

Kordon Kanı Hücrelerinin Saklanması Vitrifikasyon Metodu

Özlem Tuğçe Çilingir¹, Tülay İrez², Mustafa Taşyürekli¹, Sema Bilgiç Gazioğlu³

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul

³İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmunoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Amaç: Çeşitli hastalıkların tedavisinde uygulayabilmek amacı ile kök hücrelerin saklanması sürekli bir kök hücre bankasında toplanması fikri giderek yaygın hale gelmektedir. Saklanması sırasında hücre kaybının en aza indirilmesi için kullanılan metodların geliştirilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda, kordon kanlarından ayrılan mononükleer hücrelere farklı saklama yöntemleri uygulanarak, yapılan karşılaştırmalar sonucunda hangi yöntemin daha verimli olduğunu belirlemek amaçlanmıştır.

Yöntem: Gönüllü vericilerden alınan kordon kanlarından mononükleer hücreler, yoğunluk derecelendirme yöntemi kullanılarak ayrıldı. Bir tek aşamalı diğeri iki aşamalı olarak 2 ayrı vitrifikasyon metodu uygulandı. Vitrifikasyon öncesi ve sonrasında tripan mavisi boyama yöntemi ile hücre canlılığındaki, akım sitometri tekniği kullanılarak CD34+, CD45+ ve CD34+45+ hücre oranlarındaki, ışık mikroskobu kullanılarak morfolojide meydana gelen farklılıklar belirlendi.

Bulgular: Elde ettiğimiz bulgular sonucunda, dondurma öncesi ve sonrasında CD45+, CD34+, CD34+/45+ hücre oranlarında anlamlı düşüşler gözlemlendi. İstatistiksel değerlendirmelerde, uygulanan iki farklı vitrifikasyon metodu arasında anlamlı bir fark görülmedi. Yapılan ışık mikroskobu değerlendirmelerinde ise hücrelerin dondurma sonrasında membran yapılarının bozulduğu, hücrelerde şişmeler olduğu ve hücre kümeleri meydana geldiği görüldü.

Sonuç: Çalışmamızda vitrifikasyon sonrası hücre kayıpları saptansa da kordon kanı hücrelerinin saklanması zamandan ve maddi açıdan tasarruf sağlayacak vitrifikasyon tekniklerinin kullanılabilirliğinin sağlanması, kordon kanı bankaları ve diğeri kök hücre depolama merkezleri açısından da kullanışlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Kordon kanı, hematopoetik kök hücre, mononükleer hücre, kriyoprezervasyon, vitrifikasyon

Cerrahpaşa Tıp Derg 2009; 40: 53-62

Vitrification method in banking of cord blood mononuclear cells

Abstract

Objectives: The idea of protection of stem cells in a cord blood bank for treatment of various diseases, becomes more widespread. The methods when used during the protection, must be developed for minimizing the risk of cell lost. According to our purpose, we made a comparison by using different protection methods for the cord blood stem cells, during the experiments.

Methods: "Density-gradient" method was used for mononuclear cell separation from cord blood, which is taken from voluntary donors. We applied 2 different vitrification method. One of them consist of two steps. Before and after the freezing process, cell viabilities by trypan blue dye method, differences in CD34+, CD45+ and CD34+45+ cells ratio by flow cytometry method and, differences in morphology by light microscope had been determined.

Results: According to our experiment results, CD45+, CD34+ and CD34+/45+ cell ratios significantly decreased after vitrification processes. But there is no significant differences between 2 different vitrification method, we used. In the light microscopy analysis, cell membran structures have damaged, cells have seen like swell and cells come together and have seen attaching.

Conclusion: Vitrification methods are usefull for cell banking because of their short, cheap and easy process. We are thinking that our study is helpful for improving new and suitable methods.

Key words: Cord blood, hematopoietic stem cell, mononuclear cell, cryopreservation, vitrification

Cerrahpasa J Med 2009; 40: 53-62

Alındığı Tarih: 17 Mart 2009

Yazışma Adresi (Address): MSc. Özlem Tuğçe Çilingir
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Cerrahpaşa - 34098 - İstanbul
e-posta: ozlentugcee@gmail.com

doi:10.2399/ctd.09.53

http://www.ctf.edu.tr/dergi/online/2009v40/s2/a3.pdf

Çeşitli hematolojik hastalıklar veya kemik iliği yetmezlik sendromlarında kök hücre nakilleri kullanılmaktadır [1-4]. Kök hücre kaynağı olarak kemik iliği veya periferik kan kullanıldığında Graft versus host disease (GvHD) gelişme riski oldukça yüksektir. HLA uyumlu akraba olmayan vericilerden yapılan nakiller sonrası %70, HLA uyumlu kardeşlerden yapılan nakiller sonrası ise %35-40 oranında GvHD gelişme riski olduğu gösterilmiştir [5]. Bu sonuçlar, araştırmacıları nakiller için yeni kök hücre kaynakları bulmaya yönlendirmiştir. Yapılan çalışmalar ile plasenta ve kordon kanının zengin kök hücre kaynakları olduğu; bu kök hücrelerin kemik iliği ve periferik kana kıyasla daha öncül olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu hücrelerin aşılama kabiliyetleri de daha yüksektir. Kordon kanı nakilleri sonrasında, fetal kan hücrelerinin düşük immün yetenekleri nedeniyle doku reddi ve GvHD daha az görülmektedir [6-9].

Bu nedenlerle komplikasyonları azaltan ve nakiller için verici havuzunu genişletecek olan kordon kanı kök hücreleri, klinik uygulamalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerin nakilleri ve klinik araştırmalar 1980'den beri ilerleyerek sürmektedir. Günümüze kadar kordon kanı nakilleri; lenfoid ve miyeloid lösemileri, Fanconi anemisi, aplastik anemi, beta talasemi gibi çeşitli hematopoetik bozuklukların tedavisinde kullanılmıştır [10-12].

Kordon kanı mononükleer hücrelerinin (MNH) tanımlanması konusunda çalışmalar sürekli geliştirilmektedir. Mc Guckin ve ark.[13], kordon kanından elde ettikleri MNH'lerin bazılarının embriyonik kök hücre özelliği taşıdığını buldular.

Erken hematopoetik gelişimde sentezlenmesinden dolayı özellikle CD34 antijeni, insan hematopoetik hücrelerinin saflaştırılması ve tanımlanması için değerli bir parametre haline gelmiştir [14-18]. CD34'ün fonksiyonel özelliği tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre adezyonunda rol oynadığı düşünülmektedir [19-21]. CD34'ün öncül kök hücrelerde başkalaşım belirteci olduğu düşünülmektedir [22]. Hematopoezde, CD34'ün yüzey ekspresyonu gelişimsel olarak düzenlenmekte ve farklılaşma evreleri arttıkça ekspresyonu azalmaktadır. CD45 ise tüm hematolojik hücre gruplarını ifade etmektedir [19,23,24].

Kordon kanı, sahip olduğu bu özellikler ve kolay elde edilebilir olması nedeniyle nakil uygulamaları için önemli bir kaynak haline gelmiştir. Bu sebeple kordon kanının saklanması önem kazanmış, hatta bu yöntemi anne ve babanın isteğiyle rutin olarak yürüten kurumlar oluşmuştur (Kordon kanı bankaları).

Kordon kanının dondurulmasıyla ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda elde edilen sonuçlar, kullanılan metotların geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Günümüzde umbilikal kordon kanı kriyoprezervasyonu için kullanılan metotları destekleyen deneysel çalışmalar da oldukça kısıtlıdır [25].

Bu çalışmamızda, nakillerde kemik iliğine alternatif olarak kullanılan kordon kanı MNH'leri için, farklı vitrifikasyon teknikleri kullanarak değişik saklama metotları oluşturmayı, dondurma öncesi ve sonrasındaki hücrelerin farklılıklarını ve canlılık özelliklerini karşılaştırarak ortaya koymayı amaçladık. Bu alandaki çalışmalar, kademeli dondurma üzerinde yoğunlaşmıştır. Biz zamandan ve maddi kaynaklardan tasarruf sağlayabilecek, farklı vitrifikasyon teknikleri oluşturarak literatüre katkıda bulunmayı amaçladık. Böylece nakil alanındaki çalışmalara, verici havuzu oluşturulmasına ve kök hücrelerin daha verimli bir şekilde saklanarak sürekli bir kök hücre bankasında toplanmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Gereç ve Yöntem

Kordon Kanının Toplanması

Gerekli bilgilendirmenin yapıldığı ve izinleri alınan sağlıklı vericilerden alınan 13 göbek kordon kanı kullanıldı. Çalışmamız için kordon kanı topladığımız, İstanbul Üniversitesi ve Zeynep Kamil E. ve A. Hastanesi'nin etik kurullarından gerekli onaylar alınmıştır (No:29783, No:B.104.İSM.4340014/6531). Normal ve sezaryan doğumlarda, umbilikal venden şırınga ile girilerek alınan kanlar, steril ve antikoagülant olarak CPD-A içeren 4.5ml'lik tüplere alındı [26].

MNH'lerin Ayrılması

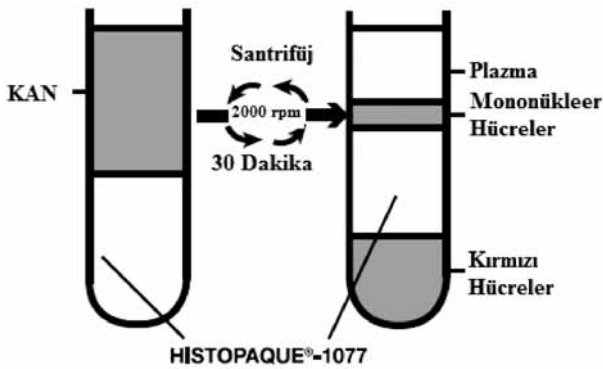
Toplanan kordon kanları en geç 24 saat içinde işleme alındı. Kanlara uygulanan ilk işlem, total kandan MNH'lerin ayrılması idi.

Total kan, hücre ayrılmasının daha verimli olması için 5:1 oranında RPMI-1640 (PAN Biotech, P04-18050) solüsyonu ile sulandırıldı. Daha sonra sulandırılan kan ile eşit hacimde Histopaque-1077 (Sigma-10771) içeren tüplere yavaşça eklendi. Bu şekilde yoğunluk farkı yaratılan tüpler, 2500 rpm'de 30 dk santrifüj edildi [16]. Bu işlem sonucunda kanlar, alttan itibaren sırasıyla eritrositler, Histopaque solüsyonu, MNH'ler ve plazma olarak fazlara ayrıldı (Şekil 1). İnce bir bulut şeklindeki görünümü ile belirlenen MNH'ler pipet yardımı ile ayrıldı. RPMI-1640 ile 5 cc'ye tamamlanan MNH'ler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Üst faz atıldıktan sonra pellet şeklindeki MNH'ler yine RPMI-1640 ile 1 cc'ye tamamlanarak re-süspanse edildi. Elde ettiğimiz bu süspanسیون, aşağıdaki işlemler için kısımlara ayrıldı:

- Hücre sayımı
- Tripan mavisi (Sigma T-8154) ile hücre canlılığının tayini
- Işık mikroskopi analizleri için preperat hazırlanması
- Akım sitometri analizleri
- 2 farklı yöntemle uygulanacak vitrifikasyon işlemi

Hücre Sayımı ve Canlılığın Belirlenmesi

Hücre sayımı için Makler kamarası kullanıldı. Hücre canlılığının belirlenmesi tripan mavisi boyası kullanılarak yapıldı [26]. Vital bir boya olan tripan mavisi, ölü hücrelerin tespiti amacıyla kullanıldı. Ölü hücrelerin sitoplazması tripan mavisi boyası ile mavi renkli olarak



Şekil 1. Total kandan mononükleer hücrelerin ayrılması.

görülmektedir. Bu şekilde, hem dondurma öncesi hem de sonrasında en az 100 hücre sayılarak canlılık oranları tespit edildi.

Vitrifikasyon

Karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla 2 farklı vitrifikasyon metodu kullanıldı. Kullanılan metotların mümkün olduğunca az sayıda basamak içermesi ve kısa süren işlemlerden oluşmasına dikkat edildi. Kordon kanı bankaları ve klinik verimlilik açılarından, kolay ve kısa süreli bir yöntemin daha kullanışlı olacağı açıktır.

Yöntem 1

Elde edilen MNH'ler üzerine yavaşça, +4 °C sıcaklığında %8.7 DMSO içeren solüsyon eklendi (Sigma C-6295). 10 dk sıvı azot buharında tutulan hücre süspanسیونu daha sonra kriyotüpler içinde sıvı azota sokularak donduruldu.

Yöntem 2

Bu yöntemde 2 farklı oranda DMSO içeren solüsyonlar kullanıldı [27]. Solüsyonların içerikleri aşağıdaki gibidir:

PBD: PBS (Sigma P-4417) + %0.5 BSA (usb-10857) + %1 Dextran 40 (Fluka-BioChemika 31389)

1. Solüsyon: PBD içinde %6,5 DMSO

2. Solüsyon: PBD içinde %10 DMSO

MNH'ler üzerine ilk olarak 75 µl 1.solüsyondan eklenerek 10dk +4°C'de inkübe edildi. Daha sonra, 2. solüsyondan yine 75 µl eklenerek +4 °C'de 5 dk inkübe edildi. Son olarak sıvı nitrojen buharında 5 dk tutulduktan sonra vitrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Her iki yöntemde de hücreler 1 hafta sıvı nitrojende saklandıktan sonra çözüldü.

Çözme

İki vitrifikasyon metodu ile saklanan örneklerin tamamı aynı yöntem ile çözdürüldü. 37 °C su banyosuna alınan hücrelerin üzerine yine 37 °C sıcaklıkta RPMI-1640 eklendi ve hücrelerin en kısa sürede çözülmesi sağlandı [28]. Ardından +4 °C sıcaklıkta 10 ml kadar RPMI-1640 eklenerek hücrelerin yıkama işlemi ger-

çekleştirildi. 2000 rpm'de 10 dk'lık santrifüj sonrası elde edilen pellet 1 cc medyum ile sulandırılarak aşağıdaki işlemler için bölümlere ayrıldı:

- Tripan mavisi ile hücre canlılığının tayini
- Işık mikroskopi analizleri için preparat hazırlanması
- Akım sitometri analizleri

Işık Mikroskopi Değerlendirmeleri

Preparatlar, elde edilen hücre süspansiyonlarından, vitrifikasyon öncesi ve sonrası farklılıkları belirleyebilmek amacıyla, hazırlandı. Her bir örnekten yayma olarak hazırlanan preparatlar, Giemsa tekniği ile boyanarak değerlendirildi.

Akım Sitometride Hücre Oranlarının Belirlenmesi

Akım sitometri, tek hücre seviyesinde analiz olanağı sunan bir tekniktir. Analizin yapılabilmesi için hücrelerin süspansiyon haline getirilip, monoklonal bir antikora işaretlenmesi gerekmektedir.

Ayrılan MNH süspansiyondan polisteren tüplere 100µl kadar alındı. Üzerine 10 µl CD34/45 antikoru (BD-341071) eklendi ve 20 dk karanlıkta inkübe edildi. 500 µl izoton ile sulandırılan örnek, analiz için akım sitometri cihazında okutuldu. Değerlendirmeler, FACS Calibur (Becton Dickinson) model akım sitometri cihazında Cellquest® (software) analiz programı ile yapıldı.

Bu programda 5.000 hücre sayılıp CD45+ ve CD34+ hücre oranları % olarak belirlendi.

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen veriler, SPSS istatistik programında değerlendirildi. Uyguladığımız 2 farklı vitrifikasyon tekniğinin birbiriyle olan ilişkilerini değerlendirmede eşli t-test kullanıldı. Anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

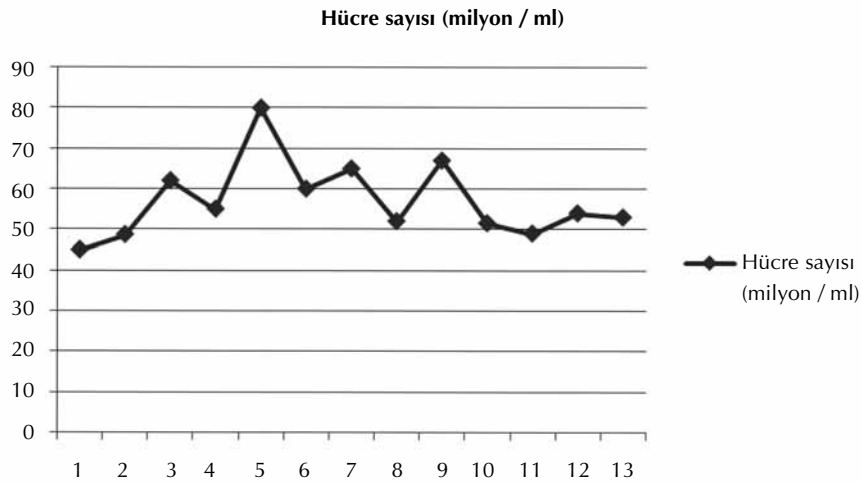
Bulgular

Hücre sayıları ve canlılık oranları

Kordon kanından elde edilen MNH sayısının ortalaması $57.09 \pm 9.5 \times 10^6$ olarak belirlendi (Tablo 1). Elde edilen hücre süspansiyonunda tripan mavisi boyaması ile belirlenen ortalama canlılık oranı $\%93.8 \pm 4.4$ şeklinde görüldü.

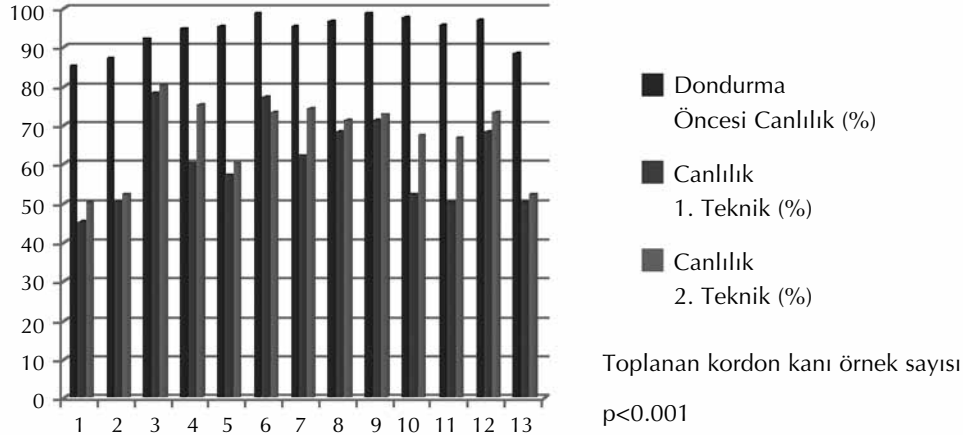
Hücre canlılıklarında, her iki farklı yöntemle uygulanan vitrifikasyon işlemlerinden sonra düşüş görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 2).

İşlemler öncesinde $\%93.9 \pm 4.4$ olan hücre canlılığında, vitrifikasyon uygulamaları sonunda anlamlı düşüşler tespit edildi. 1. teknikle vitrifikasyon sonrasında 60.61 ± 11.02 ($p < 0.001$), 2. teknikle vitrifikasyon sonrasında ise 66.63 ± 9.94 ($p < 0.001$) olmuştur.



Tablo 1. Kordon kanlarından elde edilen mononükleer hücre sayıları.

Hücre Canlılık Oranları



Tablo 2. Dondurma öncesi ve iki farklı dondurma tekniği sonrasında elde edilen hücre canlılık oranları.

Akım Sitometri Analizleri

Her bir kordon kanı örneği için vitrifikasyon öncesi ve uygulanan farklı teknikler sonrasında, akım sitometri analizleri yapılarak CD34, CD45 ve CD34/45 oranları belirlendi. Vitrifikasyon öncesinde ortalama CD45+ hücre oranı 63.43 ± 20 , ortalama CD34+ hücre oranı 0.47 ± 0.2 , ortalama CD34+/45+ hücre oranı 0.38 ± 0.2 olarak belirlendi. 1. teknikle dondurulup çözülen örneklerde ortalama CD45+ hücre oranı 37.82 ± 24.39 , ortalama CD34+ hücre oranı 0.19 ± 0.1 , ortalama CD34+/45+ hücre oranı 0.17 ± 0.1 şeklinde belirlenirken, 2. teknikle dondurulup çözülen örneklerde ortalama CD45+ hücre oranı 47.65 ± 22.6 , ortalama CD34+ hücre oranı 0.19 ± 0.1 , ortalama CD34+/45+ hücre oranı 0.16 ± 0.1 olarak belirlendi. Tablo 3'de bu sonuçların istatistik değerlendirmeleri verilmiştir. Elde edilen akım sitometri grafiklerinden bazıları ise Şekil 2, 3, 4, 5, 6 ve 7'de gösterilmiştir.

Işık mikroskopi değerlendirmeleri

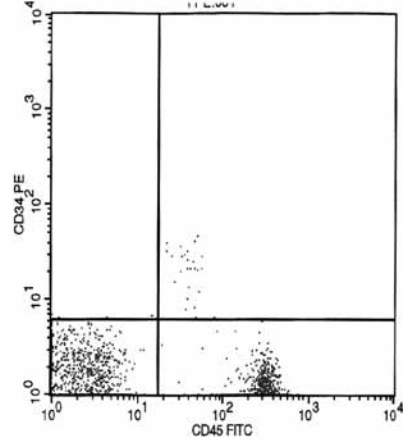
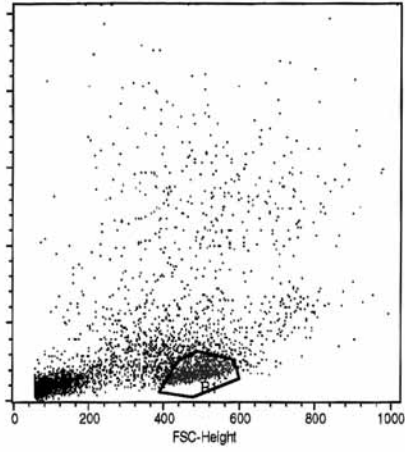
Vitrifikasyon öncesinde ve sonrasında değerlendirilen hücre örneklerinde, dondurma sonrasındaki hücrelerde çeşitli farklılıklar olduğu gözlemlendi. Herhangi bir işlemde geçirilmeyen örneklerde tam ve düzgün hücre ve membran yapıları gözlenirken, dondurulup çözülen örneklerde ise hücrelerde, yapı bütünlüğünün bozulabileceği, çekirdek ve membran yapılarında deformasyonlar olabileceği görüldü. Apoptotik hücreler gözlemlendi.

Tartışma

Günümüzde birçok hematolojik olan veya olmayan hastalıklarda, metabolik ve genetik bozukluklarda, kemik iliği nakilleri sıklıkla ve başarı ile kullanılan bir yöntemdir. Verici bulunması zor olabilen, elde edilmesi acı verici olan ve nakil sonrasında enfeksiyon ve GvHD gelişme olasılığı bulunan kemik iliğine alternatif yeni kök hücre

Tablo 3. 1. ve 2. Teknik ile vitrifikasyon sonuçlarının vitrifikasyon öncesi veriler ile istatistiksel olarak anlamlılık değerlerinin karşılaştırılması.

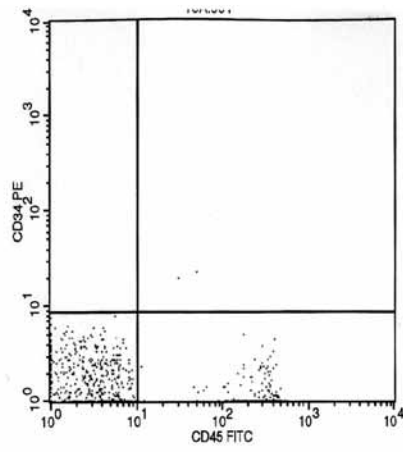
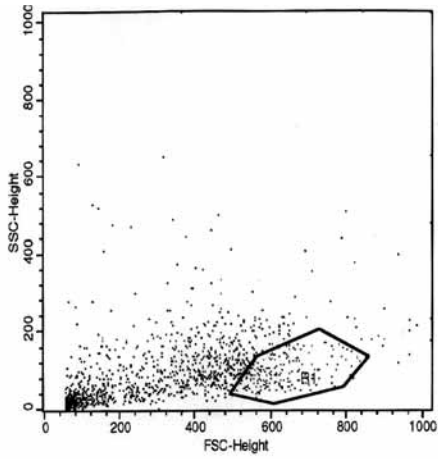
	CD34+	CD45+	CD34+/45+
1. Yöntem	$p=0.003$	$p<0.001$	$p=0.015$
2. Yöntem	$p=0.002$	$p=0.001$	$p=0.013$



Region	Events	% Gated	X Mean
R1	4684	17.9	490.52

Quad	Events	% Gated	X Mean
UL	7	0.15	8.16
UR	27	0.58	42.3
LL	851	18.17	2.8
LR	3799	81.11	325.19

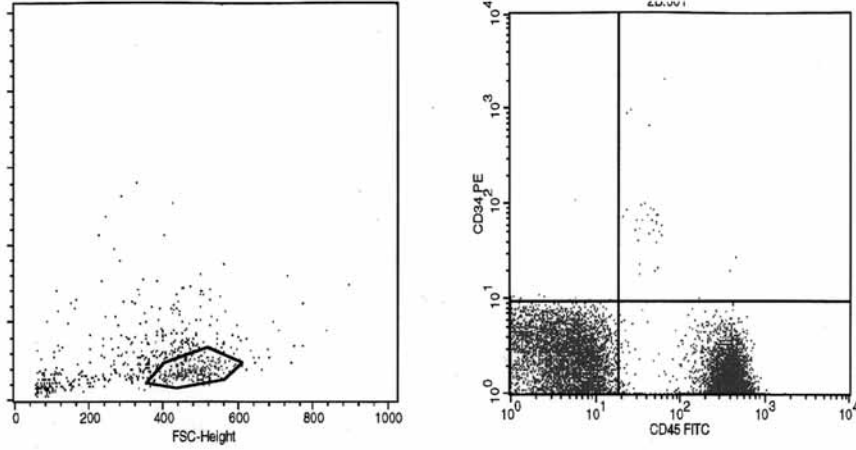
Şekil 2. Vitrifikasyon öncesi elde edilen akım sitometri değerleri.



Region	Events	% Gated	X Mean
R1	4538	17.17	622.47

Quad	Events	% Gated	X Mean
UL	1	0.02	1.96
UR	5	0.11	39.6
LL	2435	53.66	3.36
LR	2097	46.21	293.21

Şekil 3. 1. Teknik ile vitrifikasyon sonrası elde edilen akım sitometri değerleri.



Region	Events	% Gated	X Mean
R1	24449	36.51	470.39

Quad	Events	% Gated	X Mean
UL	20	0.08	3.01
UR	37	0.15	66.33
LL	5228	21.38	6
LR	19164	78.38	426.89

Şekil 4. 2. Teknik ile vitrifikasyon sonrası elde edilen akım sitometri değerleri.

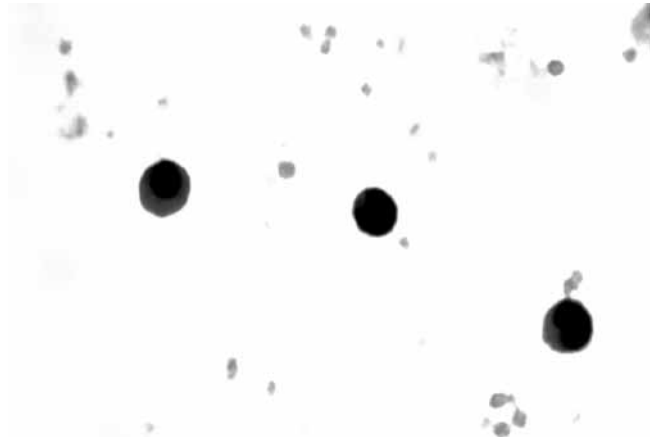
kaynakları aranmaya başlamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda kordon kanının, hematopoetik kök hücre kaynağı olarak belirlenmesinin ardından bu yeni kaynak, nakillerde kullanılmaya başlanmıştır [29,30].

Kordon kanının, diğer kaynaklara göre en önemli avantajı zayıf immün yanıtı sahip olması nedeniyle GvHD görülme olasılığının düşüklüğü ve böylece nakillere daha uygun olmasıdır [31,32].

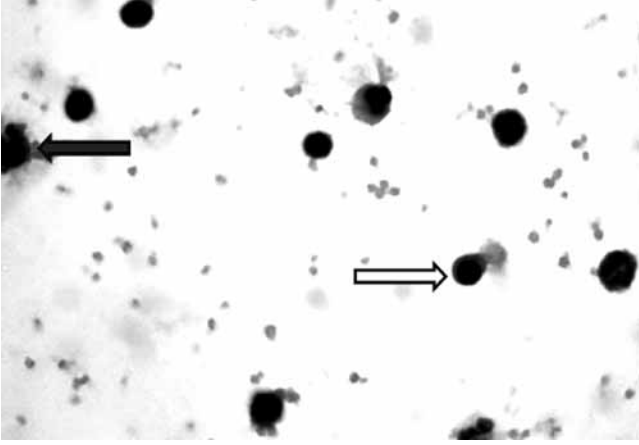
Kordon kanının bu özellikleri nedeniyle avantajlı bir kaynak olduğunun belirlenmesi ile birlikte bu alandaki araştırmalar artış göstermiştir. Kordon kanının ancak doğumda elde edilebilmesinden dolayı, dondurularak saklanması üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Kordon kanı bankalarında ve yapılan çalışmalarda genellikle kontrollü dondurucular kullanılarak uygulanan yavaş metotlar uygulanmıştır. Biz çalışmamızda daha kısa zamanda uygulanabilen ve kullanılan malzeme sayısını azaltabileceğimiz hızlı bir yöntem olan vitrifikasyon tekniğini kullandık.

Çalışmamızda, toplanan yaklaşık 10 ml kordon kanından önceki literatürlere uygun olarak ortalama

$57.09 \pm 9.50 \times 10^6$ MNH/ml hücre izole edilmiştir [33,34]. Ancak Dhot ve arkadaşları, 100-120 ml kordon kanından 13.97×10^7 MNH/ml izole etmişlerdir [26]. Aradaki farkın toplanan kordon kanı miktarları arasındaki farklılıktan meydana gelebileceğini düşünmekteyiz.



Şekil 5. Vitrifikasyon öncesinde kordon kanından elde edilen çekirdekli hücrelerin görüntüsü (Giemsa, x1000).

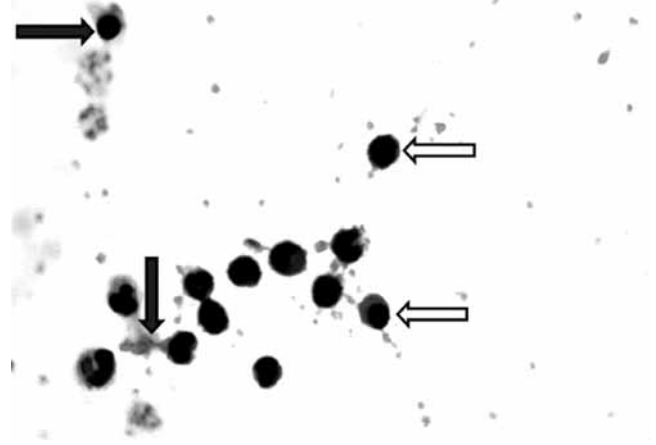


Şekil 6. 1.Teknik ile vitrifikasyon sonrasında görüntülenen hücreler (Giemsa, x1000). Beyaz ok: Yapısı bozulmamış normal hücre. Kırmızı ok: Hücre şeklinde ve çekirdek yapısında oluşan bozulmalar ile apoptotik hücre.

Elde ettiğimiz bu hücrelerde canlılık oranları, 93.8 ± 4.40 olarak belirlenmiştir. Uyguladığımız 2 farklı vitrifikasyon tekniği sonrası canlılık oranları sırasıyla, 60.61 ± 11 ve 66.63 ± 9.9 'a düşmüştür ($p < 0.001$). Dhot ve ark.'nın yaptığı çalışmada $98,4$ canlılık ile izole edilen hücrelerin canlılığı 1 yıllık saklama sonrasında 82.1 olarak belirlenmiştir [26].

Çalışmamızda, 2 basamaklı dondurma tekniğinde temel aldığımız Meyer ve ark. [27]'nin çalışmasında, 89 canlılık oranı ile dondurulan hücreler 70 canlılık ortalaması ile çözülmüştür. Çalışmada belirtilen önemli noktalardan birisi de, daha fazla hücre sayısı (50×10^6) ile yapılan çalışmalarda ulaşılan canlılık oranlarının rutin çalışma süresince kullanılan $13.6 \pm 4.1 \times 10^6$ hücre ile elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğudur. Biz kendi çalışmamızda elde ettiğimiz parametrelerde bu yönde anlamlı bir veri elde etmedik. Aynı çalışmada, izole edilen MNH populasyonunda, $CD45+$ hücrelerin $0,86$ 'sının $CD34+$ hücre olduğu bildirilmiştir.

Daha önceki bazı çalışmalarda kordon kanında $CD34+$ hücre oranları, Abboud ve ark., [35] tarafından 0.9 ± 0.1 , Sousa ve ark., [36] tarafından 0.4 ± 0.17 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda izole edilen MNH'lerin akım sitometri analizleri sonucunda, ortalama $CD34+$ hücre oranı 0.47 ± 0.2 olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. 2.Teknik ile vitrifikasyon sonrasında görüntülenen hücreler (Giemsa, x1000). Beyaz ok: Yapısı bozulmamış normal hücre. Kırmızı ok: Hücre şeklinde oluşan bozulmalar.

Özetle çalışmamızda, kordon kanından izole edilen hücre sayısı ile değerlendirdiğimiz diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki görülmemiş, izole edilen hücrelerin canlılık oranları ile $CD34+$, $CD45+$ ve $CD34+/45+$ hücre sayıları arasında da anlamlı bir bağ tespit edilmemiştir. İki teknik kıyaslandığında canlılıkta, 1. teknikte 2. tekniğe göre anlamlı bir düşüş görülmüş ($p = 0.006$), ancak $CD34+$, $CD45+$ ve $CD34+/45+$ hücreler açısından bir fark bulunmamıştır ($p < 0.005$). Bu da, 2. teknik ile az da olsa dahi iyi sonuçlar elde etme birlikte, iki tekniğin birbiri üzerinde anlamlı bir üstünlüğünün bulunmadığını göstermektedir.

Akım sitometri analizlerinin yanında ışık mikroskopik teknikler uyguladığımız yayma hücre preparatlarında inceleme yapılmıştır. Bu incelemeler sonucunda, hücrelerin membran yapılarında dondurulup çözme sonrasında bozulmalar meydana geldiği görülmüştür. Bu bozulma, belki de çözme sonrasında $CD45+$ ve $CD34+$ hücrelerde meydana gelen azalmanın, hücre canlılığındaki azalmadan daha fazla oranda olmasını açıklayabilir. Hücrelere uygulanan tripan mavisi boyamasında canlı olarak tespit edilen hücrelerde oluşabilecek membran bozulması, hücre yüzeyinden $CD45$ ve $CD34$ ekspresyonunu durdurmuş veya azaltmış olabilir. Çünkü daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur ki, akım sitometride hücrelerin belirlenebilmesi, hücre yüzey antijen ekspresyonunun devamlılığına bağ-

lıdır. Ayrıca yine aynı çalışmada CD34+ hücrelerin hızlı dondurmaya çekirdekli hücrelerden daha hassas olduğu belirtilmiştir. Alternatif bir başka açıklama ise, CD34 yüzey antijenlerinin kaybına bağlı olarak CD34+ hücrelerin yüzdelilerinin akım sitometri ile belirlenemesi yönündedir [37].

Sonuç olarak, çalışmamızda uygulanan vitrifikasyon yöntemleri sonucunda elde ettiğimiz hücrelerin canlılığında, CD34+ ve CD45+ hücrelerin oranlarında düşüşler tespit edilmiştir. Sonuçların iyileştirilmesi için bu yöntemin, özellikle çözme basamağının modifiye edilmesi gerekliliğini görmekteyiz.

Elde edilen bu verilerin daha da iyileştirilebilmesi amacıyla bu konudaki çalışmalar devam etmekte olup henüz ortak bir vitrifikasyon metodu üzerinde görüş birliği sağlanamamıştır.

Kordon kanının saklanması yönündeki çalışmalar, özellikle kriyoprezervasyon ve kademeli soğutma üzerinde durmuş bu yönde teknikler ortaya konmuştur. Biz çalışmamızda çok daha kısa sürede ve kolaylıkla uygulanabilen vitrifikasyon tekniğini, bu alandaki boşluğu dolduracak şekilde, kordon kanı hücrelerinin saklanması yönünde uyguladık. Kordon kanı hücrelerinin saklanmasında vitrifikasyon tekniklerinin kullanılabilirliğinin sağlanmasının, kordon kanı bankaları ve diğer kök hücre depolama merkezleri açısından da kullanışlı olacağı açıktır. Hem zamandan hem de maddi açıdan tasarruf sağlayacak vitrifikasyon tekniğinin geliştirilmesi gerektiği kanısındayız.

Çalışmaların yoğun bir şekilde devam ettiği kordon kanı ve kök hücre alanında literatüre katkısı olacak, geliştirilebilecek bir çalışma ortaya koyduğumuzu düşünmekteyiz.

Kaynaklar

- Okumuş N. Kordon kanı mononükleer hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu ve NK aktivitesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. İmmünoloji Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 2003.
- Broxmeyer HE, Smith FO. Cord blood stem cell transplantation. In: Thomas D, Blume KG, Forman SJ, eds. Hematopoietic cell transplantation. 2nd ed. London: Blackwell; 1999. pp. 431-443.
- Nash RA. Hematopoietic stem cell transplantation. In: Lee GR, Forester J, Lukens J, Parakevas F, Greer JP, Rodgers GM, eds. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1999. pp. 875-896
- Ramsey NKC. Bone marrow transplantation pediatric oncology. Pizzo PA, Poplack DG, eds. In Principle and Practice of Pediatric Oncology. 2nd ed. Philadelphia; Lippincott; 1993. pp. 314-344.
- Armitage JO. Bone marrow transplantation. N Engl J Med 1994; 330: 827-838.
- Han P, Hodge G, Story C, Xu X. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. Br J Haematol 1995; 89: 733-740.
- Almici C. Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. Leukemia 1997; 11: 2143-2149.
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3828-3832.
- Wagner JE, De Fort T, Rubinstein P, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood: outcomes and analysis of risk factors. Blood 1997; 90: 398-402.
- Laughlin MJ, Baeker JJ, Bambach B, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. N Engl J Med 2001; 344: 1815-1822.
- Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. Curr Opin Oncol 2002; 14:160-164.
- Gluckman E, Rocha V, Boyer Chammard A, et al. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. N Engl J Med 1997; 337: 373-381.
- Mc Guckin CP, Forraz N, Baradoz MO, et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. Cell Proliferation 2005; 38: 245.
- Dooley DC, Oppenlander BK, Xiano M. Analysis of primitive CD34- and CD34+ hematopoietic cells from adults: gain and loss of CD34 antigen by undifferentiated cells are closely linked to proliferative status in culture. Stem Cells 2004; 22: 556-569.

15. Goodel M. CD34- or CD34+: does it really matter? *Blood* 1999; 94: 2545-2547.
16. Chang H, Jensen L, Quesenberry P, et al. Standardizations of hematopoietic stem cell assays: a summary of workshops and working group meeting sponsored by National Heart Lung and Blood Institute and held at National Institutes of Health, Bethesda, MD, on September 8-9, 1998 and July 30, 1999. *Exp Hematol* 2000; 28: 743-752.
17. Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, et al. Sustained, retransplantable multilineage engraftment of highly purified bone marrow adult stem cells in vivo. *Blood* 1996; 88: 4102-4109.
18. Michallet M, Thiebaut A, Philip I, et al. Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+ Thy1+ hematopoietic stem cells (HSC) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety and immun reconstitution. *Exp Hematol* 2000; 28: 858-870.
19. Kreissig K, Krisch A, Serke S. Characterization and measurement of CD34- expressing haemopoietic cells. *J of Haematotherapy* 1994; 3: 263-289.
20. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 2001; 19: 99-107.
21. Sogo S, Inaba M, Ogata H, et al. Induction of c-kit molecules on human CD34+/c-kit low cells: evidence for CD34+/c-kit low cells as primitive hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997; 93: 2302-2307.
22. Süzergöz F. Büyüme faktörleriyle uyarılmış kordon kanı mononükleer hücrelerinin in vitro kültürlerde proliferasyonu ve immünofenotipik özelliklerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens., İmmünoloji Doktora Tezi. İstanbul, 2002.
23. Simmons PJ, Torok Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 1991; 78: 2848-2853.
24. Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis flow cytometric characterization of My 10 positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 1987; 15: 10-17.
25. Pasino M, Lanza T, Marotta F, et al. Flow cytometric and functional characterization of AC133 cells from human umbilical cord blood. *BJ Haematol* 2000; 108: 793-800.
26. Dhot Col PS, Sirohi Maj D, Swamy Brig GLN. Collection, separation, enumeration and cryopreservation of umbilical cord blood haematopoietic stem cells-an experimental study. *MJAFI* 2003; 59: 298-301.
27. Meyer TPH, Hofmann B, Zaisserer J, et al. Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2006; 8: 265-276.
28. Shreffler WG, Visness CM, Burger M, et al. Standardization and performance evaluation of mononuclear cell cytokine secretion assays in a multi-center study. *BMC Immunology* 2006; 7: 29.
29. Chivu M, Diaconu CC, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cerescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 223-231.
30. Todaro AM, Pafumi C, Pernicone G, et al. Haematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood Purif* 2000; 18: 144-147.
31. Kekarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived HSCs. *BMC Cell Biology* 2006; 7: 30.
32. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997; 90: 4665-4978.
33. Moezzi L, Pourfathollah AA, Alimoghaddam K, Soleimani M, Ardjmand AR. The effect of cryopreservation on clonogenic capacity and in vitro expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells. *Transplan Proc* 2005; 37: 4500-4503.
34. Ryu KH, Shin HY, Ahn HS, Kim YJ, Woo SY, Seoh JY. Comparison of efficiency of ex vivo expansion of whole blood mononuclear cells and purified CD34+ cells from human umbilical cord blood. *Hematologica* 2004; 89: 606-607.
35. Abboud M, Xu F, LaVia M, et al. Study of early hematopoietic precursors in human cord blood. *Exp Hematol* 1992; 20: 1043-1047.
36. Sousa T, Sousa ME, Godinho MI, et al. Umbilical cord blood processing: Volume reduction and recovery of CD34+ cells. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 311-313.
37. Yang H, Acker JP, Hannon J, Miszta-Lane H, Akabutu JJ, McGann LE. Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation. *Cytotherapy* 2001; 3: 377-386.