirlenen CD34(+) hücre sayıları, tablo 4 ve şekil 3'te gösterilmiştir. Buna göre hız kontrollü programlı dondurma grubunda, dondurulmadan önce ve çözüldükten sonra olmak üzere sayılar  $626.7 \pm 572.9$  ve  $596.7 \pm 546.6$  olarak bulunmuştur. Aradaki fark anlamlı değildir ( $p=0.0938$ ). Mekanik dondurma grubunda ise sözkonusu sayılar  $564.6 \pm 618.4$  ve  $536.2 \pm 603.5$  olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak aradaki fark anlamlıdır ( $p=0.0013$ ).

**Tablo 4 :** HKPD\* ve MD\*\* Metodları ile Dondurma Öncesi ve Sonrası CD34(+) Hücre Sayıları

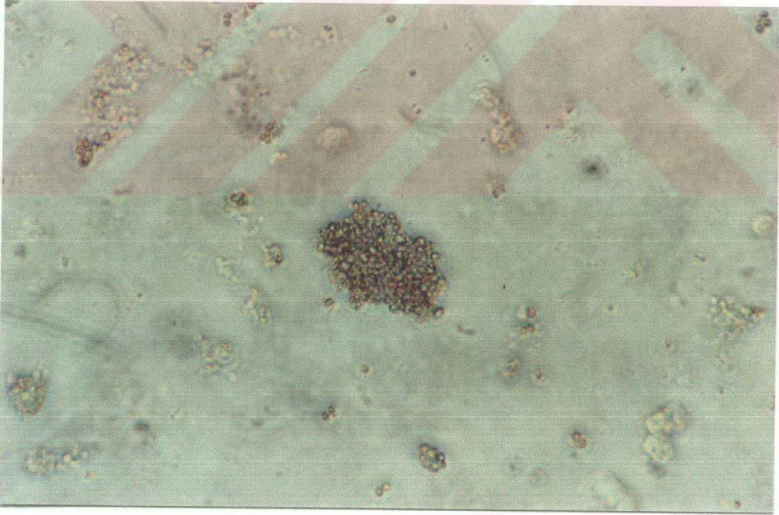
	CD34(+) Hücre Sayısı/ $\mu$ L		
	Dondurma Öncesi	Çözülme Sonrası	
HKPD (n=6)	$626.7 \pm 572.9$	$596.7 \pm 546.6$	$p=0.0938$
MD (n=19)	$564.6 \pm 618.4$	$536.2 \pm 603.5$	$P=0.0013$

\* HKPD : Hız Kontrollü Programlı Dondurma

\*\* MD: Mekanik Dondurma



**Şekil 3:** HKPD ve MD Metodları ile dondurulan hücrelerin çözülme sonrası mikrolitredeki CD34 (+) hücre sayıları



**Resim 1:** 14. günde kolonilerin görünümüleri

## 6.TARTIŞMA

Otolog periferik kök hücre ve kemik iliği transplantasyonlarında ve bazen de allojeneik periferik kök hücre veya kemik iliği nakillerinde kök hücrelerin dondurularak saklanması gereklidir. Kriyopreservasyonun amaçları, canlı hücreleri mümkün olduğu kadar yüksek canlılık oranı ve fonksiyonel kapasite ile tekrar resüsite edebilmek ve hastaya verirken de zarara yol açmamaktır. Bunun için değişik metodlar ve değişik kriyopreservanlar denenmiştir. Fakat şimdiye kadar ideal bir ajan ve metod bulunamamıştır. Şu anda bütün dünyada kabul edilen standart krioprotektan DMSO olup, en iyi metod da hız kontrollü programlı dondurma metodudur. İlk olarak 1991 yılında Makino ve arkadaşları hücre dondurma işinin daha ucuz, basit ve zahmetsiz bir yolunu tarif ettiler. Bu metod hücre solüsyonlarının direkt olarak -80 C'lik, elektrikle çalışan donduruculara konulmasıydı. Daha sonra başka araştırmacılar da bu metodu denediler ve bazıları birbiri ile çelişen raporlar olsada gerçekten hücre canlılığı, CFU-GM oranları ve engrafman özelliklerinin programlı dondurma ile benzer sonuçlarının olduğunu gösterdiler. Fakat hiçbir çalışmada bu iki metod karşılaştırılmamıştır. Sadece mekanik dondurma metodu ile de hücre canlılığı, koloni oluşturma kapasitesinin korunduğu ve hastalarda engrafmanın sağlandığı iddia edilmektedir. Biz bu çalışmamızda hız kontrollü programlı ve mekanik dondurma metodlarını hücre canlılığının korunması, CFU-mix oluşturma kapasitesi ve CD34(+) hücre kayıpları açısından karşılaştırdık ve ilginç sonuçlarla karşılaştık.



Çarpıcı sonuçlardan biri hücre canlılığının Hız kontrollü programlı dondurma metodu ile daha iyi korunması idi. Hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurulan hücrelerin çözüldükten hemen sonra bakılan canlılık oranı %69.5 9.3 iken, mekanik dondurma metodu ile dondurulup saklanmış hücrelerde bu oran %47.3 22.8 olarak bulundu ( $p=0.0361$ ). Literatüre göre DMSO hücreye toksik olduğundan DMSO miktarının azaltılması oda ısısında hücrelerin daha az zarar görmesi anlamına geliyordu, fakat bizim çalışmamızda hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurulan hücreler çözüldükten bir saat sonra bakılan canlılıkları ile 0. saat canlılığı arasında istatistiksel fark gözlenmedi. Buna karşın mekanik dondurma metodunda daha az DMSO kullanılmasına rağmen 1. saat canlılığı ile 0. saat canlılığı arasında istatistiksel anlam ifade eden fark ortaya çıktı (0. saat canlılık:%47.3 22.8, 1. saat canlılık %27.7 18.7,  $p=0.0003$ ). Literatüre bakacak olursak; Galmes A ve ark %5 DMSO kullanarak mekanik dondurma metodunu uygulamışlar ve ilk 6 ayda hücre canlılığı %80 iken 31. Ayda bu oranın %31'e düştüğünü göstermişlerdir. Fakat Makino S ve ark'nın 1991'de yaptıkları çalışmada 18. ayda dahi, hücrelerin trypan blue viabilitesi %70'in üstünde olarak rapor edilmiştir. İkinci araştırmacılar ilkinden farklı olarak %6 oranında HES kullanmışlardır. Bizim metodumuz Makino S ve arkadaşlarının metoduna daha fazla benzemekle beraber, aslında her iki metottan da farklıdır. Çünkü biz uzun süreli muhafaza için sıvı azot tankını tercih ettik. Yukarda belirttiğimiz gibi mekanik dondurma

metodu ile, ortalama 31 aylık saklama sonunda hücre canlılığını %47.3 22.8 olarak bulduk ki bu oran Galmes A ve ark'ninkinden iyi, Makino S ve ark'ninkinden kötüdür ki, muhtemelen bu da saklama zamanımızın daha uzun olmasından kaynaklanmaktadır.

Hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurup sakladığımız hücrelerde ise, ortalama saklama süresi 48 ayı geçmesine rağmen, ortalama canlılığın hala %70 civarında olması bizce dikkate alınması gerekli olan bir bulgudur.

Çözülen hücreler oda ısısında 24 saat bekletildiklerinde, dondurma metodu ne olursa olsun hücrelerin canlılığını kaybettiğini gözledik. Bu durum DMSO'in hematopoetik kök hücreler üzerinde oda ısısında, uzun sürede hem %7.5, hem de %10'luk konsantrasyonlarda toksik etkisi olduğunu göstermektedir.

Koloni oluşturma kapasitesine baktığımızda yine benzer sonuçlarla karşılaştık. Hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurularak saklanmış hücrelerin 0. ve 1. saatlerde yapılan ekimlerden sonra 14. gün sayılan koloni sayıları arasında istatistiksel fark gözlenmezken, mekanik dondurma metoduyla dondurulup saklanan hücrelerin 0. ve 1. saat ekim sonuçları arasında istatistiksel fark göze çarpmaktaydı. Bu sonuç bize DMSO oranını %10'un altına çekmenin ilk 1 saat içinde hücre hasarını azaltmadığını, bilakis belki de %10'luk DMSO oranının ideal olduğunu göstermektedir. Her iki grubu birbiri ile karşılaştırdığımızda, 0. ve 1. saatler sonunda ekilen hücrelerin,

koloni sayımlarında ibre belirgin olarak hız kontrollü programlı dondurma metodunun daha iyi olduğunu göstermesine rağmen, mekanik dondurma metodu ile dondurulan kök hücrelerin de koloni oluşturma kapasitelerini koruduğunu gözledik. Bu konu ile ilgili olarak ta literatürde tartışmalı sonuçlar vardır. Katayama Y ve ark 5 yıllık kriyopreservasyon sonunda dahi, mekanik dondurma metodu ile dondurulan hücrelerin hematopoetik aktivitelerini koruduğunu iddia ederken, Galmes A ve ark 24. ay sonun da kök hücrelerin hematopoetik özelliklerini kaybettiklerini iddia etmektedir. Bu açıdan bizim sonuçlarımız Katayama Y ve ark'nın sonuçlarına daha çok uymaktadır. Fakat şunu da belirtmek gerekir ki hız kontrollü programlı dondurma yöntemi ile dondurulan hücreler 4-5 yıllık olmasına rağmen hematopoietik kapasitelerini belirgin bir biçimde muhafaza etmişlerdir. Bu nedenle bu yöntemle hücrelerin dondurulup saklanması kanımızca daha doğru olacaktır. Fakat şunu da belirtmemiz gerekir ki bizim mekanik dondurma yöntemimizde kök hücreleri -80 C'den çıkarıp azot tankına götürürken geçen 3-5 dakikalık sürede ve azot tankına konulduktan sonra olan ani ısı değişiklikleri ile oluşan hücre hasarı hücre canlılığını ve koloni oluşturma kapasitesini etkilemiş olabilir.

CD34(+) hücre kaybı açısından iki yöntemi karşılaştırdığımızda her iki yöntemde de %5 civarında kök hücre kaybı olduğu gözlenmiş olup, bu kayıp makul sınırlarda olarak kabul edilmiştir.

Aslında literatürde uygulanan dondurma ve saklama metodlarının hematopoetik kök hücrelerin canlılığı üzerinde minimal farklılıklar vardır;



sonuçta bütün metodlarla yapılan transplantlarda engrafman başarılı olmaktadır. Fakat metod ne olursa olsun bir miktar hematopoetik kök hücre kaybı mutlaka olacağından, engrafman için yeterli olan hücrenin alt sınırında hücre toplandığında engrafman gecikmesi veya engrafmanda başarısızlık söz konusu olur (25,26). Bu nedenle ürün toplama, dondurma ve saklama esnasında kullanılan yöntemin yanında kök hücrelerin miktarının yeterli olması çok önemlidir.

Sonuç olarak;

1-Hız kontrollü programlı dondurma metodu ile hücre canlılığının ve hematopoietik aktivitenin daha uzun süre korunabildiği gözlenmiştir.

2-Hız kontrollü programlı dondurma metodu ile dondurularak saklanmış periferik kan kök hücrelerinin çözüldükten 1 saat sonra canlılıklarında ve hematopoietik aktivitelerinde bir farklılık gözlenmemiştir. Yani %10 oranında DMSO oda ısısında 1 saat boyunca toksik etki göstermemiştir.

3-Dondurma metodu ne olursa olsun, çözünen hücreler oda ısısında uzun süre bekletildiklerinde canlılıklarını kaybetmektedirler.

4-Mekanik dondurma metodu ile hücreleri dondurduktan sonra sıvı azot tankına kaldırmadan, devamlı -80 C'de saklayarak çözülme sonrası kök hücre canlılığı ve koloni oluşturma kapasitesinin değerlendirildiği ek çalışmaların yapılması gereklidir.

## 7.ÖZET

Periferik kan kök hücreleri (PKKH), genellikle programlı dondurucularla dondurularak saklanmaktadır. Fakat programlı dondurma (PD) çok zaman ve iş gücü gerektirir ve pahalıdır. Daha basit ve zahmetsiz olan mekanik dondurmanın, PD'ya alternatif olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Bu çalışmada PD ve mekanik dondurma (MD) yöntemlerini hücre canlılığı, koloni oluşturma yetenekleri ve CD34(+) hücre kaybı açısından karşılaştırmayı planladık. Altı donörün PKKH PD, 19 donörün PKKH MD metodu ile donduruldu. PD metodu ile dondurulup saklanan PKKH'nin çözüldükten hemen ve 1 saat sonra bakılan canlılık oranları ve 14. günde koloni sayımları arasında istatistiksel fark bulunamadı (0. saat: canlılık=%69.5±9.3, CFU-mix sayısı=156.3±17.7 ve 1. saat: canlılık=%59.5±8.0, CFU-mix sayısı=163.7±21.1). MD metodu ile dondurulan hücrelerin, çözüldükten sonra 1 saat oda ısısında bekletildiklerinde canlılıkları ve 14. gün koloni sayıları belirgin biçimde düşüş gösterdi (0. Saat: canlılık=%47.3±22.8, CFU-mix sayısı=97.0±35.0, 1.saat: canlılık=%27.7±18.7, CFU-mix sayısı=90.2±30.8 p=0.0003, p=0.0002). İki metod ile dondurulan hücrelerin çözüldükten hemen sonra ve 1. saatte bakılan canlılıkları ve 14. Gündeki koloni sayıları karşılaştırıldığında, PD ile dondurulan hücrelerin canlılıkları ve CFU-mix sayısı hem 0. saatte hem de 1. saatte daha iyi bulundu. PD metodu ile hücre canlılığının ve hematopoietik aktivitenin daha uzun süre korunabildiği gözlenmiştir. PD metodu ile dondurularak saklanmış PKKH'in çözüldükten 1

saat sonra canlılıklarında ve hematopoietik aktivitelerinde bir farklılık gözlenmemiştir. CD34(+) hücre kaybı açısından iki yöntemi karşılaştırdığımızda her iki yöntemde de %5 civarında kök hücre kaybı olduğu gözlenmiş olup, bu kayıp makul sınırlarda olarak kabul edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında; PD metodu ile kriyopreservasyona devam edilmesi gerektiğini düşünüyoruz.



## 8.SUMMARY

Peripheral blood stem cells (PBSCs) are usually cryopreserved with rate-controlled programmed freezing (RCPF). But this method is expensive and time consuming. A simplified method named mechanical freezing (MF) for cryopreservation of PBSCs at -80 C without rate-controlled freezing was established for cryopreservation. In this study we compared cell viability, colony forming potential and CD34(+) cell loss after thawing of cryopreserved PBSC with RCPF and MF methods. Six subject's PBSCs were cryopreserved with RCPF and 19 subject's PBSCs were cryopreserved with MF. There was no significant difference between the cell viability and 14<sup>th</sup> day colony count, just after and 1 hour after thawing in RCPF(0. hour: viability=%69.5±9.3, CFU-mix count= 156.3±17.7, 1<sup>st</sup> hour:%59.5±8.0, CFU-mix count=163.7±21.1). The cell viability and colony forming potential of PBSCs, cryopreserved with MF decreased significantly one hour after thawing (0. hour: viability=%47.3±22.8, CFU-mix count=97.0±35.0, 1<sup>st</sup> hour: viability=%27.7±18.7, CFU-mix count=90.2±30.8 p=0.0003, p=0.0002). When the two methods are compared, the cell viability and colony forming potential was better with RCPF just after and 1 hour after thawing. As a result we observed that in RCPF the viability and hematopoietic activity of PBSC is well preserved and the stem cell viability does not decrease in room temperature for one hour. CD34(+) cell loss was about 5% with both methods and this is in acceptable limits. In the light of these results we suggest to continue cryopreservation with RCPF.

## 9.KAYNAKLAR

1- Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs E, Irwin D, Blair S, Gorman AM, Patterson KG. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 1995; 346: 137-140.

2-Takaue Y, Abe T, Kawano Y, Suzue T, Saito S, Hirao A, Sato A, Makimoto A, Kawahito M, Watanabe T, Shimokawa T, Kuroda Y. Comparative analysis of engraftment after cryopreservation of peripheral blood stem cell autografts by controlled-versus uncontrolled-rate methods. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 13: 801-804.

3-Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Novo A, Morey M, Guerra JM, Duran MA. Long-term storage at -80 C of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. *Transfusion* 1999; 39: 70-73

4-Cilloni D, Garau D, Regazzi E, Sammarelli G, Savoldo B, Caramatti C, Mangoni L, Rizolli V, Carlo-Stella C. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 497-503.

5-Makino S, Harada M, Akashi K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S and Niho Y. A simplified method for criopreservation of peripheral blood stem cells at -80 C without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplantation* 1991; 8:239-244.

6-Lasky LC, Mc Cullough J and Zanjani ED. Liquid storage of unseparated human bone marrow. Evaluation of hematopoietic progenitors by clonal assay. *Transfusion*; 26: 331-334.

7-Rowley SD, Davis JM. Standard for bone marrow processing laboratories. *Transfusion* 1990; 30: 571-572.

8-Takahasi T, Hirsch A, Erbe E, Williams R. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J* 1988; 54: 509-518.

9-Zaroulis CF, Leiderman IZ, Miller J, Smickle C. Successful freeze-preservation of human granulocytes. *Cryobiology* 1980; 17: 311-317.

10-Stiff PJ, Koester A, Weidner MK et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch without rate-controlled freezing. *Blood* 1987; 70: 974-979.

11-Arakawa T, Carpentier JF, Kita YA, Crowe JH. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. *Cryobiology* 1990; 27: 401-415

12-Thome S, Craze J, Mitchell C. Dimethylsulphoxide-induced serum hyperosmolality after cryopreserved stem-cell graft. *Lancet* 1994; 344: 1431-1432.

13-Keung YK, Lau S, Elkayam U et al. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 363-367.

14-Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol* 1994; 45: 187.

15-Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, et al. A simple efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991; 8:291.

16-Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA et al. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulphoxide toxicity. *Transfusion* 1994; 34:887-890

17-Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 389-393.

18-Stiff PJ, Murgu AJ, Zaroulis CG. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 1983; 20: 17-20.

19-Gorin NC, Herzig G, Bull MI, et al. Long-term preservation of bone marrow and stem cell pool in dogs. *Blood* 1978; 51:257.

20-Katayama Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami K, Mahmut N, Shinagawa K, Omoto E, Makino S, Miyamoto T, Mizuno S, Fukuda T, Eto T, Fujisaki T, Ohno Y, Inaba S, Niho Y, Harada M. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplantation*; 19: 283-287.

21-Coutinho LH, Gilleece MH, De Wynter EA, et al. Clonal and long-term cultures using human bone marrow. Eds. Testa NG, Molineux G. *Haemopoiesis A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford 1993; p:75-106



22-Carlo-Stella C, Cazzola M, Gasner A, Barosi G, Dezza L, Meloni F, Pedrazolli P, Hoelzer D, Ascari E. Effects of recombinant alpha and gamma interferon on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 1987; 70: 1014-1019.

23-Beaujean F, Bourhis J-H, Bayle Ch, Jouault H, Divine M, Rieux C, Janvier M, Le Forestier Ch, Pico JL. Successful cryopreservation of purified autologous CD34<sup>+</sup> cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 1091-1096.

24- Carlo-Stella C, Ganser A, Hoelzer D. Defective 'in vitro' growth of the hematopoietic progenitor cells CFU-GEM, BFU-E, CFU-Mk and CFU-GM in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Clin Invest* 1987; 80: 286-293.

25-Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haematopoietic stem cells. In Goldstone AH (ed): *Clinics in Haematology*: Saunders, London, 1986, p:19

26-Rowley SD, Piantadosi S, Santos GW. Correlation of hematologic recovery with CFU-GM content of autologous bone marrow grafts treated with 4-

hydroperoxycyclophosphamide. Culture after cryopreservation. Bone marrow Transplant 1989; 4:553.

