

Kök Hücre Toplamada Akan HücreSayar

Okuma ve Değerlendirme

16.05.2025 - Antalya

Gülhis AKAR

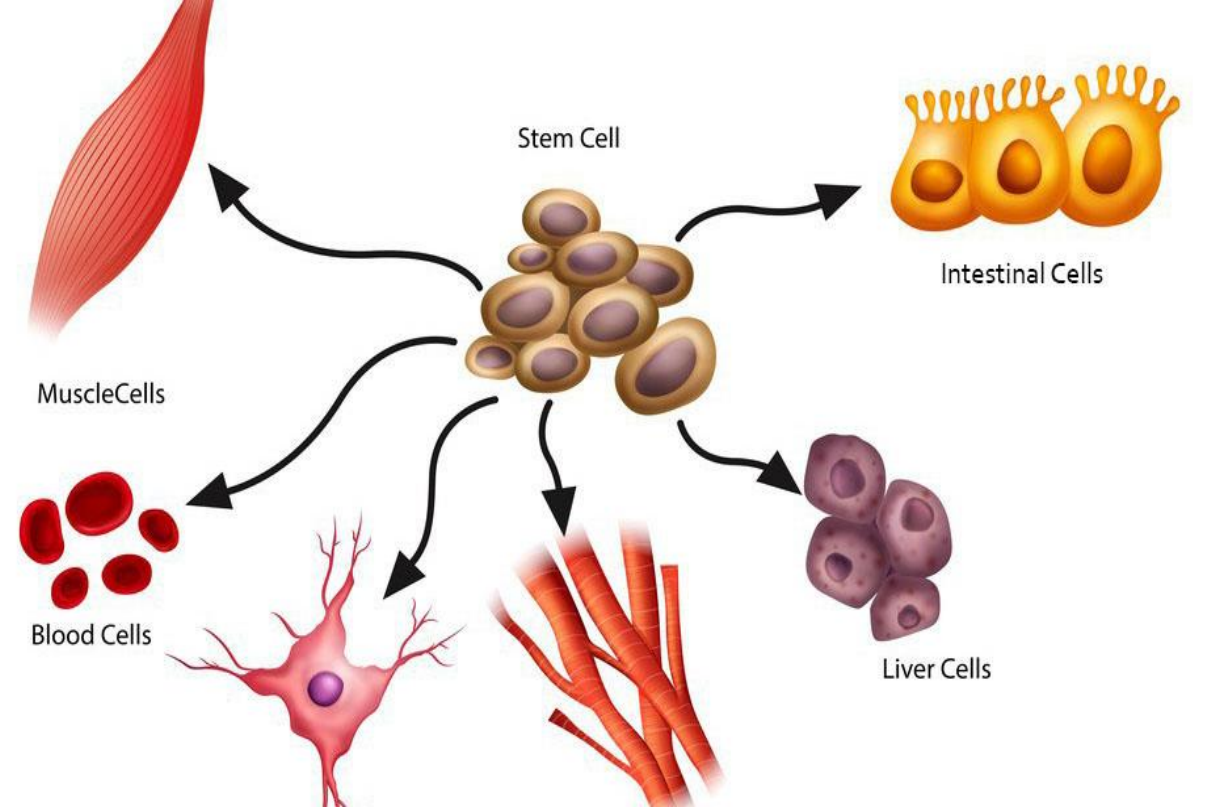
Market Development Manager

Türkiye & SEE

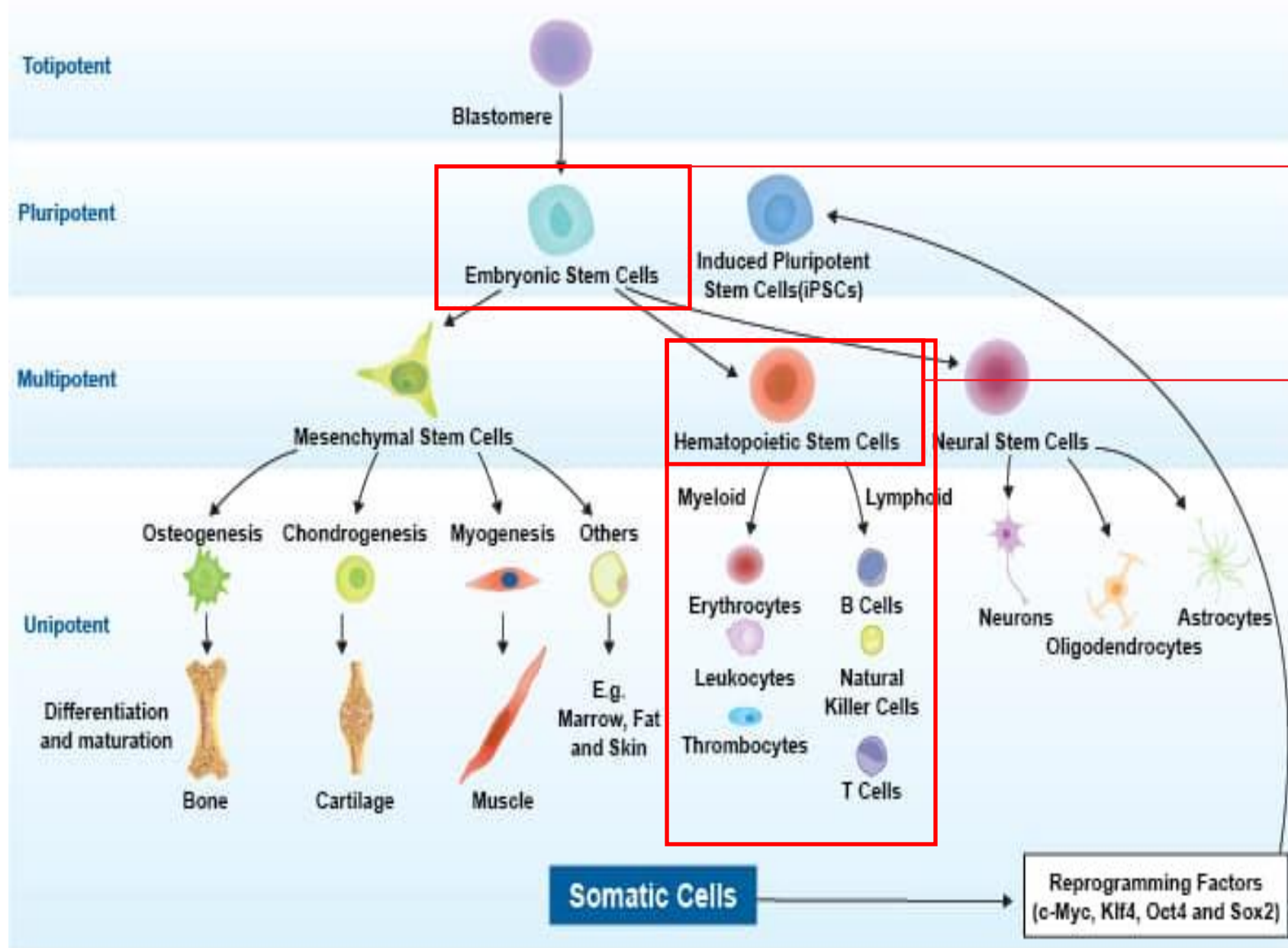


Kök Hücre

bölünme ile özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileme yeteneğine sahip olan, doku ve organların oluşturan ana hücre türüdür.*



* Wikipedia



CD34-

CD34+ lin-

lin: lineage
Hematopoietik hücre serilerine özgü antijenler yok

Hematopoietik Kök Hücre (HKH) Tanınmasında Kullanılan Yöntemler

- Akan Hücre Ölçerde Yapılan Değerlendirmeler
 - ✓ İmmunfenotipleme ile hücre yüzey profilinin belirlenmesi
 - ✓ Enzimler aracılığı ile işaretleme (HKH, ALDH aktivitesi yüksek)
 - ✓ “Side Populating” hücrelerin belirlenmesi (Hoechst 33342, Rhodamin123 gibi boyaları dışarı pompalar)
- Hücre Kültürleri ve Hücre Nakli testleri
 - ✓ İn-vivo [SRC (SCID–Repopulating Cells) takibi, Fetal sheep HSC assay]
 - ✓ İn-vitro (LTC-IC, CAFC, ELTC-IC)
- Moleküler Teknikler
 - ✓ Gen ekspresyonu
 - ✓ Telomeraz aktivitesi, telomer uzunluğu
 - ✓ “Reporter” gen yerleştirilmesi ile takip (Ör: GFP, luciferase...)
 - ✓ Tek hücre genom, epigenom transcriptom analizleri Sc RNA seq

Hematopoietik Kök Hücre (HKH) Nakli

Malin hematolojik hastalıklar, immun yetmezlikler, hemoglobinopatiler, bazı otoimmün hastalıklar ve diğer bazı hastalıkların tedavisi için kullanılan bir tedavi seçeneği

- **Otolog** (Lenfomalar, MM,...) ya da
- **Allojeneik** (Lösemiler, İmmun yetmezlikler, Talasemi,...)

Nakil için kullanılacak Kök Hücrelerin kaynağı:

- Kemik İliği (KI) (ön hazırlık yok, ameliyathanede toplanır)
- Çevresel Kan (4-5 gün GCSF uygulaması ile HKH mobilize edildikten sonra aferez ünitesinde kanın, HKHleri içeren, mononükleer hücreden zengin fazı toplanır)
- Kordon Kanı (KK) (doğumu takiben toplanıyor)

Hedeflenen Hücre (CD34+) Miktarı

Amaca ve hastalığa bağlı olarak değişebilir

2×10^6 CD34+ cells/kg for backup collections

3×10^6 CD34+ cells/kg for planned autologous high dose therapy/transplant

5×10^6 CD34+ cells/kg for planned sibling allogeneic high dose therapy/transplant

$10 - 20 \times 10^6$ CD34+ cells/kg for haploidentical collections

Yedekleme

Otolog

Uyumlu Kardeş

Haploidentik

Toplanan/nakli yapılacak ürünlerdeki CD34+ hücre sayısı engraftmanı, nakil başarısını etkiler

CD34+ HKH Sayımı için Kullanılan Örnekler

- Çevresel Kan, Aferez ürünü, Kemik iliği Aspirasyon Materyali, Kordon kanı (KK)
- Bu materyaller bir işlem uygulandıktan sonra laboratuvara iletilmiş olabilir
- Taze ya da dondurulup çözülmüş olabilir
 - Taze, seyreltilmemiş ürünler tecihen 2-8 °C de saklanmalı
 - Dondurulmuş ürünün usulüne uygun çözülmesi önemli
- İşlem uygulanan ürünlerde işlem öncesi /sonrası örnekler ve atık mutlaka değerlendirilmeli
- Taze ve / veya Çözülmüş ürünler bekletilmeden çalışılmalı (Taze:maks. 24s; KK maks. 48s)
- EDTA lı örnek iletilmesi tercih edilir, Heparinli ACD li örnekler kabul edilir
- Seyreltmek için otolog serum; %0,5 BSA içeren PBS, Boya içermeyen RPMI gibi bir medyum kullanılabilir

Hematopoetik Kök Hücre (CD34+) Sayımı Ne Zaman Yapılıyor?

- Kanda yeterli HKH var mı? (mobilizasyon başarısı?): Aferez öncesi periferik kanda CD34+ hücre sayımı
- Aferez ile ya da KI den, KK dan toplanan hücrelerin sayımı
- Toplanan ürüne uygulanan ek işlemlerin değerlendirilmesi:
 - CD34+ hücre seçilmiş ürünlerde canlılık / saflık / HKH geri kazanımı
 - CD3 (T hücre) eksiltilmiş üründe T hücre kontaminasyonu / HKH geri kazanımı
 - Kriyopreservasyonun hücre canlılığına etkisi (eriyince kalan canlı CD34+ hücre sayısı)
 - CD34+ hücrelerin alt gruplarının tesbiti/sayımı, ...
- Çeşitli hücrelerin ve/veya kemoterapi/hazırlama rejimlerinin CD34+ hücre sayılarına ve alt gruplarına etkisini değerlendirmek

Yapılan Tüm İşlemlerden Önce ve Sonra Ürün Kalitesi Mutlaka Değerlendirilmelidir

Hücre saflaştırılması yapılıyorsa;

- Toplanan ilk üründe (İşleme başlamadan önce, sıfır noktası)
- İşlemden sonra elde edilen son üründe
- Atık olarak ayrılan üründe

Mutlaka

- Hacim ölçülmeli (hesaplamada esas)
- CD34+ hücre sayımı
- Hedefe ulaşıldığını kontrol edecek diğer hücre sayımları (Ör :T lenfosit sayımı)

yapılmalıdır

CD34 Hücre Sayımı

«Dual» Platform ya da «Single» Platform yöntemleriyle yapılabiliyor

- **Dual Platform:** FCM ile lökositler içindeki CD34+ hücre oranı belirlenir (%). Otomatik Kan Sayım (OKS) cihazında bulunan WBC mutlak değeri ile bu oran çarpılarak CD34+ hücre mutlak değeri hesaplanır **ÖNERİLMİYOR**
 - *Laboratuvarlar arası fark çok fazla*
- **Single Platform:** Sadece FCM kullanarak, mikrolitresinde belli sayıda mikroboncuk bulunduran bir sistem aracılığıyla, OKS deki WBC değerlerine gerek kalmadan, CD34+ hücre mutlak değeri hesaplanır **ÖNERİLEN YÖNTEM**

CD34 Hücre Sayımı

- CD34+ hücre sayımı «International Society for Hematotherapy and Graft Engineering», (ISHAGE) tarafından tanımlanan tek (single) platform yöntemine göre yapılmalıdır
- Bu amaçla ya sıvı formdaki boncuklar ya da liyofilize boncuklar kullanılabilir
- CD34 Hücre mutlak sayım değeri: Belli sürede veya hedeflenen hücre sayısına (*) ulaşana dek sayılan hücre sayısının sayılan boncuk sayısına bölünmesi ve bu değer mikrolitrede bilinen (etikette) boncuk sayısı ile çarpılmasıyla ulaşılır (**)

$$\text{Mutlak Sayım} = \frac{\text{CD34+ hücre sayısı} \times \text{florosfer konsantrasyonu}}{\text{florosfer sayısı}}$$

Boncukların kan ile eşit miktarda pipetlendiği deneyde

* : En az CD45+ 75000 lökosit ve en az 150 CD34+ HKH sayılması hedeflenmelidir

** : Ölçümü, sistemden geçen sıvı hacmi üzerinden (volümetrik) hesaplayan sistemler de mevcut

Beckman Coulter Stem Kit – CE IVD

- CD45 FITC / İzoklonik Kontrol PE: non spesifik bağlanma kontrolü
- CD45 FITC / CD34 PE:
- 7 AAD PC5 :Canlılık Boyası, canlı hücreler boya içermezler
- Mikroboncuklar: 100µL için sayısı şişe üzerindedir
- Lizis: NH₄Cl, 1:9 distile su ile dilüsyon ile günlük hazırlanır

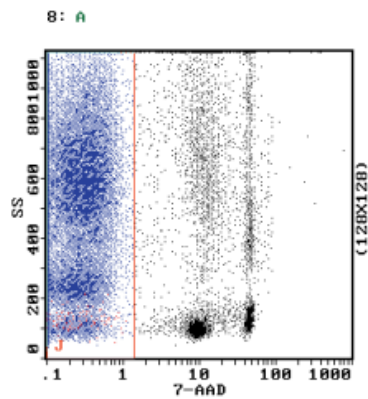


CD34 Sayım İşlemi- Deneyin Kurulması

Reaktif/Numune	45/34//7AAD	45/izoklonik kontrol//7AAD
CD45. FITC CD34. PE	20 µL	-
CD45. FITC İzoklonik kontrol. PE		20 µL
7-AAD canlılık Boyası	20 µL	20 µL
Örnek	100 µL	100 µL
Vortekslenir, oda ısısı- karanlıkta 20 dk bekletilir		
NH4Cl «lisis» sol.	2 mL	2 mL
Vortekslenir, oda ısısı- karanlıkta 10 dk bekletilir		
Kalibre floresan boncuklar	100 µL	100 µL
Vortekslenir, ve hemen veri toplama işlemine geçilir Veri toplamadan önce tüpler buz üzerinde 1 saatten fazla bekletilmemelidir (oda ısısında beklemez)		

Önemli Teknik Konular

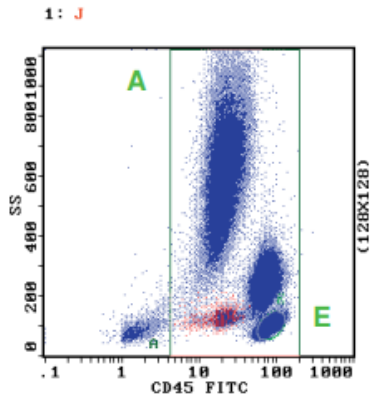
- İşlem arasında gönderilen üründe bulunan CD34 sayım değerleri son ürünü temsilen kullanılmamalı (farklı zamanda kinetikler farklı) Torbadan örnek alırken hücrelerin torbada homojen dağıldığından emin olunmalı.
- Sayım hemen yapılamayacaksa, konsantre ürün olarak bekletince oluşan hücre agregatları hatalı sayım sebebi olabilir. Sayılacak örnek tercihen seyreltilerek saklanmalı (Aferez ürünündeki WBC değeri 200-300 10^3 h / μ L olabilir).
- Deneye başlarken Lökosit sayısı 30 (50) bin h/ μ L geçmeyecek şekilde ürün seyreltilmelidir.
- Seyreltme tercihen otolog serum ile yapılmalı, yoksa uygun ticari medyumlar (ör; boyasız RPMI, %0.5 BSA içeren PBS) kullanılabilir
- Pipetleme yaparken (örnek ve boncuk) «reverse» pipetleme tekniği kullanılmalı.
Doğru pipet kullanımına dikkat edilmeli,
Seyreltme yaparken hücre hacmi düşük tutulmamalı; 100 μ L örnek için 10 kere seyreltme yapılacaksa (10 μ L örnek+90 μ L dilüent yerine 100 μ L +900 μ L tercih edilmeli)
- Boncuklar sıvı formda ise oda ısısına gelmesi ve hava kabarcığı oluşturulmadan homojenize olması sağlanmalı
- Boncuklar eklendikten sonra beklemeden okuma yapılmalı (boncuklar yüzer)



Histogram 8

- Histogram 8 displays events from region A.
- Viable events are included within Region J. The 7-AAD Viability Dye positive events are excluded from Region J.

Canlı Hücreler seçilir



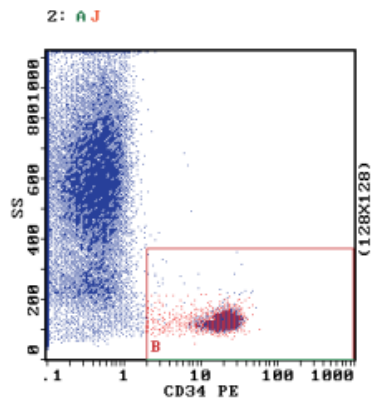
Histogram 1

- Histogram 1 displays viable events from region J (see Histogram 8). If not using 7-AAD, Histogram 1 displays all events minus all Stem-Count Fluorospheres (i.e. « -H » see Histogram 5).

NOTE:

- Position Region A to include all CD45⁺ events (leukocytes) while excluding CD45⁻ events. Position Region E to include only lymphocytes (bright CD45, low Side Scatter).
- Region A is intended to serve as an appropriate denominator for viable WBC in the calculation of the percentage of CD34⁺ HPC. Once the analysis is done, the absolute count of viable leukocytes is given on the statistic printout related to Region A.

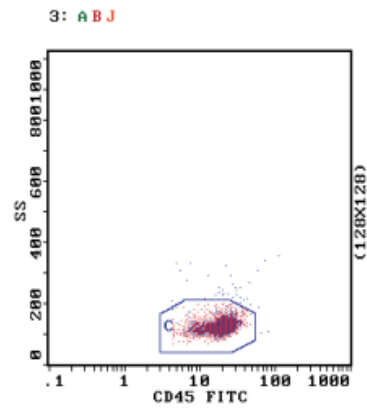
CD45+ Lökositler(A) ve Lenfositler(E) seçilir



Histogram 2

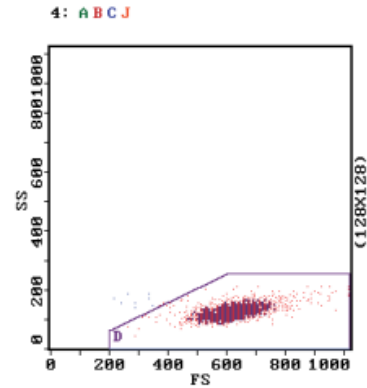
- Histogram 2 displays events from region A and J. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region A.
- Adjust Region B to surround CD34⁺ HPC, including CD34^{dim} events. The upper limit along the y-axis may be set to include CD34⁺ events with low to intermediate Side Scatter for CD34⁺ HPC.

Canlı CD45+ hücrelerde(AJ) CD34+ olanlar seçilir(B)



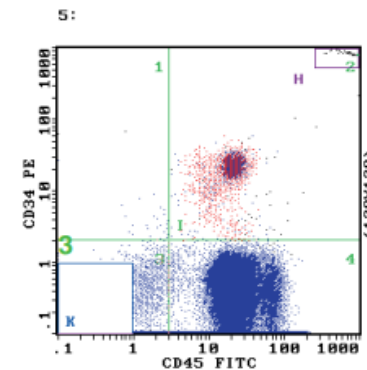
Histogram 3

- Histogram 3 displays events from A and B and J. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region A and B.
- Adjust Region C to include cells forming a cluster with characteristic $CD34^+$ HPC (i.e. low Side Scatter and low to intermediate CD45 staining). Note the characteristic shape of Region C. It is the cluster of events that determines where Region C is centered. Brightly FITC stained events (platelet aggregates and mature monomyeloid cells) must be excluded in the setting of this region.



Histogram 4

- Histogram 4 displays events from A and B and C and J. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region A and B and C.
- Lymph / Blast Region D identifies a cluster of events meeting all the fluorescence and light scatter criteria of ISHAGE Guidelines for $CD34^+$ HPC. Note the characteristic shape of Region D. If present, platelet aggregates that stain weakly must be excluded to the left of Region D.
- Once the analysis is complete, the absolute count of viable $CD34^+$ HPC is given on the statistic printout related to the $CD34^+$ Stem-Trol Control Cells or $CD34^+$ HPC (Region D).



Histogram 5 displays all events.

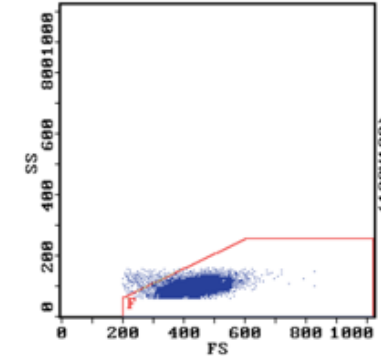
NOTE:

This histogram is useful to visualize the lower limit of CD45 expression within the $CD34^+$ events.

- Set Quadstat Region I2 to enclose all $CD45^+CD34^+$ events. Set the left boundary of Quadstat Region I2 to include all $CD34^+CD45^{dim}$ events. Verify on Histogram 1 that the lower limit of Region A includes all $CD34^+$ events (use Histogram 5 as a guide).
- **Amorphous** Region H is drawn to include all Stem-Count Fluorospheres. Region H must include the last channel of the FL1 Log (on the right) and FL2 Log scales (on the top).
- Set Region K (named "listgate -") to exclude most of the double negative events from the acquisition.

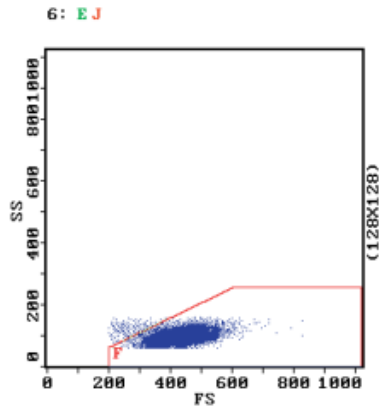
Canlı, $CD45^+$, $CD34^+$ hücrelerde (AJB) $CD45$ dim olanlar seçilir (C)

Canlı, $CD45^+$, $CD34^+CD45$ dim hücrelerde (AJBC) lenfositler küçük olanlar dışlanır (AJBCD)



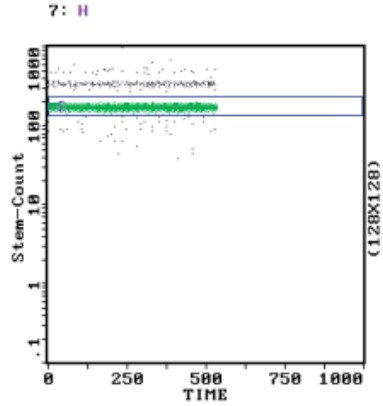
«D» lenfositler kullanılarak çizilir. $F \sim D$

Bu grafikte D için yapılan seçimlerin doğruluğu, tüm $CD34^+$ hücrelerin dahil edildiği kontrol edilir



Histogram 6

- Histogram 6 displays events from E and J regions. If not using 7-AAD, Histogram 2 displays events from region E.
- Verify whether the Forward and Side Scatter gain parameters of the flow cytometer are optimally set for the processed sample. If necessary, adjust the Forward Scatter voltage / gain so that the smallest lymphocytes scatter in the middle-left part of the histogram. Adjust the Forward Scatter discriminator to ensure that even the smallest lymphocytes scatter above the discriminator.



Histogram 7

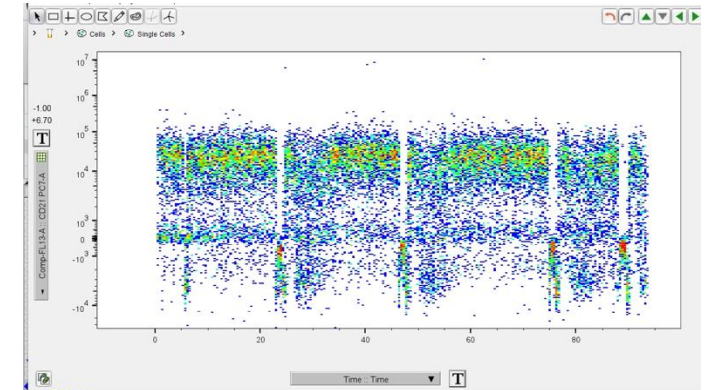
- Histogram 7 displays events from region H.
- Region G encloses the Stem-Count Fluorospheres singlet population. Check that the fluorosphere singlets accumulate homogeneously and constantly over time. Region G can be labeled as $\leq \text{CAL} \leq$ to allow automatic calculation of absolute numbers of CD34^+ HPC. Type the correct assayed concentration of the current lot of Stem-Count Fluorospheres (refer to the next section of this insert or to the instrument manual for further details).

Lenfositlerin FSC deki alt sınırları belirlenir
HKH lenfositten küçük olamaz

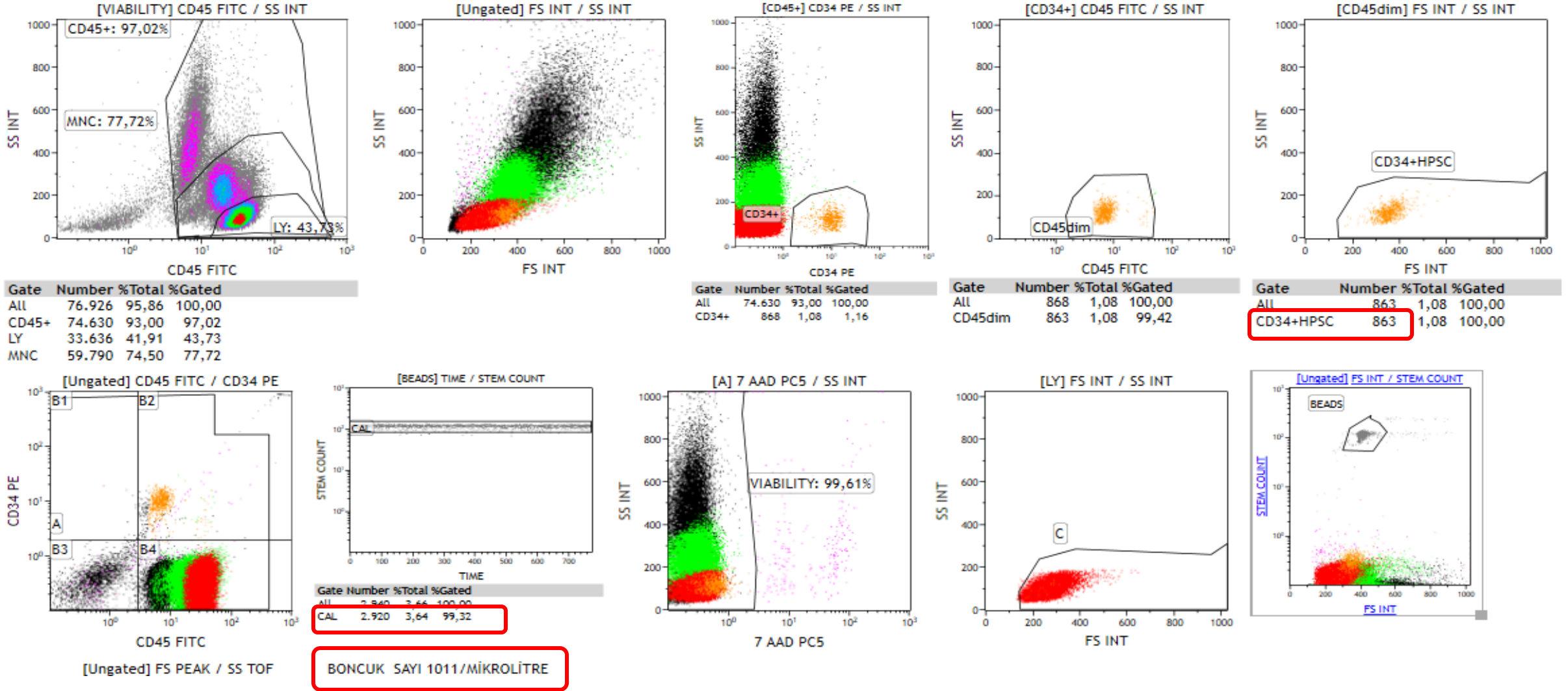
Yapışık olmayan boncuklar seçilir

Burada Zamana karşı değerlendirme yapınca okuma sürecinde bir sorun yaşanmadığı da kontrol edilmiş olur
Tıkanma vb bir sorun olsa görüntüde boşluklar olur

Boncukların kan ile eşit miktarda pipetlendiği deneyde



Toplanan Üründe CD34+ hücre analizi

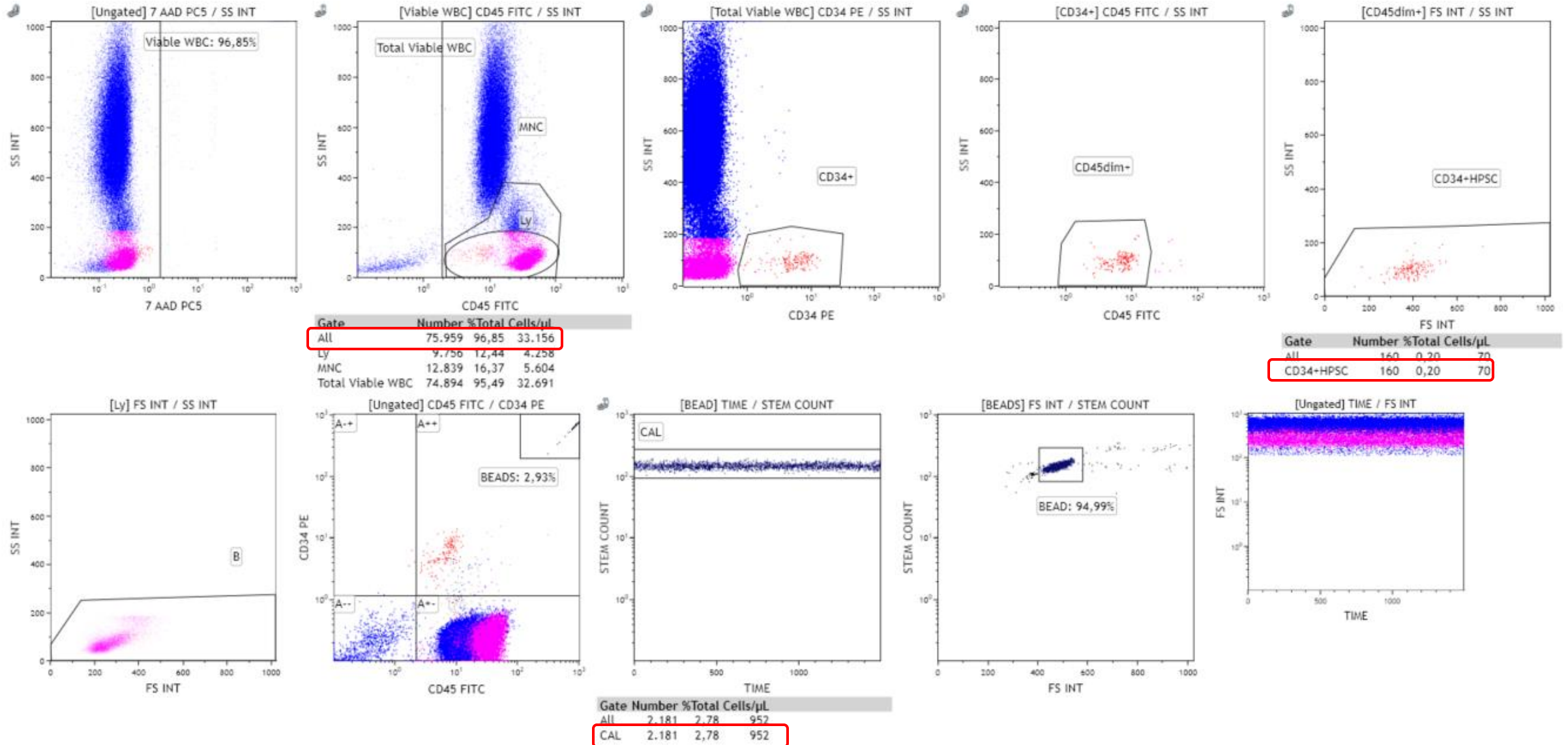


2920 ÷ 1011 = 2,9 mikrolitre boncuk sayılmış;

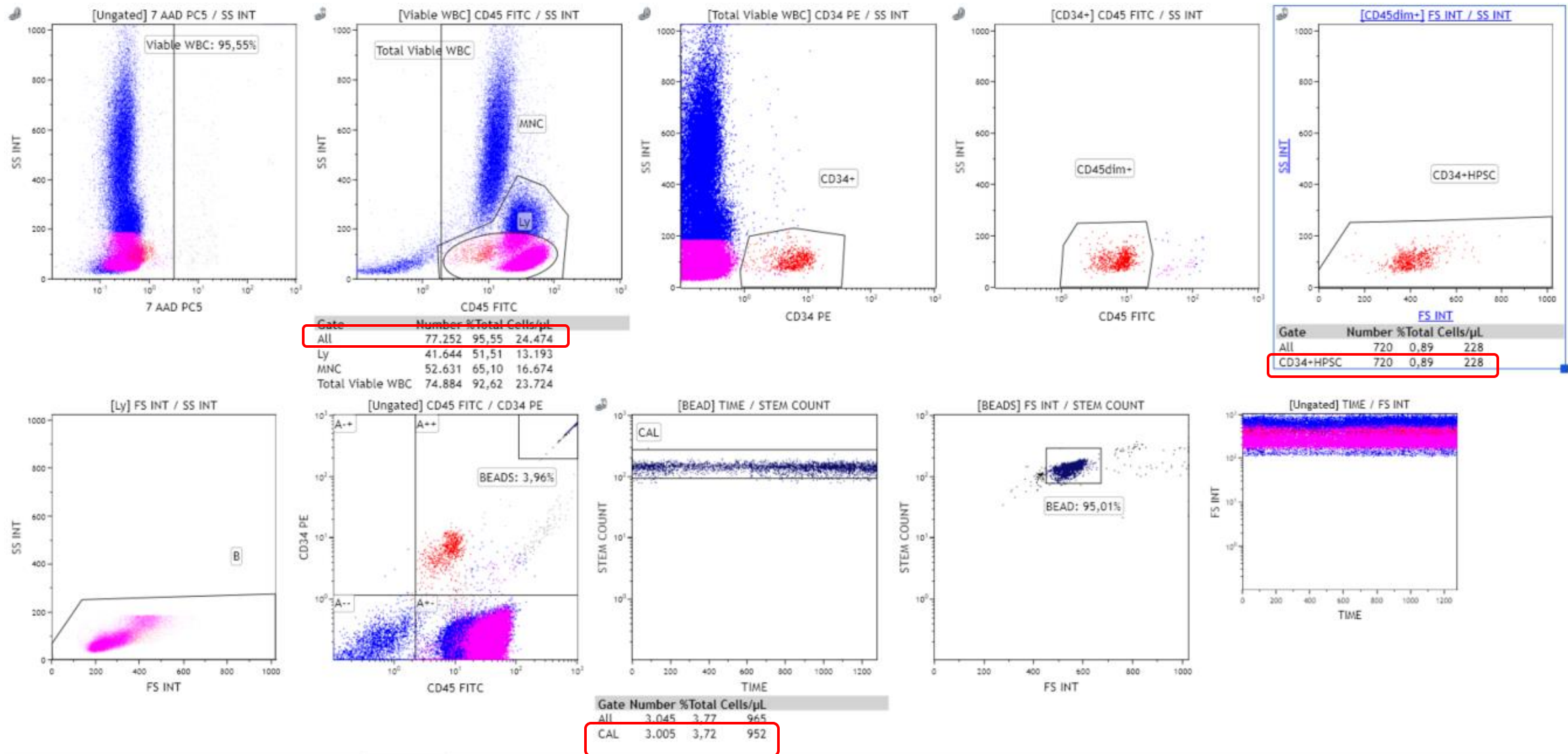
Eklenen ürün ve boncuk miktarı(100 mL) eşit olduğundan 2,9 mikrolitre de ürün sayılmıştır

863 ÷ 2,9 = 297,6 mikrolitredeki CD34+ hücre sayısıdır

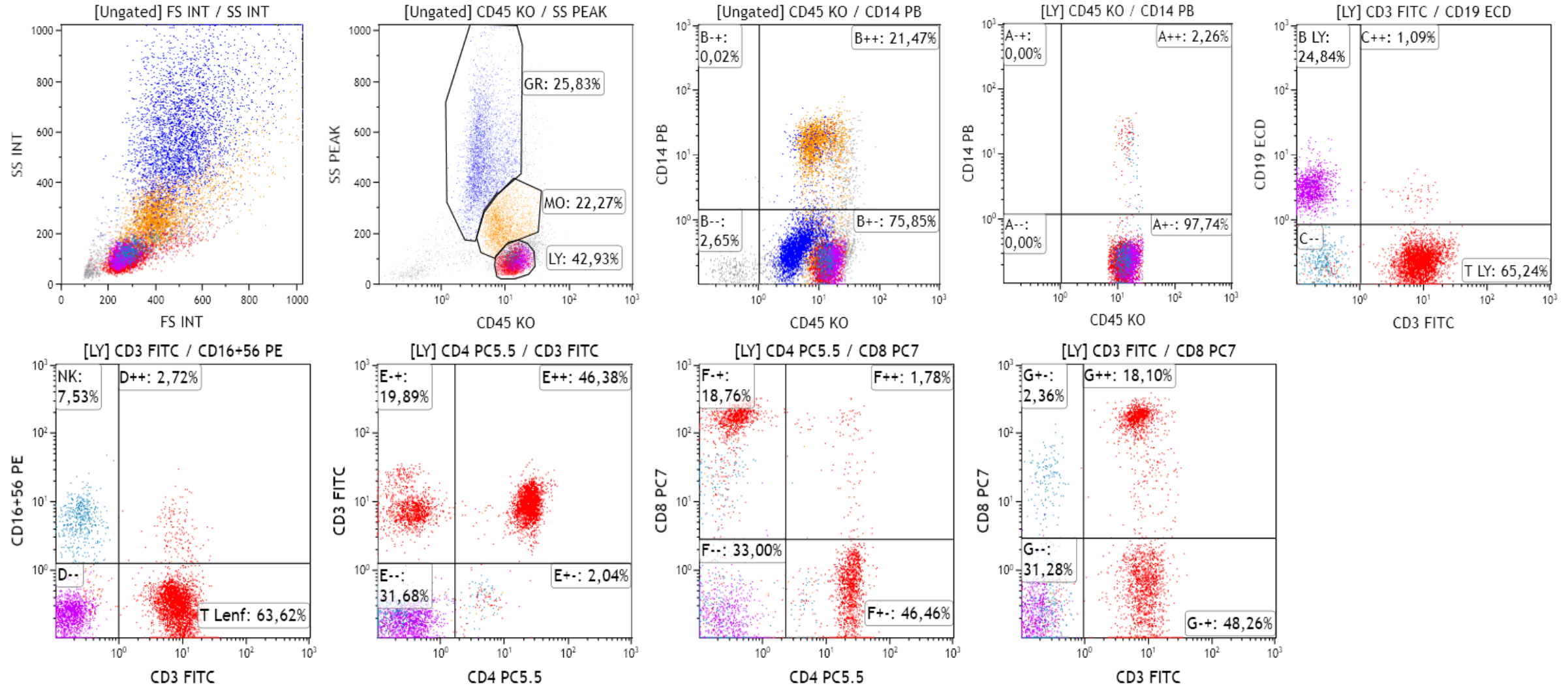
İşlem Öncesinde CD34+ hücre analizi



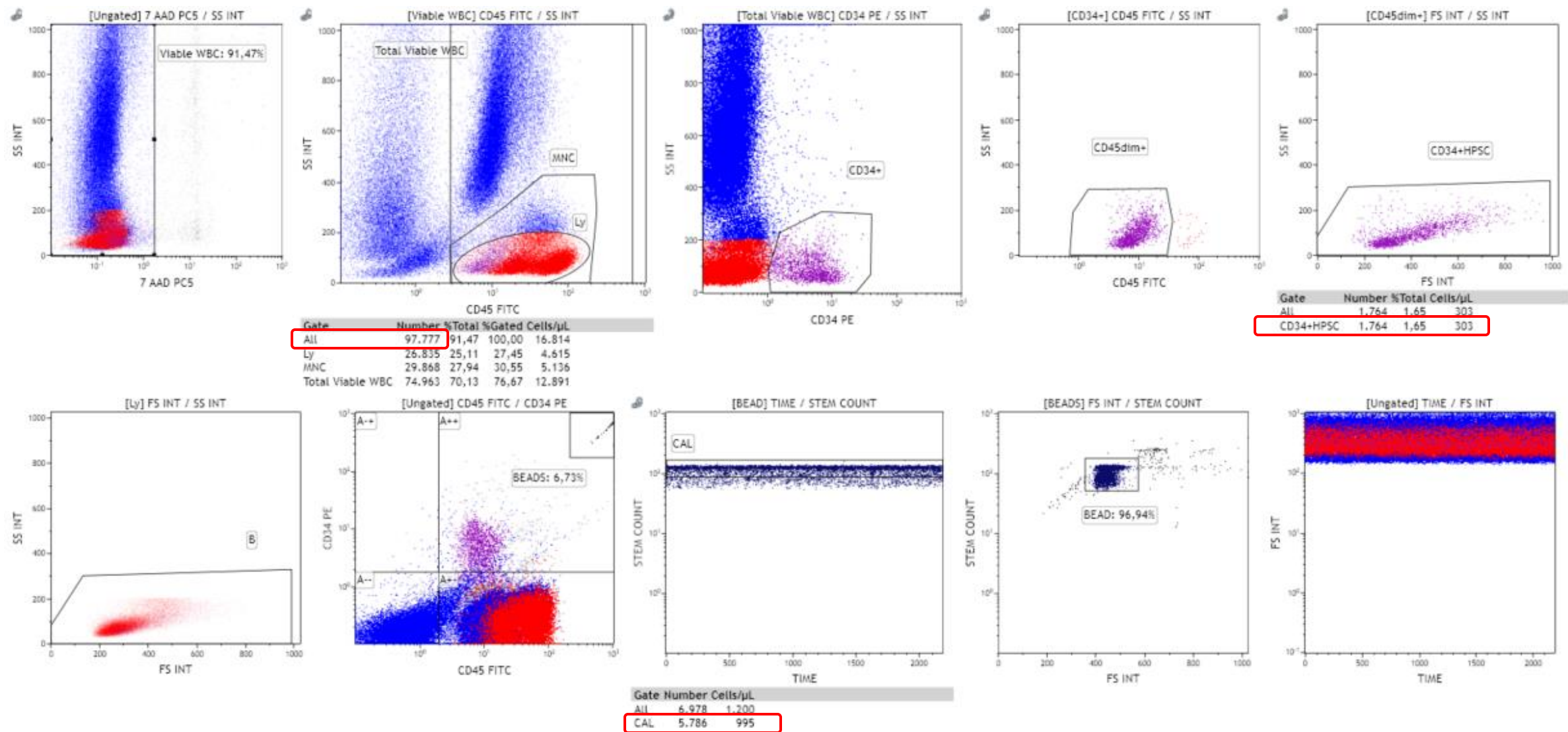
Üründe CD34+ hücre analizi



Üründe Ly altgrup – T hücre analizi



DLI CD34+ hücre analizi



Özetle

CD34+ HKH sayım işlemi;

- Örneklemeye
- Testin kurulması (kullanılan reaktifler, pipetleme vs dahil)
- Cihazda verilerin toplanması
- Verilerin analizi ve raporlanması

aşamalarında;

referanslarda tanımlanan tüm standartlara uyulması gerekir, çalışma dikkatle, titizlikle, bekletilmeden yapılmalıdır.

Dinlediğiniz için teşekkür ederim

Sorularınız?

