

Hematopoitik kök hücre naklinde kullanılan hücresel tedavi ürünlerinin değerlendirilmesinde flow sitometrinin rolü

ÖZET:

Günümüzde hücresel tedavi, kemik iliğinden, periferik kandan ve göbek kordonu kanından toplanan hematopoitik kök hücrelerden (HSC) elde edilen çeşitli ürünlerden, malign hastalıkların tedavisi için daha karmaşık adoptif immün tedaviye ve kalıtsal bağışıklık yetersizlikleri için gen tedavisine kadar çeşitli ürünleri içermektedir.

Hücresel tedavinin daha geniş kullanımı, her ne kadar çeşitli merkezlerde üretilseler de bu ürünlerin bileşim, saflık ve etki ile ilgili aynı şartları karşılaması gereken kapsamlı kalite testlerini gerektirir. Flow sitometrilere teknik ilerlemeler ve monoklonal antikoları konjuge etmek (birleştirmek) için kullanılan reaktiflerin ve florokromların sayısının artmasının da buna eşlik etmesi, bağışıklık sisteminin fonksiyonuna ve hücre biyolojisinin diğer alanlarına ilişkin ayrıntılı ve kesin bilgiler sağlar ve boyut, şekil ve morfolojiye dayalı hücre değerlendirmesine veya hücre tedavisinin gelişmesine ve ilerlemesine büyük katkı sağlayan hücre saflığı ve canlılığı kadar, hücre yüzeyi belirteçlerinin değerlendirilmesine de izin verir. Bu makalenin amacı, HSC ve lökosit alt popülasyonunun belirlenmesine ilişkin temel ilkeler ve iyi laboratuvar uygulamalarına göre flow sitometri yöntemlerinin validasyonunun ve kalite kontrolünün önemi kadar dondurularak saklanmış ve çözdürülmüş HSC'nin hücre canlılığının ve kalitesinin değerlendirilmesi bakımından da hücresel tedavi ürünlerinin kalite değerlendirmesinde flow sitometri analizinin mevcut kullanımı ve zorluklarıyla ilgili genel bir bakış açısı sunmaktır.

ANAHTAR KELİMELEER:

hücresel tedavi, flow sitometri, hematopoitik kök hücre nakli

KISALTMALAR:

7-AAD (7-aminoaktinomisin D), Ab (Antikor), Ann V (Annexin V), BM (Kemik iliği), CB (Kordon kanı), CFU (Koloni oluşturan birim), DLI (Donör lenfosit infüzyonu), EBMT (Avrupa Kan ve Kemik İliği Nakli Derneği), FACT (NetCord-Hücresel Tedavi Akreditasyon Vakfı), GvHD (Graft-versus host hastalığı), HSC (Hematopoitik kök hücre), IEC (İmmün efektör hücre), ISHAGE (Uluslararası Hemoterapi ve Greft Mühendisliği Derneği), JACIE (Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği), NK (Doğal öldürücü), PB (Periferik kan), PBSC (Periferik kan kök hücresi), UCB (Göbek kordonu kanı).

1 | GİRİŞ

Hücresel tedavi alanı, 1950'lerdeki ilk kemik iliği (BM) naklinden bu yana sürekli olarak gelişmektedir ve şu anda hematopoitik sistemin malign, konjenital veya edinsel hastalıklarının tedavisinde başarıyla uygulanmaktadır.¹ Hematopoitik kök hücre (HSC) nakliyle başlayan hücresel tedaviler artık malign hastalıklar için adoptif immün tedavi ve kalıtsal bağışıklık yetmezliklerinin tedavisi için gen tedavisi de dahil olmak üzere daha karmaşık hale geliyor.² Gelecek vaat eden yeni hücresel tedaviler; geni modifiye edilmiş T hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi immün efektör hücrelerdir (IEC'ler).³ Hücresel tedavilerin daha geniş kullanımı, çeşitli merkezlerde üretilmiş olsalar da bu ürünlerin bileşim, saflık ve etki konularında aynı gereklilikleri sağlamaları için kapsamlı kalite testleri yapılmasını gerektirir.⁴ Hücresel tedavi ürünlerinin daha ileri klinik kullanım için bir merkezden diğer merkeze gönderilmesinde hücre toplama ve işleme prosedürlerinin tüm merkezlerde güvenli, etkili ve karşılaştırılabilir ürünler elde edecek mekanizmalara sahip olması kritik derecede önemlidir.

Başlangıçta BM greftin kalitesinin değerlendirilmesi toplam çekirdekli hücrelerin sayımı ve koloni oluşturan birim (CFU) testiyle sınırlıyken günümüzde hücresel tedavi ürünlerinin kalitesini değerlendirmek amacıyla çeşitli testler

kullanılmaktadır. Hücre tipinin değerlendirilmesi; hücre boyutuna, şekline ve morfolojisine dayalı değerlendirmeleri veya hücre yüzeyi belirteçlerinin flow sitometri ile değerlendirilmesini içerebilir. Hücrelerin saflığı boya dışlama testleri ile ölçülen hücre canlılığı kadar, sıklıkla flow sitometri ile de değerlendirilir. Flow sitometrinin immünoloji, hücresel biyoloji, bakteriyoloji, viroloji, kanser biyolojisi ve bulaşıcı hastalıkların izlenmesi gibi çeşitli alanlarda uygulamaları mevcuttur. Son 30 yılda bağışıklık sisteminin işlevine ve hücre biyolojisinin diğer alanlarına ilişkin ayrıntılı ve kesin bilgiler sağlayan dramatik ilerlemeler görüldü.⁵ Bu makale HSC nakli için kullanılan hücresel tedavi ürünlerinin kalite değerlendirmesinde flow sitometri analizinin mevcut kullanımına ve zorluklarına genel bir bakış açısı sunmayı amaçlamaktadır.

2 | FLOW SİTOMETRİ:PRENSİPLER, CİHAZLAR, REAKTİFLER

Flow sitometri hem rutin laboratuvarlarda hem de araştırma merkezlerinde olmak üzere birçok farklı ortamda kullanılan bir tekniktir. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte flow sitometri alanı da gelişmektedir. Dolayısıyla bugün belirli amaçlar için özel tipte cihazlar tasarlandı, örneğin mikroskopi ve flow sitometriyi veya flow sitometri ile kütle spektrometrisini birleştiren sistemler gibi. Bu teknik, periferik kan (PB) ve BM'den elde edilen karışık hücre popülasyonunun ve yanısıra tek hücrelere ayrışabilen katı dokuların hücre özelliklerinin eş zamanlı analizine ve flow sitometrinin ana uygulamalarından biri olan, daha ileri hücre sıralaması (cell sorting) analizine olanak sağlar.⁵

Flow sitometrideki teknik ilerlemelere, monoklonal antikoları konjuge etmek için kullanılan mevcut reaktiflerin ve florokromların sayısındaki artışın neden olduğu analiz karmaşıklığı ve daha yeni küme veri analizi algoritmalarının kullanılması gerekliliği eşlik etmektedir. Veri madenciliği yöntemlerini geliştiren her şey, şu anda mevcut olan yüksek boyutlu flow sitometri verilerinden çıkarılacak faydalı bilgiler sağlar.⁵

Flow sitometride en çok kullanılan uygulama olan immünofenotiplemenin yanı sıra, apoptoz analizi, hücre döngüsü analizi ve hücre sıralama da hücresel tedavi ürünlerinin kalite değerlendirmesinde kullanılır.⁵⁻⁸

3 | HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELERİN SAYILMASI

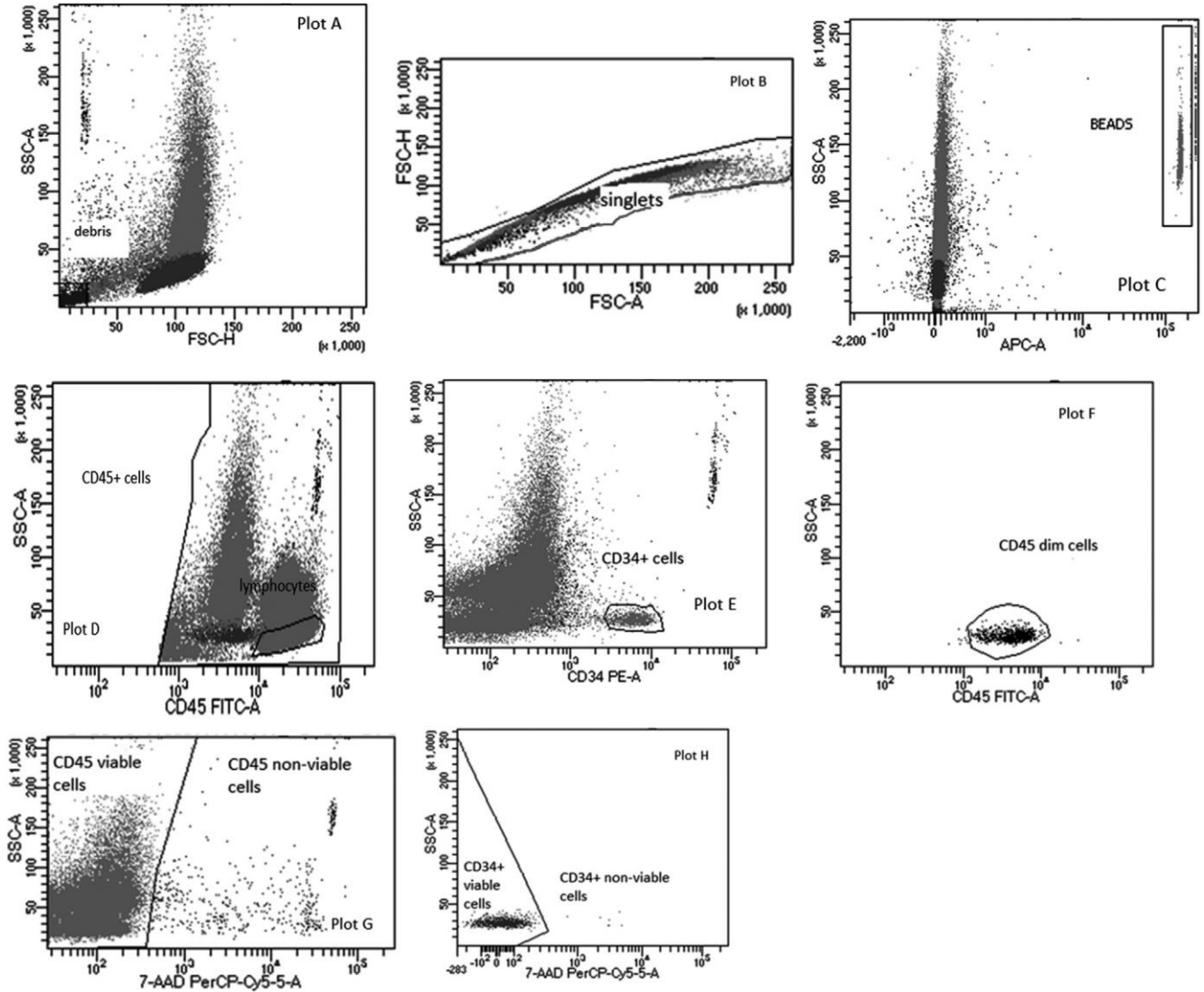
Şu anda nakil için kullanılan HSC kaynakları BM, mobilize PB ve göbek kordon kanı (UCB)'dir.⁹ Her HSC grefti tipinin, farklı bir toplama ve işleme yöntemi, avantajları ve dezavantajları vardır. HSC kaynağı olarak BM, genel anesteziye gerek kalmadan lökoferez işlemi ile daha kolay toplanması ve nakilden sonra daha hızlı hematopoietik yeniden yapılanma nedeniyle periferik kan kök hücreleri (PBSC) ile neredeyse tamamen yer değiştirdi.¹⁰⁻¹¹ UCB'den gelen HSC'ler yüksek klonojenik potansiyele sahiptir ve bağışıklık açısından saf ve olgunlaşmamış oldukları için sadece kısmi doku uyumu ile nakledilebilir. Ama sınırlı hacmi olması nedeniyle, UCB esas olarak pediatrik hastaların nakil işleminde uygulanabilir.⁹

HSC'lerin kaynağı ne olursa olsun, hematopoietik kök ve progenitör hücreler, morfolojik olarak en erken kök hücre durumunda küçük lenfositler olarak veya olgunlaşan progenitör durumunda blast formları olarak görünür. Bu nedenle yalnızca işlevsel tahlillerle veya immünofenotipik yüzey işaretleyici analizi ile tanımlanabilirler. HSC'nin fenotipi CD34⁺/CD45^{dim}/SSC^{low}/FSC^{low and intermediate}'dir.¹²

Daha sonraki progenitörler yumuşak agar kültür sistemlerinde fonksiyonel olarak test edilebilir. Uygun büyüme faktörleriyle desteklendiğinde, kaplanan hücrelerin toplam sayısı başına belirli sayıda CFU olarak numaralandırılabilen ve ifade edilebilen, kendi soylarının kolonilerini oluştururlar. Farklı HSC türlerinin numaralandırılmasına yönelik fonksiyonel analizler birkaç haftalık steril kültür inkübasyonu gerektirir. Bu

nedenle bu analizlerin bazı dezavantajlar vardır ve bunların en önemlileri laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası zayıf tekrarlanabilirlik, standartlaşmama ve uzun geri dönüş süresidir.¹³⁻¹⁴ Dolayısıyla klinik nakil uygulamasındaki fonksiyonel hematopoietik hücre analizleri genellikle dondurularak saklanan hücrelerin kalite kontrol işlemleri ile sınırlıdır ve rutin laboratuvar testlerinde nadiren kullanılır.

Bununla birlikte, CD34+ hücrelerin flow sitometri ile ölçümü, HSC ürünlerinin potansiyelini ölçmek için evrensel bir test haline geldi. Hasta PB'sinde mutlak CD34+ hücre sayısının değerlendirilmesi aynı zamanda lökoferez işlemine başlamak için en uygun zamanlamanın belirlenmesi açısından da önemlidir. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (JACIE)'nin Ortak Akreditasyon Komitesi standartlarına göre, canlı CD34+ hücrelerin sayımı greft kalitesine erişmek için taze PBSC ürünlerinde gerçekleştirilmelidir.¹⁵ Minimum CD34+ hücre sayısı bir nakilde alıcının vücut ağırlığının kg'ı başına $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ hücre olmalıdır. Optimal (en uygun) hücre sayısı ise 5×10^6 CD34+ hücre/kg (vücut ağırlığı) olup bu, nakil sonrası nötrofil ve trombosit sayımının daha hızlı iyileşmesiyle ilişkilidir.^{16,17}



Şekil 1: Modifiye ISHAGE protokolünü kullanarak tek platform için CD34+ hematopoietik kök hücrelerin analizine yönelik yol stratejisi. ISHAGE, Uluslararası Hemoterapi ve Greft Mühendisliği Derneği.

Her ne kadar nakil merkezlerinde laboratuvarlar kalite kontrolü için CD34+ hücreleri belirlemede farklı protokoller kullanılıyorsa da, Uluslararası Hemoterapi ve Greft Mühendisliği Derneği (ISHAGE) protokolü, en sık kullanılanıdır (Şekil 1).¹⁸ Bu protokol sayma boncukları tanıtılarak ve canlılık boyaları dahil edilerek sürekli olarak güncellendi.¹² Ancak ISHAGE protokolünü kullanan laboratuvarlar arasında hâlâ farklılıklar var; bazıları tek platform yöntemini kullanırken diğerleri ikili platform yöntemini kullanmakta.¹⁹ Tek platformun faydası, floresan mikroküreler (boncuklar) kullanan ve sıvı fazda veya liyofilize formda olabilen CD34+ hücrelerin yüzdesinin ve mutlak sayısının eş zamanlı olarak belirlenmesidir. Liyofilize boncukların ana avantajı, tüpün, mutlak hücre sayısının hesaplanmasına olanak sağlayan tam sayıda boncuk içermesidir. Ayrıca, tek veya ikili platform yönteminin hangisinin kullanıldığına bağlı olarak hücre etiketleme protokolünde de farklılık vardır. Bazı laboratuvarlar lyse-wash yöntemi (ikili platform) kullanır, diğerleri ise daha kısa süren ve potansiyel hücre kaybının engellendiği lyse-no wash (tek platform) yöntemini kullanır. Her ne kadar CD34+ hücre tespiti için ISHAGE protokolü birçok laboratuvarında kullanılmakta ise de bahsedilen farklılıklar, standardizasyonun gerekli olduğunu göstermektedir.

EBMT (Avrupa Kan ve Kemik iliği Nakli Derneği) kılavuzlarına göre BM değerlendirmesi için CD34+ testleri zorunlu olmasa da birçok merkez bunu kalite testlerine dahil eder.²⁰ Eğer laboratuvar BM numunelerinde canlı CD34+ hücrelerin tespitini gerçekleştiriyorsa, flow sitometride hücrelerin analizine yönelik protokollerin ve şablonların dikkatli bir şekilde ayarlanması gerekir. PB veya PBSC greftindeki CD34+ hücre sayımı ile karşılaştırıldığında, BM numunelerinin analizi zordur çünkü bunlar çok sayıda kırmızı kan hücresi içerirler ve hepsinde analizi karmaşıklaştıran yağ ve hücre kümeleri olabilir. Bu nedenle flow sitometrideki ayarların, artıkları azaltacak ve CD34+ hücre popülasyonunun daha doğru bir şekilde belirlenmesine olanak sağlayacak şekilde ayarlanması gerekir.

4 | HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Hücrelerin canlılığı ilk olarak canlı hücrelerin belirli boyaları geçirmeyen sağlam hücre zarlarına sahip olduğu, ölü hücrelerin ise sahip olmadığı ilkesine dayanan boya dışlama testleri kullanılarak değerlendirildi.

Hücre süspansiyonu boya ile karıştırılır ve daha sonra hücrelerin boyayı alıp almadığı görsel olarak incelenir. Boya dışlama testlerini gerçekleştirmek için en sık kullanılan boyalar, tripan mavisi, eozin Y, akridin turuncu veya propidyum iyodür'dür. Boya dışlama testi basit ve hızlı bir tekniktir, ancak yöntemin sınırlı olmasının nedeni, canlılığın, hücre zarı bütünlüğünün değerlendirilmesi şeklinde indirek olarak belirlenmesidir. Testin doğru bir şekilde gerçekleştirilmesi önemlidir çünkü az miktardaki bir boya alımı olması hücre hasarının göstergesi de olsa gözden kaçabilir.^{21,22}

Daha önce de belirtildiği gibi, JACIE standartlarına göre CD34+ hücrelerin sayısına ek olarak, toplanan ve işlenmiş/dondurulmuş hücrelerin canlılığının belirlenmesi de gereklidir. Flow sitometri kullanarak CD34+ hücrelerin canlılığının değerlendirilmesinde en sık kullanılan boya, hücre DNA'sının GC bölgesine bağlanarak nekrotik hücrelerin ve geç apoptozdaki hücrelerin (7-AAD pozitif) belirlenmesine olanak sağlayan 7-aminoaktinomisin D (7-AAD)'dir.²² 7-AAD'nin yanı sıra bazı laboratuvarlar rutin çalışmalarda hâlâ boya dışlama testleri kullanıyordu, ancak 7-AAD, ISHAGE protokolünün standart bir parçası haline geldiğinden dolayı çoğu laboratuvar CD34+ hücrelerin canlılığını belirlemek için bunu kullanıyor.²¹ 7-AAD yönteminin ana dezavantajı, daha önce bahsedilen boya dışlama testlerinde olduğu gibi, erken apoptoz'daki hücrelerin tespit edilememesidir, bu da greft hücresi canlılığının olduğundan fazla tahmin edilmesine yol açabilir.²³ Çeşitli çalışmalar Annexin V (Ann V)'yi kullanan yöntemin erken apoptozdaki hücrelerin tespiti için uygun olduğunu göstermiştir.^{14,24} Annexin V, canlı hücre zarının sitoplazmik tarafının karakteristiği olan fosfatidilserin gibi negatif yüklü fosfolipidler için

yüksek afiniteye sahip bir proteindir. Ancak erken apoptozda fosfatidilserin, hücre membran asimetrisi nedeniyle hücre yüzeyinde açığa çıkar ve Ann V proteini ve Ann V'nin negatif yüklü fosfolipidlere bağlanmasını sağlayan kalsiyumlu Ann V bağlama tamponu içeren bir reaktif kullanılarak tespit edilebilir. Kök hücre genişlemesi gibi veya gen terapisi gibi ex vivo manipülasyon işlemlerinin başlatılmasından önce progenitör hücrelerin apoptotik durumunu değerlendirmek faydalı olabilir.²⁵

Araştırma ortamlarında kullanılan apoptotik hücrelerin belirlenmesi için diğer testler, kaspazların aktivasyonunu tespit etme yöntemi olan DNA bağlayıcı boya Syto 16 yöntemi, DNA'nın endonükleaz sindiriminin tespiti için TUNEL (TdT dUTP Nick End Labeling) testi ve mitokondriyal apoptozun tespiti için özel boyalar kullanılarak mitokondriyal membran potansiyelini ve çekirdekteki kromasyon yoğunlaşmasını belirleyen yöntemdir.^{5,26}

5 | DONDURULARAK SAKLANMIŞ VE ÇÖZDÜRÜLMÜŞ KAN YAPICI KÖK HÜCRELERİN KALİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Taze HSC'ler toplandıktan sonra yalnızca birkaç saatten birkaç güne kadar yaşayabilirler, bu nedenle kullanımları ve coğrafi erişimleri sınırlıdır. Şu anda, HSC'ler ve tedavide kullanılan diğer hücreler aynı teknikler kullanılarak bir kriyoprotektan olan dimetil sülfoksit (DMSO) ile yavaş bir soğutma hızında dondurularak saklanır.²⁷ HSC'lerin dondurularak saklanması, bunların işlem alanından klinik kullanım alanına taşınmasına olanak tanır, hücrelerin hastalara uygulanabildiği daha geniş bir zaman penceresi yaratır ve kalite kontrol ve düzenleyici testler için yeterli zamanı sağlar. Bu faydalara rağmen hücreler, işlem sırasında greftteki hücre sayısının azalmasına ve aynı zamanda çözdürüldükten sonra hücre canlılığında azalmaya yol açabilecek bazı faktörlere maruz kalır (örneğin, santrifüjleme, saklama koşulları ve çözme işlemi gibi).²⁷

HSC'lerin kriyoprezervasyonu için altın standart hâlâ DMSO'dur. Hücrenin DMSO'ya maruz kalma zamanlaması çok önemlidir çünkü DMSO, metabolizmayı, enzim aktivitesini, apoptozu ve hücre döngüsünü etkileyerek hücre fonksiyonu doğrudan etkileyebilir. Ayrıca DMSO'nun etkisi hücre tipine, hücre farklılaşmasının aşamasına, maruz kalma süresine ve DMSO konsantrasyonuna bağlıdır.²⁸ DMSO, çözdürülmüş greftteki hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olduğundan ve infüzyon sırasında olumsuz reaksiyonlara neden olabileceğinden, bazı nakil merkezlerinde nakledilmeden önce çözdürülmüş HSC'lerden uzaklaştırılır.²⁷ Ancak soru, bu süreçte kaç hücrenin kaybolduğu ve hasar gördüğüdür, çünkü çözdürülmüş bir üründeki canlı CD34+ hücrelerin sayısının aslında hastaya nakledilen gerçek sayı olduğu bilinmektedir.^{11,29} DMSO'ya ek olarak, hücre konsantrasyonu, donma öncesi saklama koşulları, donma hızı ve saklama sıcaklığı gibi hücre canlılığını etkileyen diğer bazı faktörler de kriyoprezervasyon sonrasında hücrelerin iyileşmesini etkiler.²⁷

7-AAD ile kombinasyon halinde kullanılan 'tek platform' yönteminin, taze örneklerdeki canlı CD34+ hücrelerin sayısını belirlemek için referans yöntem olduğu iyi bilinmektedir. Ancak dondurularak saklanmış ve çözdürülmüş numunelerin analizi için yöntemin modifikasyonu gereklidir. Ölü ve canlı hücre sayısında daha yüksek bir değerin elde edilmesine izin vermek için İleri dağılıma karşı Yan dağılım ve SSC'ye karşı CD45 geçitlerinin ayarlanması önerilir. Bu nedenle çözdürülmüş numunelerin analizi, daha kesin ve doğru HSC analizi amacıyla, geçiş stratejisinin ve kazanım ayarlarının ayarlanmasını gerektirir.^{11,30}

NetCord - Hücre Tedavi Akreditasyon Vakfı (FACT)'nın, Kordon Kanı Bankaları standardına göre, çözme sonrası CD34+ hücre canlılığı \geq %70 olmalıdır³¹. PBSC'lerin (periferik kan kök hücreleri) çözme sonrası minimum CD34+ hücre canlılığı için böyle bir tavsiye yoktur ve aferez ürününün dondurulup çözdürülmesinden sonra yalnızca çekirdekli hücrelerin canlılığının $>$ %50 olması gerekir³². Bu nedenle PBSC greftinin çözme sonrası kalite kontrolünün nasıl yapılacağı ve hangi tahlil ve yöntemlerin kullanılması gerektiği şüphelidir. Her

ne kadar bazı çalışmalar PBSC ve CB (kordon kanı)'nin çözdürme sonrası canlılığı için yöntemleri değerlendirmiş ve flow sitometride numunenin hazırlanmasından testin sonucuna kadar olan süreci standartlaştırmaya çalışmış olsa da, dondurularak saklanan numunelerin çözdürülmesinden sonraki süreçte yer alan her adımı tanımlayan bir kılavuz hâlâ yoktur. Örneğin, numune çözdürmenin kesin koşulları, hücreleri yıkamanın gerekli olup olmadığı, numuneleri seyreltme ve işaretlemeyen önce kriyoprotektanı uzaklaştırma, flow sitometri çalışmaları gibi^{33,34}.

UCB için kalite spesifikasyonlarında, çözdürme sonrası CFU hâlâ gerekliliklerden biridir, ancak rutin çalışmalarda CFU testinin daha önce bahsedilen dezavantajlarından dolayı, greft kalitesinin daha hızlı değerlendirilmesi için daha yüksek tekrarlanabilirliğe ve daha kısa geri dönüş süresine sahip başka bir testin kullanılması iyi olurdu.^{35,36} 7-AAD, HSC nakillerinde flow sitometride hücre canlılığının belirlenmesinde en sık kullanılan boya olmasına rağmen, testin eksikliği erken apoptozdaki hücreleri belirleyememesidir. Erken apoptozda hücre işleyişinin bozulduğu bilindiğinden bu tür hasar görmüş hücrelerin çoğalma ihtimalinin olup olmadığı sorusu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, hücrelerin canlılığının belirlenmesinde, 7-AAD yöntemine ek olarak, aneksin V yöntemi gibi erken apoptozdaki hücrelerin belirlenmesine yönelik yöntemin kullanılması yararlı olacaktır. Az sayıda çalışma, UCB numuneleri için, 7-AAD ve Ann V kullanılan testin, CFU sonuçlarının tahmini için uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir.^{14,24} Duggleby ve arkadaşları²⁴, canlı CD34+ hücrelerini belirlemek için kendi özel protokollerinde 7 AAD-kapılı popülasyonda önemli sayıda CD34+ AnnV+ olayının bulunduğunu gösterdi. Çalışmalarında ölçülen sonuçlar, apoptotik olmayan hücreler (CD34+ AnnV-) ve CFU sonuçları arasında iyi bir korelasyon olduğunu gösterdi, dolayısıyla 7- AAD ile standart sayım, erken apoptotik hücreyi ölçmediği için, CD34+ canlı hücrelerin mevcut standart sayımının çözülme sonrası potansiyeli tam olarak yansıtmadığı gerçeğini doğruladılar. Radke ve arkadaşları¹⁴ çalışmalarında standart ISHAGE protokolüyle karşılaştırıldığında, Ann V yönteminin CFU ve çekirdekli CD34+ hücreler arasında benzer iyi korelasyonlarla sonuçlandığını ve bunun da teorik olarak beklenen koloni oluşumuyla daha iyi bir uyumluluğa yol açtığını belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları özellikle önemlidir çünkü canlı hücre sayısının nakilden önce mümkün olan en kısa sürede belirlenmesi gerektiğinde Ann V yöntemi kullanılabilir.

6 | LÖKOSİT ALT GRUPLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

CD34+ hücre tespitine ek olarak allojenik HSC grefti kalite değerlendirmesi diğer lökosit alt gruplarının sayımını özellikle CD3+ T hücrelerini de içermelidir. T hücrelerinin yanı sıra hücre tedavisinin farklı tipleri için greftin içindeki lökosit alt gruplarını belirlemek gereklidir. Günümüzde laboratuvar çalışmalarında kullanılan flow sitometreler, flow sitometrinin lazer ve dedektör konfigürasyonuna bağlı olarak aynı anda birden fazla hücre işaretleyicisinin tespit edilmesini sağlar. (örn. 10 renkli üç lazerli flow sitometri [mor 405 nm, mavi 488 nm ve kırmızı 638 nm]). Bu nedenle monoklonal antikorları (mAb) bir test tüpünde kullanarak ve böylece test maliyetlerini ve test süresini de azaltmak suretiyle lökosit alt gruplarını belirlemek mümkündür. Lökosit alt grupları genellikle B hücreleri için anti-CD 19 mAb, NK hücreleri için anti-CD 16 ve anti-CD 56, T hücreleri alt grubu için anti-CD 3, anti-CD 4 ve anti-CD 8 mAb ve monositler için anti-CD 14 ve anti-CD 16 kullanılarak tespit edilir (Tablo 1).

Tablo 1: Hematopoietik kök hücre nakline yönelik hücresel tedavi ürünlerinin değerlendirmesinde en sık kullanılan antikorlar

Antikor	Hücre dizisi	Referans
Anti-CD34	Hematopoietik kök hücreler	[14,17,18,23,24,33,34,37,39,43,45,47,48,54-56]
Anti-CD3	T hücreler	[38,40,45,47,48,50,52]
Anti-CD19 Anti-CD20	B hücreler	[38,40,43,45,47,48,50,52]

Anti-CD14	Monositler	[50]
Anti-CD56/CD16	NK hücreleri	[38,40,48,50]

Laboratuvar ilgili hücrelerin tespitine yönelik protokolü tanımladığında doğru hücre tanımlamasına izin verecek antikorları (Abs) ve florokromları seçmek gerekir. Bu özellikle tek adımda birden fazla analiz gerçekleştirirken önemlidir (örneğin, lenfosit alt grubunun sayımı). Tek tek Ab'nin yanı sıra, önceden tanımlanmış ve ilgili hücreleri, örneğin HSC veya lenfosit alt gruplarını tespit etmek için florokromlar ve reaktiflerle etiketlenmiş Ab'leri içeren ticari kitler mevcuttur.^{16,37,38} Bu kitlerin avantajı, şirket içi yöntemlerin ayarlanmasında deneyimi olmayan laboratuvarlardaki protokollerin oluşturulmasını ve uygulanmasını kolaylaştıran önceden monte edilmiş Ab panellerini içermeleridir.

Ayrıca bazı üreticiler, ilgili hücrelerin izolasyonu için otomatik geçiş algoritmasına sahip, daha kullanıcı dostu hücre analizine katkıda bulunan toplama ve analiz yazılımı (örneğin, BD FACSCanto Clinical yazılım (BD Bioscience, San Jose, CA gibi) sunmaktadır.³⁹

Allojeneik HSC naklini bazen donör lenfositlerinin ek olarak uygulanması, örneğin donör lenfosit infüzyonu (DLI) takip eder. Allo-HSC toplama prosedürü sırasında veya uyarılmamış PB'den, DLI için lenfositler toplanabildi ve hastalığın nüksetmesi durumunda basit ve etkili bir tedavi seçeneği olması için dondurularak saklanabildi.^{40,41} DLI'nin amacı donör T hücrelerinin lösemik hücelere karşı gücünü arttırmak (graft-vs.-tümör etkisi), yani hastalığın nüksetmesini tedavi etmek ve bağışıklığın iyileşmesini artırmaktır.⁴²

DLI için dondurulacak taze aferez ürünlerinde, CD3+ hücreler flow sitometride belirlenir. Bu hücre popülasyonunun kriyoprezervasyonu ve çözülme işlemini nasıl tolere ettiğine dair sadece birkaç rapor olduğundan ve laboratuvarlar arasında kriyoprezervasyon protokollerindeki farklılıklar nedeniyle her merkezin, infüzyondan önce çözülmüş numunedeki CD3+ hücrelerin canlılığını belirlemesi gerekir.³⁸

Kısmi HLA eşleşmesi durumunda, uygulamadan önce istenmeyen hücreleri ortadan kaldırmak için HSC grefti manipüle edilmelidir. Haploidentik donörlerden elde edilen HSC greftinin naklinde graft-versus host hastalığı (GvHD) gelişme riski yüksektir. Nakil sonrası olası bu komplikasyonları önlemek için, greftin infüzyonundan önce immünomanyetik teknikler kullanılabilir: CD34+ zenginleşmesiyle indirek T hücreli depleksiyonu veya istenmeyen CD3+ T hücrelerin ve CD19+ B hücrelerin depleksiyonu gibi.^{43,45} Hedef CD34+ hücrelerini zenginleştirme yöntemi, süperparamanyetik demir dekstran parçacıklarına konjuge olmuş anti-CD 34 mAb ve manyetik hücre ayırıcı kullanan manyetik izolasyon tekniğine dayanır.⁴⁵ Ayıklama sonrası canlı CD34+ ve CD3+ hücrelerin sayısı flow sitometri kullanılarak belirlenir. Analizdeki zorluk, ayıklamadan sonra pozitif fraksiyondaki CD3+ hücrelerin sayısını belirlemektir. Artık CD3+ hücrelerin sayısı genellikle %1'den azdır ve analiz için nadir sayıdaki T hücreleri için özel bir protokole ihtiyaç vardır. Ayrıca çoklu geçiş stratejisi protokolü de uygulanmalıdır.⁴⁶ Günümüzde haploidentik HSC naklinde iki farklı T hücreli depleksiyonu kullanılmaktadır: PBSC'nin in vitro T hücreli depleksiyonu ve in vivo T hücreli depleksiyonu için nakil sonrası siklofosamid.⁴⁷ T hücreli reseptörü alfa/betanın ve CD19+ hücrelerin depleksiyonuna yönelik immünolojik teknikler, zenginleştirme tekniklerinden çok daha zorludur. Depleksiyon işleminden sonra flow sitometri kullanılarak çok az miktarda artık TCR $\alpha\beta^+$ ve CD19+ hücreler belirlenmelidir.⁴⁸ İmmünolojik teknikler kullanılarak elde edilen ürünlerin analizi için, geçiş stratejileri geliştirmek, flow sitometriye ilişkin bir protokol oluşturmak ve daha sonra ilgili hücreleri doğru bir şekilde analiz etmek çok önemlidir, çünkü ürünlerdeki sayıları çok az olsa da işlemin etkisi flow sitometriden alınan sonuca göre değerlendirilir.

7 | İMMÜNEFEKTÖR HÜCRELER

IEC'lerle adoptif hücresel terapi, genellikle akademik enstitülerde oluşan üretim modelinden, merkezi üretime sahip bir endüstri modeline doğru evrimleşen, heyecan verici ve hızlı gelişen bir alandır. İmmün efektör hücreler halihazırda tümörlere karşı geniş sitotoksiteyi ifade eden veya tümörle ilişkili antijenlere karşı hedeflenen sitotoksiteyi eksprese eden hücrelerin yanı sıra inflamatuvar yanıtları baskılayarak veya immün tanımayı artırarak toleransı indükleyen hücreleri içerir. Bunların kimliği, numaralandırılması ve canlılığı, manipülasyonu başlatmak ve ürünlerin infüzyonunu serbest bırakmak için kritik bilgilerdir.^{49,50}

Hızlı gelişmeye rağmen, IEC tedavisi hâlâ, üretim süreçleri, lojistik ve koordinasyon konuları ve toksisite profilleri gibi çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Bu nedenle Immun Effector Cell Task Force (İmmün Efektör Hücre Görev Gücü) kuruluşu IEC için standartlar ve akreditasyon programı oluşturdu.⁵¹ Standartlar, hedef hücre popülasyonunun işlevini değiştiren manipülasyona uğramış hücresel tedavi ürünlerini değerlendirmek için, çok renkli flow sitometrinin, hücre yüzeyi işaretleyicinin tespiti, canlılık ve sayım için tercih edilen teknoloji olduğu ilgili ve valide edilmiş testlerin kullanılmasının gerekliliğini açıkça belirtmektedir. Mutlak sayıda canlı hücrenin doğru ölçümü, birçok uygulama için bir önkoşuldur: CAR ile dönüştürülmüş T veya NK hücre üretimi için girdi hücresel malzemenin standardizasyonu, hücre ayıklama, proses içi kalite kontrolleri ve IEC'nin dozajı gibi.^{50,51}

CAR-T hücre tedavisi, genetik modifikasyonun, kanser hücrelerini tanımak ve aktif olarak çoğaltmak için T hücrelerini en iyi şekilde kullandığı klinik uygulamalarda giderek daha fazla yer almaktadır.⁴⁹ HSC nakli için CD34+ hücrelerin toplanmasında olduğu gibi yeterli konsantrasyonda T hücresi elde etmek toplama sürecinin kritik bir parçasıdır. Bu nedenle Anti-CD3 mAb kullanan lökoferez ürünlerinin kalite kontrolünü gerçekleştirmek önemlidir, çünkü nihai ürünün kalitesi, CAR-T hücrelerinin imalatında kullanılan başlangıç malzemesinin kalitesine bağlıdır.^{42,52} Üretim sürecinden sonra CAR-T hücre ürününün bir örneği, diğer testlerin yanı sıra fenotiplemeyi, efektör hücre popülasyonunun canlılığını ve saflığını da içeren kalite kontrol testleri için alınır.⁴²

Lökoferez ürününün kalitesinin belirlenmesinin yanı sıra, infüzyondan sonra terapötik hücrelerin genişlemesi ve kalıcılığı ile CAR-T hücreleriyle greft alan hastalarda uygulanan tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de flow sitometri kullanılır.⁵³

8 | FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMLERİNİN KALİTE KONTROLÜ VE DOĞRULAMASI

Rutin çalışmalarda yeni yöntemlerin uygulanmasından önce genellikle, kesinlik ve doğruluk, doğrusalık, nicelik sınırı, iki veya daha fazla flow sitometri arasındaki yöntem karşılaştırması, ayırma, bazen de numune stabilite çalışmasını da içeren bir değerlendirme yaparak doğrulamayı (validasyon) gerçekleştirmek gereklidir.^{37,39,50}

8.1 | Hücresel tedavi ürün numunelerinin stabilitesi

Numune stabilite çalışması protokolün doğrulanmasının önemli bir parçasıdır, özellikle yeni bir hücresel tedavi ürün türünün uygulanacağı zaman kalite değerlendirmesi için kullanılır. Çeşitli çalışmalarda taze lökoferez örneklerinin ve dondurularak saklandıktan sonra çözdürülmüş UCB örneklerinin stabilitesi incelenmiştir.^{37,39,54,55} Sonuçlar taze lökoferez örneklerinin 4°C'de saklandığında 24 saate kadar stabil olduğunu gösterdi.^{37,39} Çözdürülmüş UCB örnekleriyle ilgili stabilite çalışmalarının sonuçları çelişkiliydi. Lee ve ark.⁵⁴ kendi çalışmalarında, çözdürülmüş UCB numunelerinin çözdürüldükten sonra oda sıcaklığında veya 4 C'de saklanıp saklanmadığına bakmaksızın 6 saate kadar stabil olduğunu gösterdiler. Öte yandan Huang ve arkadaşları, çözdürülmüş UCB numuneleri oda sıcaklığında saklandığında yalnızca 20 dakika sonra CD34+ hücre canlılığının

önemli ölçüde azaldığını bildirdiler.⁵⁵ Krasna ve arkadaşları⁵⁶ HSC ürünlerinin immün ayıklama sonrasındaki stabilitesini değerlendirdiler ve ayıklama sonrası CD34+ hücrelerin, buzdolabında 6 güne kadar saklanan lökoferez ürünündeki CD34+ hücrelere göre daha az stabil olduğunu raporladılar. Şu ana kadar yapılan araştırmaların sonuçları hücresel tedavi ürünlerinin türüne ve saklama koşullarına göre farklılık gösterdiğine göre, her laboratuvar doğrulama protokolünün bir parçası olarak numune stabilite çalışması yapılmalıdır.

Doğrulama yapmadan önce mümkün olan en iyi florokromlarla birleştirilmiş klonların ve ayrıca arka planda spesifik olmayan floresanı en aza indirmek için antikor konsantrasyonunun ayarlarını optimize etmek gerekir.

Rutin çalışmalarda, başlatma ve çalıştırma prosedüründen sonra flow sitometrideki lazerlerin ayarlanması gerekir ve bu amaç için ticari reaktifler (floresan boncuklar) en yaygın olarak kullanılır. Gerekirse, spektral örtüşme telafisi (spectral overlap compensation) gerçekleştirilebilir.⁵⁷

8.2 | Dahili ve harici kalite kontrol

İyi laboratuvar uygulamalarına göre rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılan yöntemlerin kalite kontrolünün sağlanması gerekmektedir. Rutin çalışmalardan önce her gün, genellikle aynı üreticiye ait ticari reaktiflerin kullanıldığı dahili kalite kontrolü yapılmalıdır. Dahili kontrolün yanı sıra, harici kalite değerlendirmesine (EQA) katılmak da önemlidir. EQA numuneleri genellikle yılda birkaç kez analiz edilir ve hangi programa katılacağına laboratuvarlar karar verir (örneğin CD34 sayımı veya lenfosit immüno-fenotipleme için). HSC nakli programının parçası olan laboratuvarlar genellikle Birleşik Krallık NEQAS kalite planına ve/veya ulusal planlara katılırlar.^{58,59} EQA için alınan örneklerin rutin numunelerle aynı şekilde işlenmesi çok önemlidir, çünkü harici kontrol, yöntemin periyodik olarak doğrulanmasına olanak tanır ve aynı zamanda testin teknik performansını kontrol eder. Yöntemin doğrulanması ve onaylanması dahili ve harici akreditasyon işleminin bir parçasıdır.⁶⁰ Laboratuvarın akreditasyon gerekliliklerini karşılamak istemesi halinde için söz konusu işlemleri uygulaması gerekmektedir.

9 | SONUÇ

Flow sitometri yöntemleri günümüzde hücre tedavisinin gelişmesine ve ilerlemesine büyük katkı sağlayan HSC nakli alanında kullanılan çeşitli hücresel ürünlerin kalitesiyle ilgili yeni görüşler ve anlayışlar ortaya koyuyor. Artık araştırma laboratuvarı çalışmalarında olduğu kadar klinikte de rutin olarak kullanılıyorlar ve hızla büyüyen bu laboratuvar alanındaki test yöntemlerinin uygulanması ve sürdürülmesi için iyi laboratuvar uygulamalarına, sürekli eğitime ve öğretime ihtiyaç vardır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar potansiyel bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

VERİ KULLANILABİLİRLİĞİ BEYANI

Bu çalışmadaki tüm veriler makul talep üzerine ilgili yazardan temin edilebilir.

ORCID

Vladimira Rimac, <https://orcid.org/0000-0002-4598-4870>

REFERANSLAR