

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*EX VIVO* GRANÜLOSİTER KOLONİ OLUŞTURAN İNSAN GÖBEK KORDON KANI  
HÜCRELERİNİN KÖK HÜCRE FENOTİP ANALİZİ

Emine Begüm Genç

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr.Meral Beksaç

Ağustos

2014

## **ETİK BEYAN**

Bu tez çalışmasının, akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Emine Begüm Gençer

## ONAY

Prof.Dr.Meral Beksaç danışmanlığında Emine Begüm GENÇER tarafından hazırlanan bu çalışma 28/08/2014 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: .....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### EX VIVO GRANÜLOSİTER KOLONİ OLUŞTURAN İNSAN GÖBEK KORDON KANI HÜCRELERİNİN KÖK HÜCRE FENOTİP ANALİZİ

Emine Begüm GENÇER

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Meral BEKSAÇ

İnsan göbek kordon kanı (KK) kaynaklı Hematopoietik kök hücre (HKH)'lerin klinik uygulama için yeterli niteliklere sahip olup olmadığını gösteren standart yöntemler mevcuttur. Akım sitometri yöntemi ile CD34<sup>+</sup> hücre mutlak sayısı KK ünitesi seçimindeki HLA uyumundan sonraki seçim kriteridir. Fenotipik bir belirleyici olan CD34<sup>+</sup> hücre sayısı kadar, bu hücre fraksiyonların ve işlevselliğinin ortaya konması, uzun dönem ve kısa dönem hücreleri tanımlamak için de kullanılmaktadır. Kök hücre dondurarak saklama sırasında ve eriterek çözme sonrası HKH kalite ve sayısının belirlenmesi de önemli bir gereksinimdir. KK HKH içeriğini belirlemeye yönelik işlevsel bir yöntem olan *ex vivo* koloni oluşturma (CFU-GM) testleri bu gereksinimleri karşılamaya yönelik olarak geliştirilmiştir. Hücre fraksiyonlarının işlevsel niteliklerini hızlı bir şekilde belirlemek için aldehit dehidrogenaz (ALDH) aktivite tayini yöntemi geliştirilmiştir. Bu tez çalışması ile KK hücrelerinde toplanmayı takiben kabul kriterlerini sağlayan taze örneklerde ve dondurup çözülme sonrası örneklerde çalışılan CFU-GM kapasitesi, akım sitometrik CD34<sup>+</sup> ve ALDH aktivitesi arasındaki ilişkinin analizi hedeflenmiştir. Araştırmaya 35 KK örneği dahil edilmiş, tüm örneklerde bu üç parametre analiz edilmiştir. Örneklerin 30'u eritrosit ve plazma ayırıştırma işlemi sonrası; 5'i araştırmaya ayrılmış -196°C'de saklanma sonrası çözüldükten sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Taze örneklerin ortalama hücre içeriği toplam çekirdekli hücre (TNC) ( $93,27 \pm 30,1 \times 10^6/\text{Ünite}$ ), CD34<sup>+</sup> hücre ( $3,85 \pm 2,55 \times 10^6/\text{Ünite}$ ), ALDH pozitif (ALDH<sup>+</sup>) hücre ( $3,14 \pm 2,55 \times 10^6/\text{Ünite}$ ), CFU-GM sayısı ( $13,2 \pm 9,81 \times 10^5/\text{Ünite}$ ), CFU-GEMM sayısı ( $19,3 \pm 13,65 \times 10^5/\text{Ünite}$ ) ve dondurulup çözülmüş örneklerde, TNC ( $71,76 \pm 29,77 \times 10^6/\text{Ünite}$ ), CD34<sup>+</sup> hücre ( $5,44 \pm 5,08 \times 10^6/\text{Ünite}$ ), ALDH<sup>+</sup> hücre ( $2,9 \pm 2,82 \times 10^6/\text{Ünite}$ ), CFU-GM sayısı ( $6,18 \pm 3,44 \times 10^6/\text{Ünite}$ ) ve CFU-GEMM sayısı ( $4,57 \pm 3,22 \times 10^6/\text{Ünite}$ ) aktiveteleri analiz edilmiştir. Taze örneklerde CD34 ile CFU-GM ( $r=0,722$   $p<0,001$ ) ve CFU-GEMM ( $r=0,723$   $p<0,001$ ) arası ilişki ; ALDH ,CFU GM ( $r=0,624$   $p<0,001$ ), CFU-GEMM ( $r=0,451$   $p=0,12$ ) ve CD34 ile ALDH ( $r=0,670$   $p<0,01$ ) arası ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

2014, 68 sayfa

**Anahtar kelimeler:** İnsan Göbek Kordon Kanı, Hematopoietik Kök Hücre, CFU GM, ALDH

## ABSTRACT

MSc Thesis

### PHENOTYPICAL ANALYSIS OF *EX VIVO* GRANULOCYTE COLONY FORMING HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD CELLS

Emine Begüm GENÇER

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Meral BEKSAÇ

There are presently a few methods available in the scientific literature to determine sufficiency and qualification of the hematopoietic stem cells (HSC)'s extracted from human umbilical cord blood (UCB) to use in the clinical applications. Flow cytometry procedure to determine the absolute number of CD34<sup>+</sup> cells is the main CB unit selection criterion after HLA matching. The number of CD34<sup>+</sup> cells and subpopulations, is also being used to identify the cell functionality fraction of the evaluation of long term (LTR) and short term repopulating (STR) capacity. In stem cell banking the quality and number of HSC is also an important requirement. In order to determine functionality *ex vivo* colony forming, UCB HSC unit-granulocyte macrophage (CFU-GM) tests have been developed as the main method which has strong engraftment prediction potential of the CB unit. One of the recent methods described for the rapid and accurate detection of functional CB cell fractions is ALDH activity measurement in CB cells. In this thesis, CB cells collected according of the following acceptance criteria CFU-GM capacity, flow cytometric enumeration of CD34<sup>+</sup> cells and measurement of ALDH positivity has been targeted to analyze the relationship between them. 35 samples of UCB included in this study and analyzed in all the samples for the mentioned three parameters. 30 samples have been studied following erythrocyte and plasma separation; another 5 samples which were cryopreserved at -196 °C and used after thawing. The total number of nucleated cells of fresh samples (TNC) ( $93,27 \pm 30,1 \times 10^6/\text{Unit}$ ), CD34<sup>+</sup> cell counts ( $3,85 \pm 2,55 \times 10^6/\text{Unit}$ ) ALDH positive (ALDH<sup>+</sup>) ( $3,14 \pm 2,55 \times 10^6/\text{Unit}$ ), CFU-GM ( $13,2 \pm 9,81 \times 10^5/\text{Unit}$ ), CFU-GEMM ( $19,3 \pm 13,65 \times 10^5/\text{Unit}$ ) and in freeze-thaw samples TNC ( $71,76 \pm 29,77 \times 10^6/\text{Unit}$ ), CD34<sup>+</sup> ( $5,44 \pm 5,08 \times 10^6/\text{Unit}$ ), ALDH<sup>+</sup> ( $2,9 \pm 2,82 \times 10^6/\text{Unit}$ ), CFU-GM ( $6,18 \pm 3,44 \times 10^6/\text{Unit}$ ) and CFU-GEMM ( $4,57 \pm 3,22 \times 10^6/\text{Unit}$ ) were analyzed. In fresh samples relationship between CFU-GM, CD34 ( $r = 0,722$ ,  $p < 0,001$ ), and CFU-GEMM ( $r = 0,723$ ,  $p < 0,001$ ) ALDH, CFU GM ( $r = 0,624$ ,  $p < 0,001$ ), and the relation between CFU-GEMM ( $r = 0,451$ ,  $p = 0,12$ ) and CD34, ALDH ( $r = 0,670$ ,  $p < 0,01$ ) were found to be statistically significant.

2014, 68 pages

**Key words:** Human umbilical cord blood, Hematopoietic stem cells, CFU GM, ALDH

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca desteğini her zaman hissettiğim, sorularımı hiç bir zaman cevapsız bırakmayan, akademisyenlik kimliğiyle hayranlık duyduğum, örnek aldığım çok saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr.Meral Beksaç'a,

Bu tez çalışmama üstün bilgi ve tecrübeleri ile her daim güler yüzle, yardım severliğiyle bana destek olan, çok değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Klara Dalva'ya, yoğun iş akışına rağmen çalışmalarına vakit ayıran, sorularıma yanıt veren, tecrübeleriyle, çalışma düzeniyle bana öğretici olan çok sevgili Bio.Sema Meriç ve Akım Sitometrisi çalışanlarına,

Bu tez çalışması boyunca elinden gelen tüm desteği sağlayan, kişiliğine ve kusursuz çalışma düzenine hayran olduğum hocam Dr. Pınar Yurdakul'a,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankası' nın en başta destekleyicileri olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Kliniği Sorumlularına,

Tez çalışmasını gerçekleştirmemde yardımcı olan desteğini esirgemeyen, yoğunluğuna rağmen bana vakit ayıran değerli hocam Yrd.Doç.Dr.Arzu Atalay'a,

Laboratuvara geldiğim ilk günden beri bir an olsun desteğini esirgemeyen, tüm teknik problemlerimde konularda bilgisini ve desteğini benden eksik etmeyen çalışma arkadaşım, Bio. Handan Karakaya'ya ve yine tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, çalışma arkadaşım Bio.Seda Özkul'a teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması 113S261 kodlu, 'İnsan Göbek Kordon Kanı Hematopoetik Kök Hücrelerinin *Ex Vivo* Şartlarda Çoğaltılması' konulu TÜBİTAK 1001 projesiyle desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ONAY .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	3
2.1. Hematopoietik Kök Hücre (HKH) .....	3
2.2. İnsan Göbek Kordon Kanı.....	3
2.3. Hematopoietik Kök Hücre (HKH) Ölçüm Yöntemleri .....	5
2.3.1. Canlılık (7 AAD) CD34 <sup>+</sup> Hematopoietik Kök Hücre (HKH) Tayini .....	6
2.3.2. <i>Ex vivo</i> HKH Koloni Oluşturma (CFU-GM/GEMM) Yöntemi: .....	6
2.3.3. ALDH (Aldehit Dehidrogenaz) Enzim Aktivitesi .....	14
3. GEREKÇE ve AMAÇ .....	16
4. MATERYAL ve YÖNTEM .....	18
4.1. İnsan Göbek KK Üniteleri .....	18
4.2. İnsan Göbek KK Ünitesinde Plazma/Eritrosit Deplesyonu .....	18
4.3. Dondurulmuş İnsan Göbek KK Ünitesinin Eritilmesi ve DMSO'nun Uzaklaştırılması .....	19
4.4. İnsan Göbek KK Ünitelerinin Canlılık ve CD34 <sup>+</sup> Hücre Sayısı Belirlenmesi... ..	20
4.5. İnsan Göbek KK Kök Hücrelerinin Akım Sitometri ile Fenotipik Analizi ve ALDH Aktivite Tayini .....	20
4.6. <i>Ex vivo</i> Koloni Oluşturma (CFU) Yöntemi .....	21
4.7. İstatistiksel Analiz.....	23
5. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	24
5.1. KK Üniteleri .....	24
5.2. İnsan Göbek KK'sında Canlılık Oranları ve CD34 <sup>+</sup> Hücre Miktarları .....	26
5.3. İnsan Göbek KK CD34 Kök Hücrelerinin ALDH Aktivite Düzeyi .....	29
5.4. Koloni Oluşturma (CFU) Yöntemi.....	34
5.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları .....	41

<b>6. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>47</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>52</b>
<b>EK .....</b>	<b>53</b>
<b>EK1 .....</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>55</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR .....</b>	<b>56</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hematolojik hastalıkları tedavi amaçlı nakilde kök hücre kaynağı olarak kullanılan Kİ ile KK karşılaştırılması. ....	5
Çizelge 5.1. AÜTF KKB'ye ulaşan KK üniteleri arasından çalışmada kullanılmak için seçilen 30 KK ünitesinin hacim ve TNC miktarları.....	24
Çizelge 5.2. KK ünitesinin işlenip saklanması sonrası standarda uymadığı tespit edilip araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen 5 KK ünitesinin hacim ve TNC değerleri .....	25
Çizelge 5.3. Eritrosit deplesyonu sonrası dondurulma öncesi 30 KK ünitesinin lökosit sayısı, CD34 <sup>+</sup> miktarları ve canlılık yüzdeleri .....	27
Çizelge 5.4. KK ünitesinin işlenip saklanması sonrası standarda uymadığı tespit edilip araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen 5 KK ünitesinin lökosit sayısı, CD34 <sup>+</sup> miktarları ve canlılık yüzdeleri.....	28
Çizelge 5.5. Taze KK örneklerinde ALDH <sup>+</sup> hücre alt tiplerinin dağılımı.....	32
Çizelge 5.6. Araştırma grubundan seçilen dondurulup çözme sonrası ALDH <sup>+</sup> hücre alt tip dağılımı .....	33
Çizelge 5.7. Taze KK ünitelerinde 7. ve 14. gün koloni sayım sonuçları .....	38
Çizelge 5.8. Araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen 5 KK ünitesinde 7. ve 14. gün koloni sayım sonuçları.....	39
Çizelge 5.9. Taze 30 KK ünitesinde CFU-GM ve CFU-GEMM hücre sayıları .....	39
Çizelge 5.10. KK ünitesinin işlenip saklanması sonrası standarda uymadığı tespit edilip araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen beş KK ünitesinde CFU-GM ve CFU-GEMM hücre sayıları.....	40
Çizelge 5.11. Taze KK 'da Ünitelerdeki hesaplanmış değerleri .....	41
Çizelge 5.12. Donma çözülme sonrası KK'da Ünitelerdeki hücre değerleri .....	42
Çizelge 5.13. Otuz KK ünitesinin Karakteristik Analizi .....	42
Çizelge 5.14. Dondurma çözülme sonrası 5 KK ünitesinin Karakteristik Analizi .....	43
Çizelge 5.15. CFU-GM / CFU-GEMM Koloni sayılarına karşı KK ünitesindeki hematopoietik aktiviteyi gösteren korelasyon değerleri .....	43
Çizelge 5.16. Taze KK'nın tüm parametrelere göre istatistiki dağılım değerleri .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	CFU-GEMM kolonilerinin farklılaşma sonrası oluşturdukları hücre grupları.....	9
Şekil 2.2.	CFU-GEMM <i>inverted</i> mikroskop görüntüsü (4X objektif).....	10
Şekil 2.3.	CFU-GEMM <i>inverted</i> mikroskop görüntüsü (10X objektif).....	10
Şekil 2.4.	BFU-E kolonisi <i>inverted</i> mikroskop görüntüsü (4X objektif).....	11
Şekil 2.5.	BFU-E kolonileri <i>inverted</i> mikroskop görüntüsü (10X objektif).....	12
Şekil 2.6.	CFU kolonisi <i>inverted</i> mikroskop görüntüsü (4X objektif) .....	13
Şekil 2.7.	CFU kolonisi <i>inverted</i> mikroskop görüntüsü (10X objektif) .....	13
Şekil 4.1.	<i>Neubauer Thoma</i> lamı .....	22
Şekil 5.1.	Örnek 30 akım sitometri analiz sonrası 7AAD canlılık tayini sonuç grafiği.....	26
Şekil 5.2.	Örnek 30 akım sitometri analizi sonucu PE ile boyanmış CD34 Hücreler .....	27
Şekil 5.3.	Örnek 30 akım sitometrisi ile hesaplanan mutlak CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı .....	27
Şekil 5.4.	Akım Sitometri ALDH analizi sonrası ALDH <sup>+</sup> hücre popülasyonu grafiği.....	29
Şekil 5.5.	Akım Sitometri ALDH analizi sonrası ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD34 <sup>+</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik.....	30
Şekil 5.6.	Akım Sitometri ALDH analizi sonrası aynı anda ALDH <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> olan hücre popülasyonunu gösteren grafik .....	30
Şekil 5.7.	Akım Sitometri ALDH analizi sonrası CD34 <sup>+</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik .....	31
Şekil 5.8.	Akım Sitometri ALDH analizi sonrası CD34 <sup>+</sup> hücreler arasında ALDH <sup>+</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik.....	31
Şekil 5.9.	Akım Sitometri ALDH analizi sonrası CD45 <sup>+</sup> olup CD90 <sup>-</sup> CD73 <sup>-</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik.....	32
Şekil 5.10.	Örnek 22 14. günde Bfu-E kolonisi (1 koloni -10X objektif) .....	34
Şekil 5.11.	Örnek 25 14. gün CFU-GEMM kolonisi (1 koloni -10X objektif) .....	35
Şekil 5.12.	Örnek 22 7. gün kolonileri (4X objektif-4 adet CFU-GM kolonisi) .....	35
Şekil 5.13.	Örnek 22 7. gün kolonileri (4X objektif- 2 adet CFU-GM kolonisi) .....	36

Şekil 5.14. Örnek 25 14. gün kolonileri (4X objektif- 2 CFU-GM, 3-4 CFU-GEMM kolonisi).....	36
Şekil 5.15. Örnek 21 14. gün kolonileri (4X objektif 1, 2, 4 CFU-GM, 3 CFU-GEMM kolonisi).....	37
Şekil 5.16. Örnek 28 14. gün kolonileri (4X objektif 1 CFU-GM, 2-4 CFU-GEMM kolonisi).....	37
Şekil 6.1. ALDH <sup>+</sup> olup CD34 <sup>-</sup> ve CD34 <sup>+</sup> olup ALDH <sup>-</sup> olan hücre popülasyonu oranları.....	46

## SİMGELER DİZİNİ

ALDH	Aldehit Dehidrogenaz Enzimi
CFU-GEMM	Koloni Oluşturan Birim Granülositer Makrofaj Eritrosit Megakaryosit
CFU-GM	Koloni Oluşturan Birim Granülositer Makrofaj
C02	Karbondioksit
g	Gram
g	Yer çekimi sabiti
HKH	Hematopietik Kök Hücre
HSC	Hematopietic stem cell
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
KK	Kordon Kanı
L	Litre
LTR	Uzun dönem popülasyon oluşturan hücreler
ml	Mililitre
SSD	Standart Sapma Değeri
STR	Kısa dönem popülasyon oluşturan hücreler
TNC	Toplam çekirdekli hücre
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Günümüzde kan ve bağışıklık sistemi hastalıklarının tedavisinde doku uyumu taşıyan bireylerden hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) en başarılı ve yaşam kurtarıcı tedavi yöntemidir. Kordon Kanı (KK) 1989 yılından beri kullanılan önemli bir alternatif HKH kaynağıdır<sup>1,2</sup>. Bu kök hücre kaynağından nakiller giderek artmakta ve günümüzde 10 000'den fazla sayıda hastaya uygulanmış bulunmaktadır. HKHN açısından kemik iliği (Kİ) ve çevre kan (ÇK) ile birlikte, insan göbek kordon bağından toplanan KK da önemli bir kök hücre kaynağını oluşturmaktadır. KK kaynaklı HKH'lerin klinik uygulama için yeterli niteliklere sahip olup olmadığını gösteren standart yöntemler mevcuttur<sup>3</sup>. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) yöntemi baz alınarak akım sitometri yöntemi ile *cluster of differentiation* (CD)34<sup>+</sup> hücre mutlak sayısının belirlenmesi (KK) ünitesinin değerlendirilmesinde klinik seçim kriteridir<sup>4</sup>. CD34<sup>+</sup> sayısı kadar, CD34<sup>+</sup> hücreler arasındaki fraksiyonların ve farklı fraksiyonların işlevselliğinin ortaya konması ve dondurma/çözme sonrası CD34<sup>+</sup> HKH kalite ve sayısının belirlenmesi de önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, KK HKH'deki CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonundaki çeşitli hücrelerin engrafman yeteneklerinin nakil başarısını farklı şekilde etkilediği gösterilmiştir. KK HKH içeriğini belirlemeye yönelik kullanılan ikinci yöntem *ex vivo* koloni oluşturma (CFU-GM) testleridir. Bu *ex vivo* kültür testleri, yarı katı besiyerinde belirli HKH tiplerinin üremesine ve bu kolonilerin kantitatif/semi kantitatif değerlendirilmelerine olanak sağlar. CFU-GM testlerinin insan periferik kanındaki CD34 hücre sayısı ile ilişkisi daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur<sup>3,5</sup>. Emek yoğun ve zaman kaybettirici doğaları, daha da önemlisi standardizasyonda yaşanan güçlükler CFU-GM testlerini rutin uygulama olmaktan çıkarmaktadır<sup>3</sup>. Bu nedenle CFU-GM testlerinden daha pratik ve fonksiyonel hücre fraksiyonlarını saptamaya yönelik yöntem arayışı devam etmektedir. Standart ISHAGE yöntemi ile paralel kullanılacak, hem sayı hem işlev hakkında bilgi verebilecek, hızlı, duyarlı/özgül yöntemler araştırılmaktadır<sup>6</sup>. Fonksiyonel hücre fraksiyonlarının hızlı belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden diğer bir tanesi de, KK hücrelerindeki ALDH aktivitesinin belirlenmesi yöntemidir. Normal koşullarda kısa dönem progenitor hücrelerdeki ALDH aktivitesi daha düşüktür ve boyanmadaki kantitatif farklılıklar sayesinde uzun ve kısa dönem progenitor hücreler bu yöntemle ayırt edilebilmektedir<sup>7</sup>. ALDH aktivitesi yüksek olan HKH popülasyonlarının HKH nakilleri sonrası engrafmanla ilişkisine dair çelişkili yayınlar vardır<sup>8-10</sup>. Buna karşılık KK nakli

sonrası kalıcı engrafmanı sağlayan hücre topluluğu olduğuna dair hayvan çalışmaları bulunmaktadır. *Pearce ve ark* farelerde ALDH<sup>+</sup> ile CD34<sup>+</sup> birlikteliğinin % 63 oranında, her iki parametreyi de içermeyen hücre oranının % 28.4 olduğunu göstermişler, akabinde fareye nakil sonrası sadece ALDH<sup>+</sup> hücrelerin engrafman oluşturduğu, ALDH negatiflerin(ALDH<sup>-</sup>) yeniden popüle olamadığını göstermişlerdir<sup>5</sup>. *Storms ve ark* ise ALDH aktivitesi yüksek (ALDH parlak) ve ALDH aktivitesi düşük (ALDH zayıf) hücrelerin CD34<sup>+/+</sup> olmasına göre üç ayrı popülasyon oluşturduktan sonra sadece ALDH parlak ve CD34<sup>+</sup> hücreler arasında hem kısa hem de uzun süreli engrafman oluşturma yüzdesinin en yüksek olduğunu göstermişlerdir<sup>11</sup>. Engrafman sonrası miyeloid koloni oluşturma sayısı açısından en yüksek kapasitesi olanlar ALDH parlak CD34<sup>+</sup> hücreler olup bunları Lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> hücreler izlemiştir. En az koloni (1/60 oranında) ALDH<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> hücrelerle elde edilmiştir. *Boxall ve ark* istirahat fazındaki CD133<sup>+</sup> KK hücrelerinin %75 inin aynı zamanda ALDH<sup>+</sup> olduğunu oysa CD133<sup>+</sup> ama G1 fazındaki hücrelerin ancak %4-11 oranında ALDH<sup>+</sup> olduğunu göstermişlerdir<sup>12</sup>.

Görüldüğü üzere CD34<sup>+</sup> HKH'ler homojen bir topluluk değildir. CFU-GM koloni sayısı ile standart akım sitometri yöntemiyle saptanan CD34<sup>+</sup> hücre sayısı arasındaki ilişkinin belirlenmesi gereksinimine yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Kİ ve çevre kök hücre nakillerinde, nakil başarısı üstüne CFU-GM ve CD34 dozuna bağlı bir etki olduğu kesin olmakla beraber, KK için ispatlanmış korelasyonu gösterecek yeterli çalışma literatürde yer almamaktadır. İlaveten dondurma işlemi öncesi ve dondurma-çözme sonrası apoptozise uğrayan veya ölen hangi tip progenitor hücrelerin olduğu bu tez araştırması başlandığında henüz yayınlanmamıştı. *Lee ve ark'* nın yakın zamanda yayınlanan araştırması CD34, ALDH ve CFU-GM koloniler arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir<sup>13</sup>.

Bu araştırma ile hem taze hem de dondurma sürecinden geçmiş repopülasyon kapasiteleri farklı HKH alt tiplerinin üç farklı yaklaşım bir arada kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu analiz ile farklı gelişim evrelerindeki kök hücrelerin ve progenitörlerin saptanmasını sağlayan, hızlı, ekonomik ve prediktif değeri güçlü bir HKH analiz yönteminin seçilmesi hedeflenmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Hematopoitik Kök Hücre (HKH)

Erişkin kök hücreler, canlı organizmalarda doku ve organlarda bulunan kök hücrelerdir. Erişkin kök hücreler kendilerini yenileme özelliklerine sahiptirler ve ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların tamirini, yenilenmelerini ve yaşamlarını devam ettirmelerini sağlamaktadırlar. Son yıllarda araştırılan birçok dokuda erişkin kök hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelere en güzel örnek olarak hematopoitik kök hücreler gösterilebilir<sup>1,2</sup>.

### 2.2. İnsan Göbek Kordon Kanı

HKH çeşitli dokulardan elde edilir. En fazla Kİ, daha az olarak ÇK veya KK hatta fetal döneme ait karaciğer, dalak gibi dokularda da bulunmaktadır. Gebelik boyunca anneye rahimdeki bebek (fetus) arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonundaki kana KK denilir. Doğum sırasında atılan KK ilk kez 1988'de kök hücre nakli amacıyla kullanılmıştır. ABD'de yaşanan Molly Nash olgusu bu konu için çok iyi bir örnektir. Fanconi aplastik anemi tanısı konan bu çocuğun hemşire olan annesinin bir şifa bulmak konusundaki gayretleri, onları dünyada ilk kez preimplantasyon genetik tanı ve *ex vivo* fertilizasyon ile sağlanan bir vericiye ulaştırmıştır. *Ex vivo* fertilizasyon ile elde edilen, *Fanconi* mutasyonuna sahip olmayan 12 embriyodan, HLA uygun olan 5'i dört embriyo transfer denemesinden sonra beşincide gebelik başarılmıştır. Bebekten toplanan kordon kanı kardeşine başarılı bir transplantasyon ile aktararak normal hematolojik değerlere kavuşması sağlanmıştır<sup>14,15</sup>. Bu başarılı deneyimin ardından malign olan veya olmayan değişik tanılara sahip hastalarda da başarılı sonuçlar yayınlanmıştır.

KK, erişkin kanından daha yüksek yoğunlukta kök hücreler barındırır. KK telomeri uzun hematopoitik öncül hücrelerden çok zengin bir kaynaktır. Bu hücrelerin proliferasyon hızı perifer kandakilerden daha yüksektir. Yeni doğan, bağışıklık sisteminin henüz şekillenmediği, immatür ve dolayısıyla yeni konağa uyumun en iyi gerçekleşebildiği modeldir. Hücre sayıları erişkindeki ile benzer olmakla birlikte çoğu immatürdür ve sitokin

yapımı düşüktür. Bu nedenlerden dolayı KK nakillerinde rejeksiyon ve *graft versus host* hastalığı gibi istenmeyen reaksiyonlar daha az gelişmektedir. Göbek kordon kanından elde edilen HKH'ler alıcı-verici arasında tam *human leukocyte antigen* (HLA) uyumu gerektirmemesi (4/6 uyum kabul edilebilir) ve erişkin HKH'ye oranla 1 log daha az sayıda kök hücre ile nakil gerçekleştirilebilmesi olumlu özellikleridir. HLA uyumsuz KK nakillerinin Kİ nakillerine göre daha iyi sonuç verdiği ancak sınırlayıcı faktörün alıcının vücut ağırlığı olduğu bilinmektedir. Etnik azınlıklarda kullanılabilirliği ve dondurulmuş ve saklanmış hazır bir HKH kaynağı olması da diğer avantajları arasındadır <sup>3,16,17</sup>. Bu özellikleri nedeniyle eskiden doğum eylemi sonrasında çöpe atılan KK, artık tedavi amacıyla kullanılan bir kök hücre kaynağı haline gelmiştir ve doğumu hemen takiben toplanarak ilerde kullanılmak üzere özel koşullarda saklanmaya alınabilmektedir. KK, tek kök hücre kaynağı değildir. Bugün için tıbben kabul gören tek kullanım alanı, kan ve bağışıklık sistem hastalıklarının tedavisidir. KK kök hücre nakli tedavisinden yarar gören durumlar arasında akut lösemiler, kalıtsal kan hastalıkları (talasemi), metabolik ve immun yetmezlik sendromları, akkiz kemik iliği yetmezlikleri dahil olmak üzere toplam 70 hastalığı içermektedir. KK az hacimde (yaklaşık 100 ml) olduğu için içerdiği toplam HKH miktarı da Kİ veya büyüme faktörü ile uyarılmış periferik kandan elde edilebilenden daha azdır. Bu nedenle KK çoğunlukla çocuklarda kullanılmıştır. Ancak son dönemde birden fazla bebekten toplanan ürünlerin tek bir hastaya da başarıyla kullanılabilirdiğinin görülmesi sonucu giderek artan oranda erişkinlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Dünyada en çok kullanıldığı durum, kök hücre nakli tedavisi gereken ancak aile bireyleri arasında veya tüm dünyadaki 1 milyondan fazla verici arasında doku grupları uygun bir verici bulunamayan hastaların tedavisi amacıyla kullanımınıdır. Kök hücre araştırmalarında deneysel düzeydeki sonuçlar KK'nın ilerde insanlarda doku tamiri konusunda da kullanabileceği işaretlerini vermektedir.

İlk başarılı uygulamayı takiben 1990'lı yıllardan itibaren KK bankacılığı gelişmeye başlamıştır. ABD'de *New York Blood Center*, Avrupa'da Barcelona ve Düsseldorf'taki örnekleri takip etmiştir. Bugün *International NetCord Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT/ NETCORD)*'ı oluşturan 50'den fazla KK bankası akraba olmayan kök hücre kaynaklarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır.<sup>18,19</sup>



**Çizelge 2.1.** Hematolojik hastalıkları tedavi amaçlı nakilde kök hücre kaynağı olarak kullanılan Kİ ile KK karşılaştırılması (Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar Kitabı 29.bölümden adapte edilmiştir).

	<b>Kİ</b>	<b>KK</b>
<b>Kök Hücre ve Lenfosit İçeriği</b>	Daha fazla	Daha az
<b>HLA-DRB1 tiplendirme oranı</b>	% 16-56	% 80
<b>Uygun verici bulma süresi</b>	3 ay	1 aydan az
<b>Sanal-reel oranı</b>	% 30	% 1'den az
<b>Nadir haplotip içermesi</b>	% 2-10	% 20
<b>Engrafmanı etkileyen</b>	HLA uyumu	HLA uyumu ve hücre sayısı
<b>Harvest ve uygulama</b>	Zor	Kolay
<b>Donör lenfosit infüzyonu</b>	Var	Yok
<b>Viral bulaşma riski</b>	Var	Yok
<b>Kalıtsal hastalık riski</b>	Yok	Var
<b>Vericiye riski</b>	Var	Yok
<b>GVHH riski</b>	Daha fazla	Daha az
<b>Engrafman</b>	Daha hızlı	Daha yavaş
<b>Nakil Sonrası CMV riski</b>	Daha az	Daha fazla
<b>Nakil Sonrası HHV-6 enfeksiyon riski</b>	Daha az	Daha fazla
<b>Nüks riski</b>	Daha az	Daha fazla
<b>Kök hücre ve lenfosit içeriği</b>	Daha fazla	Daha az

### 2.3. Hematopoietik Kök Hücre (HKH) Ölçüm Yöntemleri

Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek, günümüzde en yaygın başvurulan yöntemlerdendir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçler genel olarak CD olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunabilirler. Örneğin; en yaygın HKH CD belirteçleri, CD34 ve CD45 'tir. Buna karşın mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için CD29, CD73 gibi belirteçler kullanılır. Daha az oranda CD133 de erken progenitörleri saptamak için kullanılırken CD38 bu hücrelerde negatiftir.

Dondurma öncesi toplanan hücrelerin yeterli miktarda ve canlılığa sahip olduğu kanıtlanmalıdır. Kordon kanı üzerinde mutlaka yapılması gereken diğer bir inceleme toplanan kan hacmi, toplanan hücre sayısı toplam çekirdekli hücre sayısı (TNC), kök hücre sayısının akım sitometrik veya CFU-GM kültür yöntemleriyle tayinidir<sup>20</sup>. CD34 transmembran glikoproteini KK'daki önemli HKH belirteçidir. Bugünkü uygulamada, CD34<sup>+</sup> hücre mutlak sayısının belirlenmesi KK ünitesi seçimindeki HLA uyumundan sonraki en önemli klinik seçim kriteridir<sup>8,21,22</sup>. Büyüme faktörü ile indüklenmemiş bir kaynak olduğu için CD34<sup>+</sup>lığı %1 düzeyindedir. Verici alıcı tespitinde en önemli noktalardan birisi verilecek kök hücre sayısının 2 x 10<sup>5</sup> kök hücre/kg'dan az olmamasını sağlamaktır. EBMT, kök hücre tayininin standardizasyonu için merkezler arasında bir kalite kontrol programı geliştirmiştir. Kök hücre naklinde kullanılacak KK'nın toplanma öncesinden başlayarak tüm aşamalarda ulusal ve uluslararası akreditasyonlara sahip laboratuvar ve KK bankalarında test edilerek saklandığının belgelenmesi gereklidir.

### **2.3.1. Canlılık (7 AAD) - CD34<sup>+</sup> Hematopoetik Kök Hücre (HKH) Tayini**

Günümüzde CD34<sup>+</sup> hücrelerin akım sitometrik analizi, HKH sayısının belirlenmesinde en sık başvurulan yöntemdir. İşlemin 1 saatten kısa sürmesi, aferez ünitelerinin eş zamanlı işlemleri için bu yöntemi ideal hale getirmektedir. Buna karşın birçok akım sitometri analiz yöntemiyle standardizasyonda yaşanan problemler nedeniyle optimize olmayan veriler elde edilmektedir. Günümüzde HKH canlılığının akım sitometri analizi ile belirlenmesinde altın standart ISHAGE protokolüdür<sup>23,24</sup>. ISHAGE, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) boyasının ölü hücreleri boyamasıyla geriye kalan her canlı 10.000 CD45<sup>+</sup> lökosit arasından 10-20 CD34<sup>+</sup> hücre seçilebilecek hassasiyete sahiptir. *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) ile işaretli lökosit CD45 ve *Phycoerythrin* (PE) ile işaretli konjuge CD34 antikorunun kullanılması basit ve hızlı analizi olanaklı kılmaktadır<sup>25</sup>.

### **2.3.2. Ex vivo HKH Koloni Oluşturma (CFU-GM/GEMM) Yöntemi:**

Kantitatif olarak CD34<sup>+</sup> HKH ve TNC sayısının belirlenmesi klinik nakil başarısını öngörmek için her zaman yeterli olmamakta ve bu nedenle engrafman potansiyelini değerlendirmeyi sağlayan farklı testlerin önemi de vurgulanmaktadır<sup>3,7,26</sup>. CD34<sup>+</sup> hücreler arasındaki fraksiyonların ve farklı fraksiyonların işlevselliğinin ortaya konması, diğer

yandan dondurma/çözme sonrası CD34<sup>+</sup> HKH kalite ve sayısının belirlenmesi önem taşımaktadır<sup>20</sup>. KK ünitesi kısa ve uzun dönemli (sırasıyla, *short term repopulating-long term repopulating* STR-LTR) immün yapılanma kapasitesi olan iki tip progenitör hücre grubu içermektedir ve özellikle LTR progenitörler kalıcı engraftmanda rol oynamaktadır<sup>7,27</sup>. Farklı HKH tiplerinin *in vivo* fonksiyonlarını belirlemek adına laboratuvarında en sık kullanılan yöntem CFU-GM testleridir<sup>21,22,26</sup>. Bu *ex vivo* kültür testleri, yarı katı besiyerinde üreyen farklı özellik ve evresindeki HKH tipleri ve bunların kantitatif/semi kantitatif değerlendirilmelerine olanak sağlar. Ancak, kalıcı engraftman oluşturma özelliği gösterilmiş LTR HKH'nin üretilmesi açısından yetersiz kalan CFU-GM testleri, zor ve zaman kaybettirici olmaları nedenleriyle daha az tercih edilmektedir<sup>21</sup>. Her ne kadar, CFU besiyerinde üreme gösteren hücreler kendini yenileme kapasitesi düşük progenitörler olsa da *ex vivo* testlerle belirlenen CFU dozunun, engraftman süresini ve KK nakil başarısını belirlemede üstünlüğünü vurgulayan yayınlar da mevcuttur<sup>3,28,20,27</sup>. Özellikle, Kİ ve ÇK kök hücre naklinde nötrofil engraftmanını tayin etmek için en anlamlı klinik kriter olduğu daha önceki yıllarda ve yayınlarda belirtilmiştir<sup>9,10,20,26,28,29</sup>. Ancak bu kriterle bağlantı KK nakli için belirsizliğini korumaktadır. *Migliacco ve ark* çalışmalarında, CFU-GM sayısının yüksekliğinin TNC'ye oranla kordon *graft*'lerinde daha iyi nötrofil ve platelet engraftmanı sağladığını göstermişlerdir<sup>26</sup>. Ancak dondurma öncesi gerçekleştirdikleri denemeyi, çözme aşamasında tekrarlamadıkları için, sonuçların klinik anlamı tartışmalı kalmıştır. Yakın bir zaman önce, *Lori ve grubu*, akraba dışı KK nakli uygulanan 42 yüksek riskli lösemi hastalarını dahil ettikleri bir çalışmada<sup>30</sup>, TNC sayısı, CD34 dozu ve CFU-GM koloni sayısı arasında CFU-GM in akraba dışı KK nakillerinde bir çok yaşam göstergesi için tek anlamlı parameter olduğunu göstermişlerdir. Özellikle, hastalısız sağkalım oranını sadece CFU-GM dozu ile ilişkili bulmuşlar ve KK seçim kriteri olarak mutlaka seçim parametreleri arasına eklenmesi gerekliliği üstünde durmuşlardır. Dolayısıyla, CD34 sayısı ile birlikte, hücre popülasyonlarının ve fonksiyonel işlevlerinin belirlenmesinin nakil başarısına büyük katkısı olduğu ve bunu hızlı ve standardize bir şekilde gerçekleştirecek CFU-GM alternatiflerine ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir.

*Ex vivo* deneyler çeşitli gelişim aşamalarında HKH'nin frekansları ve büyüme özellikleri hakkında fikir elde etmek için kullanılır. HKH'ler kültürde çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip olmasına rağmen sınırlı yenileme özelliği gösteren kısa dönem progenitor hücrelerin saptanmasına olanak tanır. Fakat aynı zamanda kültürde saptanan hücreler multipotansiyel (çeşitli kan hücre tiplerini oluşturabilecek yetenekte) veya farklı

iki soy farklılaşmasına gidebilecek yetenektedir (eritrosit, granulosit, monosit/makrofaj veya trombosit).

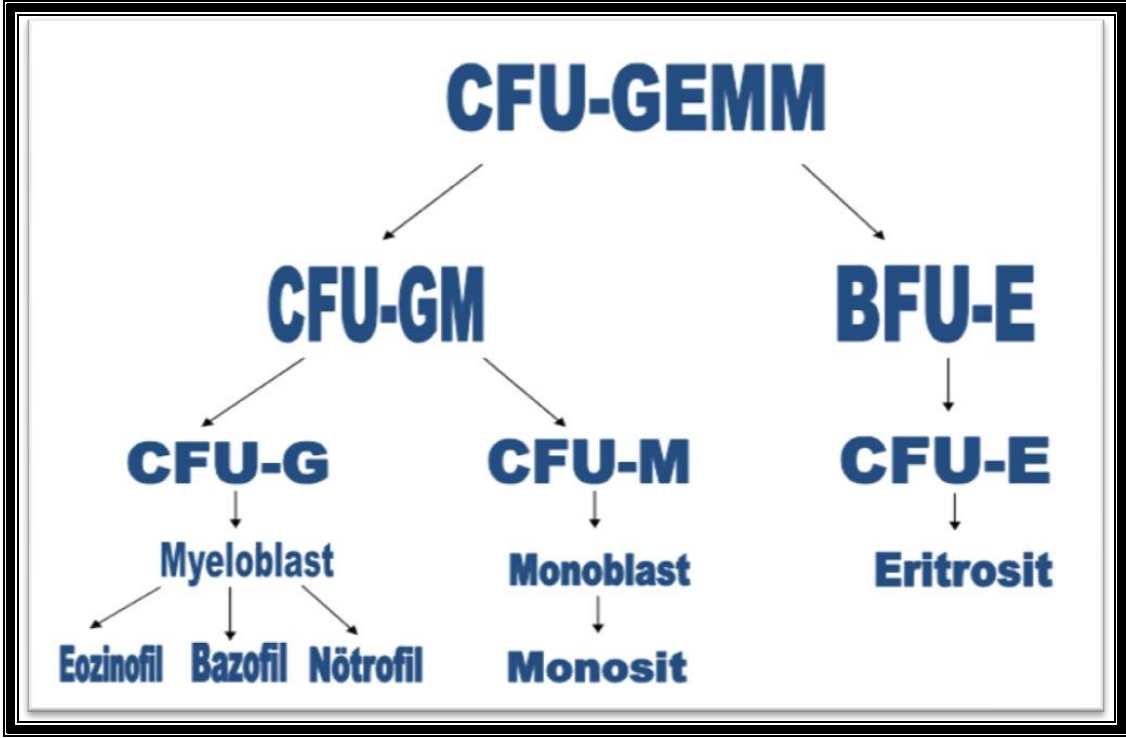
Hücreler yarı katı metil selüloz besiyerinde kültür edildiğinde, topluluk oluşturan hücreler koloni oluşturan hücre (CFC) olarak adlandırılır ve net bir şekilde ayırt edilebilecek kümeler veya koloniler oluştururlar. Metilselüloz besiyeri pH değişikliklerinden etkilenmediğinden CFC deneyleri için standart yarı katı matriks olarak kullanılmaktadır.

Metilselüloz besiyerinde optimal ekim ve inkübasyon şartları sağlanmak koşuluyla, gözlenen her koloni tek başına bir progenitor olarak kabul edilir. Standart CFC deneylerinde, CFC'lerin hangi hematopoetik kökene farklılaşacağı, oluşan koloni morfolojileri baz alınarak sayılır ve sınıflandırılır.

#### **Morfolojilerine Göre Koloni Oluşturan Hücre Birimi (CFU) Tipleri:**

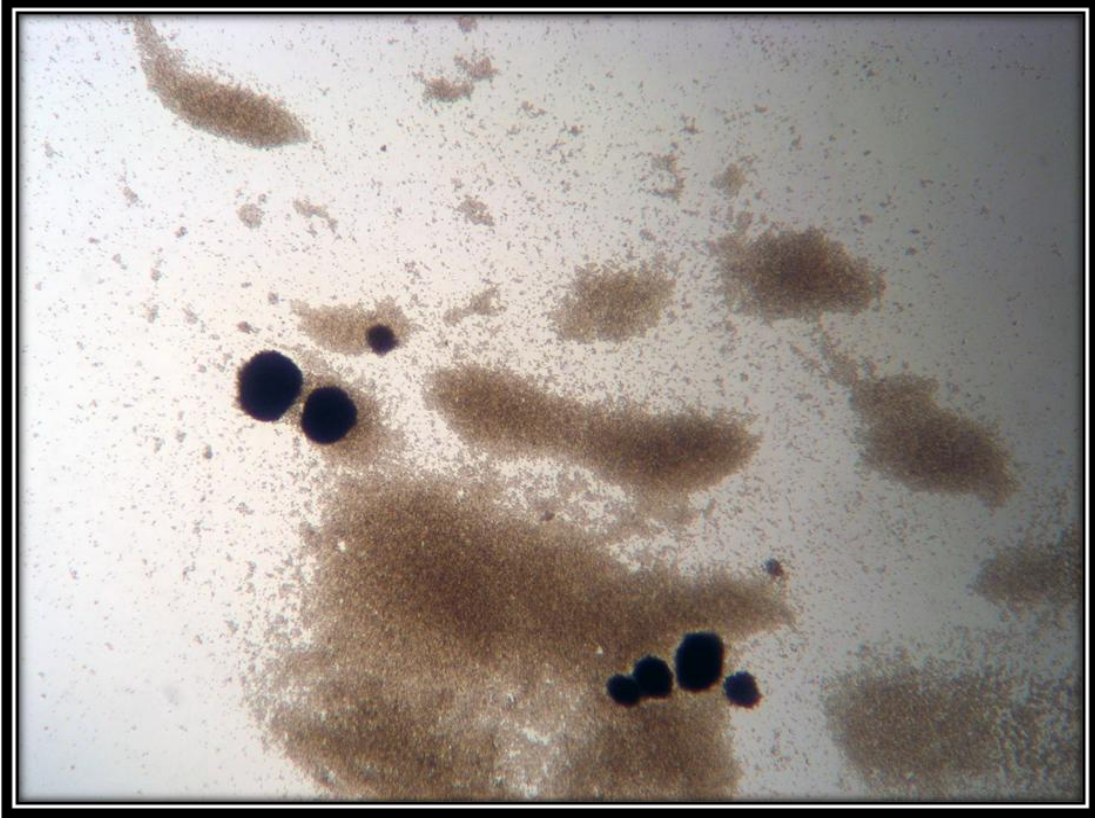
**CFU-GEMM (*Colony Forming Unit / Granulocyte Erythroid Macrophage Megakaryocyte*):** Granülositer, eritrosit, makrofaj, megakaryosit, koloni oluşturan birimi. CFU-GEMM kolonileri daha sonra CFU-GM ve BFU-E kolonilerine ve alt gruplarına farklılaşır. Bahsi geçen alt gruplara farklılaşma Şekil 2.1.'de şematize edilmiştir. Şekil 2.2. ve Şekil 2.3. ise CFU-GEMM kolonilerinin *inverted* mikroskopta çekilmiş fotoğraf görüntüleridir.

Bu tez çalışmasında kullanılan fotoğraflar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde bulunan *inverted* mikroskopuna bağlı kamera ile çekilmiştir.

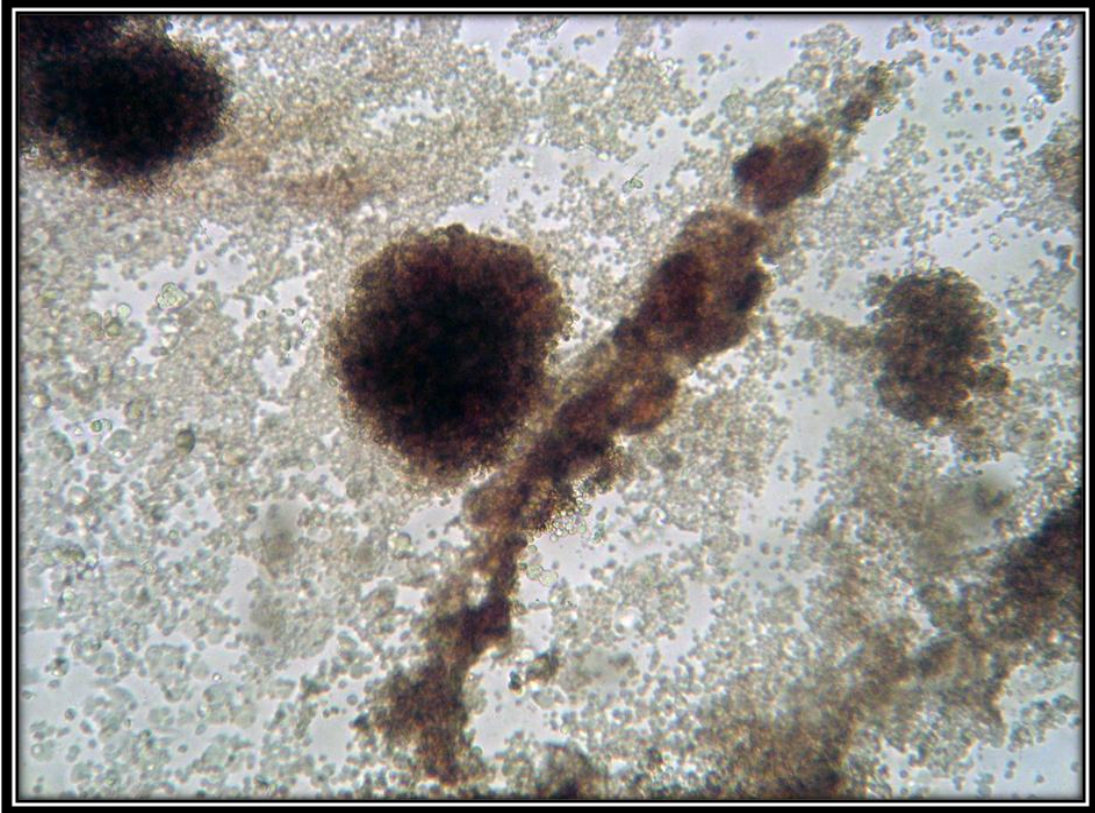


**Şekil 2.1.** CFU-GEMM kolonilerinin farklılaşma sonrası oluşturdukları hücre grupları (StemCell Technologies Technical Manual versiyon 4.0.0'dan modifiye edilmiştir).

CFU-GM ve CFU-GEMM kolonileri nakil sonrası engraftmanda rol oynayan HKH öncül kolonilerdir.

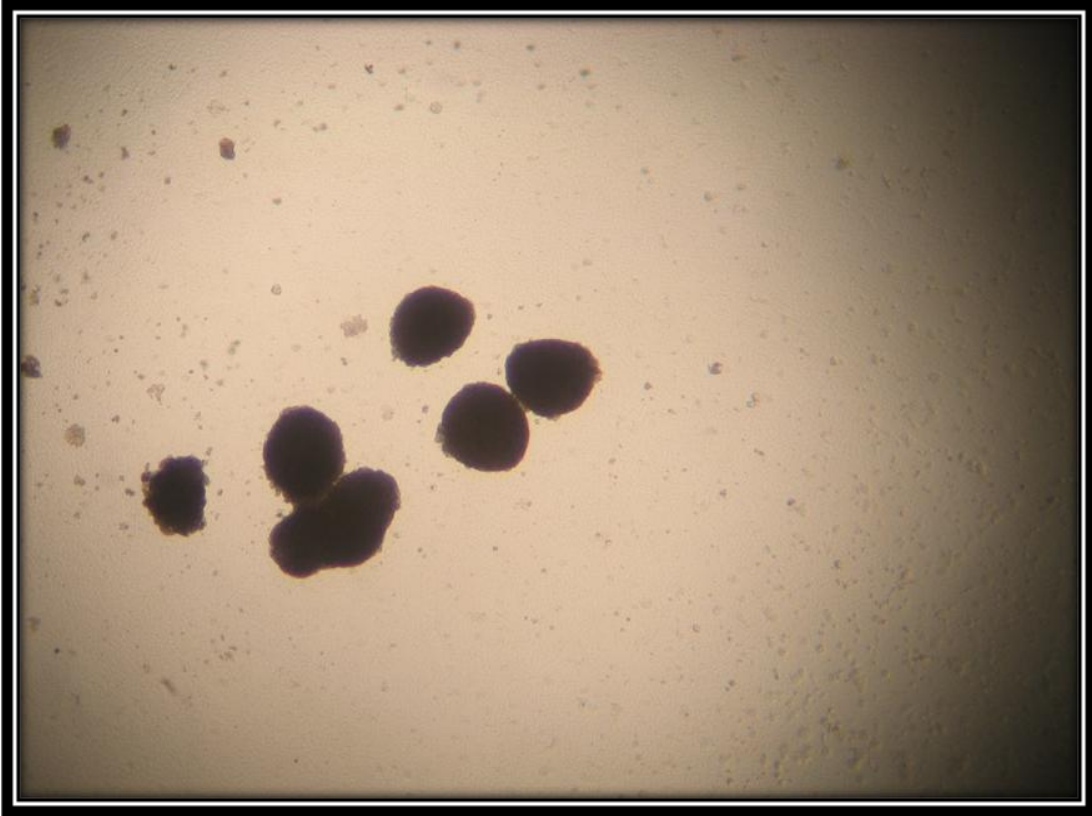


Şekil 2.2. CFU-GEMM *inverted* mikroskop görüntüsü (4X objektif)

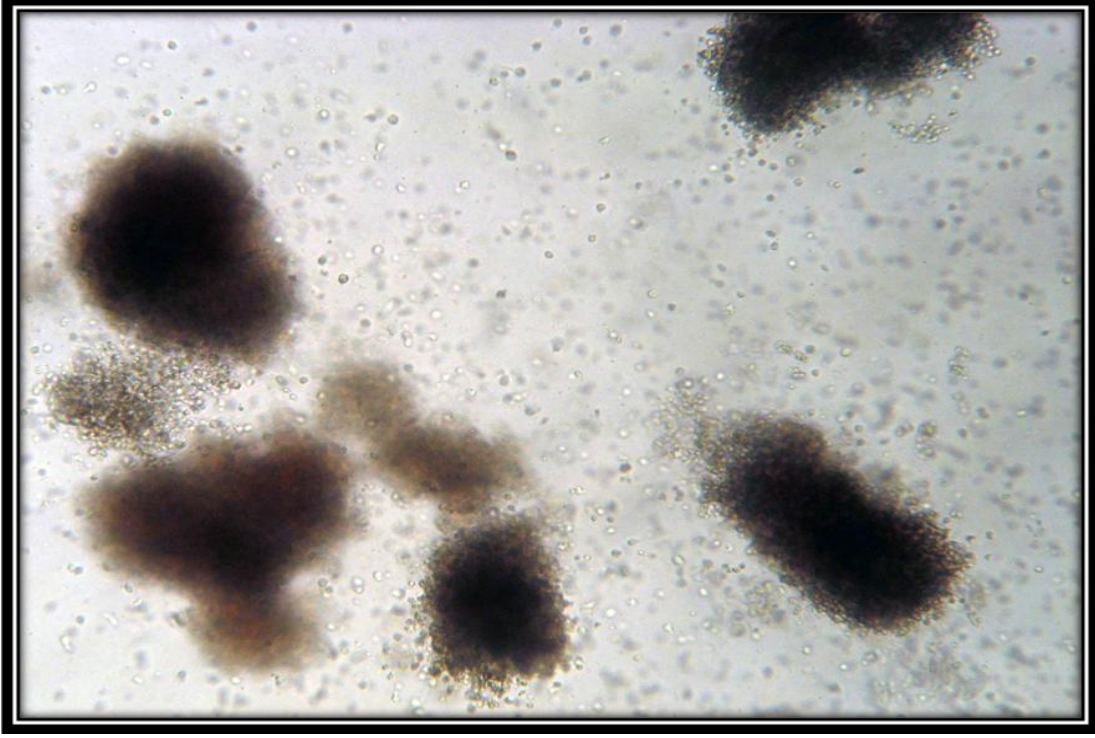


Şekil 2.3. CFU-GEMM *inverted* mikroskop görüntüsü (10X objektif)

**BFU-E (*Burst Forming Unit / Erythroid*):** Parçalanmış eritrosit koloni oluşturan hücre birimi. 200 eritroblast ve fazlası halinde tek koloni veya çoğul kümelenme oluştururlar, alt kümelere ayrılarak sınıflandırabilirler. BFU-E, CFU-E'ye kıyasla immatürdür. BFU-E parçalama etkisini gösterebilmesi için eritropoietin (EPO) ve sitokinlere ihtiyaç duyarken, optimal koloni oluşturabilmek için ise interlökin -3 (IL-3) ve “*stem cell factor*” (SCF)'ye ihtiyaç duymaktadır. BFU-E kolonilerine ait *inverted* mikroskop görüntüleri Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'te yer almaktadır.



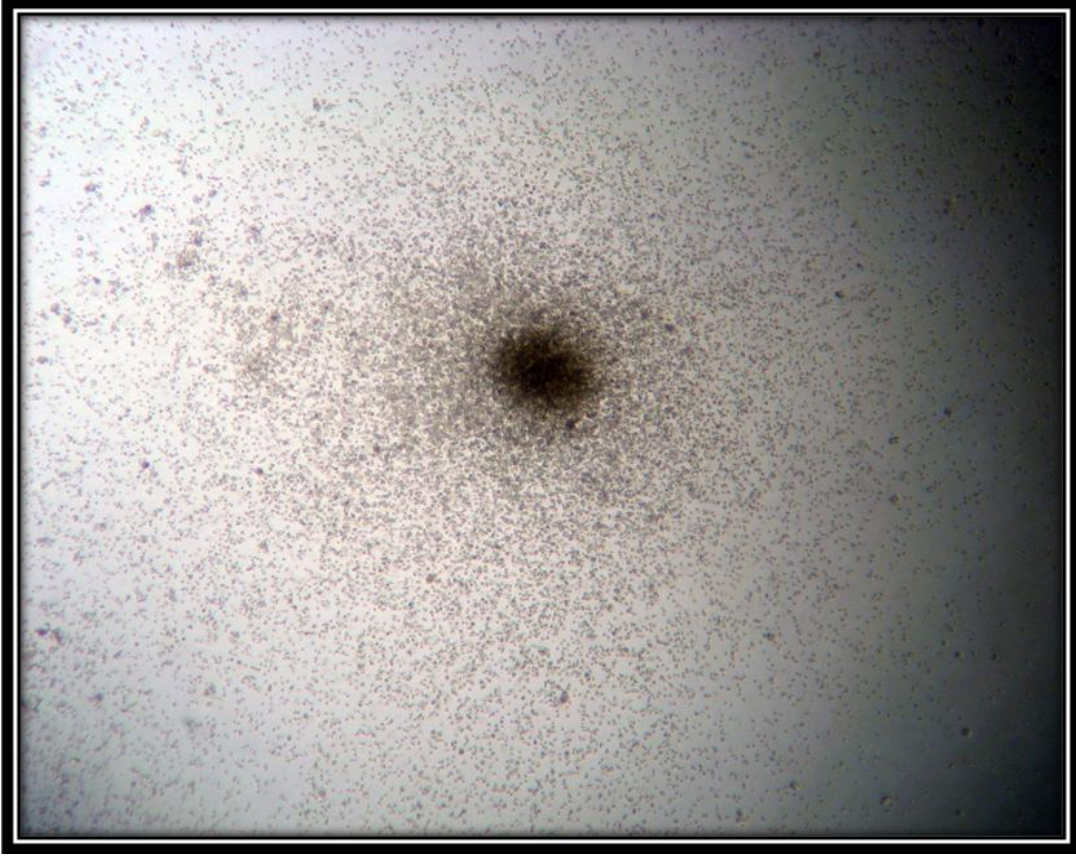
**Şekil 2.4.** BFU-E kolonisi *inverted* mikroskop görüntüsü (4X objektif)



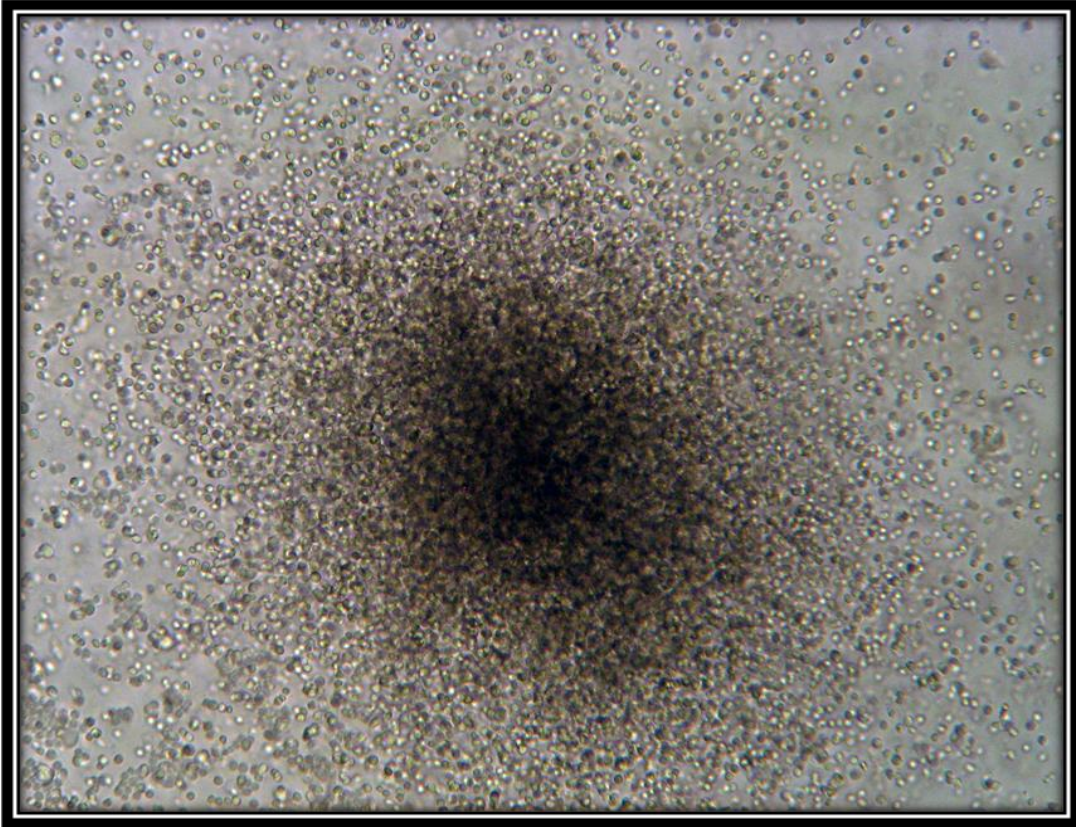
**Şekil 2.5.** BFU-E kolonileri *inverted* mikroskop görüntüsü (10X objektif)

**CFU-GM (*Colony Forming Unit / Granulocyte-Macrophage*):** Granülositer-Makrofaj koloni oluşturan birim. En az 20 granülositten (CFU-G) ve makrofajdan (CFU-M) oluşan veya her ikisini de oluşturan kolonidir. CFU-GM kolonileri temel olarak binlerce hücreden oluşan küme oluşturabilirler. Şekil 2.6. ve Şekil 2.7.'de CFU-GM kolonilerinin *inverted* mikroskopta çekilmiş görüntüleri yer almaktadır.





Şekil 2.6. CFU kolonisi *inverted* mikroskop görüntüsü (4X objektif)



Şekil 2.7. CFU kolonisi *inverted* mikroskop görüntüsü (10X objektif)

### 2.3.3. ALDH (Aldehit Dehidrogenaz) Enzim Aktivitesi

ALDH enzimi, hücre içi aldehit yıkımı ve oksidasyonundan sorumlu olan ve, KK, Kİ ve ÇK hücrelerinde bulunan bir enzimdir<sup>5,11,31,32</sup>. İnsan primitif progenitör hücrelerinde yüksek ALDH aktivitesi olduğu bilinmektedir<sup>5,7,31,32</sup>. ALDH aktivitesi, enzim kinetikleri kullanılarak, hücre lizatlarında NAD<sup>+</sup> substratının NADH'ye redüksiyonu ve bunun 37°C, 340 nm dalga boyunda ölçümü yoluyla hesaplanabilir.<sup>3</sup> Şimdiye kadar ALDH<sup>+</sup> progenitörleri fenotiplendirmeyi hedefleyen *ex vivo* çalışmalarla, *in vivo* miyeloproliferatif özelliklerini araştırmaya yönelik araştırmalar Kİ'de yapılmıştır<sup>3,5,27,33,34</sup>. ALDH<sup>+</sup> HKH içinde, hem STR hem de LTR progenitörlerin var olduğu, fenotipik özelliklerine bağlı olarak ALDH aktivitesi yüksek olan progenitörlerin hayvanda kısa ve uzun dönem engrafman sağlayabildiği, CFU kolonilerinin farklı oranlarda ALDH aktivitesi gösterebileceği ve ALDH, CD34 ko-ekspresyonunun özellikle engrafman başarısı yüksek progenitörler olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir<sup>3,5,7,11,27,33,34</sup>. Bu özelliğin, floresanla işaretli substrat varlığında gösterilmesi ise (ALDH aktivite tayini) son yıllarda primitif HKH popülasyonlarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaya başlamıştır<sup>3,5,33-36</sup>. *Gentry ve ark* çalışmalarında, ALDH aktivitesinin kısa dönem progenitör hücrelerde az olmasının ayırt edici bir kriter olduğunu vurgulamışlardır<sup>33</sup>. CD34<sup>+</sup> ve ALDH artmış enzim aktivitesi gösteren HKH'lerin yüksek re-popülasyon potansiyeli olan HKH'ler olduğu hem *ex vivo* çalışmalarda hem de *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency* (NOD/SCID) fare kullanılan hayvan deneylerinde gösterilmiştir<sup>7,11,36-38</sup>. ÇK HKH'lerindeki ALDH aktivitesinin yüksek HKH kalitesi ve artmış engrafman ile ilişkileri gösterilmiştir<sup>39</sup>. *Liaznov ve ark*, ALDH<sup>+</sup>lığının her zaman CD34 sayısı ile korele olmadığını, ALDH aktivitesinin CFU dozu ve nakil sonrası donor kimerizmine dair daha güçlü bilgi verdiğine dikkat çekmişlerdir. Yine aynı çalışmada ortaya konan çok önemli bir başka bulgu da, CD34 sayısının kanın fiziksel koşullarından daha fazla etkilendiği ve ALDH aktivitesine kıyasla klonojenik potansiyele dair daha az bilgi verdiğini olmuştur<sup>31,39</sup>. KK ve ÇK'ındaki progenitör fenotiplendirmesine yönelik çalışmalarda, en sık CD34 ko-ekspresyonu, yüksek CD133 ve düşük CD38<sup>-</sup> CD45RA aktivitesi gösteren hücrelerde daha yüksek ALDH aktivitesi olduğunu belirtmişlerdir<sup>7,11,34,36</sup>.

KK'da ALDH aktivite ölçümü ile HKH fenotiplendirmesine yönelik en geniş kapsamlı çalışmalardan birinde, tümü *light scatter low* (SSC<sup>lo</sup>) olan ALDH<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>, ALDH<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> olmak üzere 3 farklı grup progenitör karakterize edilmiştir<sup>11</sup>. ALDH aktivitesinin, KK ünitesi kalitesini belirlemedeki etkinliğini değerlendiren çalışma sayısı sınırlıdır<sup>3,13</sup>. *Boxall ve ark* CD133<sup>+</sup> HKH'lerdeki ALDH aktivitesini araştırmışlardır<sup>12</sup>. *Gentry ve ark*, dondurulmuş KK ünitelerindeki ALDH<sup>+</sup> hücre fraksiyonlarında, CD133<sup>+</sup> grubu seçmişler ve farklı CFU kolonilerindeki ALDH aktivite ve fenotipleri saptamışlardır<sup>33</sup>. *Christ ve ark*' in çalışmasında, CD34, CD133 ve ALDH<sup>+</sup> olan KK HKH alt tipleri değerlendirilmiştir<sup>7</sup>. CD34<sup>+</sup> hücrelerin dörtte birinin ve CD133<sup>+</sup> hücrelerin üçte ikisinin ALDH<sup>+</sup> olarak tespit edildiği çalışmada ALDH aktivitesinin uzun dönem engrafman belirteci olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. ALDH<sup>+</sup> hücrelerin uzun dönem ve ALDH<sup>-</sup> hücrelerin de kısa dönem HKH belirteci olarak kullanılabilceğini öneren yayınlar da mevcuttur<sup>7,11</sup>. Farklı ALDH aktivitesi gösteren KK kökenli primitif progenitör hücrelerin kısa-uzun dönem hücre kültürü ve NOD/SCID farelere transfer sonrası engrafman kapasitelerinin saptandığı *Storms*'un çalışmasında ise, ALDH<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> progenitörlerin kısa dönem myeloproliferatif özelliklerinin düşük olmasına rağmen, kısa dönem *natural killer* (NK)oluştuma yeteneklerinin yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>11</sup>. *Ex vivo* CFU testlerinde, hem ALDH<sup>+</sup> hem de negatif popülasyonun olduğu da aynı çalışmada bildirilmiştir. Literatürdeki az sayıdaki çalışmaya rağmen, KK STR ve LTR progenitörlerin ALDH aktiviteleri ve fenotipleri ile CFU kolonilerindeki hücrelerin alt tipleri tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

### 3. GEREKÇE ve AMAÇ

Günümüzde HKH araştırmaları, hızlı ve/veya yeterli immün yapılanmayı sağlayacak progenitor hücrelerin karakterize edilerek seçici kullanımına yönelmiştir. Diğer HKH kaynaklarına oranla daha yavaş engrafmanla karakterize olan KK naklinde, KK ünitesinin kalitesinin doğru belirlenmesi kritiktir. KK naklinde karşılaşılan sorunlardan bir tanesi, hücre canlılığı ve sayısı yüksek bir KK *graft*'inin nakil sonrası başarısız olmasıdır. Genellikle yüksek CD34<sup>+</sup> hücre ile nakle giden hastalarda engrafman başarısı yüksektir ancak nadiren de olsa başarısız nakil gerçekleşebilmektedir<sup>20,22</sup>. Bu sonuç kısmen işlevselliğini yitirmiş, donma sonrası nekroz/apoptozise tetiklenmiş CD34<sup>+</sup> hücrelerin naklediliyor olmasıyla veya üründeki uzun dönem progenitörlerin oran/engrafman yeteneklerinin farklı olmasıyla açıklanabilir<sup>11,21,31</sup>.

CFU oluşturan hücre dozu, dondurma/çözme sonrası KK engrafman başarısını öngörebilecek önemli kriterlerden biridir, zira progenitor HKH işlevselliği CFU-GM testleriyle ortaya konabilir. Yaklaşık 20 yıl önce Kİ nakil başarısındaki önemli belirteçlerden biri olarak geliştirilen CFU-GM yöntemi ile CD34<sup>+</sup> hücrelerin ancak küçük bir fraksiyonunu kapsar. Sonuç için en az bir hafta gerektirmesi, laboratuvar standardizasyon zorlukları gibi dezavantajlarından ötürü klinik pratikte aktif kullanılamamaktadır. Oysa HKH işlevsel analizine ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızın temelini oluşturan konvansiyonel akım sitometri yöntemlerine komplementer ALDH kullanımı, hem yeni işlenmiş KK'da hem de dondurma/çözme sonrası KK'da CD34 hücre sayısı ve kalitesiyle birlikte, CFU dozunun tahmin edilmesine ve CFU yapılmaksızın engrafman süresinin ve *graft* başarısının öngörülmesine olanak sağlayabilir.

Kİ ve ÇK HKH alt tiplerinin ALDH ve CD34<sup>+</sup> ifadelerine göre belirlenmesine yönelik araştırmalar mevcuttur. HKH fonksiyonlarının belirlenmesinde bu fenotipik değerlendirmeler ile CFU-GM kolonileri arasında yüksek korelasyon görülebilmektedir<sup>3,7,11,40</sup>. KK'da kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası ALDH aktivitesinin CFU-GM kolonileriyle ilişkisi bu tez araştırması başlandığında henüz yayınlanmamıştı. Öte yandan CFU-GM, daha çok STR hakkında bilgi vermekte olup, LTR hücre serileri daha fazla emek ve maliyet gerektiren uzun dönemli hücre kültürü testleri (*long term cell culture*, LTCC) ile saptanabilmektedir. Dolayısıyla, *ex vivo* kültür testlerinde üreme gösterebilen ve

gösteremeyen, yüksek engrafman kapasitesine sahip HKH ve progenitör alt tiplerinin ALDH aktivitesi yoluyla kısa sürede belirlenmesi çok önemlidir. Beklenen şekilde, ALDH<sup>+</sup> HKH, CFU-GM koloni sayısı ile CD34 kantitatif değerlendirmesinden daha uyumlu sonuç vermesiyle, ALDH aktivitesi, CFU-GM yapılmaksızın, KK bankacılığında hızlı ve daha bilgi verici bir yöntem olarak tercih edilebilir.

Bu tez çalışmasının birincil amacı, nakil öncesi KK ünitesi klinik kalitesini belirlemek için kullanılan temel yöntem olan ISHAGE akım sitometri yöntemiyle belirlenen CD34<sup>+</sup> HKH'nin, CFU-GM koloni sayısı arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Kİ ve ÇK hücre nakillerinde, nakil başarısı üzerinde CFU-GM ve CD34 dozuna bağlı bir etki olduğu oldukça kesin olmakla beraber KK için yayınlanmış az sayıda yayın bulunmaktadır<sup>30,40</sup>.

İkinci amaç olarak donma öncesi ve donma-çözme sonrası CD34 ve CFU-GM koloni tayini ile, hem donma-çözme sonrası KK kalitesindeki olası değişikliğin takibi, hem de KK ünitesinin kalitesini belirlemek için kullanılan iki temel yöntemin karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır.

Üçüncü amaç ise, günümüzde hızla önem kazanan fonksiyonel akım sitometrik analiz testlerinden biri olan ALDH analiz testi ile, yeni işlenmiş dondurulmuş ve çözülmüş KK ünitelerinde HKH ve progenitör alt tip belirlenmesidir. Bu yaklaşımla, konvansiyonel akım sitometri yöntemi ve CFU testleriyle karşılaştırmalı olarak ALDH yönteminin etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## 4. MATERYAL ve YÖNTEM

### 4.1. İnsan Göbek KK Üniteleri

Araştırma için Ankara Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar'dan Etik Kurul onayı 11 Mart 2013 tarihli, 04-173-13 sayılı kararla alınmıştır (EK1). Bu çalışmada, KK kaynağı olarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Doğum Polikliniği (KDP), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi KDP'de gerçekleşen sezaryen ve normal doğumlardan, AÜKKB bilgilendirilmiş onam ve tıbbi hikaye anket formu doldurularak toplanan KK üniteleri kullanılmıştır. Doğum sırasında pediatrik kan torbasına (KANSUK, Katalog No: 1KN0062040) toplanmış olan KK, anne kanları ve anket-onamlarla birlikte, özel hazırlanmış KK toplama kiti içinde +4°C transfer çantasında KK bankasına ulaştırılmıştır. Çalışmaya, uluslararası kriter ve standartlara uyan 30 adet KK ünitesi seçim kriterlerine göre; >70 cc başlangıç hacmine sahip olması ya da başlangıç çekirdekli hücre sayısı değeri  $100 \times 10^7$ 'den büyük ise işleme protokolü başlatılırken, hacmi >100 cc'den büyük olup TNC değeri  $100 \times 10^7/\text{kg}$ 'den küçük olan KK üniteleri pre-CD34<sup>+</sup> analizi yapılmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Hematoloji Laboratuvar'ına gönderilir ve CD34<sup>+</sup> hücre sayısı hacim değeriyle çarpılarak toplamda CD34<sup>+</sup> hücre sayısı  $1.5 \times 10^6/\text{kg}$ 'nin üzerinde olan KK üniteleri de işlemeye alınır. Bu rutin işlemede kullanılan KK ünitelerine ek olarak daha önce sıvı azotta dondurmaya takiben kriterlere uymadığı tespit edilmiş(aile hikayeleri, anne kanı örnek eksikliği gibi kriterlere uygun olmama açısından) ve nakilde kullanılmayacak grup olan "araştırma" grubuna dahil edilmiş 5 KK ünitesi ise bu 30 örnek dışında deneme amaçlı yapılmış ve çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 35 KK ünitesi, CFU GM, CD34<sup>+</sup> hücre sayımı ve ALDH aktivite tayini için kullanılmıştır (30 KK ünitesi donma öncesi ve 5 KK donma-çözme sonrası olacak şekilde).

### 4.2. İnsan Göbek KK Ünitesinde Plazma/Eritrosit Depleasyonu

KK Bankası'na ulaşılmış olan KK ünitesinin uygun şartlar altında gelip gelmediği kontrol edildikten sonra (ısı takibi, anket onam kontrolü) tartılır ve kütlesi not edilir.  $d=m/v$  formülü kullanılarak hacmi hesaplanmış KK, hacim >70 cc ise AÜTF Cebeci Kampüsü Merkez Laboratuvarına tam kan test analizi yapılmak üzere 1 cc KK örneği gönderilir.

Analiz sonucunda lökosit sayısı (WBC) hacim ile çarpılarak toplam TNC hesaplanır. TNC değeri  $100 \times 10^7/kg$  değerinden büyük ise KK için eritrosit depleasyonu süreci başlatılır. Bu kriterleri sağlamıyor ise KK imha edilir. Kriterleri sağlayan KK, floresan mikroskopta akridin oranj boyası kullanılarak (20 µl kan + 10 µl akridin oranj) başlangıç çekirdekli hücre canlılığını belirlenir. Eritrositleri çöktürmek amacıyla kullanılan *Hydroxy-Ethyl-Starch* (HES) (Varihes, Baxter ) solüsyonu (1/5 (v/v)) eklenir. Takiben eritrosit ve plazma depleasyonu için özel Sepax kitlerine (Biosafe, CS-530.4) bağlanan KK torbası, Sepax S-100 (Biosafe) cihazına yerleştirilir. Sepax cihazı kullanılarak KK'nından plazma, kırmızı kan hücreleri ve kök hücreden zengin *buffy coat* kısmı ayrılır. Ayrılan plazmadan alınan örnekler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilip, viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyon belirteçleri için tarama testleri gerçekleştirilir. Kalan plazma, dondurmaya dayanıklı *vial*'lere aktarılarak (Greiner bio one, Katalog No: E10090L9) -80°C'de derin dondurucuda (Sanyo/MDF-U5386S) dondurulur. Ayrılan kırmızı kan hücrelerinden Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Merkezi'nde kan grubu tespiti gerçekleştirilir. Bu aşamada, CFU-GM kültürü için uygun miktarda örnek alınır ve geri kalan kısım sıvı azotta uzun süreli saklama amaçlı dondurulur. Dondurulacak *buffy coat* hücrelerine, Coolmix (Biosafe/AS-210) karıştırıcılı soğutucu içinde, 25ml/saat hız ile koruyucu dimetilsülfoksit (DMSO) Dextran 40 (CryoSure-DEX40, Katalog No: WAK-DMSO-10), infüzyon pompası (Medima-S) vasıtasıyla +4°C derecede verilir. Uygun şekilde etiketlenen ürün, etiketli dondurma kaseti içinde kademeli dondurucuda (Freezer 2100 Series) -80°C dereceye kadar yavaş yavaş dondurulur ve takibinde buhar fazında uzun süreli saklama için -196 °C'de sıvı azot tankına (Taylor-Wharton Cryoce Labs 40K) aktarılır.

#### **4.3. Dondurulmuş İnsan Göbek KK Ünitesinin Eritilmesi ve DMSO'nun Uzaklaştırılması**

Beş KK ünitesi 37 °C su banyosunda çözüldükten sonra, 10 ml alınarak konik tabanlı tüpe aktarılır. DMSO'nun uzaklaştırılması için KK ünitesine yıkama protokolü uygulanır: 4/8 oranında %10 Dekstroz içeren Dextran 40 (BioFleks, Katalog No: B05AA05), 1/8 %20 Albumin içeren insan serumu (Centurion Pharma, Katalog No: J06BA02) ve 3/8 fosfat tamponundan (Lonza, Katalog No: 17-516F) oluşan yıkama solüsyonu kullanılır. Örneğin; 50 ml'lik yıkama solüsyonu hazırlamak için 25 ml Dextran 40, 6,25 ml insan serum

albumini ve 18,75 ml fosfat tamponu kullanılır. Su banyosundan çıkarılan KK ünitesi 1:1 oranında yıkama solüsyonu ile muamele edilir ve 400g'de 10 dk santrifüj (NÜVE/NF 1200R) edilir. Süpernatant uzaklaştırılarak yıkama işlemi tekrarlanır. İkinci yıkamanın ardından süpernatant tekrar uzaklaştırılarak, çökelti 1:1 yıkama solüsyonuyla süspansiyon haline getirilir.

#### **4.4. İnsan Göbek KK Ünitelerinin Canlılık ve CD34<sup>+</sup> Hücre Sayısı Belirlenmesi**

Otuz KK ünitesi Sepax sonrası ve dondurma öncesi; beş dondurulmuş KK ünitesinden 37 °C su banyosunda çözüldükten ve DMSO uzaklaştırıldıktan sonra (yıkama protokolüne göre) CD34<sup>+</sup> hücre sayısı belirlenir ve öncelikle tam kan sayımı yapılır. Eğer hücre miktarı çok yüksekse (yaklaşık 40x10<sup>6</sup> h/ml'den fazla ise) akım sitometri cihazının duyarlılık sınırlarına uygun şekilde dilüsyon yapılır. Dilüsyon sonrası 100 µl kan örneği alınır ve canlılık tayini için 20 µl 7-AAD (Beckman Coulter Katalog No: IM3630c) boyası ve CD34 sayısı belirlemek için CD34 ve CD45 (Beckman Coulter, Katalog No: IM3630c) 20 µl antikorlarıyla işaretlenir. 20 dk inkübasyon sonunda lizis solüsyonu (distile su ile 1/10 oranında dilüe edilmiş) eklenir (Beckman Coulter, Katalog No: IM3630c) ve lizis solüsyonunda 10 dk inkübasyon sonunda üzerine 2 ml *absolute count bead* içeren solüsyon eklenir (Beckman Coulter, Katalog No: IM3630e). Daha sonra akım sitometri cihazıyla değerlendirilerek (Beckman Coulter Cytomics FC500 Navios) CD34<sup>+</sup> hücre sayısı belirlenir. Elde edilen sonuç dilüsyon yapılmışsa dilüsyon faktörüyle çarpılır.

#### **4.5. İnsan Göbek KK Kök Hücrelerinin Akım Sitometri ile Fenotipik Analizi ve ALDH Aktivite Tayini**

Otuz KK ünitesi Sepax sonrası ve dondurma öncesi; beş dondurulmuş KK ünitesi 37 °C su banyosunda çözüldükten ve DMSO uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonlarında ALDH aktivitesi araştırılmıştır. ALDH aktivitesi (ALDEFLOUR Assay Kit, StemCell Technologies, Katalog No: 1700) ölçümü yapılarak, parlak sinyal veren hücrelerle ve zayıf sinyal veren kök hücre fraksiyonlarının ayrımı sağlanmıştır. ALDEFLOUR kit sisteminin yöntemi kısaca şu şekildedir:



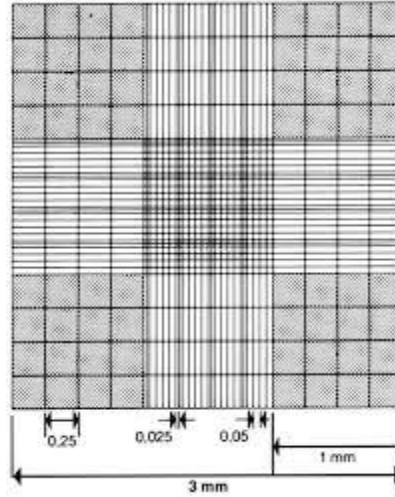
Başlangıçta hücreler  $10^6$  /ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilir. Eritrosit lizisi yapılmak istenirse, ilk basamak olarak KK örneklerine lizis solüsyonu (Amonyum klorür) (StemCell Technologies, Katalog No: 7850) eklenir. 10-15 dk lizis tamponunda bekletilen hücreler, 5 dk süreyle 300 g 'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır, hücre pelleti 2 ml yıkama tamponuyla tekrar süspansiyon haline getirilir. İki kez santrifüj kullanılarak yıkama gerçekleştirilir. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler 1500 µl ABC transport inhibitör içeren assay buffer (StemCell Technologies, Katalog No: 1702) ile resüspanse edilerek ve tekrar hücre sayımı yapılarak ( $1 \times 10^6$  h/ml olacak şekilde sulandırım gerçekleştirilir). Her bir deneyde bir deney bir de kontrol tüpü kullanılır. Kontrol tüpüne ALDH aktivitesini baskılayan inhibitör dietilaminobenzaldehit (DEAB) (Stemcell Technologies, Katalog No: 1705) solüsyonundan 5 µl eklenir. -20 °C'den çıkarılan Aldeflour reaktifi (Stemcell Technologies, Katalog No: 1703) deney tüpüne ve kontrol tüpüne üreticinin önerdiği miktar olan 10 µl olarak eklenir. İki tüp de sıkıca kapatılıp vortekslenerek su banyosunda 30 dk inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında tüm tüpler 5dk 300 g'de santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra kontrol tüplerine 500 µl assay buffer (Stemcell Technologies, Katalog No: 1701) konur. Test tüplerine ise 100 µl assay buffer eklenir.

Daha sonra FITC ile boyalı ALDH (StemCell Technologies, Katalog No: 1703), PE (Beckton Dickinson, Katalog No: 550257) ile boyalı CD73 antikoru, *Phycocyanin 5* (PC5) ile işaretli CD90 antikoru (Beckton Dickinson, Katalog No: 555597), *Allophycocyanin* (APC A-750) ile işaretli CD38 antikoru (Beckman Coulter, Katalog No: A86049), *Phycocyanin 7* (PC7) ile işaretli CD34 antikoru (Beckman Coulter, Katalog No: A21691) ve krom oranj (KO) ile işaretli CD45 antikoru (Beckman Coulter, Katalog No: A96416) eklenecektir. Karışım 4°C' de 15 dk inkübe edilerek, süre dolunca test tüplerine 1,5 ml CellWash (Stemcell Technologies, Katalog No: 1702) eklenerek 5dk 300 g'de santrifüj edilir. Üzerine 500 µl Aldeflour assay buffer eklenen hücrelerden akım sitometri cihazında veri toplanır. ALDH parlak reaksiyon veren hücre grubu ALDH pozitif / (+) olarak kabul edilir.

#### **4.6. *Ex vivo* Koloni Oluşturma (CFU) Yöntemi**

Otuz KK ünitesinden (Sepax sonrası DMSO eklenmesi öncesi; eritrosit depleasyonu yapılmış *buffy coat* kısmından) alınan 100 µl kan örneği ve 5 KK ünitesini 37 °C su

banyosunda çözüldükten ve yıkadıktan sonra alınan 100 µl kan örneğine 80 µl HetaSep (StemCell Technologies, Katalog No: 7806) ve 300 µl hücreler % 2 fotal sığır serumu (FBS) içeren *Iscove Modifiye Dulbecco* Besiyeri'nde (IMDM) (StemCell Technologies, Katalog No: 7700) eklenir ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde (Sanyo /CO<sub>2</sub> Incubator / MCO-18AIC) 20 dk süreyle inkübe edilir.Yirmi dk inkübasyondan sonra dibe çöken eritrosit pelletine dikkat edilerek süpernatant ayrı bir tüpe alınır. Daha sonra elde edilen mononükleer kök hücrelerin *Thoma* lamı ile hücre sayımı gerçekleştirilir. *Thoma* lamıyla hücre sayımı için kan örneğinden 20 µl alınır ve 380 µl %3 asetik asit içeren metilen mavisi (StemCell Technologies, Katalog No: 7060) ile sulandırılır (1/20 sulandırım). *Thoma* lamına bir miktar örnek alınır ve lökosit sayımı için uygun olan 16 mm<sup>2</sup>'lik dört farklı bölge sayılır. Şekil 4.1.'de *Neubauer* marka *Thoma* lamında sayım yapılan alanlar gösterilmiştir (Köşelerde bulunan 4x4'lük kareler) .



**Şekil 4.1.** *Neubauer Thoma* lamı (<http://www.microbehunter.com> sitesinden alınmıştır).

Lökosit sayımı için özel olan bu dört bölgeki çekirdekli hücre sayısı toplanır ve 4'e bölünür. Çıkan değer sulandırım faktörüyle ve 10<sup>4</sup> ile çarpılarak ml'deki hücre sayısı bulunur.

Örneğin; Toplam 4 karede 400 hücre sayıldı ise;  $400:4 \times 20 \times 10^4 = 20 \times 10^6$  h/ml olarak hesaplanır.

*Thoma* lamı sayımında ulaşılan değer baz alınarak, ekim öncesi hücreler % 2 fotal sığır serumu (FBS) içeren IMDM'de (StemCell Technologies, Katalog No: 7700) ekim için

konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  h/ml olacak şekilde dilüe edilir. Son hücre süspansiyonundan 300 µl alınarak 3 ml MethoCult<sup>tm</sup> Express (StemCell Technologies, Katalog No: 4447) besiyerine ekim yapılır. MethoCult<sup>tm</sup> Express ve hücreleri içeren tüplerdeki karışımın homojen olması için tüpler vortekslenir ve oluşan hava kabarcıklarının üstte toplanması için 5 dk beklenir. MethoCult<sup>tm</sup> Express içeren hücre karışımını hücre kültür plaklarına aktarmak için özel 3 ml'lik enjektörler (StemCell Technologies, Katalog No: 28110) ve 16 gauge iğneler (StemCell Technologies, Katalog No: 28110) kullanılır. MethoCult<sup>tm</sup> Express içeren hücre karışımından enjektörle 2.2 ml alınarak iki farklı 35 mm'lik hücre kültür plaklarına (StemCell Technologies, Katalog No: 27100) ekim gerçekleştirilir (1.1'er ml besiyeri+hücreler 2 ardışık 35mm'lik plağa ekilir). Hücre kültür plakları 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda ve %95 nemli ortamda 7-14 gün boyunca inkübasyona bırakılır.

Hücre kültür plakları 7. ve 14. günlerde, *inverted* ışık mikroskopunda (Olympus/IX51) 4X ve 10X objektifinde incelenerek oluşan kolonilerin morfolojik değerlendirmesi ile fenotipik analiz gerçekleştirilir, sayıları belirlenir ve not edilerek karşılaştırma yapılır.

#### **4.7. İstatistiksel analiz**

SPSS programı kullanılarak, bağımlı gruplar arası ilişki Pearson's r ve r<sup>2</sup> değerleri hesaplanarak korelasyon analizi ve Student's t-test ile de gruplar arası farklılıklar değerlendirilerek, p<0,05 anlamlılık sınırı olarak kabul edilir.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. KK Üniteleri

KK toplama kiti içinde +4°C transfer çantasında AÜTF KK Bankası'na ulaştırılan KK üniteleri çalışmaya, uluslararası kriter ve standartlara uyan 30 adet KK ünitesi işlemeye alınmıştır. Bu KK ünitelerine ek olarak daha önce sıvı azotta dondurmaya takiben kriterlere uymadığı tespit edilmiş (tıbbi öyküde uygunsuzluk, anne kan örneği eksikliği kriteri gibi standarda uymama) “araştırma” grubuna dahil edilmiş 5 KK ünitesi de çalışmaya dahil edilmiştir. Çizelge 5.1 AÜTF KKB'ye bağlı amaçlı gelen KK üniteleri arasından herhangi bir kriter aranmaksızın seçilen 30 KK ünitesinin ağırlık, hacim ve total TNC sayıları verilmiştir. Hacmi >100 ml ve TNC >100x 10<sup>7</sup>/kg olan örneklerden (Örnek 3, Örnek 4, Örnek 5, Örnek 10, Örnek 24, Örnek 26) 1 ml kan örneği alınarak CD34<sup>+</sup> analizi için AÜTF Hematoloji Laboratuvarına gönderilmiş ve sonucu 1,5x10<sup>6</sup> h/ml değeri üzerinde olup ,eritrosit depleksyonu yapılmıştır. Çizelge 5.2'de ise araştırma grubundan seçilen ve çalışmaya dahil edilen 5 KK ünitesinin aynı veriler yer almaktadır.

**Çizelge 5.1.** AÜTF KKB'ye ulaşan KK üniteleri arasından çalışmada kullanılmak için seçilen 30 KK ünitesinin hacim ve TNC miktarları

ÖRNEK NO	WBC (LÖKOSİT) MİKTARI (x10 <sup>6</sup> h/ml)	KK AĞIRLIK DEĞERİ (g)	KK HACİM DEĞERİ (ml)	TNC (x10 <sup>7</sup> /Ünite)
Örnek 1	9,6	140	110,8	105,6
Örnek 2	9,3	141	111,7	103,2
Örnek 3	6,9	151	120,9	82,8
Örnek 4	6,0	153	123,1	73,8
Örnek 5	9,0	122	93,6	84,2
Örnek 6	9,9	165	134,6	132,7
Örnek 7	9,8	148	118,4	115,6
Örnek 8	11,8	117	89,1	105,0
Örnek 9	17,0	161	131,0	221,0
Örnek 10	7,6	148	118,0	89,7
Örnek 11	7,4	168	137,2	101,4
Örnek 12	7,6	163	132,4	100,3
Örnek 13	13,1	124	95,8	124,5
Örnek 14	11,2	168	137,1	153,4
Örnek 15	17,4	120	92,0	160,1

Çizelge 5.1. (devam)

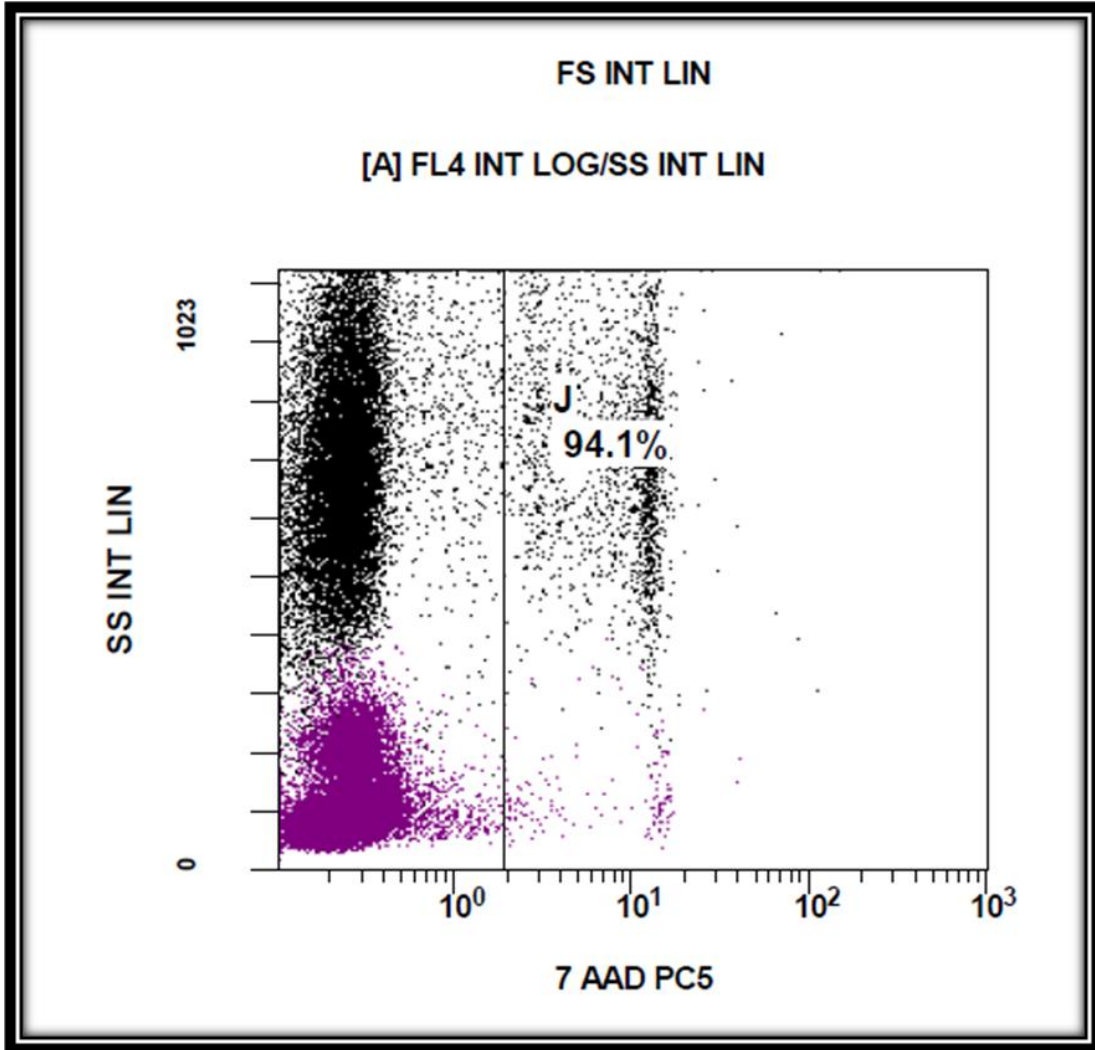
ÖRNEK NO	WBC (LÖKOSİT) MİKTARI (x10 <sup>6</sup> h/ml)	KK AĞIRLIK DEĞERİ (g)	KK HACİM DEĞERİ (ml)	TNC (x10 <sup>7</sup> /Ünite)
Örnek 16	9,1	154	124,1	112,8
Örnek 17	8,6	159	128,9	110,1
Örnek 18	8,7	156	126,0	109,6
Örnek 19	13,4	170	139,9	186,3
Örnek 20	11,8	193	161,1	190,0
Örnek 21	9,7	175	144,1	139,7
Örnek 22	14,2	164	133,2	188,9
Örnek 23	12,9	136	107,0	136,7
Örnek 24	7,7	157	127,2	97,8
Örnek 25	12,2	133	104,1	126,8
Örnek 26	7,2	161	130,8	93,6
Örnek 27	8,2	179	147,9	120,5
Örnek 28	16,6	160	129,8	214,1
Örnek 29	7,7	212	179,3	137,8
Örnek 30	15,8	170	139,3	219,6

Çizelge 5.2. KK ünitesinin işlenip saklanması sonrası standarda uymadığı tespit edilip araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen 5 KK ünitesinin hacim ve TNC değerleri

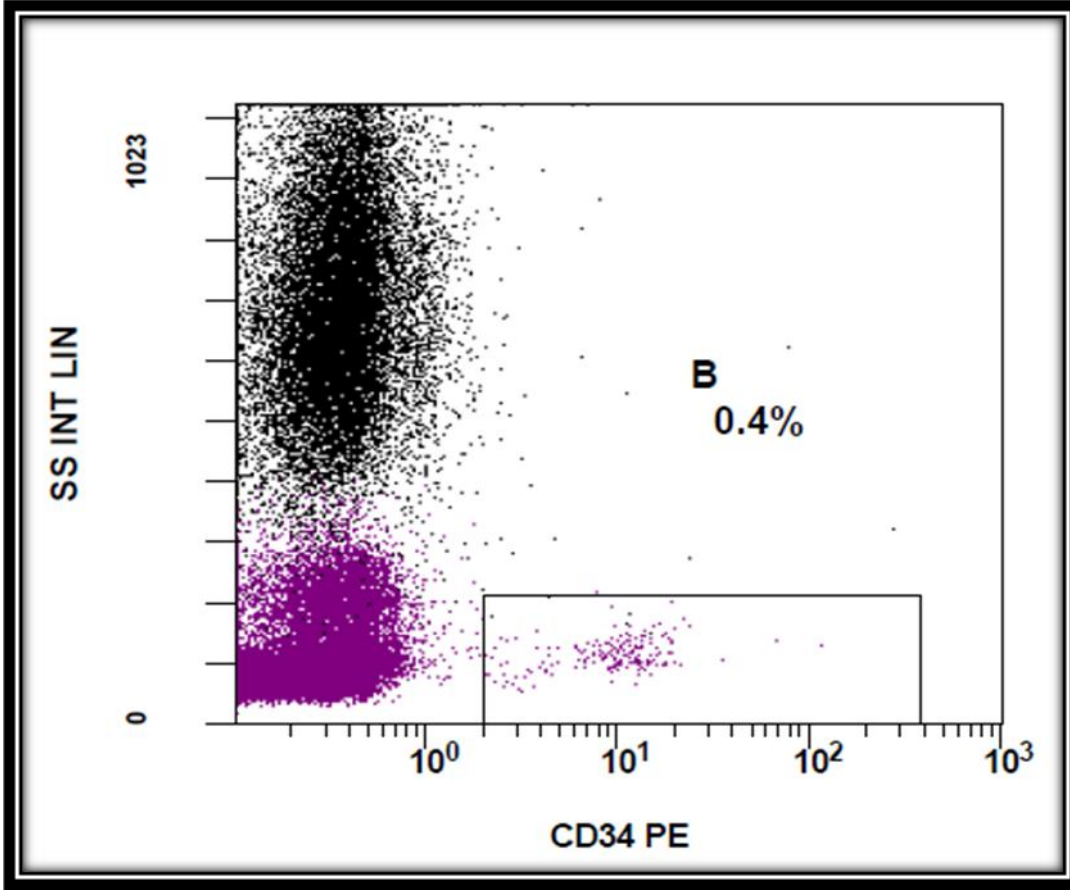
ÖRNEK NO	WBC(LÖKOSİT) MİKTARI (x10 <sup>6</sup> h/ml)	KK AĞIRLIK DEĞERİ (g)	KK HACİM DEĞERİ (ml)	TNC (x10 <sup>7</sup> /Ünite)
Örnek 1	6,9	133	104,1	71,8
Örnek 2	6,7	189	157,4	105,1
Örnek 3	12,2	148	117,8	142,7
Örnek 4	8,7	132	105,8	91,4
Örnek 5	11,1	123	94,2	113,7

## 5.2. İnsan Göbek KK'sında Canlılık Oranları ve CD34<sup>+</sup> Hücre Miktarları

KK ünitelerinin Sepax ile eritrosit deplesyonu sonrası flow sitometri analiz sonuçlarından elde edilen CD34<sup>+</sup> hücre sayısı, eritrosit deplesyonu sonucu lökosit sayısı, canlılığı ve TNC miktarları Çizelge 5.3.'de gösterilmiştir ve beş dondurulmuş çözülmüş KK ünitesinin analiz sonuçları Çizelge 5.4.'de görülmektedir. Şekil 5.1.'de 7-AAD ile işaretlenmiş bir KK ünitesinin canlılık oranı görülmektedir (%94,1). Şekil 5.2. ise aynı KK ünitesi için pan lökosit belirteçi olan CD45 hücreler arasından PE ile boyanmış CD34<sup>+</sup> hücre yüzdesini göstermektedir (%0,4). Şekil 5.3.'de bu KK ünitesinin hesaplanmış mutlak CD34<sup>+</sup> hücre sayısı görülmektedir. Eğer başlangıçta bir dilüsyon yapılmışsa bu çıkan değer dilüsyon faktörüyle çarpılarak µl'de ki hücre sayısı hesaplanmıştır.



Şekil 5.1. Örnek 30 akım sitometri analiz sonrası 7-AAD canlılık tayini sonuç grafiği (Canlı hücreler 7-AAD<sup>-</sup>, ölü hücreler 7-AAD<sup>+</sup> olarak işaretlenmiştir).



Şekil 5.2. Örnek 30 akım sitometri analizi sonucu PE ile boyanmış CD34 Hücreler

File:- BEBEK SEMERCI KORD 2506 001.LMD				
Gate:- C [A AND B AND C]				
Compensation:-				
Region	Abs Count	Number	%Total	%Gated
ALL	144	301	0.35	100.00
D	144	301	0.35	100.00

Şekil 5.3. Örnek 30 akım sitometrisi ile hesaplanan mutlak CD34<sup>+</sup> hücre sayısı

Çizelge 5.3. Eritrosit depleasyonu sonrası dondurulma öncesi 30 KK ünitesinin lökosit sayısı, CD34<sup>+</sup> miktarları ve canlılık yüzdeleri

ÖRNEK NO	CD34 HÜCRE SAYISI (h/µl)	WBC(LÖKOSİT) SAYISI (x10 <sup>6</sup> h/ml)	CANLILIK (%)	TNC (x10 <sup>7</sup> /Ünite)
Örnek 1	66	33,8	99,5	67,6
Örnek 2	128	36,9	99,4	73,8
Örnek 3	241	30,7	92,5	61,4
Örnek 4	181	26,1	92,8	52,2

Çizelge 5.3. (devam)

ÖRNEK NO	CD34 HÜCRE SAYISI (h/µl)	WBC(LÖKOSİT) SAYISI (x10 <sup>6</sup> h/ml)	CANLILIK (%)	TNC (x10 <sup>7</sup> /Ünite)
Örnek 5	60	23,4	99,9	46,8
Örnek 6	204	49,7	99,9	99,4
Örnek 7	122	48,3	93,9	96,6
Örnek 8	199	33,4	99,6	66,8
Örnek 9	433	70,7	93,8	141,4
Örnek 10	82	32,0	83,5	64
Örnek 11	63	42,2	93,4	84,4
Örnek 12	47	41,4	98,9	82,8
Örnek 13	189	47,1	93,8	94,2
Örnek 14	178	56,1	99,0	112,2
Örnek 15	582	54,8	94,1	109,6
Örnek 16	105	39,7	98,0	79,4
Örnek 17	63	43,9	98,9	87,8
Örnek 18	128	40,0	99,5	80,0
Örnek 19	198	61,9	84,5	123,8
Örnek 20	410	77,2	99,2	154,4
Örnek 21	249	49,7	95,4	99,4
Örnek 22	102	39,7	97,6	79,4
Örnek 23	102	43,3	89,3	86,6
Örnek 24	124	36,2	97,0	72,4
Örnek 25	279	40,8	98,9	81,6
Örnek 26	67	37,1	96,6	74,2
Örnek 27	283	47,8	98,4	95,6
Örnek 28	265	84,4	98,8	168,8
Örnek 29	320	55,2	99,2	110,4
Örnek 30	303	75,6	94,1	151,2

Çizelge 5.4. KK ünitesinin işlenip saklanması sonrası standarda uymadığı tespit edilip araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen 5 KK ünitesinin lökosit sayısı, CD34<sup>+</sup> miktarları ve canlılık yüzdeleri

ÖRNEK NO	CD34 HÜCRE SAYISI (h/µl)	WBC(LÖKOSİT) SAYISI (x10 <sup>6</sup> h/ml)	CANLILIK (%)
Örnek 1	179	23,4	62,6
Örnek 2	144	35,8	57,0
Örnek 3	168	30,4	54,6
Örnek 4	143	28,5	40,3
Örnek 5	725	61,3	55,0

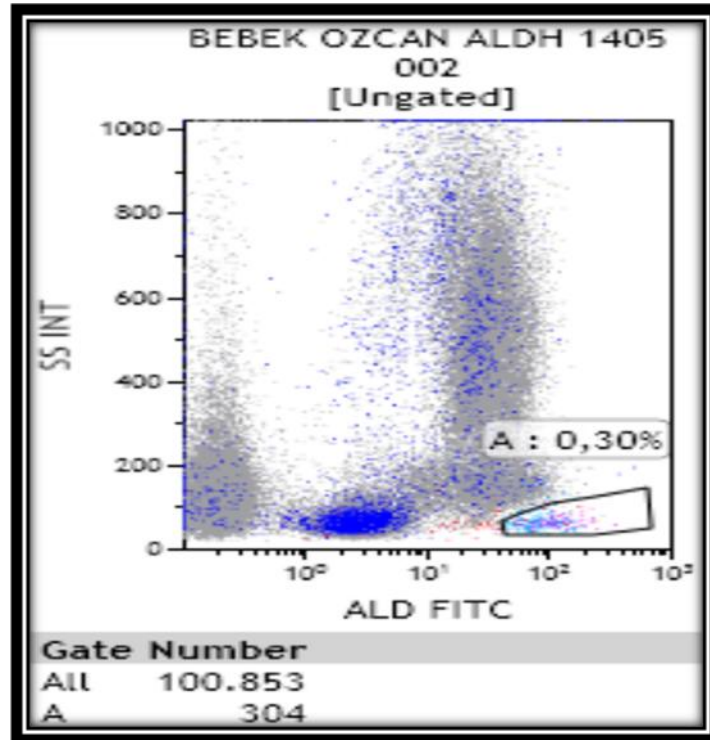


### 5.3. İnsan Göbek KK CD34 Kök Hücrelerinin ALDH Aktivite Düzeyi

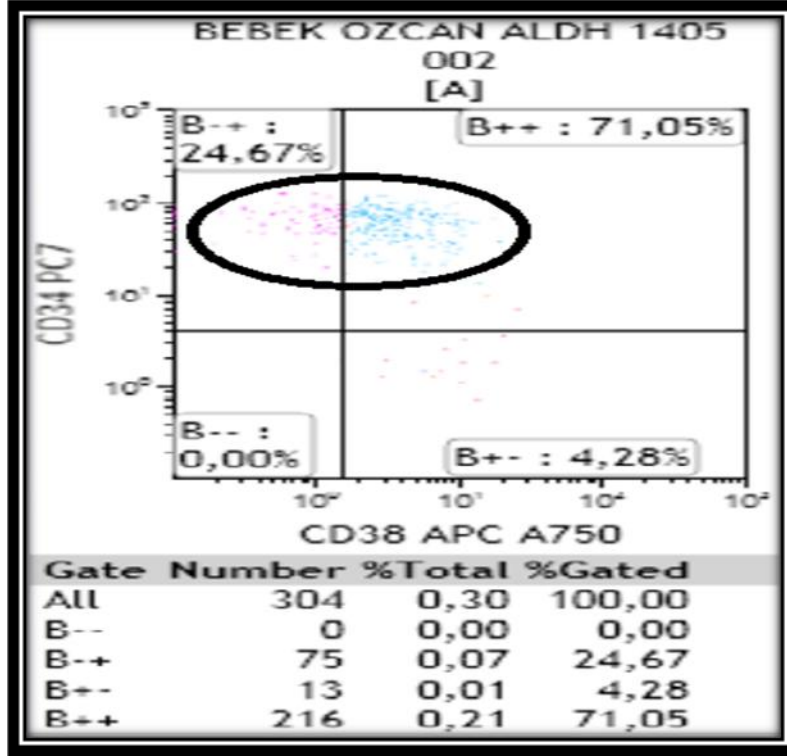
Otuz taze KK örneği ve beş donma çözülme sonrası KK örneğinde ALDH aktivitesi (ALDEFLOUR Assay Kit, StemCell Technologies) ölçümü yapılarak, parlak sinyal veren hücreler pozitif kabul edildi. ALDH<sup>+</sup> hücrelerde CD34 analizleri yapılırken kapı parlak pozitif hücrelerde açıldı.

Şekil 5.4.'te akım sitometride ALDH analizi sonrası ALDH<sup>+</sup> hücre popülasyonunu, Şekil 5.5'te ALDH<sup>+</sup> hücreler arasında CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonunu, Şekil 5.6.'da aynı anda ALDH<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> olan hücre popülasyonunu, Şekil 5.7.'de CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonunu, Şekil 5.8. CD34<sup>+</sup> hücreler arasında ALDH<sup>+</sup> hücre popülasyonunu, Şekil 5.9.'da CD90<sup>-</sup> CD73<sup>-</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik yer almaktadır.

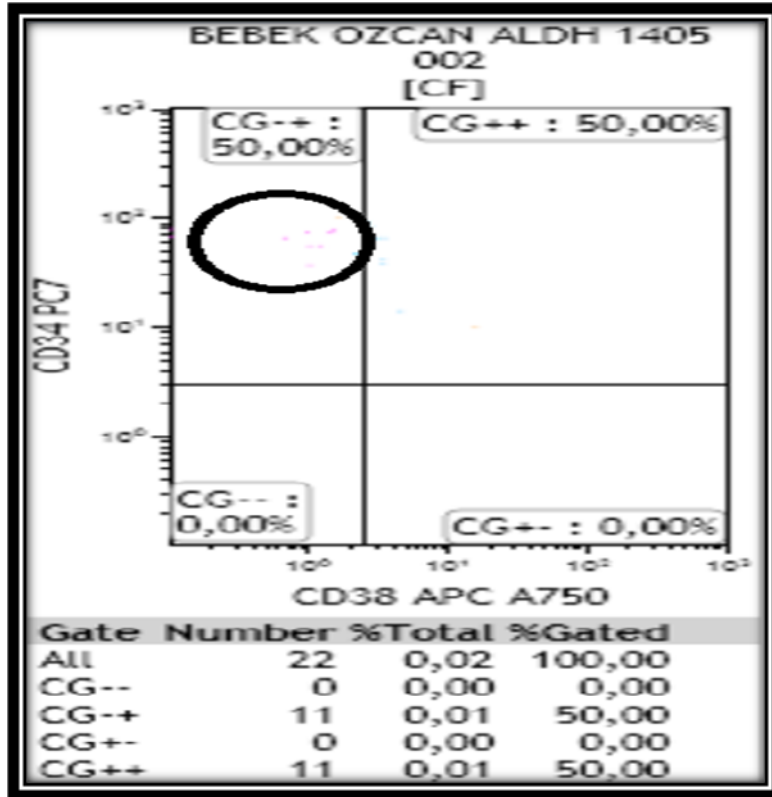
Çizelge 5.5.'te taze KK örneklerinde ALDH<sup>+</sup> hücre alt tiplerinin dağılımına göre veriler gösterilmiştir. Çizelge 5.6. ise dondurulup çözülmüş örneklere ait verileri içermektedir.



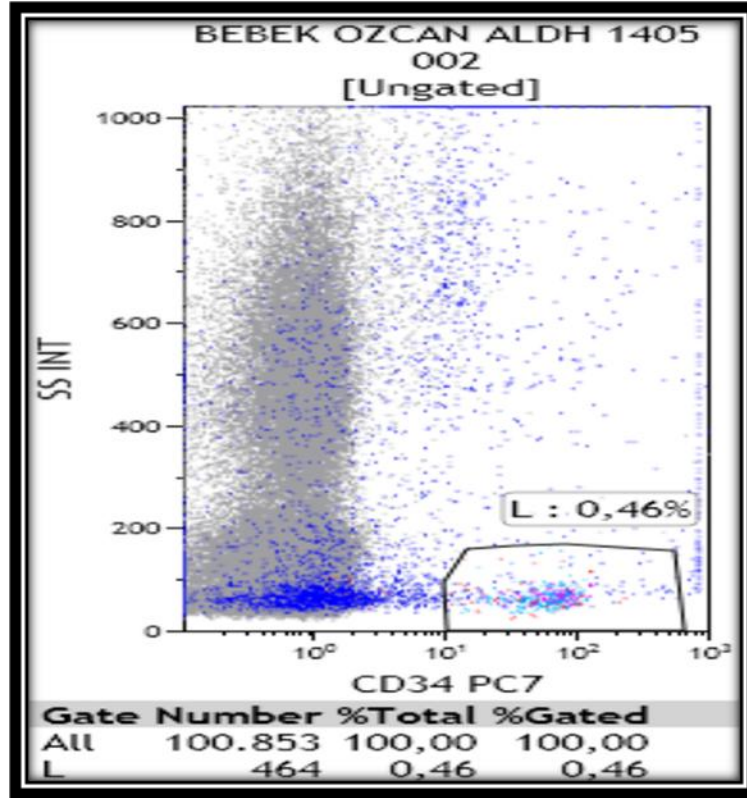
Şekil 5.4. Akım Sitometri ALDH analizi sonrası ALDH<sup>+</sup> hücre popülasyonu grafiği (ALDH<sup>+</sup> hücre topluluğu A ile gösterilmiştir.)



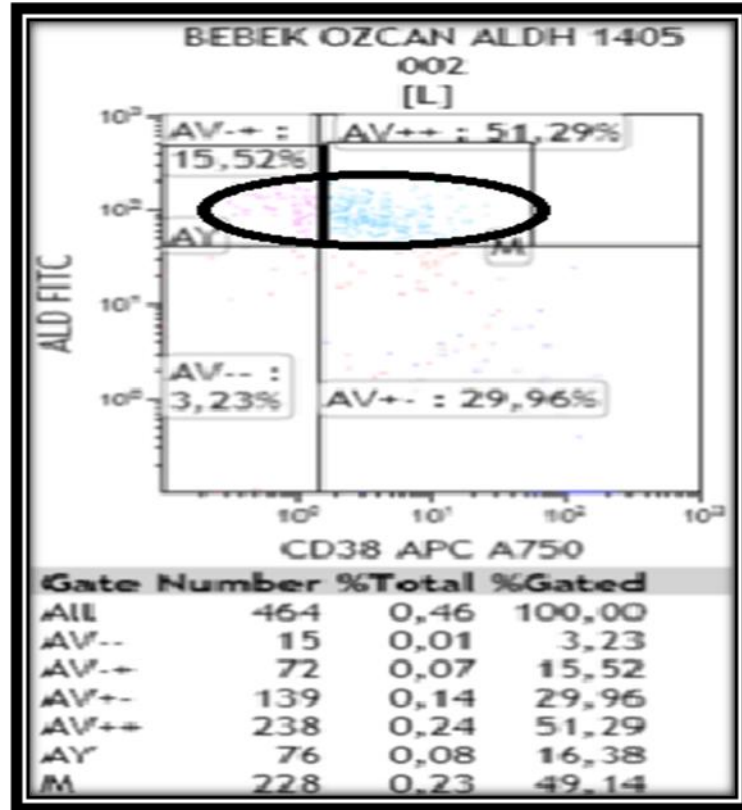
Şekil 5.5. Akım Sitometri ALDH analizi sonrası ALDH<sup>+</sup> hücreler arasında CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik



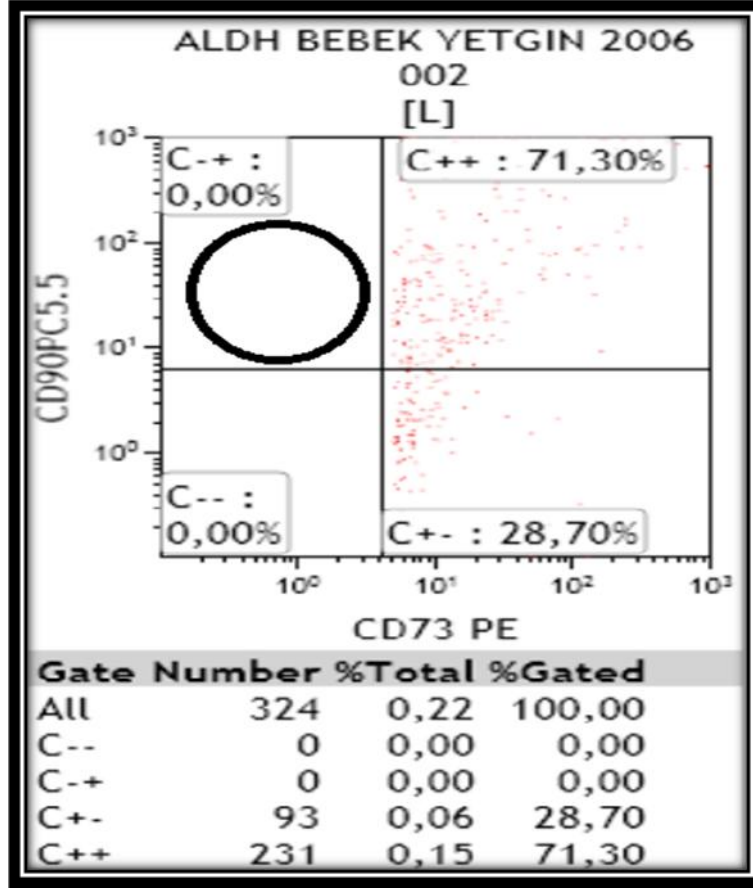
Şekil 5.6. Akım Sitometri ALDH analizi sonrası aynı anda ALDH<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> olan hücre popülasyonunu gösteren grafik



Şekil 5.7. Akım Sitometri ALDH analizi sonrası  $CD34^+$  hücre popülasyonunu gösteren grafik



Şekil 5.8. Akım Sitometri ALDH analizi sonrası  $CD34^+$  hücreler arasında  $ALDH^+$  hücre popülasyonunu gösteren grafik



Şekil 5.9. Akım Sitometri ALDH analizi sonrası CD45<sup>+</sup> olup CD90<sup>-</sup> CD73<sup>-</sup> hücre popülasyonunu gösteren grafik

Çizelge 5.5. Taze KK örneklerinde ALDH<sup>+</sup> hücre alt tiplerinin dağılımı

ÖRNEK NO	CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (h/µl)	ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (h/µl)	ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (h/µl)	CD34 <sup>+</sup> hücreler arasında ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (h/µl)	ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD 90 <sup>+</sup> CD 34 <sup>+</sup> CD 38 <sup>-</sup> hücre sayısı (h/µl)
Örnek 1	24,3	18,8	14,4	17,14	1,7
Örnek 2	193,9	127,0	121,6	129,53	4,6
Örnek 3	348,6	12,2	13,8	338,62	0,6
Örnek 4	166,6	103,9	96,8	131,59	8,7
Örnek 5	108,2	6,1	5,4	99,75	0,3
Örnek 6	293,3	238,2	230,9	269,44	3,2
Örnek 7	151,8	128,8	122,7	143,66	4,5
Örnek 8	263,4	216,7	207,2	254,08	4,2
Örnek 9	305,7	266,5	246,5	293,52	8,7
Örnek 10	128,1	118,1	116,5	121,86	4,1
Örnek 11	94,9	87,1	78,1	82,02	1,8
Örnek 12	68,9	58,6	58,1	65,15	5,4
Örnek 13	348,2	314,5	302,7	332,16	5,1

Çizelge 5.5. (devam)

ÖRNEK NO	CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	CD34 <sup>+</sup> hücreler arasında ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD 90 <sup>+</sup> CD 34 <sup>+</sup> CD 38 <sup>-</sup> hücre sayısı (h/μl)
Örnek 14	333,2	244,0	231,9	262,98	6,9
Örnek 15	192,8	150,8	144,3	172,11	10,1
Örnek 16	152,6	152,6	144,4	145,87	14,9
Örnek 17	79,3	79,3	72,7	75,92	7,7
Örnek 18	66,9	55,0	50,8	56,67	2,4
Örnek 19	265,8	213,2	199,4	231,74	28,9
Örnek 20	306,7	188,1	172,7	280,90	10,3
Örnek 21	470,0	424,2	406,1	447,11	25,0
Örnek 22	144,6	107,3	102,1	46,58	4,9
Örnek 23	91,8	109,9	52,0	74,84	5,3
Örnek 24	149,5	100,9	97,2	129,42	16,4
Örnek 25	119,4	88,4	84,4	103,31	3,1
Örnek 26	90,0	68,5	66,1	80,53	2,8
Örnek 27	276,2	224,7	214,2	259,22	14,4
Örnek 28	275,0	233,1	217,7	241,07	0,3
Örnek 29	442,8	386,9	356,7	400,84	39,8
Örnek 30	316,5	256,8	233,3	295,69	25,3

Çizelge 5.6. Araştırma grubundan seçilen dondurulup çözme sonrası ALDH<sup>+</sup> hücre alt tip dağılımı

ÖRNEK NO	CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	CD34 <sup>+</sup> hücreler arasında ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (h/μl)	ALDH <sup>+</sup> hücreler arasında CD 90 <sup>+</sup> CD 34 <sup>+</sup> CD 38 <sup>-</sup> hücre sayısı (h/μl)
Örnek 1	179	37,8	34,8	49,08	17,4
Örnek 2	144	78,6	70,3	84,78	18,6
Örnek 3	168	104,9	95,6	125,71	49,9
Örnek 4	143	111,1	96,5	157,05	47,1
Örnek 5	725	391,7	304,7	581,41	77,7

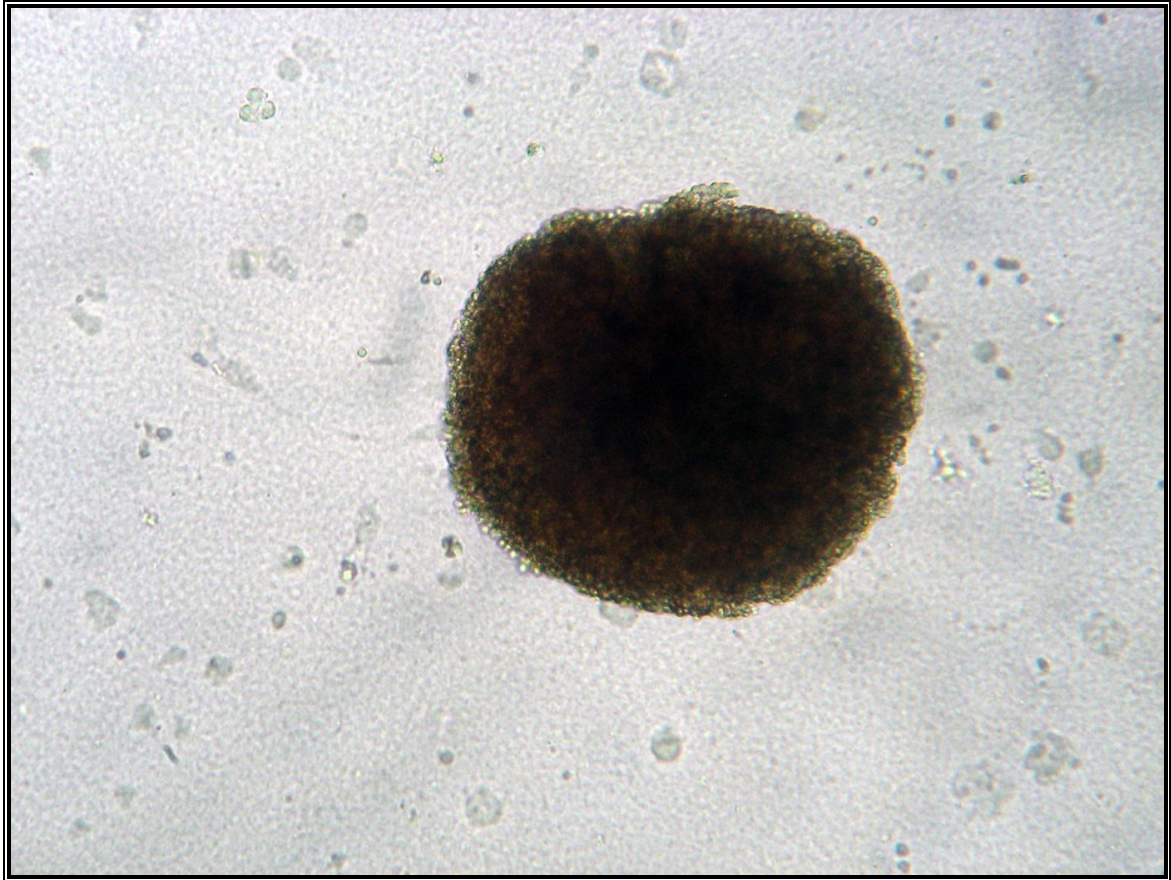
#### 5.4. Koloni Oluşturma (CFU) Yöntemi

Otuz KK ünitesinden (Sepax sonrası DMSO eklenmesi öncesi; eritrosit deplesyonu yapılmış *buffy coat* kısmından) alınan kan örneği ve dondurulup çözülen beş KK ünitesinden alınan kan örneğiyle ekim yapılmıştır. Yedinci günde üreyen koloniler

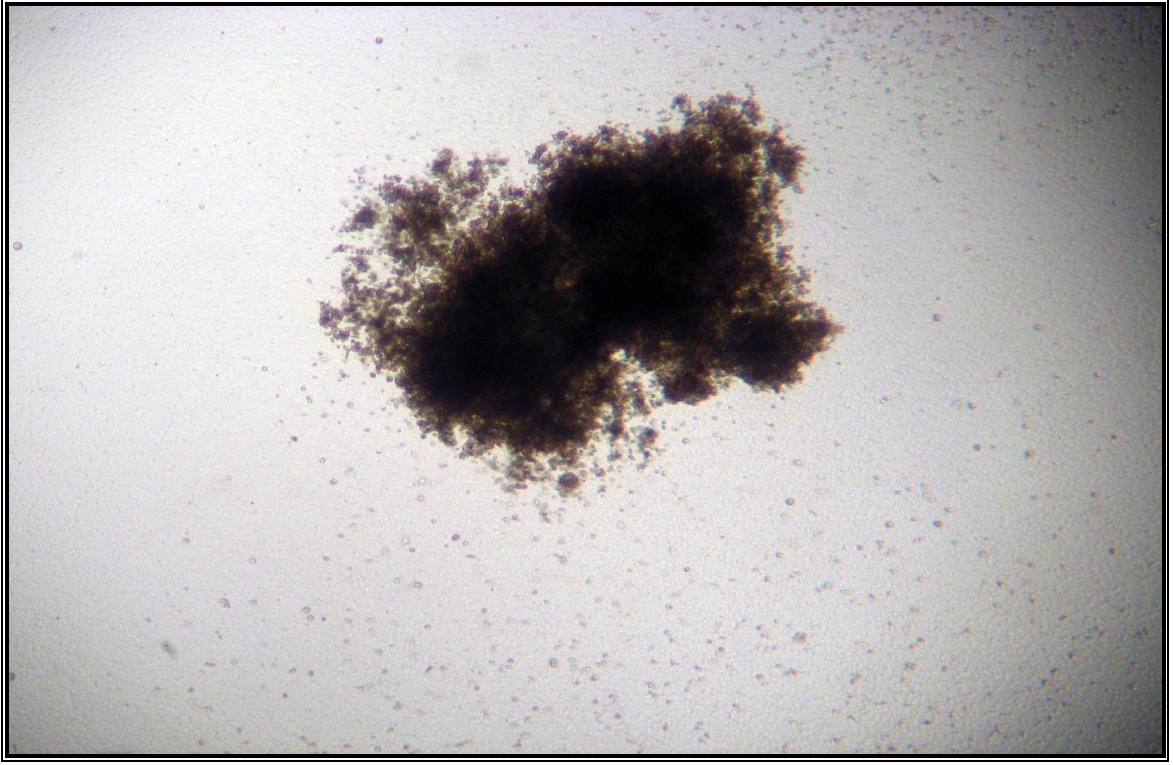
sayılırken 14. günde bu koloniler CFU-GM, CFU-GEMM ve BFU-E olarak farklılaşmış alt sınıfları sayılmıştır. Sayımlar tecrubeli üç kişi tarafından ayrı ayrı yapılmıştır.

Şekil 5.10.'da 22. Örneğe ait 14. gündeki *inverted* mikroskop görüntüsü, Şekil 5.11.'de 25. örneğe ait 14. gün *inverted* mikroskop görüntüsü, Şekil 5.12. ve Şekil 5.13.'de Örnek 21'in 7. gün *inverted* mikroskop görüntüleri, Şekil 5.14., Şekil 5.15. ve Şekil 5.16.'da ise sırasıyla Örnek 25, Örnek 21 ve Örnek 28'in *inverted* mikroskopta çekilmiş 14. gün görüntüleri yer almaktadır.

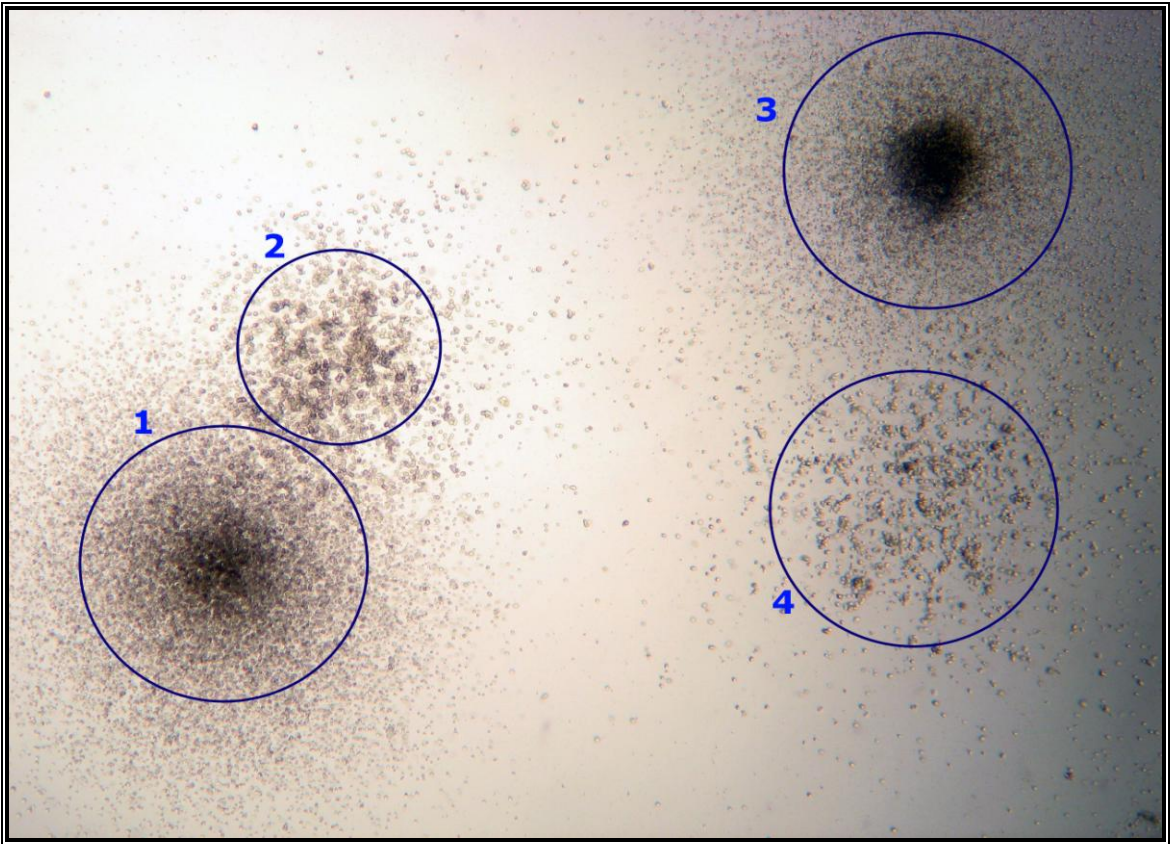
Çizelge 5.7. ve Çizelge 5.8. 'de taze 30 KK ünitesindeki ve dondurulup çözülme sonrası 5 KK 7. gün ve 14. gün koloni sayım sonuçları alt tip koloni sayılarıyla birlikte verilmiştir. Çizelge 5.9. ve Çizelge 5.10.' da ise her bir KK ünitesinin koloni sayılarıyla, ünite de bulunan toplam TNC sayısı ile çarpılarak hesaplanmış CFU-GM ve CFU-GEMM toplam koloni sayısı bulunmaktadır.



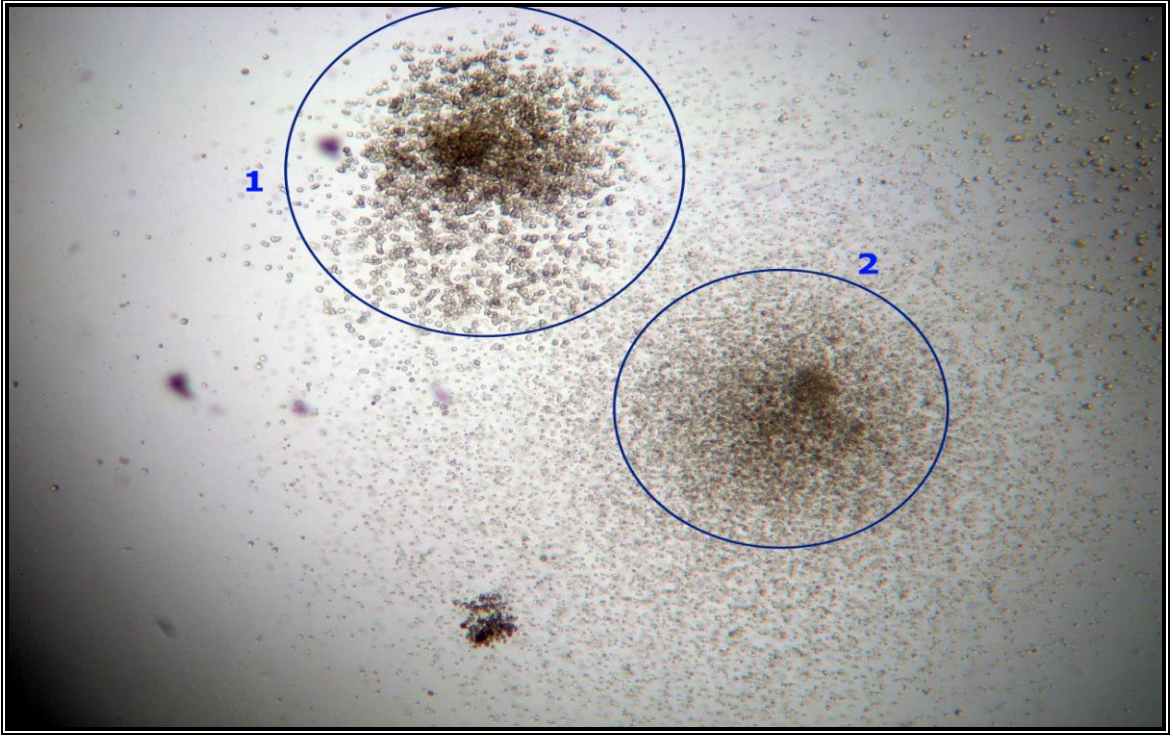
**Şekil 5.10.** Örnek 22 14. günde BFU-E kolonisi (1 koloni -10X objektif)



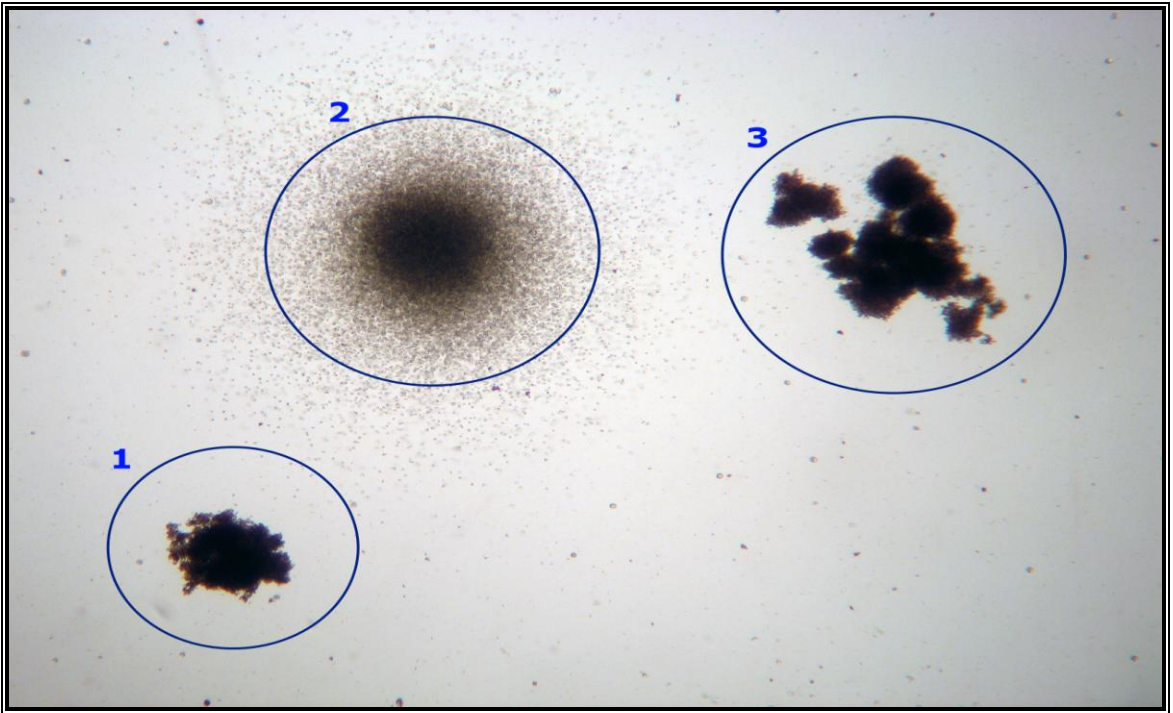
Şekil 5.11. Örnek 25 14. gün CFU-GEMM kolonisi (1 koloni -10X objektif)



Şekil 5.12. Örnek 22 7. gün kolonileri (4X objektif - 4 adet CFU-GM kolonisi)

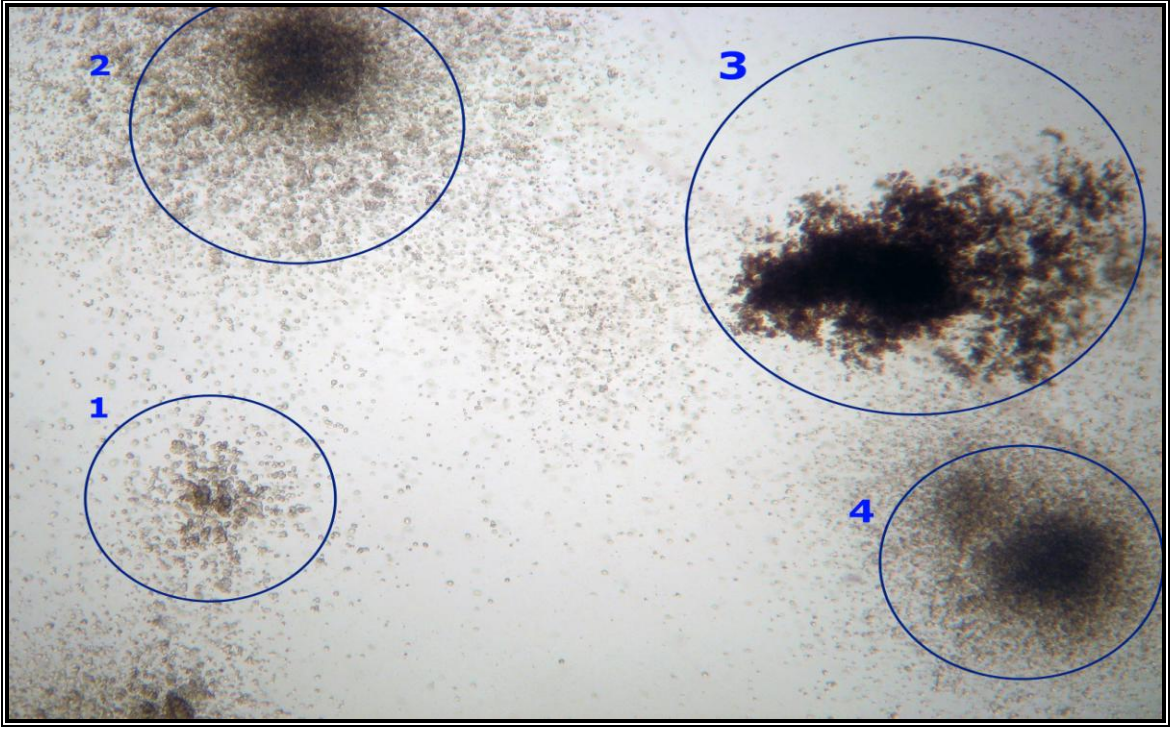


Şekil 5.13. Örnek 22 7. gün kolonileri (4X objektif - 2 adet CFU-GM kolonisi)

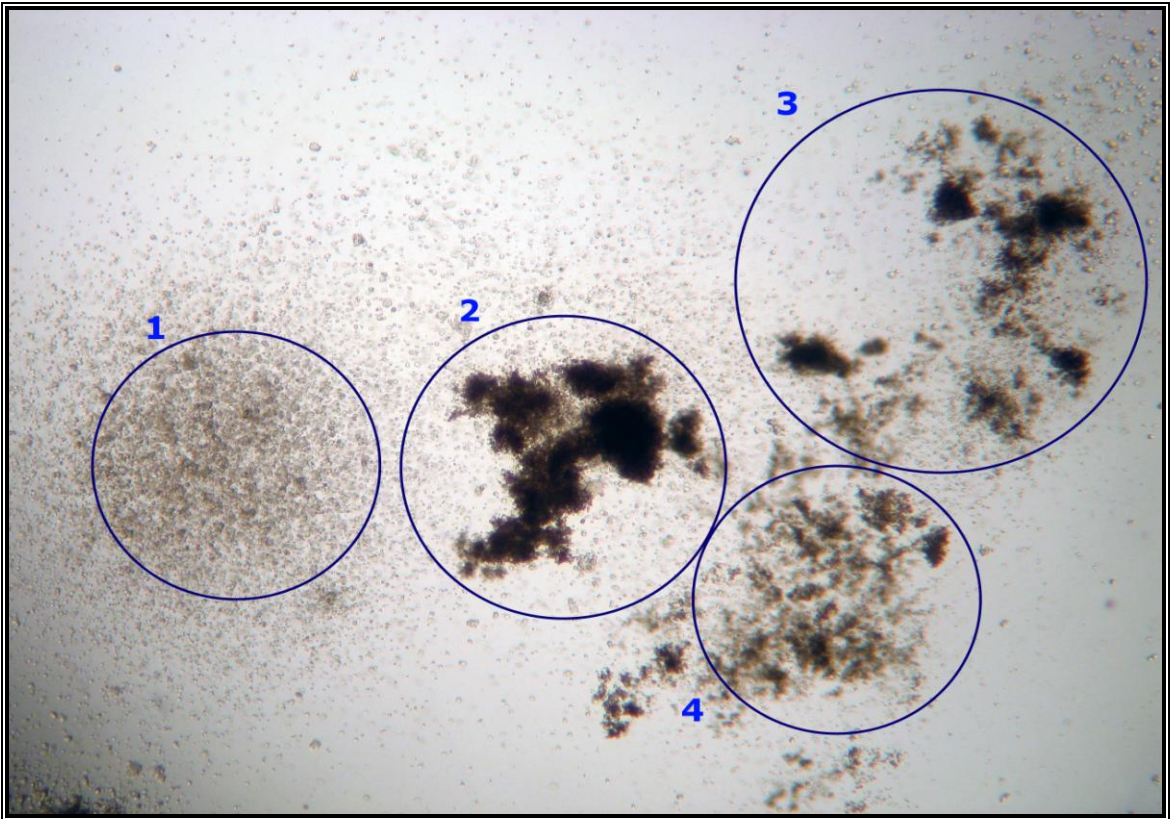


Şekil 5.14. Örnek 25 14. gün kolonileri (4X objektif - 2 CFU-GM, 3-4 CFU-GEMM kolonisi)





**Şekil 5.15.** Örnek 21 14. gün kolonileri (4X objektif - 1, 2, 4 CFU-GM, 3 CFU-GEMM kolonisi)



**Şekil 5.16.** Örnek 28 14. gün kolonileri (4X objektif - 1 CFU-GM, 2-4 CFU-GEMM kolonisi)

**Çizelge 5.7.** Taze KK ünitelerinde 7.ve 14. gün koloni sayım sonuçları

ÖRNEK NO	CFU 7. GÜN SAYIM SONUÇLARI (KOLONİ/PLAK)	CFU 14. GÜN SAYIM SONUÇLARI(KOLONİ/PLAK)		
		CFU-GEMM	CFU-GM	BFU-E
Örnek 1	30	5	9	13
Örnek 2	63	5	20	42
Örnek 3	31	39	2	1
Örnek 4	64	60	20	55
Örnek 5	36	20	12	10
Örnek 6	78	22	11	5
Örnek 7	62	19	8	35
Örnek 8	38	27	10	8
Örnek 9	64	33	27	33
Örnek 10	32	34	9	43
Örnek 11	18	9	6	20
Örnek 12	28	4	5	20
Örnek 13	60	14	13	30
Örnek 14	34	7	5	28
Örnek 15	125	24	35	74
Örnek 16	70	15	17	36
Örnek 17	29	8	8	23
Örnek 18	78	30	9	35
Örnek 19	35	19	9	31
Örnek 20	83	32	18	33
Örnek 21	78	33	23	30
Örnek 22	70	26	17	27
Örnek 23	13	5	6	7
Örnek 24	38	17	9	19
Örnek 25	65	22	22	26
Örnek 26	45	10	13	18
Örnek 27	70	15	16	39
Örnek 28	61	14	17	31
Örnek 29	74	14	10	45
Örnek 30	59	38	17	12

**Çizelge 5.8.** Araştırma grubuna dahil edilen dondurulup çözülmüş 5 KK ünitesinde 7. ve 14. gün koloni sayım sonuçları

ÖRNEK NO	CFU 7. GÜN SAYIM SONUÇLARI (KOLONİ/PLAK)	CFU 14. GÜN SAYIM SONUÇLARI(KOLONİ/PLAK)		
		CFU-GEMM	CFU-GM	BFU-E
Örnek 1	23	3	10	14
Örnek 2	18	4	16	6
Örnek 3	6	6	4	3
Örnek 4	26	9	13	4
Örnek 5	16	8	4	16

**Çizelge 5.9.** Taze 30 KK ünitesinde CFU-GM ve CFU-GEMM hücre sayıları

ÖRNEK NO	CFU-GM ( $\times 10^5/\ddot{u}$ nite)	CFU-GEMM ( $\times 10^5/\ddot{u}$ nite)
Örnek 1	6	3
Örnek 2	15	4
Örnek 3	1	24
Örnek 4	10	31
Örnek 5	6	9
Örnek 6	11	22
Örnek 7	8	18
Örnek 8	7	18
Örnek 9	38	47
Örnek 10	6	22
Örnek 11	5	8
Örnek 12	4	3
Örnek 13	12	13
Örnek 14	6	8
Örnek 15	38	26
Örnek 16	13	12
Örnek 17	7	7
Örnek 18	7	24
Örnek 19	11	24
Örnek 20	28	49
Örnek 21	23	33
Örnek 22	13	21
Örnek 23	5	4
Örnek 24	7	12
Örnek 25	18	18
Örnek 26	10	7
Örnek 27	15	14
Örnek 28	29	24
Örnek 29	11	15
Örnek 30	26	57

**Çizelge 5.10.** KK ünitesinin işlenip saklanması sonrası standarda uymadığı tespit edilip araştırma grubuna dahil edilen örneklerden seçilen beş KK ünitesinde CFU-GM ve CFU-GEMM hücre sayıları

ÖRNEK NO	CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	CFU-GEMM (X10 <sup>5</sup> /Ünite)
Örnek 1	5	1
Örnek 2	11	3
Örnek 3	2	4
Örnek 4	7	5
Örnek 5	5	10

### 5.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları

SPSS programı kullanılarak, bağımlı gruplar arası ilişki Pearson's r ve r<sup>2</sup> değerleri hesaplanarak korelasyon analizi ile yapıldı. Student's t-test ile de gruplar arası farklılıklar değerlendirilerek, p<0.05 anlamlılık sınırı belirlendi.

Çizelge 5.11. ve Çizelge 5.12. otuz taze KK ünitesinde ve donma çözülme sonrası 5 KK ünitesindeki hesaplanmış değerleri verilmiştir. Çizelge 5.13. ve Çizelge 5.14. ise 30 taze KK ünitesinde ve donma çözülme sonrası 5 KK ünitesindeki karakteristik analiz değerleri yer almaktadır. Çizelge 5.15. ise CFU-GM / CFU-GEMM koloni sayılarına karşı KK ünitesindeki hematopoietik aktiviteyi gösteren korelasyon değerleri ve Çizelge 5.16. ise taze KK ünitelerinin tüm parametrelere göre istatistiksel dağılım verilerini göstermektedir.

**Çizelge 5.11.** Taze KK 'da ünitedeki hesaplanmış değerler

ÖRNEK NO	CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	CFU-GEMM (X10 <sup>5</sup> /Ünite)
Örnek 1	1,32	0,38	0,34	0,29	0,03	6	3
Örnek 2	2,56	2,54	2,59	2,43	0,09	15	4
Örnek 3	4,82	0,24	6,77	0,28	0,01	1	24
Örnek 4	3,62	2,08	2,63	1,94	0,17	10	31
Örnek 5	1,2	0,12	2,00	0,11	0,01	6	9
Örnek 6	4,08	4,76	5,39	4,62	0,06	11	22
Örnek 7	2,44	2,58	2,87	2,45	0,09	8	18
Örnek 8	3,98	4,33	5,08	4,14	0,08	7	18
Örnek 9	8,66	5,33	5,87	4,93	0,17	38	47
Örnek 10	1,64	2,36	2,44	2,33	0,08	6	22
Örnek 11	1,26	1,74	1,64	1,56	0,04	5	8
Örnek 12	0,94	1,17	1,30	1,16	0,11	4	3
Örnek 13	3,78	6,29	6,64	6,05	0,10	12	13
Örnek 14	3,56	4,88	5,26	4,64	0,14	6	8
Örnek 15	11,64	3,02	3,44	2,89	0,20	38	26
Örnek 16	2,1	3,05	2,92	2,89	0,30	13	12
Örnek 17	1,26	1,59	1,52	1,45	0,15	7	7
Örnek 18	2,56	1,10	1,13	1,02	0,05	7	24
Örnek 19	3,96	4,26	4,63	3,99	0,58	11	24
Örnek 20	8,2	3,76	5,62	3,45	0,21	28	49
Örnek 21	4,98	8,48	8,94	8,12	0,50	23	33
Örnek 22	2,04	2,15	0,93	2,04	0,10	13	21
Örnek 23	2,04	1,09	1,50	1,04	0,11	5	4
Örnek 24	2,48	2,02	2,59	1,94	0,33	7	12
Örnek 25	5,58	1,77	2,07	1,69	0,06	18	18
Örnek 26	1,34	1,37	1,61	1,32	0,06	10	7
Örnek 27	5,66	4,49	5,18	4,28	0,29	15	14
Örnek 28	5,3	4,66	4,82	4,35	0,01	29	24
Örnek 29	6,4	7,74	8,02	7,13	0,80	11	15
Örnek 30	6,06	5,14	5,91	4,67	0,51	26	57

**Çizelge 5.12.** Donma çözülme sonrası KK ünitesindeki hücre değerleri

ÖRNEK NO	CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	CFU-GEMM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)
Örnek 1	3,58	0,76	0,70	0,98	0,35	5	1
Örnek 2	2,88	1,57	1,41	1,70	0,37	11	3
Örnek 3	3,36	2,10	1,91	2,51	1,00	2	4
Örnek 4	2,86	2,22	1,93	3,14	0,94	7	5
Örnek 5	14,5	7,83	6,09	11,63	1,55	5	10

**Çizelge 5.13.** Otuz KK ünitesinin karakteristik analizi

Değişkenler	Ortalama ± SSD	Ortanca	Aralık
TNC sayısı (x10 <sup>7</sup> /Ünite)	93,8 ± 30,1	85,5	46,8-168,8
CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	3,85 ± 2,55	3,6	0,94-11,64
ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	3,14 ± 2,55	2,6	0,12-8,48
ALDH <sup>+</sup> hücrelerde CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	2,97 ± 2,02	2,4	0,11-8,12
CD34 <sup>+</sup> hücrelerde ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	3,72± 2,28	2,9	0,34-8,94
ALDH <sup>+</sup> hücrelerde CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	0,19± 0,19	0,1	0,005-0,795
CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	13 ± 10	11	1- 38
CFU-GEMM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	19 ± 14	17	3- 57

**Çizelge 5.14.** Dondurma çözülme sonrası 5 KK ünitesinin karakteristik analizi

Değişkenler	Ortalama ± SSD	Ortanca	Aralık
TNC sayısı (x10 <sup>7</sup> /Ünite)	71,8 ± 29,8	60,8	46,8-122,6
CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	5,44 ± 5,08	3,36	2,86-14,5
ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	2,9 ± 2,82	2,09	1,57-7,83
ALDH <sup>+</sup> hücrelerde CD34 <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	2,41 ± 2,12	1,91	0,70-6,09
CD34 <sup>+</sup> hücrelerde ALDH <sup>+</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	3,99 ± 4,34	2,51	0,98-11,63
ALDH <sup>+</sup> hücrelerde CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> hücre sayısı (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	0,84 ± 0,5	0,94	0,32-1,55
CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	6 ± 3	5	2- 11
CFU-GEMM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	5 ± 3	4	1- 10

**Çizelge 5.15.** CFU-GM/CFU-GEMM koloni sayılarına karşı KK ünitesindeki hematopietik aktiviteyi gösteren korelasyon değerleri

Değişkenler	CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	CFU-GEMM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)
TNC (x10 <sup>7</sup> h/Ünite)	r=0,569 p=0,001	r=0,382 p=0,037
CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	r=0,722 p<0,001	r=0,723 p<0,001
ALDH <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	r=0,624 p<0,001	r=0,451 p=0,120
ALDH <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	r=0,618 p<0,001	r=0,435 p=0,016
CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	r=0,423 p=0,020	r=0,558 p<0,001
ALDH <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	r=0,412 p=0,240	r=0,256 p=0,172

**Çizelge 5.16.** Taze KK'nın tüm parametrelere göre istatistiki dağılım değerleri

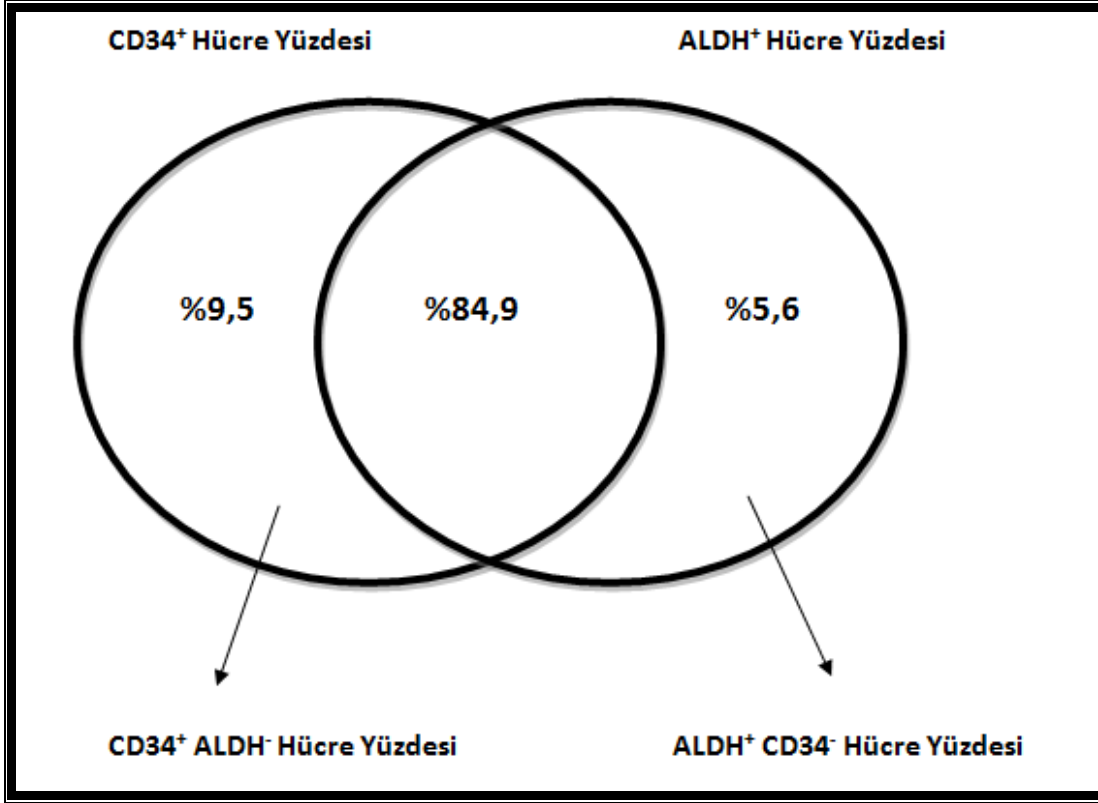
Değişkenler	TNC (x10 <sup>7</sup> h/Ünite)	CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	ALDH <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD 34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)	CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)	CFU-GEMM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)
TNC (x10 <sup>7</sup> h/Ünite)		r=0,586 p=0,010	r=0,681 p<0,001	r=0,685 p<0,001	r=0,501 p=0,050	r=0,461 p=0,010	r=0,569 p=0,001	r=0,382 p=0,037
CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)			r=0,670 p<0,001	r=0,666 p<0,001	r=0,768 p<0,001	r=0,416 p=0,022	r=0,722 p<0,001	r=0,723 p<0,001
ALDH <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)				r=0,999 p<0,001	r=0,786 p<0,001	r=0,586 p<0,001	r=0,624 p<0,001	r=0,451 p=0,120
ALDH <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)					r=0,786 p<0,001	r=0,568 p=0,010	r=0,618 p<0,001	r=0,435 p=0,016
CD34 <sup>+</sup> ALDH <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)						r=0,431 p=0,001	r=0,423 p=0,020	r=0,558 p<0,001
ALDH <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (x10 <sup>6</sup> /Ünite)							r=0,412 p=0,240	r=0,256 p=0,172
CFU-GM (x10 <sup>5</sup> /Ünite)								r=0,567 p=0,001
CFU-GEMM (x10 <sup>5</sup> Ünite)								



## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde HKH araştırmaları; bağışıklık sistemini baskılayıcı tedavi ve nakil sonrası: HKH tanımlaması, izolasyonu, en çok da hızlı ve/veya yeterli immün yapılanmayı sağlayacak hücrelerin karakterize edilerek, seçici kullanımına yönelmiştir. Diğer HKH kaynaklarına oranla daha yavaş engrafmanla karakterize olan KK naklinde, KK ünitesinin kalitesinin doğru belirlenmesi kritiktir. KK naklinde karşılaşılan sorunlardan bir tanesi, hücre canlılığı ve sayısı yüksek bir KK'nın nakil sonrası *graft*'inin başarısız sonuçlanabilmesidir. Genellikle yüksek CD34<sup>+</sup> hücre ile nakle giden hastalarda engrafman başarısı yüksektir ancak nadiren de olsa başarısız nakil gerçekleşebilmektedir<sup>22</sup>. Bu sonuç kısmen işlevselliğini yitirmiş ve donma sonrası nekroz/apoptozis tetiklenmiş CD34<sup>+</sup> hücrelerin naklediliyor olmasıyla kısmen de kısa veya uzun dönem progenitörlerin engrafman yeteneklerinin farklı olmasıyla açıklanabilir<sup>11,21</sup>. Akım sitometri ile paralel ALDH aktivite belirlenmesi yönteminin, daha önce CD34<sup>+</sup> HKH alt tiplerinin belirlenmesindeki etkinliği kanıtlanmıştır. Bu yöntemler, HKH fonksiyonlarının belirlenmesinde CFU-GM testlerine oranla daha yüksek korelasyon gösterebilmektedir<sup>3,11</sup>

Yaptığımız çalışmada bulgular ALDH<sup>+</sup> hücre popülasyonu ile CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonunun oldukça yüksek korelasyon gösterdiğini ( $r=0,670$   $p<0,001$ ) kanıtlamıştır. KK ünitelerinin tüm bahsi geçen parametrelerin analizi ilk kez bu çalışmada yapılmıştır ve Çizelge 5.16'da gösterilmiştir (TNC sayısı, CD34<sup>+</sup> hücre sayısı, ALDH<sup>+</sup> hücre sayısı, ALDH<sup>+</sup> hücreler içinde CD34<sup>+</sup> hücre sayısı, CD34<sup>+</sup> hücreler içine ALDH<sup>+</sup> hücre sayısı ve ALDH<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> hücre sayısı, CFU-GM ve CFU-GEMM koloni sayıları) TNC ile CD34<sup>+</sup> arası ilişki dahil parametrelerin hepsinin birbirleriyle pozitif korelasyonu görülmektedir ( $r=0,586$   $p=0,01$ ).



**Şekil 6.1.** ALDH<sup>+</sup> olup CD34<sup>-</sup> ve CD34<sup>+</sup> olup ALDH<sup>-</sup> olan hücre popülasyonu oranları

Araştırmamızın sonucunda taze kordon kanı örneklerinde TNC'nin % 4,04 ± 0,2' sinin CD34<sup>+</sup> ve % 3,25 ± 1,2'sinin ALDH<sup>+</sup> olduğu; CD34<sup>+</sup> hücrelerin % 90,5 ± 45,9'unun ALDH<sup>+</sup>, ALDH<sup>+</sup> hücrelerin % 94,4 ± 5,3'ünün CD34<sup>+</sup> hücrelerden oluştuğu görülmüştür. Böylece HKH' lerin çok büyük kısmının hem ALDH<sup>+</sup> hem de CD34<sup>+</sup> hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Öte yandan ALDH<sup>+</sup> hücrelerin %5,6'sının CD34<sup>-</sup> hücre popülasyonu oluşturması, CD34<sup>+</sup> hücrelerin ise % 9,5'nin ALDH<sup>-</sup> hücreler olması diğer önemli bir bulgudur (Şekil 5.16). Daha önceki yayınlarda CD34<sup>+</sup> lerde ALDH oranı değişik oranlarda bildirilmiştir. Bunun klinik açıdan önemi tam olarak bilinmemekle birlikte başka bir araştırma konusu olabilir. Bizim dışımızda CFU-GEMM ve CFU-GM ile ALDH/CD34 birlikteliğini araştıran tek araştırma 2014 yılında yayınlanmıştır. *Lee ve ark' ları* 245 KK ünitesinde ALDH ile CD34 arasında dondurma öncesi ve sonrası TNC ,CD34<sup>+</sup>, ALDH<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> ve CD34 ALDH<sup>+</sup> hücre popülasyonlarının sadece CFU-GM ve CFU-GEMM ile korelasyonunu araştırmış ve alt tiplendirme yapmamıştır<sup>13</sup>.

CFU dozu dondurma/çözme sonrası KK engrafman başarısını öngörebilecek önemli kriterlerden biridir, çünkü farklı HKH alt tiplerinin işlevselliği ancak CFU-GM testleriyle ortaya konabilir. CD34 hücre sayısı ve kalitesiyle birlikte, CFU dozunun tahmin

edilmesine ve CFU yapılmaksızın engrafman süresinin ve *graft* başarısının öngörülmesine olanak sağlayabilir. Çalışmamızda klinik seçim kriteri olarak kullanılan CD34<sup>+</sup> hücre sayısı ile CFU-GM (r=0,722 p<0,001) ve CFU-GEMM (r=0,723 p<0,001) kolonileri arasında oldukça yüksek korelasyon saptanmıştır. Bunun yanısıra ALDH<sup>+</sup> hücre popülasyonu ile yine CFU-GM (r=0,624 p<0,001) ve CFU-GEMM (r=0,451 p=0,12) arasında CD34 ile korelasyonuna yakın yüksek korelasyon gösterilmektedir. Bulgularımız kısa sürede sonuç veren maliyeti düşük akım sitometrik yöntemlerle analizini; pahalı, emek ve zaman gerektirmesinin yanında optimizasyon problemleriyle sıklıkla sorun yaşanan *ex vivo* koloni yerini alabileceğini göstermektedir. ALDH aktivitesi, CFU-GM yapılmaksızın, KK ünitesinin işlenmesini takiben fonksiyonel ve daha az fonksiyonel HKH ve progenitör alt gruplarının belirlenmesine de olanak sağlayabilir. CFU-GM testleri en fazla STR hakkında bilgi vermekte olup, LTR hücre serileri daha fazla emek ve maliyet gerektiren uzun dönemli hücre kültürü testleri (*long term cell culture*, LTCC) ile saptanabilmektedir. Dolayısıyla, CFU-GM testlerinde üreme gösterebilen ve gösteremeyen, yüksek engrafman kapasitesine sahip HKH ve progenitör alt tiplerinin ALDH aktivitesi yoluyla kısa sürede belirlenmesi klinik açıdan çok önemlidir.

Araştırmamızda dondurup çözülmüş örneklerde de taze örneklerde olduğu gibi CD34<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> hücre oranlarının değiştiği görülmüştür. Sayı azlığı nedeniyle korelasyon bakılamamış ancak CD34 düşük gibi görülen örneklerin ALDH<sup>+</sup> lerden zengin olabildiği görülmüştür.

ISHAGE yöntemi ile saptanan CD34<sup>+</sup> 'liği ile ALDH birlikte yapılan analizlerdeki CD34<sup>+</sup> 'liği arasında % 10'u aşmayan bir sapma görülmüştür. Akım sitometrik analizlerde yöntemin standardizasyonu açısından bu gözlemin dikkate alınması gereklidir. Bu durumun sebebi kullanılan yöntem arasındaki farklılıklardan kaynaklanması olabilir. ISHAGE yönteminde mutlak hücre sayımı yapılırken, yıkama işlemi yapılmamaktadır. ALDH ile birlikte analizde ise hücrelerde ön yıkama yapıldıktan sonra eklenen antikorlardan bağlanmayanları uzaklaştırmak için 2. yıkama işlemi yapılmaktadır ve boncuk kullanımı söz konusu olmayıp, değerler % WBC üzerinden hesaplanmaktadır.

Akım sitometri analizi ile mutlak CD34<sup>+</sup> hücre sayısı hesaplanırken ALDH benzeri belirteçlerin analize eklenmesi sayesinde, CD45<sup>+/-</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+/-</sup> erken/geç alt popülasyonların ve hatta son yıllarda önemi daha çok vurgulanan CD34<sup>-</sup> ALDH<sup>+</sup>

fenotipinde hücre tanımlanması mümkün olmuştur. Çalışmamızda klinik açıdan önemli olabilecek CD34<sup>-</sup> ALDH<sup>+</sup> ve ALDH<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> hücre popülasyonuna rastlanmıştır. Bu alt tiplendirme sayesinde potansiyeli yüksek ALDH<sup>+</sup> progenitör grupların saptanması, tıpkı *ex vivo* ekspansiyon yapılmış ya da pluripotensi indüklenmiş hücre bankacılığında olduğu gibi, ALDH<sup>+</sup> hücrelerin seçici bankacılığının yapılmasına da olanak sağlayabilir. Rutin kullanımının yanı sıra, ALDH<sup>+</sup> özelliğe sahip olan progenitörlerin seçici kullanımı hücrel tedaviler için de alternatif bir kaynak teşkil edebilir. Kontrollü randomize bir klinik çalışmada, ALDH<sup>+</sup> Kİ hücrelerin olog naklinin iskemik olgularda ve bir başka çalışmada da işitme kaybında tedavi edici etkisi gösterilmiştir<sup>41,42</sup>. Kurtzberg ve grubu tarafından pediatrik hastaların dahil edildiği faz I çalışmasında da KK ALDH<sup>+</sup> hücreleriyle zenginleştirilmiş KK naklinde, ALDH aktivitesi yüksek hücrelerin tedavi edici etkisi ispat edilmiştir<sup>43</sup>.

Intrinsik ALDH enzim etkinliğinin dayanıklı bir biyolojik fonksiyon olması nedeniyle, özellikle uzun süre dondurulmuş KK gibi HKH kaynaklarının kalitesinin öngörülmesinde, işlevsel bir analize dayanan CFU-GM koloni sayısı ile birlikte değerlendirildiğinde sadece CD34<sup>+</sup> hücre sayısı belirlemeye oranla HKH miktarını daha gerçekçi olarak belirleyebilir. ALDH aktivitesi, güvenilirliği ve etkinliği kanıtlanmış sitometrik temele dayanması ve hızlı bir test olmasıyla gelecekte *ex vivo* CFU testlerinin yerine geçebilir. ALDH kullanılarak akım sitometri ile engrafman kapasitesi yüksek CD34<sup>+</sup> progenitör ve kök hücre fraksiyonunu tespit edebilmek, CFU dozunun önceden tahminine olanak sağlayarak, kültür sisteminin dezavantajlarını ortadan kaldırabilir. ISHAGE rehberi benzeri standart bir protokolünün olmaması ve yöntemin henüz yeterince standardize edilmemiş olması, KK nakillerinde zaman faktörünün daha az önem taşıması, CFU-GM ve CD34 analizlerinin yaygın uygulanıyor olması gibi nedenlerle ALDH ile KK literatüründeki yayın sayısı kısıtlıdır. Oysa KK ile HKH nakillerinde engrafman sorunları geç yeniden yapılanma ve hatta engrafman yetmezliği ile kendini göstermektedir. Bu olası başarısızlıkları önceden belirleme gereksinimi, pratik ve hızlı sonuç veren, başlangıç ve dondurma/çözme sonrası yalnızca CD34<sup>+</sup> HKH sayısına değil, kısa/uzun dönem yapılanma sağlayabilen HKH'leri saptayacak moleküler belirteçlere gereksinimi oluşturmaktadır<sup>7,11,44</sup>. Yeterli optimizasyon ve standart yöntemle karşılaştırma sayesinde, ALDH aktivitesi ölçümüne dayalı akım sitometri analizi KK'daki HKH'lerin proliferatif potansiyelleri hakkında fikir verebilecek ve nakil için KK seçiminde kriter olarak kullanılacak standart yöntemler arasında yer alabilir.

## KAYNAKLAR

1. Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell death and differentiation*. Nov 2007;14(11):1851-1859.
2. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match doesn't exist. *Blood*. Jun 9 2014.
3. Beksac M, Preffer F. Is it time to revisit our current hematopoietic progenitor cell quantification methods in the clinic? *Bone marrow transplantation*. Nov 2012;47(11):1391-1396.
4. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry*. Apr 15 1998;34(2):61-70.
5. Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem cells*. Jun-Jul 2005;23(6):752-760.
6. Pranke P, Hendrikx J, Alespeiti G, Nardi N, Rubinstein P, Visser J. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*. Jul 2006;39(7):901-906.
7. Christ O, Lucke K, Imren S, et al. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica*. 2007;92(9):1165-1172.
8. Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, et al. Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*. Jun 2002;29(12):967-972.
9. Emminger W, Emminger-Schmidmeier W, Hocker P, Hinterberger W, Gardner H. Myeloid progenitor cells (CFU-GM) predict engraftment kinetics in autologous transplantation in children. *Bone marrow transplantation*. Jul 1989;4(4):415-420.
10. Kozłowska-Skrzypczak M, Gil L, Komarnicki M. Factors affecting neutrophil recovery after autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Transplantation proceedings*. Nov 2009;41(9):3868-3872.
11. Storms RW, Green PD, Safford KM, et al. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*. Jul 1 2005;106(1):95-102.
12. Boxall SA, Cook GP, Pearce D, et al. Haematopoietic repopulating activity in human cord blood CD133+ quiescent cells. *Bone marrow transplantation*. Apr 2009;43(8):627-635.
13. Lee HR, Shin S, Yoon JH, Roh EY, Kim BJ, Song EY. Aldehyde dehydrogenase-bright cells correlated with the colony-forming unit-granulocyte-macrophage assay of thawed cord blood units. *Transfusion*. Jul 2014;54(7):1871-1875.
14. Gustafsson B, Moell J, Leblanc K, Barbany G, Soderhall S, Winiarski J. Donor cell-derived acute myeloid leukemia after second allogeneic cord blood transplantation in a patient with Fanconi anemia. *Pediatric transplantation*. Sep 2012;16(6):E241-245.

15. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine*. Oct 26 1989;321(17):1174-1178.
16. Michel G, Detrait M, Elsermans V, et al. [Hematopoietic Stem Cell Transplantation using unrelated cord blood: which unit to choose? A report of the SFGM-TC]. *Pathologie-biologie*. Aug 2013;61(4):147-148.
17. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone marrow transplantation*. Jan 2007;39(1):11-23.
18. Gluckman E. Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *British journal of haematology*. Oct 2009;147(2):192-199.
19. Broxmeyer HE. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. *Cell proliferation*. Apr 2011;44 Suppl 1:55-59.
20. Yoo KH, Lee SH, Kim HJ, et al. The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone marrow transplantation*. May 2007;39(9):515-521.
21. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, et al. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion*. Mar 2012;52(3):549-559.
22. Radke TF, Barbosa D, Duggleby RC, Saccardi R, Querol S, Kogler G. The Assessment of Parameters Affecting the Quality of Cord Blood by the Appliance of the Annexin V Staining Method and Correlation with CFU Assays. *Stem cells international*. 2013;2013:823912.
23. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Journal of hematotherapy*. Jun 1996;5(3):213-226.
24. Guttridge MG, Soh TG, Belfield H, Sidders C, Watt SM. Storage time affects umbilical cord blood viability. *Transfusion*. May 2014;54(5):1278-1285.
25. Yurdakul P, Beksac M. Modalities to Improve Cord Blood Engraftment. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 2014;04(03).
26. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. Oct 15 2000;96(8):2717-2722.
27. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of medical research*. Nov-Dec 2003;34(6):461-475.
28. al-Fiar F, Prince HM, Imrie K, Stewart AK, Crump M, Keating A. Bone marrow mononuclear cell count does not predict neutrophil and platelet recovery following autologous bone marrow transplant: value of the colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) assay. *Cell transplantation*. Sep-Oct 1997;6(5):491-495.
29. 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 transplantation*. Sep 1989;4(5):553-558.

30. Iori AP, Cerretti R, De Felice L, et al. Pre-transplant prognostic factors for patients with high-risk leukemia undergoing an unrelated cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation*. Jun 2004;33(11):1097-1105.
31. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, et al. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Journal of the American College of Cardiology*. Dec 4 2007;50(23):2243-2248.
32. Balber AE. Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem cells*. Apr 2011;29(4):570-575.
33. Gentry T, Deibert E, Foster SJ, Haley R, Kurtzberg J, Balber AE. Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH-bright cell population of cryopreserved, banked UC blood. *Cytotherapy*. 2007;9(6):569-576.
34. Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, et al. Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC physiology*. 2008;8:13.
35. Gunduz E, Demirel G, Bal C, Gulbas Z. Evaluation of mobilized peripheral stem cells according to CD34 and aldehyde dehydrogenase expression and effect of SSC(lo) ALDH(br) cells on hematopoietic recovery. *Cytotherapy*. Dec 2010;12(8):1006-1012.
36. Fallon P, Gentry T, Balber AE, et al. Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *British journal of haematology*. Jul 2003;122(1):99-108.
37. Sondergaard CS, Hess DA, Maxwell DJ, et al. Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. *Journal of translational medicine*. 2010;8:24.
38. Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, Hess DA, Nolte J. Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology*. Jun 2009;49(6):1992-2000.
39. Lioznov MV, Freiburger P, Kroger N, Zander AR, Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone marrow transplantation*. May 2005;35(9):909-914.
40. Lee HR, Shin S, Yoon JH, Roh EY, Kim BJ, Song EY. Aldehyde dehydrogenase-bright cells correlated with the colony-forming unit-granulocyte-macrophage assay of thawed cord blood units. *Transfusion*. Mar 14 2014.
41. Perin EC, Silva G, Gahremanpour A, et al. A randomized, controlled study of autologous therapy with bone marrow-derived aldehyde dehydrogenase bright cells in patients with critical limb ischemia. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*. Dec 1 2011;78(7):1060-1067.
42. Perin EC, Silva GV, Zheng Y, et al. Randomized, double-blind pilot study of transendocardial injection of autologous aldehyde dehydrogenase-bright stem cells in patients with ischemic heart failure. *American heart journal*. Mar 2012;163(3):415-421, 421 e411.
43. Hickerson D, Fiordalisi M, Reese M, et al. Modification of a commercial cell sorter to support efficient and reliable preparation of ALDH-bright cells for clinical use. *Cytotherapy*. 2007;9(6):562-568.
44. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, et al. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated

umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. Sep 2011;17(9):1362-1374.



**EK**

**EK1: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararı**

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kordon Kanı hematopoetik kök hücrelerinin ex vivo şartlarda çoğaltılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Meral Beksaç			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>		
Yüksek Doz Araştırması		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz: Prospektif Çalışma					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARAS 1 <input type="checkbox"/>	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
ASLI GÖRÜLMEZ  
17 Ocak 2014

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:04-173-13	Tarih: 11 Mart 2013		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			
<b>ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>				
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu		
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Mehmet MELLİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yurtdışın da
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Toplantıda
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Rahatsız
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yurtdışın da
Doç.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Rahatsız
Doc.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji		E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
30 Mart 2014



## TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. **Gencer EB**, Yurdakul P, Karakaya H, Özkul S, Dalva K, Beksaç M. “Kordon Kanı Hematopoietik Kök Hücre İçeriğini Belirlemek için CD34 miktarı ve *ex vivo* Granülositer Koloni Oluşturma (CFU-GM) arası ilişki analizi”, 8.Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, 2014, Belek, Antalya, P-059.