

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KORDON KANI, MATERNAL PLAZMA VE AMNİYON SIVISINDAKİ SİTOKİN  
SEVİYELERİNİN SEROLOJİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE KORDON  
KANI *IN VITRO* KOLONİ OLUŞTURMA POTANSİYELİNE ETKİSİ

Hasan Yalım Akın

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Meral Beksaç

Ağustos

2017

## 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.

Hasan Yalım Akın

İmzası

## ONAY

Prof. Dr. Meral Beksaç danışmanlığında Hasan Yalım Akın tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../2017 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

### KORDON KANI, MATERNAL PLAZMA VE AMNİYON SIVISINDAKİ SİTOKİN SEVİYELERİNİN SEROLOJİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE KORDON KANI *IN VITRO* KOLONİ OLUŞTURMA POTANSİYELİNE ETKİSİ

Hasan Yalım Akın

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Meral Beksaç

İnsan hematopoietik kök hücrelerinin (HKH) proliferasyonu ve farklılaşması sitokinler ile düzenlenir. Başlıca kemik iliği (Kİ), çevre kanı (PK) ve göbek kordon kanı (KK) kaynaklı HKH naklinde kısa dönemli yapılanma sağlayan CD34<sup>+</sup> HKH'lerin engrafman kapasitelerinin *in vitro* belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntem koloni oluşturma (CFU) testleridir. CFU testleri, ortama eklenen çeşitli hematopoietik sitokinler aracılığıyla HKH'lerin proliferasyon ve farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla Kİ koşullarının yarı-katı besiyerinde taklit edilmesi temeline dayanır. Günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan sitokinler, tarihsel olarak önceleri amniyon sıvısı (AS) veya hücre serisi kaynaklı iken daha sonra rekombinant insan proteinleri kullanıma girmiştir. Hassas ve optimal konsantrasyonlarda kullanılabilmesi yönünden avantajlı olan bu proteinlerin çok düşük miktarlarının pahalı olması ve saklama koşullarının zorluğu gibi dezavantajları nedeniyle farklı sitokin kaynakları arayışına gidilmektedir. Günümüzde kullanılmayan, elde edilmesi kolay, doğal, olog sitokin kaynakları bu soruna çözüm oluşturabilir. Gebelik sürecinde fetal gelişim sürecinde hematopoietik sitokin düzeylerinde artış, maternal çevre kanında (MK) ve KK'da Granülosit-Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF) düzeylerinin belirlenmesine yönelik kısıtlı sayıda araştırmada gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak, bu tez çalışmasında MK, KK ve AS'nin *in vitro* KK kısa dönem CFU potansiyeline etkisi ve bu kaynaklardaki hematopoezde kritik rol oynayan Kök Hücre Faktörü (SCF), G-CSF ve İnterlökin (IL)-3 sitokin düzeylerinin direkt *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Araştırmaya 20 elektif sezaryen olgu dahil edilmiştir. MK ve KK plazmaları ve AS ile desteklenen erken dönem CFU testlerinde koloni oluşturulamamıştır. Öte yandan, AS ve KK plazmasında sırasıyla G-CSF (1.068 pg/ml; aralık: 613-3.996) ve SCF (1.761 pg/ml; aralık: 1.089-2.514) konsantrasyonları yüksek düzeylerde saptanmıştır. Yüksek düzeyde SCF içeren KK plazması, *in vitro* agar kolonizasyonunda olmasa bile sıvı kültürde HKH ekspansiyonunda destekleyici bir bileşen olarak proliferasyon hızının artırılmasına katkı sağlayabilir. Bulgularımız ışığında HKH nakillerinde yaygın olarak kullanılan plazma ve eritrosit uzaklaştırılmış KK yerine plazma içeren ürününün kullanılması engrafman başarısına katkı sağlama olasılığı taşımaktadır.

2017, 50 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Kordon kanı; maternal plazma; amniyon sıvısı; hematopoietik sitokinler; ELISA; hematopoietik kök hücre; CFU.

## ABSTRACT

MSc Thesis

Serological Detection of Cytokine Levels in Cord Blood, Maternal Plasma and Amniotic Fluid and Their Impact on *in vitro* Cord Blood Colony Forming Potential

Hasan Yalım Akın

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Meral Beksaç

The proliferation and differentiation of human hematopoietic stem cells (HSC) are regulated by cytokines. Colony forming unit (CFU) tests are the most common method used for *in vitro* testing of engraftment capacities of short-term repopulating (STR) cord blood (CB) HSC to be transplanted into the immune-suppressed patients. CFU tests are based on mimicking the bone marrow (BM) environment in a semi-solid medium in order to determine the capacity of proliferation and differentiation of HSC through various hematopoietic cytokines. The most commonly used cytokines today were historically based on amniotic fluid (AF) or cell lines, but later recombinant human proteins got into use. Although these proteins have advantages in terms of being used in sensitive and optimal concentrations, they are disadvantageous because of high costs of low quantities and their storage conditions. Therefore, different cytokine resources have been the subject of scientific research. Easy to obtain, natural and autologous cytokine resources could be a solution to this problem. An increase in the hematopoietic cytokine levels during fetal growth in gestation has been shown in a limited number of research in determining Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) levels in maternal blood (MB) and CB. This study, depending on the above mentioned data, aims to determine the effect of MB, CB and AF on *in vitro* CB short-term CFU potential and to determine the stem cell factor (SCF), G-CSF and interleukin (IL)-3 cytokine levels in these resources which have a critical role in hematopoiesis via direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. 20 elective caesarean pregnancies have been included in this study. No colonies were observed in the short-term CFU tests supported by MB and CB plasma and AF. On the other hand, in AF and CB plasma, high-level G-CSF and SCF concentrations were determined (respectively, 1.068 pg/ml; range: 613-3.996 and 1.761 pg/ml; range: 1.089-2.514). The CB plasma with high SCF content may increase the proliferation rates as a supportive additive in liquid HSC expansion even if not in *in vitro* agarose colonization. In consideration of our findings, rather than plasma and erythrocyte depleted CB, which is commonly used in HSC transplantations, infusion of CB including its plasma may promote to a successful engraftment.

2017, 50 pages

**Keywords:** Cord blood; maternal plasma; amniotic fluid; hematopoietic cytokines; ELISA; hematopoietic stem cell; CFU.

## TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın bu ilk basamağında, bilimsel çalışma azmiyle hayranlık uyandıran bir bilim insanı olarak paha biçilmez deneyimler kazanmama vesile olan, tez çalışmamı yürütürken çok değerli bilgi ve tecrübeleriyle desteğini benden asla esirgemeyen, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Meral Beksaç'a;

Bu tez çalışmasında kullanılan biyolojik materyallerin elde edilmesinde ve organizasyonunda çok değerli katkıları ile bu çalışmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sinan Beksaç'a;

Yüksek lisans programım süresince ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, karşılaştığım güçlüklerin aşılmasında yol gösteren, aynı zamanda manevi desteğini de esirgemeyen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Pınar Yurdakul'a;

Tez çalışmamda kritik önemi olan örnek toplanma sürecinde değerli vakitlerini ayırarak yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Doruk Cevdi Katlan'a, Uzm. Dr. Gökçen Örgül'e ve destek olan tüm Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği çalışanlarına;

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankası'nda, başta Handan Karakaya olmak üzere, manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim tüm çalışma arkadaşlarıma;

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi bünyesinde araştırma laboratuvarını kullanmama olanak sağlayan Doç. Dr. Birsen Can Demirdöğen'e ve laboratuvardan sorumlu öğrencilerine;

Son olarak, hayatımın her alanında olduğu gibi akademik çalışmalarım boyunca ve bu tez çalışmasının ortaya çıkma sürecinde, maddi ve manevi her türlü desteklerini iliklerime kadar hissettiğim anneme ve babama teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b><u>ETİK BEYAN .....</u></b>	<b><u>i</u></b>
<b><u>ÖZET .....</u></b>	<b><u>iii</u></b>
<b><u>ABSTRACT .....</u></b>	<b><u>iv</u></b>
<b><u>TEŞEKKÜR.....</u></b>	<b><u>v</u></b>
<b><u>İÇİNDEKİLER.....</u></b>	<b><u>vi</u></b>
<b><u>SEKİLLER DİZİNİ.....</u></b>	<b><u>viii</u></b>
<b><u>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</u></b>	<b><u>ix</u></b>
<b><u>SİMGELER DİZİNİ .....</u></b>	<b><u>x</u></b>
<b><u>1. GİRİŞ .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2. KURAMSAL TEMELLER.....</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b><u>2.1. SİTOKİNLER .....</u></b>	<b><u>4</u></b>
2.1.1. GEBELİKTE SİTOKİNLER.....	4
<b><u>2.2. KLİNİKTE HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELER VE SİTOKİNLER .....</u></b>	<b><u>6</u></b>
2.2.1. <i>İN VİTRO</i> HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ALTERNATİF SİTOKİN KAYNAKLARI .....	8
<b><u>2.3. SİTOKİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ.....</u></b>	<b><u>9</u></b>
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b><u>13</u></b>
4.1. ÖRNEK SEÇİM KRİTERİ VE ÖRNEK TEMİNİ .....	13
4.2. KOLONİ OLUŞTURMA (CFU) TESTLERİ.....	13

<b>4.3. KK, MP VE AS'DEKİ SİTOKİN DÜZEYLERİNİN ELISA İLE SEROLOJİK OLARAK BELİRLENMESİ.....</b>	<b>15</b>
<b>4.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....</b>	<b>16</b>
<b><u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b>5.1. KOLONİ OLUŞTURMA TESTLERİ (CFU).....</b>	<b>17</b>
<b>5.2. HEMATOPOİETİK SİTOKİN KONSANTRASYONLARI.....</b>	<b>17</b>
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b><u>7. KAYNAKLAR .....</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>8. EKLER.....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b>EK-1: ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI.....</b>	<b>30</b>
<b><u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>	<b><u>32</u></b>
<b><u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR .....</u></b>	<b><u>35</u></b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. SCF ve G-CSF ELISA okumalarında SkanIt Software 4.1 (ver. 4.1.0.43) yazılımında oluşturulan standart eğri grafikleri..... 18

Şekil 2. AS, KKP ve MP'de ölçülen medyan SCF ve G-CSF sitokin düzeyleri. .... 19



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 20 elektif sezaryen doğumdan elde edilen AS, KKP ve MP'de ELISA ile belirlenen SCF ve G-CSF konsantrasyonları. .... 19



## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AS	Amniyon sıvısı
AÜTF KKB	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankası
BFU-E	Eritroblast oluşturan seri
CD	Başkalaşım Kümesi
CFU	Koloni oluşturan birim
CFU-GEMM	Granülosit, eritroid, makrofaj ve megakaryosit oluşturan seri
CFU-GM	Granülosit-makrofaj oluşturan seri
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
dk	Dakika
EDTA	etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FCS	Fetal sığır serumu
Flt-3L	FMS-Benzeri Tirozin Kinaz 3 Ligandı (FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand)
g	Yer çekimi sabiti
G-CSF	Granülosit - Koloni Stimüle Edici Faktör
GM-CSF	Granülosit Makrofaj - Koloni Stimüle Edici Faktör
HKH	Hematopoietik kök hücre
HSC	Hematopoietic stem cell
IFN $\gamma$	İnterferon-gamma
IL	İnterlökin
IMDM	Iscove modifiye Dulbecco'nun besiyeri

KHD ABD	Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
Kİ	Kemik iliği
KK	Kordon Kanı
KKP	Kordon kanı plazması
LTR	Uzun dönem popülasyon oluşturan hücreler
MK	Maternal kan
ml	Mililitre
MNC	Mononükleer hücre
MP	Maternal plazma
pg	Pikogram
PK	Çevre kanı
SCF	Kök hücre faktörü (Stem cell factor)
STR	Kısa dönem popülasyon oluşturan hücreler
TNF $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktör-alfa

## 1. GİRİŞ

Sitokinler, immün sistemde hücreler arası iletişimden sorumlu, immün sistem hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, aktivasyonu ve inaktivasyonunda rol oynayan küçük sinyal proteinleridir. Farklı immün süreçlerle ilişkili olarak salgılanan sitokinler otokrin ve/veya parakrin sinyal mekanizmalarıyla hücreler arası iletişimi sağlamaktan ve bağışıklık sisteminin orkestrasyonundan sorumludurlar (1, 2).

Sitokinler, sınırları çok net olmamakla beraber immün süreçlerdeki etkinliklerine göre üç ana başlık altında sınıflandırılırlar. Belirli bir etkene karşı immün cevabın tetiklenmesinde genel olarak pro-enflamatuvar/enflamatuvar sitokinler rol alırken anti-enflamatuvar sitokinler, hücresel faaliyetlerin baskılanması/düzenlenmesi ile immün sistemin regülasyonunda rol oynamaktadır. Kök Hücre Faktörü (SCF), Granülosit - Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF), Granülosit Makrofaj - Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF), İnterlökin (IL)-3 başlıca hematopoietik sitokinlerden olup, hematopoietik kök hücrelerin (HKH) proliferasyonunda veya olgun hücrelere farklılaşmasında etkindir. İmmün sistemde dinamik bir denge halinde olan sitokin düzeyleri, patojenle karşılaşma, hücresel stres, kanserleşme veya gebelikle ilişkili süreçlerde değişir (3).

Özellikle gebelik sürecindeki immün sistem yeniden yapılanması diğer süreçlerden farklı işlemektedir. Gebelikte immün mekanizmalar, maternal immün sisteminin büyük ölçüde baskılanması, fetusa tolerans gelişimi ve fetal immün sistemin gelişimi olarak ortaya çıkar. Maternal kanda (MK) genellikle belirli enflamatuvar sitokin düzeyleri azalırken, anti-enflamatuvar sitokin düzeylerinde artış gözlenir. Gebelik sürecinin sağlıklı olması immün sistemi dengeleyen bu sitokin düzeyleri ile yakından ilişkilidir (4). Maternal kan dolaşımı ile fetal kan dolaşımı arasındaki fizyolojik ve metabolik etkileşimler ve moleküllerin anne ile bebek arasındaki geçişleri kontrollü bir şekilde plasenta ve fetal membranlar aracılığıyla sağlanır. Bazı sitokinler, molekül büyüklükleri ve yapıları doğrultusunda plasentayı geçebilirken bazıları geçemez. Örneğin *Aaltonen ve ark.*'in çalışmasında bazı pro-enflamatuvar sitokinlerin plasentadan geçemediği gösterilmiş olup, *Calhoun ve ark.*'in çalışmasında G-CSF'nin plasentadaki reseptörüne bağlanma ihtiyacı olmaksızın plasentadan geçebildiği rapor edilmiştir (5, 6). Bu nedenle ve farklı immün yapılanma

süreçleriyle ilişkili olarak MK'da bulunan sitokin düzeyleri ile fetal dokularda bulunan sitokin düzeyleri farklıdır (3, 7).

Bu dokulardaki sitokinlerin düzeyleri sağlıklı bir gebelik süreci ile yakından ilişkilidir. Birçok çalışmada, farklı perinatal etiyojiler ile çeşitli pro-enflamatuvar/enflamatuvar sitokin düzeyleri arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (8-10). Hastalıklarla ilişkilendirilmelerinin yanı sıra, hematopoietik sitokinler gebelikle ve embriyonik gelişimle ilişkili biyolojik materyaller olarak da *in vitro* HKH kültürleri için kullanılan besiyeri ortamlarında destekleyici kaynaklar olarak ilgi görmektedir. Örneğin, geçmişten günümüze kadar süregelen birçok hücre kültürü ortamında Fetal Sığır Serum (FCS), yaygın bir şekilde destekleyici protein kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak, hayvansal bir protein kaynağı olan FCS, başta etik unsurlar olmak üzere birçok yönden dezavantajlı olması nedeniyle son yıllarda daha az tercih edilmeye başlamıştır. Günümüzde hayvansal kaynaklı sitokinlere alternatif olarak en çok kullanılan rekombinant insan proteinleri ise birçok yönden avantajlı olmasına rağmen, miktar/fiyat dengesi ve saklanma koşulları açısından dezavantajlıdır (11).

Fetal ve plasental çevreden elde edilebilecek HKH kaynaklarının *in vitro* kültürlerde destekleyici kullanımına dair çok az sayıda çalışma mevcuttur. Kİ kaynaklı HKH'lerin veya kordon kanı (KK) mezokimal hücrelerinin, amniyon sıvısı (AS) veya KK plazması (KKP) içeren sıvı besiyeri ortamında proliferasyonuna dair bazı sonuçlar rapor edilmiştir (12-16). Ancak çalışmalar bu araştırmalarla sınırlı kalmıştır.

Klinikte Kİ, mobilize çevre kanı (PK) ve KK, bağışıklık sistemi ve kan hastalıklarının tedavisi amacıyla kullanılan başlıca HKH kaynaklarıdır. KK; primitif HKH içeriği, kolay elde edilebilirliği ve kısmi doku uyumu ile naklinin mümkün olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. KK'nın klinik seçim kriterlerinin başında, içerdiği HKH sayısı ve bu hücrelerin erken/geç engrafman oluşturma yetenekleri gelmektedir. HKH'lerin erken engrafman kapasitesinin belirlenmesinde *in vitro* koloni oluşturma (CFU) testleri kabul görmüş bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Kİ çevre şartlarının taklit edildiği yarı-katı besiyeri ortamında HKH'lerin koloni oluşturma yeteneklerinin test edildiği bu yöntemde HKH'lerin farklı hücre serilerine farklılaşması, ortama eklenen hematopoietik sitokinler aracılığıyla yönlendirilmektedir. Bu sitokinler başlıca; HKH'lerin proliferasyonunda etkili

SCF; granülosit/makrofaj serilerine farklılaşmasını tetikleyen G-CSF, GM-CSF ve eritroid progenitörlere farklılaşmasında etkili eritropoietindir.

Bu veriler ışığında bu tez çalışmasında elektif sezaryen doğumlardan toplanan AS, KKP ve maternal plazmanın (MP) KK HKH'lerinin alternatif sitokin kaynakları olarak, erken dönem CFU oluşturma potansiyeline etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. İlaveten, en kritik hematopoez tetikleyici sitokinlerden olan SCF, G-CSF ve IL-3 düzeylerinin *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi ile belirlenmesi ve bahsi geçen farklı kaynaklar arası düzeylerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi de araştırmanın hedefleri arasındadır.



## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. SİTOKİNLER**

Sitokinler; immün yanıtta, hücreler arası iletişimde ve hematopoezde, aracı ve düzenleyici rol oynayan, protein yapıda küçük sinyal molekülleridir. Farklı hedef hücrelerle ve kendi aralarında olmak üzere, birden fazla hedefle etkileşerek süreçlerin aktivasyonu veya inhibisyonunda görev alırlar (17). Sitokinlerin immün sistem hücrelerinin proliferasyonuna ve farklılaşmasına etkileri moleküler düzeyde henüz tam olarak bilinmemekle beraber, hematopoezde HKH proliferasyonu, seçilimi ve farklılaşmasında hematopoietik sitokinlerin, immün sistem hücrelerinin aktivasyon ve/veya inaktivasyon dengesinin düzenlenmesinde ise pro-enflamatuvar/anti-enflamatuvar sitokinlerin rol oynadığı bilinmektedir. Bu sınıflandırma çok net bir çerçeveye sahip olmamakla birlikte, bu süreçler pro-enflamatuvar, anti-enflamatuvar ve hematopoietik sitokinlerin çevredeki konsantrasyonlarıyla ilişkilidir (18).

Başlıca hematopoietik sitokinler; Kök Hücre Faktörü (SCF), Granulocyte - Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte, Monocyte - Colony Stimulating Factor (GM-CSF), İnterlökin (IL)-3, FMS-Benzeri Tirozin Kinaz-3 Ligandı (Flt-3L), Eritropoietin ve Trombopoietin olarak bilinmektedir. Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF $\alpha$ ), İnterferon-gamma (IFN $\gamma$ ), IL-6, IL-8, IL-11, IL-12 ise bilinen pro-enflamatuvar/enflamatuvar sitokinlerden bazılarıdır (19).

Sitokinlerin insan vücut sıvılarındaki homeostatik konsantrasyonları normal koşullarda çok düşüktür; fakat patojenle karşılaşma, hücrel stres, kanserleşme gibi immün yanıtı tetikleyen durumlarda veya gebelik sürecindeki immün düzenlenmelerde ilgili süreçte rol oynayan sitokinlerin konsantrasyonlarında 1000 kata kadar artış olduğu bildirilmektedir (17, 20).

#### **2.1.1. GEBELİKTE SİTOKİNLER**

Gebelik sürecinde immün sistem düzenlemeleri, maternal immün sistemin büyük ölçüde baskılanması ve fetal immün sistem gelişimi şeklinde ortaya çıkar. Gebeliğin ilk evrelerinden doğuma kadar olan süreçte kan hacminin artmasına, belirli sitokinlerin



üretimindeki artışa veya baskılanmaya bağlı olarak sitokin konsantrasyonları dinamik bir değişim içerisinde (21, 22). Gebelik süreci, doğası gereği çeşitli immün sistem moleküllerinin dengesinde ileri düzey değişikliklerin gerçekleştiği önemli bir araştırma konusudur.

Anne ile fetus arasındaki fizyolojik ve metabolik etkileşimler, sitokinler aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak sağlanır. Maternal ve fetal kanda bulunan moleküllerin geçişi, plasenta ve fetal membranlar aracılığıyla molekül büyüklüklerine, yapılarına ve plazma konsantrasyonlarına göre düzenlenir. Bazı küçük sitokin molekülleri bu bariyerleri geçebilirken bazı sitokinler geçemezler, ancak plasental hücrelerle etkileşimleri aracılığıyla metabolik süreçte rol oynarlar. Örneğin, *Aaltonen ve ark.*'in çalışmasında pro-enflamatuvar sitokinlerden TNF $\alpha$ , IL-1beta ve IL-6'nın plasentadan geçemediği gösterilmiştir (5). *Calhoun ve ark.* tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise G-CSF'nin plasentayı geçebilen bir sitokin olduğu ispat edilmiştir (6). Bu nedenle, farklı immün yapılanma süreçleriyle ilişkili olarak, MK, plasenta, AS, KK ve fetal kandaki sitokinler farklı düzeylerde bulunur (3, 7).

MK, plasenta, fetal membranlar, AS, KK ve fetal kanda bulunan aktivatör ve inhibitör sitokin düzeyleri arasındaki denge önemlidir. Bu süreçte MK'da genellikle belirli pro-enflamatuvar/enflamatuvar sitokin düzeyleri azalırken, anti-enflamatuvar sitokinler ve hematopoezde rol oynayan hematopoitik sitokin düzeylerinde artış gözlenir (1). *Kraus ve ark.*'in 2010'da yayımladıkları bulgulara göre; 1., 2. ve 3. trimesterde ve doğum sonrasında MP'de gözlenen çeşitli büyüme faktörleri (Vasküler endotelial büyüme faktörü - VEGF), enflamatuvar (Tümör Nekrozis Faktör-alfa – TNF $\alpha$  ve İnterferon-gamma - IFN $\gamma$ ) ve hematopoitik sitokinlerden G-CSF'nin düzey değişimleri gösterilmiştir. Bu çalışmada gebeliğin başlangıcından doğuma kadar geçen süre boyunca, enflamatuvar sitokinlerden olan TNF $\alpha$  ve IFN $\gamma$ 'nın MP konsantrasyonlarında azalma olurken, G-CSF hematopoitik sitokin düzeyinde artış olduğu gözlenmektedir (21). Bu savı destekler nitelikte, *Burns ve ark.*'in 2015'te yayımladıkları çalışmada, gebeliğin üçüncü trimesterinde azalan enflamatuvar sitokin düzeyleri dikkat çekmektedir (7).

Gebelik sürecinin sağlıklı olması, immün sistemi dengeleyen sitokinlerin düzeyleri ile yakından ilişkilidir (4). Birçok çalışmada gebelikte belirli sitokin düzeyleri ile erken

doğum, tekrarlayan düşükler, gelişim geriliği, gebelik diyabeti, preeklampsi, kronik akciğer hastalığı, otizm gibi birçok hastalık arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Gebelikte maternal plazma/serum, KKP, AS veya fetal membranlardaki sitokin düzeylerinin belirli hastalıkların etiolojisinde rol oynadığına dair veriler bir dekadı aşkın süredir mevcuttur (9).

Gebelik sürecinde değişen sitokin düzeyleri, hastalıklarla ilişkilendirilmenin yanı sıra *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında hematopoietik sitokin kaynağı olarak da dikkat çekmektedir. Gebelikte hematopoietik sitokinlerin araştırıldığı çalışma sayısı çok az olmakla birlikte MP, KKP ve AS'de hematopoietik sitokinlerin araştırıldığı çalışmalar GM-CSF ve G-CSF ile sınırlı kalmaktadır ve bu araştırmalarda sunulan veriler arasında yüksek farklılıklar saptanması nedeniyle güçlü bir karşılaştırma sağlanamamaktadır (7, 8, 21). Seçilen örneklem grubunun heterojen olması, bu durumun olası nedenlerinden biridir. Bunu destekler nitelikte vajinal ve sezaryen doğumlarda sitokin düzeyleri arasında fark bulunduğu dair yayımlanmış sınırlı veri mevcuttur (8). Bugüne kadar MP, KK ve AS'de SCF düzeylerinin karşılaştırmalı olarak rapor edildiği bir çalışma ise bilgimiz dahilinde henüz gerçekleştirilmemiştir.

Klinik araştırma ve uygulamalarda önemli yeri olan *in vitro* çalışmalarda etkin kullanılacak alternatif sitokin kaynaklarının belirlenerek hematopoietik sitokin içeriklerinin aydınlatılması önem taşımaktadır.

## **2.2. KLİNİKTE HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELER VE SİTOKİNLER**

Kök hücreler, yaşam süreleri boyunca kendilerini çoğaltabilme, olgun, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme ve buldukları dokuları yenileyebilme özelliklerine sahip hücrelerdir. İmmün sistemi oluşturan hücreler, büyük ölçüde farklılaşmamış, pluripotent özellikte, kemik iliği (Kİ) çevresinde ve dolaşımında bulunan HKH'lerden köken alırlar (23).

Başlıca Kİ, PK ve doğum esnasında toplanan göbek KK kaynaklı elde edilebilen HKH'ler, günümüzde birçok farklı hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Kİ ve mobilize PK'dan farklı olarak; KK, erken progenitör hücre içeriği, nakil için kısmi doku uyumunun yeterli kabul edilebilmesi, girişimsel yöntemle ihtiyaç duyulmaksızın toplanabilmesi gibi birçok avantajı nedeniyle tercih edilen bir kaynak haline gelmiştir (24, 25).

KK klinik seçim kriterlerinin başında, akım sitometrik olarak CD45dim CD34<sup>+</sup> fenotipindeki HKH'lerin mutlak sayısı ve nakledilen hücrelerin engrafman yeteneği gelmektedir. Başarılı bir nakil için KK ünitesinin hastanın ağırlığına oranla belirli sayıda CD34<sup>+</sup> hücre içermesi gerekmektedir. KK, hacminin az olması, dolayısıyla içeriğindeki CD34<sup>+</sup> HKH sayısının düşük olması nedeniyle, özellikle 50 kilogramın üzerindeki hastalar için tek bir KK ünitesi yeterli olamamaktadır. Bu duruma çözüm arayışı olarak CD34<sup>+</sup> HKH'lerin *in vitro* ekspansiyonu gündeme gelmiş ve ekspande edilen CD34<sup>+</sup> hücrelerde yapılan klinik denemelerde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yakın zamanda büyük ölçekte, klinik uygulamalara yönelik ekspansiyon sistemleri geliştirilmiş olup bu yönde araştırmalar hız kazanmıştır (26-30).

Bunun yanı sıra, KK CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonu, farklı engrafman kapasitesine sahip hücreler açısından da çeşitlilik göstermektedir. KK ünitesi kısa ve uzun dönemli (sırasıyla, *short term repopulating-STR*, *long term repopulating-LTR*) immün yapılanma kapasitesi olan iki tip progenitör hücre grubu içermektedir. Farklı HKH tiplerinin *in vivo* fonksiyonlarını belirlemek amacıyla en sık kullanılan yöntem *in vitro Colony-Forming Unit* (CFU) testleridir. Bu testler, yarı katı besiyerinde üreyen farklı özellikte ve farklılaşma evresindeki HKH'lerin STR engrafman kapasitelerinin kantitatif/semi-kantitatif değerlendirilmelerine olanak sağlamaktadır. CFU testlerin prensibi Kİ çevre şartlarının *in vitro* sağlanarak HKH'lerin olgunlaşmış immün sistem hücrelerine farklılaşma ve koloni oluşturma yeteneklerinin belirlenmesine dayanır. Kültür ortamında oluşan koloniler, temelde granülosit-makrofaj oluşturan seri (CFU-GM); granülosit, eritroid, makrofaj ve megakaryosit oluşturan seri (CFU-GEMM) ve eritroblast oluşturan seri (BFU-E) olmak üzere 3 farklı grupta değerlendirilir. CFU-GM, engrafman başarısını gösteren temel hücre grubu olarak düşünülmektedir (31-33).

HKH'lerin *in vitro* proliferasyonunda ve CFU oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde, hücrelerin kendini yenileme veya farklılaşma süreçleri kültür ortamına eklenen hematopietik sitokin karışımları ile kontrol edilir. Sitokinlerin karmaşık pleiotropik etkileşimleri tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, KK HKH proliferasyonunda ve engrafmanında rol oynayan temel sitokinler SCF, G-CSF, IL-3 ve Flt-3L olarak bilinmektedir (34).

Nakil amaçlı kullanılacak HKH'lerin engraftman yeteneğinin test edilmesi ve *in vitro* CD34<sup>+</sup> HKH ekspansiyon aşamaları kritik öneme sahiptir. Bu süreçlerde kullanılan sitokin çeşitleri ve elde edildikleri kaynaklar, *in vitro* etkinlikleri ve nakil aşamasında güvenilirlikleri yönünden önemlidir. Sadece HKH kültürlerinde değil, birçok *in vitro* hücre kültürü için besiyeri ortamına dışarıdan eklenen sitokinlerin ve diğer proteinlerin çeşidi ve miktarı testlerin etkinliği açısından kritiktir.

### **2.2.1. İN VİTRO HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ALTERNATİF SİTOKİN KAYNAKLARI**

HKH kültürleri dâhil bütün *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında, sitokinlerin ve hücrelerel etkileşimlerde rol oynayan proteinlerin seçimi ve optimal konsantrasyonlarının sağlanması önemlidir.

Gebelikle ilişkili biyolojik materyallerde immün sistem yapılanmasıyla ilişkili olarak hematopoietik sitokin seviyelerinin önemli ölçüde artış göstermektedir. Örneğin, fetal bir materyal olarak FCS, geçmişten günümüze hücre kültürü çalışmalarında protein kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, hayvansal bir kaynak olan FCS, başta eldesinin etik açıdan sakıncaları olmak üzere, hücre kültür ortamlarında konsantrasyonunun optimizasyonuna dair güçlükler ve insan hücrelerine olası toksik etkileri nedeniyle son yıllarda daha az tercih edilmektedir.

Günümüzde özellikle klinik uygulamalara yönelik yapılan Kİ, PK ve KK kaynaklı kök hücrelerin *in vitro* proliferasyonu ve farklılaşması yönündeki çalışmalarda en yaygın kullanılan sitokin kaynakları, ticari olarak temin edilebilen rekombinant sitokin karışımlarıdır. Rekombinant sitokinler, ilgilenilen proteinin sentezinden sorumlu genin maya, bakteri veya memeli hücrelerine klonlanarak ilgili proteinin üretimi ve saflaştırılması ile kullanıma hazır halde ticari olarak elde edilebilmektedir. FCS gibi hayvansal kaynaklara kıyasla birçok yönden avantaj sağlayan rekombinant sitokinler, üretimlerinin az miktarlarda yapıyor olması, düşük miktar/fiyat oranları ve saklama koşulları yönünden dezavantajlıdır. Bu dezavantajlar araştırmacıları sitokinler açısından zengin *in house* kaynak/molekül arayışına yöneltmiştir (11).

Alternatif biyolojik bir kaynak olarak AS'nin araştırıldığı bir çalışmada, AS'nin fare Kİ HKH ekspansiyonuna ve hücrelerin uzun dönem engraftman kapasitesine olumlu etkileri gösterilmiştir. Bu çalışma, AS'nin düşük miktarda SCF ile birlikte besiyerine eklendiğinde HKH farklılaşmasını engelleyerek proliferasyonunu ve uzun dönem engraftman potansiyelini artırdığını gösteren ilk ve tek çalışmadır. AS'nin HKH kültürüne etkilerinin araştırılması bu çalışmayla sınırlı kalmıştır (12).

Başka bir çalışmada ise alternatif sitokin kaynağı olarak KKP, Kİ kaynaklı progenitör hücrelerin *in vitro* proliferasyonuna ve farklılaşmasına etkisi yönünden incelenmiştir. Bu çalışmada Kİ progenitör kök hücrelerinin, KKP ile zenginleştirilmiş minimal besiyeri ortamında 2000 kata kadar ekspansiyonu ve uygun koşullarda adipositlere farklılaşmasındaki başarısı rapor edilmiştir (13). Bu çalışmayı takiben; 2009'da *Jung ve ark.*, mezenkimal stromal hücre kültüründe; 2013'te *Ding ve ark.* ve 2014'te ise *Pereira ve ark.*, KK kaynaklı mezenkimal kök hücre kültüründe KKP'nin hücre proliferasyon ve farklılaşmasına etkisini göstermişlerdir (14-16).

Gebelikte MP protein konsantrasyonları ise, birçok farklı özellik açısından araştırılmıştır. Ancak çalışmalar genellikle yukarıda bahsedildiği üzere enflamatuvar sitokin düzeylerinin doğumsal anomaliler ve hastalıklarla ilişkisini araştırmakla sınırlı kalmış olup MP'nin *in vitro* HKH kültürünü destekleyici potansiyeline dair veri bulunmamaktadır.

### **2.3. SİTOKİN DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Sitokinlerin farklı kaynaklara ait plazma örneklerindeki konsantrasyonlarını belirlemeye yönelik uygun yöntemin seçilmesi, sitokin kaynaklarının HKH kültürlerinde olası kullanımının doğru yorumlanmasında büyük önem taşımaktadır. Dolaşımda ve KK'daki sitokin miktarlarının çok az olması nedeniyle yapılan ölçüm metotlarının yüksek duyarlılıkta olması gerekmektedir. Sitokin belirlemede kullanılan başlıca standart yöntemler, ELISA, *Enzyme-Linked Immuno Spot Assay* (ELISPOT) ve benzer temelde gerçekleşen etkili serolojik yöntemlerdir. Sitokin düzeylerinin belirlenmesine yönelik 2 dekadı aşkın zamandır kullanılan ELISA temelli yöntemlerin, sitokinlerin aktif ve inaktif formlarını ayırt edebilme avantajları mevcuttur (17). Amaca yönelik farklı çalışma prensipleri arasından direkt (sandviç) ELISA yöntemi, yüksek molekül ağırlıklı protein konsantrasyonlarının ölçümünde hassas duyarlılığa sahip bir yöntem olarak literatürde

yerini almış bulunmaktadır. Geçmişten bugüne anne-bebek sağlığının plazma veya AS sitokin düzeyleri ile ilişkisinin araştırılmasında temel, güvenilir bir yöntem olarak direkt (sandviç) ELISA testleri kullanılmaktadır (21, 35-37).

Testin temel çalışma prensibi şu şekildedir: Araştırılan proteine özgün monoklonal antikor önceden ELISA plağının tabanına kaplanır. Plağa araştırılan örnekler ve farklı kuyucuklara ilgili protein konsantrasyonu bilinen, seri dilüsyonlar halinde hazırlanmış standartlar eklenir. Bu şekilde aranan ilgili proteinin tabandaki antikorlar ile bağlanması sağlanır. Plak yıkılarak bağlanmayan diğer moleküller ortamdan uzaklaştırılır. Akabinde plağa eklenen, önceden enzim bağlanarak modifiye edilmiş poliklonal antikorların araştırılan proteine, iki antikorun arasında hapsedecek şekilde bağlanması sağlanır. Bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak üzere yıkama işlemini takiben ortama antikora bağlanmış enzimle reaksiyona girecek olan substrat eklenir. Reaksiyon, renk değişimi ile sonuçlanır. Enzim aktivitesinin yoğunluğuna göre elde edilen rengin spektrumu aranan proteinin miktarı hakkında bilgi verir. Ölçüm, spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilerek protein içeriği bilinen, seri dilüsyonlar halinde ölçülen standarttan elde edilen sonuçlar doğrultusunda standart eğri grafiği oluşturulur. Protein içeriği araştırılan örneğin ışığa verdiği dalga boyu, oluşturulan standart eğri grafiğinin fonksiyonel denkleminde hesaplanarak ilgili protein konsantrasyonu elde edilir (38).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Sitokinler, immün sistemin uygun işlemeden sorumlu olan, çeşitli sağlık/hastalık durumları ile direkt/dolaylı ilişkileri açısından araştırılan, hücre etkileşimi sayesinde etki gösteren önemli, sayıları her geçen gün artan moleküllerdir. Fizyolojik rollerinin yanı sıra *in vitro* hücre kültürlerinde de, hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve aktivasyonu gibi çeşitli süreçleri kontrol etmek amacıyla kullanılan moleküller olarak ilgi konusu olarak öneme sahiptir. Pahalı ve zor elde edilebilir kaynaklar olmaları nedeniyle, aynı işlevleri görebilecek alternatif biyolojik kaynak arayışı söz konusudur. Örneğin, *in vitro* HKH kültürlerinde temel olarak kullanılan hayvansal kaynaklı fetusa ait FCS yerine alternatif sitokin kaynakların araştırılması sonucunda rekombinant sitokinler kullanımı gündeme gelmiştir. Ancak yüksek maliyetli, eldesi ve saklanması açısından dezavantajlı olan bu ürünlerin klinik araştırmalarda ve uygulamalarda kullanım potansiyeli düşüktür (11).

Günümüzde birçok farklı hastalığın tedavisinde kullanılma potansiyeli taşıyan HKH'ler, başlıca Kİ, PK ve KK kaynaklıdır. Son yıllarda KK, büyük oranda farklılaşmamış HKH içeriği, kısmi doku uyumunun nakilde yeterli olması, kolay elde edilebilirliği gibi avantajları nedeniyle nakillerde tercih edilen bir HKH kaynağı haline gelmiştir (39). Kİ, PK ve KK, HKH içerikleri nedeniyle alternatif sitokin kaynağı olarak da ilgi çekicidir. Bununla birlikte, bahsi geçen kaynakların sitokin seviyelerinin belirlendiği veya sitokin içeriklerinin *in vitro* sistemlerde hücre kültürlerini destekleyici olarak kullanımlarına dair bilimsel veri yok denecek kadar azdır.

AS'nin, besiyeri ortamında hücreleri destekleyici materyal olarak Kİ progenitörlerinin proliferasyonu ve farklılaşmasına etkileri ilk kez 2004 yılında rapor edilmiştir (12). KK plazması ile ilgili ise literatürde bulunan dört çalışma, bu kaynağın yalnızca Kİ progenitör hücreleri ve mezenkimal kök hücre kültürleri üzerine etkisinin araştırıldığı yayınlarda toplanmıştır (13-16). AS kaynaklı kök hücrelerin biyolojisi ve tedavi edici etkinlikleri araştırılmakla birlikte, bu tez çalışmasının birincil konusu olan HKH CFU oluşturma kapasitesine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde, bilginiz dahilinde AS, KKP veya MP'nin KK kaynaklı HKH *in vitro* kültür sistemlerindeki etkisi de henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmalarda kullanılan sitokin kaynaklarının çeşitliliği,

konsantrasyonları ve etkinliklerinin hematopoietik sitokin düzeyleri ile ilişkilendirilmesine dair veri bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasının hedeflerinden biri, elektif sezaryen doğumlardan elde edilen AS, KKP ve MP'nin, alternatif sitokin kaynakları olarak KK HKH'lerinin erken dönem CFU oluşturma kapasitelerine olası etkilerinin araştırılmasıdır. Öte yandan bu alternatif sitokin kaynaklarının *in vitro* kullanımda optimize edilebilmesi amacıyla sitokin içeriklerinin belirlenmesi de kritik önem taşımaktadır. Literatürde, bu konuyla ilgili olarak serolojik veya moleküler yöntemlerin kullanıldığı az sayıdaki çalışmada AS, KKP veya MP'de G-CSF veya GM-CSF düzeyleri rapor edilmiştir (6, 8, 21). Ancak bu çalışmalarda sunulan veriler arasında büyük farklılıklar mevcuttur ve heterojen örneklem popülasyonları nedeniyle bütünlük teşkil etmemektedir. Ayrıca, bu üç farklı kaynağın hematopoietik sitokin içerikleri açısından karşılaştırıldıkları bir veri analizi de mevcut değildir. Bilgimiz dahilinde gebelikle ilişkili örneklerde SCF düzeylerinin karşılaştırmalı olarak araştırıldığı bir çalışma ise henüz gerçekleştirilmemiştir.

Bu verilerden yola çıkarak, bu tez çalışmasının bir başka hedefi de alternatif sitokin kaynakları olarak AS, KKP ve MP'de en kritik hematopoez tetikleyici sitokinlerden olan SCF IL-3 ve G-CSF düzeylerinin *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi ile belirlenmesidir. Daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak bu çalışma, sitokin düzeylerini etkileyebilecek olan farklı gebelik sonlandırma süreçlerinden bağımsız olarak yalnızca elektif sezaryen gebeliklerden toplanan klinik materyallerin değerlendirileceği şekilde planlanmıştır.

Bu çalışmanın aynı zamanda ileride klinik tedavi amaçlı *in vitro* HKH ekspansiyon uygulamalarında kullanıma girebilecek, gerekli yüksek miktarlarda hematopoietik sitokin desteği için en uygun kaynağın saptanmasına öncülük edebilecek bir çalışma olması amaçlanmaktadır.



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. ÖRNEK SEÇİM KRİTERİ VE ÖRNEK TEMİNİ

Araştırma kapsamı için, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar tarafından 22.02.2016 tarihli ve 04-120-16 numaralı karar ile Etik Kurul onayı verilmiştir. Çalışmaya, 35 hafta gebeliği takiben Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankası'na (AÜTF KKB) başvuran, bilgilendirilmiş onam vererek sağlık öyküsü anket formu dolduran 20 gönüllü dahil edildi. 11'i Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda (KHD ABD), 9'u Hacettepe Üniversitesi KHD ABD'de takip edilen elektif sezaryen gebeliklerden; doğum öncesinde MK, doğum sırasında ise KK ve AS toplandı.

MK, doğumdan 1-3 saat önce, 4 adet etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüpe yaklaşık 16 ml hacimde alındı. Bir tüp MK'dan lökosit sayımı, Siemens ADVIA 2120i tam kan sayım cihazında (Siemens Healthcare Diagnostic Inc.) gerçekleştirildi. Ameliyathaneye alınan gönüllü vericilerden steril enjektörle 8-15 ml AS toplanmasını takiben, doğum gerçekleştikten sonra 3 adet EDTA'lı tüpe (12 ml) ve rutin kullanımda olan pediatrik kan torbasına (KANSUK, Katalog No: 1KN0062040) *in utero* KK toplandı.

Örneklerin toplanmasını takiben 30 dk içerisinde istenmeyen doku ve hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla AS, 3000 g'de 10 dk santrifüj edildi. MK ve KK'dan hücre sayım işlemlerinde kullanılmak üzere 1'er tüp ayrıldıktan sonra 1300 g'de 15 dk santrifüj edilerek plazma ayrımı gerçekleştirildi. Yedi gönüllüye ait 1'er ml MP, KKP ve AS, CFU testlerinde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan örnekler, ileride sitokin içerikleri belirlenmek amacıyla ELISA deneylerinde kullanılmak üzere, 2ml'lik vidalı kapaklı kriyo tüplere (Greiner bio-one) bölünerek -30 °C'de saklamaya alındı.

### 4.2. KOLONİ OLUŞTURMA (CFU) TESTLERİ

Toplanan MP, KK ve AS'nin KK koloni oluşturma potansiyeline etkilerini belirlemek amacıyla, her verici için kendi KK hücreleri kullanılarak CFU testleri gerçekleştirildi. Her bir CFU deneyi için, toplandığı gün içerisinde işlenmemiş KK torbasından 1,5 ml KK alınarak, % 2 FBS içeren Iscove Modifiye Dulbecco Besiyeri (IMDM) (StemCell

Technologies, Katalog No: 7700) ile 1:2 oranında sulandırıldı. Eritrositlerin uzaklaştırılarak mononükleer hücre (MNC) süspansiyonu elde edilmesi amacıyla, 2 ml sulandırılmış KK içerisine 400 µl HetaSep (StemCell Technologies, Katalog No: 7806) eklendi. 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub>’li ve nemli inkübatörde (Sanyo /CO<sub>2</sub> Incubator / MCO-18AIC) 20 dk eritrositlerin çökmesi beklendi. İnkübasyon sonrasında süpernatant ayrı bir tüpe alınarak *Neubauer* lamında MNC sayımı gerçekleştirildi. *Neubauer* ile hücre sayımı için, 20 µl hücre süspansiyonu, 480 µl metilen mavisi (%3 asetik asit) (StemCell Technologies, Katalog No: 7060) ile sulandırılarak elde edilen süspansiyondan 10 µl *Neubauer* lamı ile lamel arasına pipetlendi. *Neubauer* lamında, lökosit sayımına uygun alanlardaki hücreler, *inverted* ışık mikroskopunda (Olympus/IX51) 10x ve/veya 20x objektiflerde sayıldı. Hücre konsantrasyonu, dört farklı alanda yapılan hücre sayımının ortalaması baz alınarak hesaplandı. Bir alandaki hücre sayısına göre konsantrasyon hesaplaması aşağıdaki formül ile gerçekleştirildi.

$$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \times \text{Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırma Katsayısı} = \text{Hücre/mm}^3 = \text{Hücre/}\mu\text{l}$$

CFU besiyerine ekilecek MNC süspansiyonu, %2 FBS içeren IMDM ile sulandırılarak 1-5x10<sup>5</sup> hücre/ml konsantrasyonda hazırlandı. 300 µl hücre süspansiyonu; KKP, MP ve AS’nin seri dilüsyonları ile veya yalnızca %2 FBS içeren IMDM ile hazırlanmış olan 3 ml sitokinsiz MethoCult (StemCell Technologies, Katalog No: H4230) yarı-katı besiyerine eklendi. Zengin ticari sitokin içerikli kontrol grubu olarak ise; AÜTF KKB’de rutin olarak *in vitro* CFU-GM analizi için kullanılan MethoCult *Enriched w/o EPO* (StemCell Technologies, Katalog no: H4535) besiyerine, deney gruplarıyla aynı sayıda hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücre-besiyeri karışımı, homojenize edilmek amacıyla vortekslendikten sonra, 3 ml’lik enjektör (StemCell Technologies, Katalog No: 28110) ve 16 *gauge* iğne (StemCell Technologies, Katalog No: 28110) aracılığıyla 35 mm’lik hücre kültür plaklarına (StemCell Technologies, Katalog No: 27100) 1,1’er ml olacak şekilde ekildi. Hücre kültürleri, 14 gün süre ile 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> içeren %95 nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. 14 günün sonunda, kültür plaklarında oluşması beklenen kolonilerin sayısal ve morfolojik değerlendirmeleri, *inverted* ışık mikroskopunda (4x ve 10x objektiflerde) gerçekleştirildi.

### 4.3. KK, MP VE AS'DEKİ SİTOKİN DÜZEYLERİNİN ELISA İLE SEROLOJİK OLARAK BELİRLENMESİ

Çalışmaya dahil edilen toplam yirmi vericiye ait MP, KKP ve AS örneklerindeki *Human SCF Immunoassay* (Katalog no: DCK00), *Human G-CSF Immunoassay* (Katalog no: DCS50) ve *Human IL-3 Immunoassay* (Katalog no: D3000) düzeyleri Quantikine® ELISA ile serolojik olarak araştırıldı. Bununla birlikte AÜTF KKB'de CD34<sup>+</sup> HKH ekspansiyonu deneylerinin rutin testlerinde kullanılan CC100 rekombinant sitokin kokteylindeki (StemCell Technologies, Katalog No: 02690) SCF, G-CSF ve IL-3 sitokin düzeyleri de yine aynı yöntem kullanılarak belirlendi. ELISA kiti ile birlikte temin edilen standartlar ve tüm çalışma gruplarına ait örnekler duplike test edildi. Üreticinin önerileri doğrultusunda uygulanan protokolün detayları aşağıda verilmektedir.

1. Tüm reaktifler ve örnekler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Serum ve plazma örnekleri için her bir kuyucuğa 100 µl (IL-3 testi için 50 µl) *Assay Diluent* eklendi.
3. Her kuyucuğa 100 µl standart (IL-3 testi için 200 µl) ve örnekler eklendikten sonra yapışkan ELISA kapağı ile örtülerek iki saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuk aspire edilerek yıkandı. Üretici firma tarafından sağlanan 400 µl *Wash Buffer* ile yapılan yıkama işlemi, toplamda 3 yıkama olacak şekilde tekrar edildi.
5. Son yıkamadan sonra mikropalak ters çevrilerek temiz bir kurutma kağıdı üzerine hafifçe vurularak kurutuldu.
6. Her kuyucuğa 200 µl uygun insan konjugatı eklendi. Yeni bir yapışkan kapakla kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrasında, dördüncü basamakta anlatılan aspirasyon ve yıkama işlemleri tekrar edildi.
8. Her kuyucuğa 200 µl *Substrate Solution* eklenerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 50 µL *Stop Solution* eklendi.
10. Kuyucuktaki renk, maviden sarıya döndükten sonra 450 nm'de (540 nm doğrulama dalga boyunda) optik yoğunluk ölçümü yapıldı.

Direkt (sandviç) ELISA prensibine göre optimize edilmiş olan kitlerin üretici tarafından belirtilen minimum ölçüm duyarlılık sınırları aşağıda belirtildiği gibidir:

- SCF < 9 pg/ml
- G-CSF < 20 pg/ml
- IL-3 < 7,4 pg/ml

ELISA plak okuyucusunda (Multiskan GO, Thermo Scientific) gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler, SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers RE (ver. 4.1.0.43) yazılımı ile analiz edildi.

#### **4.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

İstatistiksel analizler SPSS 11.5 for Windows programında gerçekleştirildi. Değişkenler arasındaki ilişki, *Spearman* korelasyon katsayısı yardımıyla hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi 0,05 olarak kabul edildi.

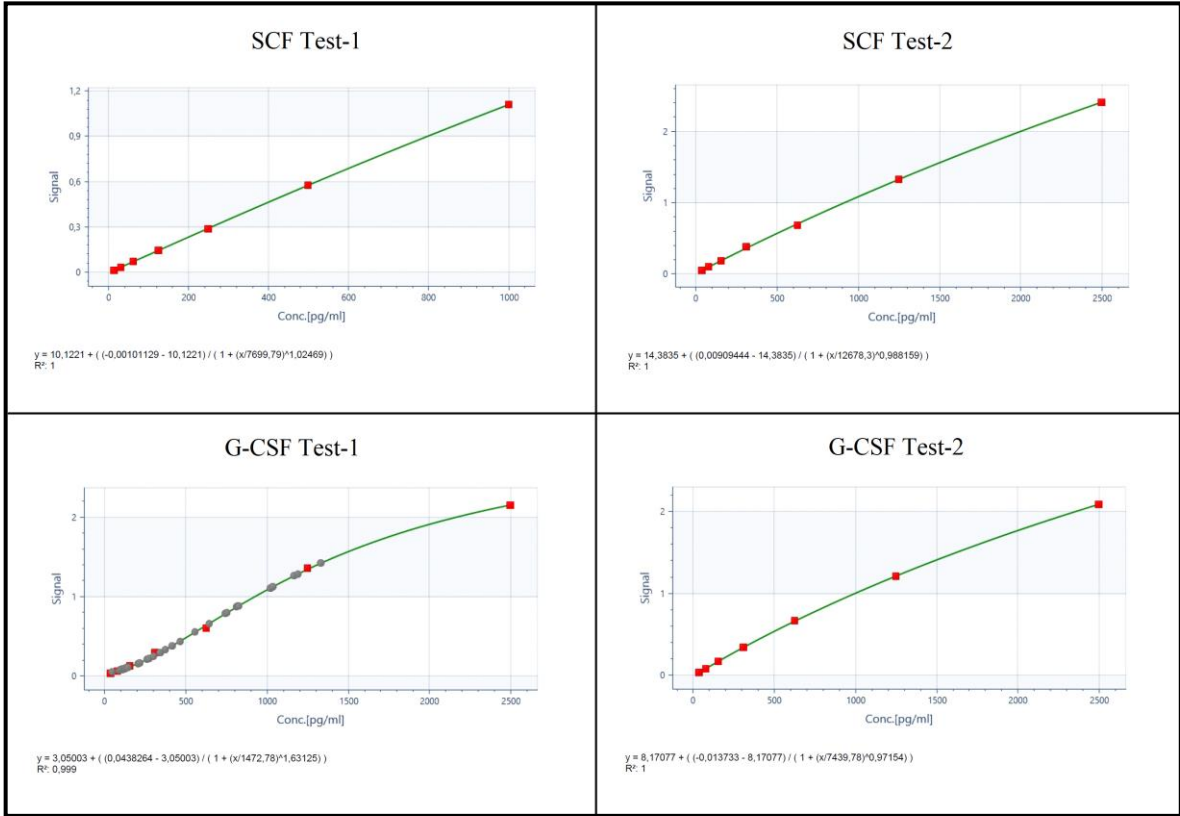
## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. KOLONİ OLUŞTURMA TESTLERİ (CFU)

Çalışmaya dahil edilen 20 elektif sezaryen olgusundan yedisinde taze KK ünitesine ait HKH'lerin, MP, KKP, AS varlığında sitokin içermeyen *MethoCult* besiyerine (StemCell Technologies, Katalog No: H4230) veya zengin *MethoCult* besiyerine (StemCell Technologies, Katalog no: H4535) ekimlerini takiben 14 gün inkübasyon sonunda, koloni oluşumları *inverted* mikroskop altında takip edildi. Zengin besiyerlerinde koloni oluşumu gözlenirken deney gruplarında beklenenden çok az sayıda koloni gözlemlendi veya hiç koloni oluşumuna rastlanmadı. Örneklerin CFU oluşumuna yeterli etki göstermemesi nedeniyle kalan 13 KK ünitesinde CFU testi gerçekleştirilmedi.

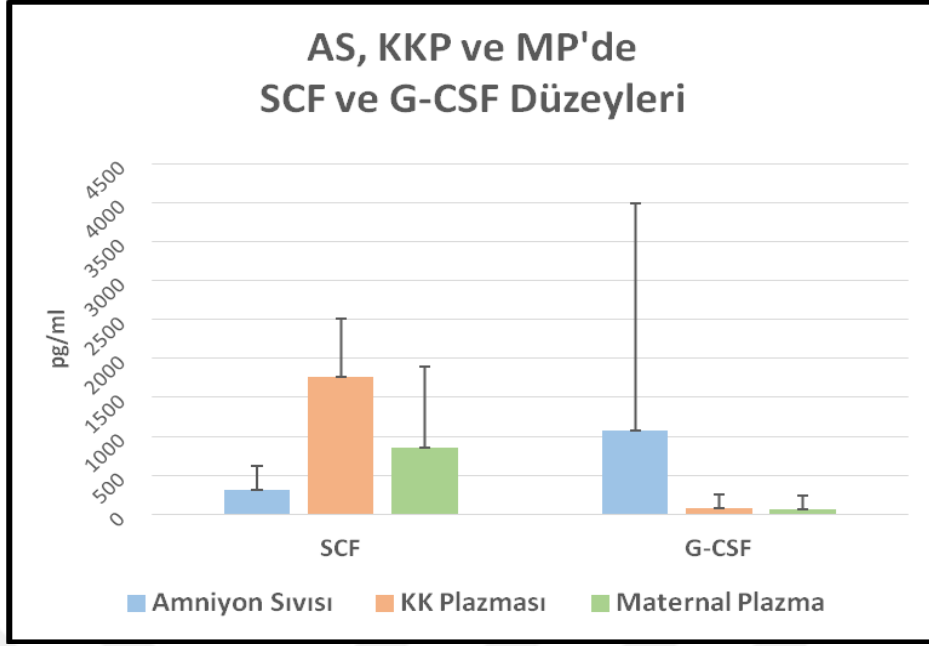
### 5.2. HEMATOPOİETİK SİTOKİN KONSANTRASYONLARI

Yirmi elektif sezaryen doğumdan toplanan AS, MP ve KKP'de; ilaveten AÜTF KKB'de HKH ekspansiyonunda kullanılan ticari sitokin kokteylinde (StemCell Technologies, Katalog No: 02690) SCF ve G-CSF hematopoietik sitokin düzeyleri, ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. IL-3 düzeyleri ise yalnızca 11 olguda test edilmiştir. SCF ve G-CSF için duplike test sonucu elde edilen standart eğriler, Şekil 1'de verilmektedir. Tüm olgulardaki deney gruplarına ait duplike örneklerden elde edilen veriler, SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers RE (ver. 4.1.0.43) yazılımı ile otomatik hesaplanmıştır.



Şekil 1. SCF ve G-CSF ELISA okumalarında SkanIt Software 4.1 (ver. 4.1.0.43) yazılımında oluşturulan standart eğri grafikleri.

AS, KKP ve MP deney grupları arasında en yüksek SCF konsantrasyonu KKP’de gözlenmiştir (1.761 pg/ml; aralık: 1.089-2.514 pg/ml). MP’de 530-1.889 pg/ml aralığında, ortanca 852 pg/ml konsantrasyonda SCF belirlenmiştir. Örnek grupları arasında en az SCF düzeyi, AS’de tespit edilmiştir (309 pg/ml; aralık: 110-622 pg/ml). HKH ekspansiyonunda kullanılan ticari sitokin kokteylinin (StemCell Technologies, Katalog No: 02690) 1 ml kültür için önerilen miktarında (3,3 µl/ml) ise, 30.970 pg/ml SCF tespit edilmiştir. AS, en yüksek G-CSF konsantrasyonuna (1.068 pg/ml; aralık: 613-3.996 pg/ml) sahip deney grubunu oluşturmaktadır (Şekil 2). KKP ve MP’de ise sırasıyla, 85 (45-249) pg/ml ve 62 (44-237) pg/ml G-CSF saptanmış olup MP ve KKP’deki G-CSF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,458$ ). IL-3 düzeyleri, ticari sitokin kokteyli dahil tüm gruplarda minimum değer altında gözlenmiştir. Tüm olgulara ait doğum öncesi MK lökosit sayıları ve örneklerde gözlemlenen SCF ve G-CSF konsantrasyonları Çizelge 1’de sunulmaktadır.



Şekil 2. AS, KKP ve MP'de ölçülen medyan SCF ve G-CSF sitokin düzeyleri.

Çizelge 1. 20 elektif sezaryen doğumdan elde edilen AS, KKP ve MP'de ELISA ile belirlenen SCF ve G-CSF konsantrasyonları.

Olgular	Maternal lökosit sayısı (x10 <sup>6</sup> h/ml)	SCF (pg/ml)			G-CSF (pg/ml)		
		AS	KKP	MP	AS	KKP	MP
1	10,9	324	1.908	785	1.418	97	56
2	14,3	622	1.292	530	1.564	118	56
3	8,5	171	1.635	945	977	84	97
4	13,1	168	1.461	779	970	178	106
5	11,0	110	1.435	856	1.754	249	237
6	8,7	280	1.610	748	866	118	46
7	9,6	225	1.204	573	1.390	87	109
8	10,4	133	1.422	1.061	613	188	177
9	10,3	169	1.989	985	1.238	121	120
10	12,2	422	2.180	803	727	85	47
11	7,0	517	1.089	1.889	1.159	68	57
12	8,3	293	2.514	806	859	48	62
13	13,6	466	1.752	847	961	45	44
14	10,1	337	1.605	836	1.537	81	61
15	16,4	262	2.138	809	2.060	57	48
16	11,4	602	2.014	1.006	852	80	70
17	11,1	289	2.304	1.047	973	72	47
18	9,0	432	1.769	952	3.996	95	53
19	9,6	327	1.854	972	681	80	74
20	10,0	347	1.810	1.143	2.318	62	100

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kök hücreler yaşamın tüm evrelerinde çeşitli kaynaklardan elde edilebilen önemli hücrelerdir. İnsan HKH'sinin başta Kİ olmak üzere PK ve KK'da yoğun bir şekilde bulunduğu uzun süredir bilinen bir gerçektir. KK'daki HKH miktarı hematopoezi tetikleyen G-CSF gibi sitokinlerle uyarılmış PK'dakine eşdeğer miktarlardadır. Günümüzde farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere yeterli miktarda HKH elde etmek ve HKH nakli sonrası engrafman başarısını arttırmak başta olmak üzere HKH'lerin *in vitro* koşullarda manipülasyonları yaygın laboratuvar uygulamaları haline gelmiştir. Bu uygulamaların temelini ise HKH kültürleri teşkil etmektedir. Çeşitli destekleyici sitokin ve büyüme faktörleri kullanılarak gerçekleştirilen kültürler sayesinde HKH ekspansiyonu ve farklılaşması sağlanabilmektedir. HKH kültürlerinde kullanılan pahalı, eldesi ve saklama koşulları zor olan rekombinant sitokinlere alternatif fizyolojik kaynakların belirlenmesi gündeme gelmiştir ve araştırılan kaynaklardaki hematopoezde rol oynayan sitokinlerin düzey analizi bu açıdan önem taşımaktadır (11).

Sınırlı sayıda araştırmada, KK, MK ve AS'de hematopoietik sitokinler ve interlökinlerin düzey analizi yapılmıştır. Ancak, fetal dönemde yaşamın en yüksek proliferasyon ve farklılaşma süreçlerinde etkin olan büyüme faktörlerinin kaynağına yönelik arayışlar henüz emekleme aşamasındadır. Mevcut kaynaklardaki sitokin ve büyüme faktörü düzeylerinin tespit edildiği yayın sayısı da kısıtlıdır. Bu yayınların çoğu, sitokin düzeyindeki değişikliklerle gebelik ilişkili hastalıklar arasındaki bağlantıyı saptamaya yöneliktir. Bu nedenle araştırmalar, enflamatuvar sitokinlere odaklanmış olup hematopoezde kritik rol oynayan G-CSF, IL-3 vb. düzeylerine yönelik kısıtlıdır. Mevcut araştırmalarda da seçilen heterojen örneklem popülasyonu sağlıklı veri elde edilmesini ve kıyaslamasını zorlaştırmaktadır. Bilgimiz dahilinde, mevcut literatürde SCF ve G-CSF düzeylerinin elektif sezaryen doğumlarda AS, KKP ve MP'deki konsantrasyonlarının araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında AS, KKP ve MP'de hematopoietik sitokinlerden üçü; G-CSF, SCF ve IL-3 düzeyleri ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. İlk araştırılan sitokin olan G-CSF açısından en zengin kaynak, AS olarak tespit edilmiştir [AS'de 1.068 (613-3.996) pg/ml, KKP'de 85 (45-249) pg/ml ve MP'de 62 (44-237) pg/ml].



MP ve KKP'de saptanan G-CSF düzeyleri AS'dekine oranla düşük olmakla birlikte, MP ve KKP'deki G-CSF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ( $p<0,05$ ,  $r=0,458$ ). Bazı sitokinler plasentadan geçebilirken bazılarının geçemediği bilinmektedir. MP ve KKP konsantrasyonlarında sadece G-CSF açısından saptanan anlamlı korelasyon kendi başına yetersiz bir veri olmakla beraber, *Calhoun ve ark.*'ın çalışmasında hayvan deneylerinde gerçekleştirilen çalışmada da rapor edildiği üzere G-CSF'nin plasentadan geçebildiğine dair fikir vericidir (6).

G-CSF'nin fetal ve maternal dokulardaki bazal düzeylerinin AS'deki G-CSF yüksekliğine etki ettiği düşünülebilir. Yenidoğanda G-CSF'nin erişkine göre düzey düşüklüğünün bu şekilde açıklanması söz konusu olabilir. Ancak bunun ispatlanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde, AS'de G-CSF düzeylerinin araştırıldığı az sayıda yayın mevcuttur ve bu yayınlar gebelikteki çeşitli klinik endikasyonlarla sitokin düzeyleri arasında ilişki kurmak üzere gerçekleştirilmiştir. İlâveten yayınlardan bir tanesi haricinde doğum şekli ayrı bir parametre olarak ele alınmamış olup bizim çalışmamız sadece belirli bir doğum tipini ele almak açısından özgündür.

Bilgimiz dahilinde sağlıklı sezaryen doğumlardan elde edilen AS'de G-CSF düzeylere ait verilerin rapor edildiği, 1995 yılına ait yalnızca bir çalışma vardır. *Raynor ve ark.*'ın gerçekleştirdiği bu çalışmada AS'de mevcut olan G-CSF düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüş ve doğum ya da *intrauterin* enfeksiyonun AS'deki G-CSF düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Doğum öncesi AS'deki G-CSF konsantrasyonları ile doğum esnasındaki konsantrasyonların karşılaştırıldığı çalışmada, G-CSF düzeyleri sırasıyla, 183 pg/ml ve 490 pg/ml olarak bildirilmiştir. Sağlıklı sezaryen grubuna dahil olarak değerlendirilen yalnızca 7 olguda ise 490 pg/ml ortalama konsantrasyonda G-CSF rapor edilmiştir (40). Bu değer, bizim çalışmamızda AS'de tespit edilen G-CSF düzeyinden daha düşüktür. Ancak, bizim ortanca değerimiz 20 sezaryen olgusunun G-CSF düzeyini yansıtmakta olup örneklem büyüklüğü daha sağlıklı veri saptanmasına olanak sağlamıştır. Benzer bulgular *Saito ve ark.*'nın gerçekleştirdiği AS'de G-CSF düzeyinin sağlıklı kontrol grubu ve koryoamniyonitli hasta grup ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışmada da mevcuttur (41). Literatürde AS'de hematopoietik sitokinlerin araştırıldığı nadir

çalışmalardan olan bu iki araştırmada enfeksiyon varlığında G-CSF artışı tespit edilmiş olup enfekte amniyon sıvısındaki lökositöz ile bağlantısı kurulmuştur (40, 41).

*Lu ve ark.*'nin gerçekleştirdiği, Mayıs 2017'de yayımlanan çok yeni bir başka çalışmada, AS ve KKP'de birçok farklı belirteç ve sitokin düzeyi araştırılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer yöntemlerle G-CSF başta olmak üzere araştırılan birçok farklı sitokinin preterm yenidoğanda beyin hasarıyla ilişkisi araştırılmıştır. Sağlıklı kontrol grupta ve farklı doğum tiplerinde bizim verilerimize benzer şekilde, KKP'de ortalama 104 (45,12 - 177) pg/ml konsantrasyonda G-CSF rapor edilmiştir (10).

AS, KKP ve MP'de ikinci parametre olarak HKH proliferasyonunda kritik role sahip olduğu ispatlanmış SCF araştırılmıştır. Diğer kaynaklara oranla KKP'de en yüksek konsantrasyonda (1.761 pg/ml; aralık: 1.089-2.514 pg/ml) tespit edilmiştir. SCF'nin MP konsantrasyonlarının, KKP'den yaklaşık 2 kat daha az olduğu gözlemlenmiştir (852 pg/ml; aralık: 530-1.889 pg/ml). AS'de ise SCF, karşılaştırılan örnek gruplarına göre en az düzeyde saptanmıştır (309 pg/ml; aralık: 110-622 pg/ml). Bu durumun gebelik sürecinde maternal immün sistemin baskılanması sırasında fetal dokularda artmış hücre proliferasyonu ve kan hacmi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (22).

KK, doğum esnasında girişimsel olmayan yöntemlerle toplanabilen, erken progenitör HKH'lerce zengin bir materyal olmasına karşın çoğu zaman çöpe atılan değerli bir kaynaktır. Doğumda toplanmasını takiben kordon kanı bankalarına ulaştırılan KK'lar genellikle, otomatik cihazlarda veya manuel santrifüj yöntemiyle eritrosit ve plazma deplesyonu ile yoğunlaştırılmış, düşük hacimlerde saklanmaktadır. Ayrılan plazması, enfeksiyon ve hastalık belirteçlerinin araştırılması dışında bir klinik kullanım alanına sahip değildir (42). SCF'nin KKP'de bulunan yüksek konsantrasyonları, toplanmayan KK'lar gibi KKP'nin de çoğu zaman değeri bilinmeyen önemli bir kaynak olduğuna işaret etmektedir. Kordon kanı bankalarının, genellikle toplanan KK'dan plazma deplesyonu sonrasında hali hazırda SCF açısından zengin KKP havuzu oluşturma potansiyelleri vardır. HKH proliferasyonunda önemli rolü olan KKP'nin HKH nakli uygulanan hastaya KK ile birlikte verildiğinde, engrafman süresinin azaltılarak nakil başarısının artırılacağı düşünülmektedir.

Literatürde KKP ile desteklenen besiyerinin Kİ kaynaklı progenitör hücrelerin veya KK kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna katkı sağladığına dair veriler de mevcuttur (13-16). KK CD34<sup>+</sup> hücrelerin *ex vivo* ekspansiyonuna yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmakta; proliferasyon hızını ve ekspande edilen HKH'lerin engrafman kapasitesini geliştirmeye yönelik çeşitli yöntemler araştırılmaktadır. Ekspande edilen KK HKH'lerin klinik denemelerde başarısı gösterilmiş olup yakın geçmişte klinik uygulamalarda büyük ölçekli ekspansiyon denemelerine başlanmıştır (43). Çalışmamızda KKP'de saptanan yüksek düzeyde SCF varlığı, KKP'nin progenitör hücrelerin proliferasyonunu artırıcı etkisini akla getirmektedir.

Yüksek düzey G-CSF içeren AS ve yüksek SCF içeren KKP başta olmak üzere, tüm kaynakların *in vitro* HKH kültürlerine destekleyici etkilerinin araştırılması, bu tez çalışmasının önemli bir diğer hedefidir. Literatür, G-CSF'nin progenitör HKH'lerin granülosit serilerine farklılaşmasında etkisine işaret etmektedir (18). Bu bilgi ışığında yüksek G-CSF içeriğine sahip olduğu tespit edilen AS'nin yanı sıra KKP ve MP *in vitro* koşullarda HKH kültür ortamına eklenmiş ve kısa dönem CFU oluşumunu destekleyici etkileri yönünden incelenmiştir. Ancak sezaryen olgulardan elde edilen toplam 21 örnekte (7 AS, 7 KKP ve 7 MP) başlatılan CFU oluşturma kapasitesi değerlendirmeleri olumlu sonuç vermemiş olup temel hipotezimizi desteklememiştir. Daha önce *Barria ve ark.*, araştırmalarında bizim yaklaşımımızdan farklı olarak AS+rekombinant SCF ile *in vitro* ekspansiyonun takibinde CFU-GM protokolü uygulandığında hematopoezi artırıcı etkiyi gösterebilmişlerdir (12). Bu bilgilerin ışığında AS, KKP ve MP'nin kısa dönem CFU oluşumunda yeterli etkiyi göstermemesinin olası iki nedeni olduğunu düşünmekteyiz. Bunlardan biri, AS de dahil olmak üzere araştırılan hiçbir kaynağın CFU ticari besiyerinde bulunan sitokin karışımlarındaki G-CSF konsantrasyonlarına ulaşamaması olasılığıdır. Bir diğer olasılık ise, G-CSF'nin tek başına kültürü destekleyecek nitel/nicel yeterlilikte olmamasıdır. Dolayısıyla AS, bizim de öngördüğümüz şekilde tek başına kullanımına kıyasla, görece yüksek SCF konsantrasyonuna sahip olduğu ortaya konmuş KKP ile birlikte uygulanabilir. Böyle bir uygulamanın kısa dönem CFU oluşumuna katkısının araştırılmasında yarar bulunmaktadır. Ancak, her ne kadar KKP'de yüksek SCF düzeyleri saptanmış olsa da, HKH ekspansiyonunda kullanılan ticari sitokin kokteylindeki SCF'ye kıyasla (KKP'de 1.761 pg/ml; ticari sitokin kokteylinde 30.970 pg/ml) çok daha düşük

düzeyde SCF içermektedir. Bu nedenle KKP'nin fizyolojik SCF düzeyleri, ticari olarak kullanılan sitokin kokteyline kıyasla HKH ekspansiyonunda yetersiz kalmaktadır.

Bu sonuçlara ilişkin değerlendirilmesi gereken önemli bir diğer nokta ise bu çalışmada gerçekleştirilen CFU testlerinin kısa dönem koloni oluşumunu belirlemeye yönelik olmasıdır. KK CD34<sup>+</sup> hücre popülasyonu farklı engrafman kapasitesine sahip hücreler açısından çeşitlilik göstermektedir. KK ünitesi kısa ve uzun dönemli (sırasıyla, STR ve LTR) immün yapılanma kapasitesi olan iki tip progenitör hücre grubu içermektedir ve yüksek çeşitlilikte farklılaşma kapasitesi olan uzun dönem engrafman yeteneğindeki primitif HKH'lerin belirlenmesinde LTC-IC testlerinin daha belirleyici olduğu bilinmektedir (44). Bu çalışmayı takiben, KK kaynaklı LTR HKH'lerin LTC-IC testleri ile *in vitro* uzun dönem engrafman kapasitelerinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirmeyi planladığımız çalışmada, yüksek G-CSF ve SCF içerikleri nedeniyle AS'nin tek başına veya KKP ile birlikte CFU granülosit-makrofaj serilerinin oluşumunu arttıracığı öngörülmektedir.

AS, KKP ve MP'de üçüncü parametre olarak düzey analizi gerçekleştirilen IL-3 için ELISA sonuçları, test duyarlılık sınırının altında (<7,4 pg/ml) sonuç vermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda araştırdığımız hiçbir kaynaktan anlamlı düzeyde IL-3 saptanmamıştır. IL-3, KK HKH'lerin *in vitro* proliferasyonunda ve kültüre IL-6 ile birlikte kullanıldığında kısa ve uzun dönem CFU oluşumunda etkinliği kanıtlanmış bir moleküldür (45, 46). IL-3'ün gebeliğin farklı dönemlerinde ve gebe olmayanlarda MP serolojik yöntemlerle araştırıldığı *Vassiliadis ve ark.*'ın çalışmasında, gebe olmayan grupta PK'da 3.800 pg/ml IL-3 varlığı gösterilmiştir. Gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü trimesterlerinde MP'de IL-3 düzeylerinin %14 oranında azalarak doğuma yaklaşırken doğum esnasında tekrar normal plazma düzeylerine arttığı rapor edilmiştir (35). AS veya KKP'de IL-3 protein düzeylerine dair bir araştırma ise bulunmamaktadır. *Lu ve ark.* tarafından 2006'da yayımlanan, Kİ ve KK mezenkimal kök hücrelerinde çeşitli sitokinlerin gen ifade düzeylerinin araştırıldığı çalışmada Kİ ve KK mezenkimal hücrelerinde IL-3 gen ifadesine rastlanmadığı belirtilmiştir (47).

Çalışmada, doğum öncesinde MK'da ölçülen lökosit sayısı ile araştırılan sitokin düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Lökositözün gebeliğin normal sonlanma sürecinde

belirleyici olduğu bilinmektedir. Çalışmaya dahil ettiğimiz olguların tđmđ elektif sezaryen doğum gerçekleştirmiş olup gebelik doğal gidişatından önce sonlandırılmıştır. Bu nedenle araştırılan sitokinlerle lökositoz arasında anlamlı bir korelasyon gösterilemediği dđřđnlmektedir.

Hematopoezde kritik rol oynayan sitokinlerden SCF, bu üç örnek arasında KKP'de; G-CSF ise AS'de önemli düzeylerde saptanmıştır. Bu düzeyler CFU-GM için tek sitokin kaynağı olarak kullanıldığında koloni oluşumunu mümkün kılamamıştır. Bu araştırma ile literatürde ilk kez SCF bu biyolojik örneklerde araştırılmış olup yeni araştırmaların nn açacak veriler elde edilmiştir. İlaveten bu çalışma, gebelik ve doğum tipi yönünden homojen bir popülasyonda ve daha öncekilere göre çok daha standardize yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen bir araştırma olması nedeniyle de önceki yayınlardan farklılık göstermektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta*. 2002;23(4):239-56.
2. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells*. 2001;19(2):99-107.
3. Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):332-44.
4. Reid TM. Striking a balance in maternal immune response to infection. *Lancet*. 1998;351(9117):1670-2.
5. Aaltonen R, Heikkinen T, Hakala K, Laine K, Alanen A. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstet Gynecol*. 2005;106(4):802-7.
6. Calhoun DA, Chegini N, Polliotti BM, Gersting JA, Miller RK, Christensen RD. Granulocyte colony-stimulating factor in preterm and term pregnancy, parturition, and intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol*. 2001;97(2):229-34.
7. Burns C, Hall ST, Smith R, Blackwell C. Cytokine Levels in Late Pregnancy: Are Female Infants Better Protected Against Inflammation? *Front Immunol*. 2015;6:318.
8. Takahashi N, Uehara R, Kobayashi M, Yada Y, Koike Y, Kawamata R, et al. Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings. *Cytokine*. 2010;49(3):331-7.
9. Ryan JG, Davis RK, Bloch JR. The placenta as a research biospecimen. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2012;41(6):834-45.
10. Lu H, Huang W, Chen X, Wang Q, Zhang Q, Chang M. Relationship between premature brain injury and multiple biomarkers in cord blood and amniotic fluid. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017:1-7.
11. Tekkotte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int*. 2011;2011:504723.
12. Barria E, Mikels A, Haas M. Maintenance and self-renewal of long-term reconstituting hematopoietic stem cells supported by amniotic fluid. *Stem Cells Dev*. 2004;13(5):548-62.
13. Phadnis SM, Joglekar MV, Venkateshan V, Ghaskadbi SM, Hardikar AA, Bhonde RR. Human umbilical cord blood serum promotes growth, proliferation, as well as differentiation of human bone marrow-derived progenitor cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2006;42(10):283-6.

14. Jung J, Moon N, Ahn JY, Oh EJ, Kim M, Cho CS, et al. Mesenchymal stromal cells expanded in human allogenic cord blood serum display higher self-renewal and enhanced osteogenic potential. *Stem Cells Dev.* 2009;18(4):559-71.
15. Ding Y, Yang H, Feng JB, Qiu Y, Li DS, Zeng Y. Human umbilical cord-derived MSC culture: the replacement of animal sera with human cord blood plasma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013;49(10):771-7.
16. Pereira T, Ivanova G, Caseiro AR, Barbosa P, Bartolo PJ, Santos JD, et al. MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolomics and composition. *PLoS One.* 2014;9(11):e113769.
17. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Anal Chim Acta.* 2015;853:95-115.
18. Ende M, Etzrodt M, Schroeder T. Instruction of hematopoietic lineage choice by cytokine signaling. *Exp Cell Res.* 2014;329(2):207-13.
19. Lyon D, Cheng CY, Howland L, Rattican D, Jallo N, Pickler R, et al. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I--associations with preterm birth. *Biol Res Nurs.* 2010;11(4):371-6.
20. Hwang SH, Kim MH, Yang IH, Bahk JY and Han H. Analysis of Cytokines in Umbilical Cord Blood-derived Multipotent Stem Cell. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2007;12:32-8.
21. Kraus TA, Sperling RS, Engel SM, Lo Y, Kellerman L, Singh T, et al. Peripheral blood cytokine profiling during pregnancy and post-partum periods. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64(6):411-26.
22. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta.* 2002;23(4):257-73.
23. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2006;2(2):155-62.
24. Beksac M. Is There Any Reason to Prefer Cord Blood Instead of Adult Donors for Hematopoietic Stem Cell Transplants? *Front Med (Lausanne).* 2015;2:95.
25. Beksac M. Cord Blood As A Stem Cell Source. Chapter in *Stem Cell Biology and Clinical Applications.* 2009.
26. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(7):368-76.
27. Peled T, Mandel J, Goudsmid RN, Landor C, Hasson N, Harati D, et al. Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded ex vivo with cytokines

and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy*. 2004;6(4):344-55.

28. Duche P, Chevaleyre J, Vlaski M, Dazey B, Milpied N, Boiron JM, et al. Definitive setup of clinical scale procedure for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic cells for transplantation. *Cell Transplant*. 2012;21(11):2517-21.

29. Mehta RS, Rezvani K, Olson A, Oran B, Hosing C, Shah N, et al. Novel Techniques for Ex Vivo Expansion of Cord Blood: Clinical Trials. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:89.

30. Beksac M. Editorial: "How to Improve Cord Blood Transplantation: By Enhancing Cell Counts or Engraftment?". *Front Med (Lausanne)*. 2016;3:20.

31. 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*. 2000;96(8):2717-22.

32. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, Fry LJ, Gibson DA, Horton RB, et al. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion*. 2012;52(3):549-59.

33. 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 Int*. 2013;2013:823912.

34. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111(2):485-91.

35. Vassiliadis S, Ranella A, Papadimitriou L, Makrygiannakis A, Athanassakis I. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in non-pregnant women, during pregnancy, labour and abortion. *Mediators Inflamm*. 1998;7(2):69-72.

36. Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Farhat R, Hassan N, Bandar A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod*. 2000;15(9):2011-7.

37. Fox CE, Lash GE, Pretlove SJ, Chan BC, Holder R, Kilby MD. Maternal plasma and amniotic fluid cytokines in monochorionic, diamniotic twin pregnancies complicated by twin-to-twin transfusion syndrome. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(4):280-8.

38. Nemzek JA, Siddiqui J, Remick DG. Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs. *J Immunol Methods*. 2001;255(1-2):149-57.

39. Beksac M, Preffer F. Is it time to revisit our current hematopoietic progenitor cell quantification methods in the clinic? *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(11):1391-6.

40. Raynor BD, Clark P, Duff P. Granulocyte colony-stimulating factor in amniotic fluid. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1995;3(4):140-4.



41. Saito S, Kasahara T, Kato Y, Ishihara Y, Ichijo M. Elevation of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6), IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in term and preterm parturition. *Cytokine*. 1993;5(1):81-8.
42. Yurdakul P. Hücre Bankacılığında Kalitenin Önemi. *Hematolog, Hematologlar İçin Kordon Kanı Uygulamaları ve Bankacılığı*. Ankara: Türk Hematoloji Derneği; 2016. p. 50-7.
43. Beksac M, Yurdakul P. Kordon Kanının in vitro/ex vivo Ekspansiyonu: Deneysel ve Klinik Uygulamalar. *Hematolog, Hematologlar İçin Kordon Kanı Uygulamaları ve Bankacılığı*. Ankara: Türk Hematoloji Derneği; 2016. p. 113-8.
44. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*. 2003;34(6):461-75.
45. Encabo A, Mateu E, Carbonell-Uberos F, Minana MD. IL-6 precludes the differentiation induced by IL-3 on expansion of CD34+ cells from cord blood. *Haematologica*. 2003;88(4):388-95.
46. Bordeaux-Rego P, Luzo A, Costa FF, Olalla Saad ST, Crosara-Alberto DP. Both interleukin-3 and interleukin-6 are necessary for better ex vivo expansion of CD133+ cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Dev*. 2010;19(3):413-22.
47. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006;91(8):1017-26.

## 8. EKLER

### EK-1: ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

#### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kordon kanı, maternal plazma ve amniyon sıvısındaki sitokin seviyelerinin serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve kordon kanı <i>in vitro</i> koloni oluşturma potansiyeline etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Meral BEKSAÇ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Akraba Dışı Doku ve Kordon Kanı Bankası			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1			
		FAZ 2		<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3		<input type="checkbox"/>	
FAZ 4			<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması			<input type="checkbox"/>		
Tıbbi cihaz klinik araştırması			<input type="checkbox"/>		
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları			<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma			<input type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz. Metodolojik Çalışma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ  
İmza:



24 Şubat 2016



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmaktadır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kordon kanı, maternal plazma ve amniyon sıvısındaki sitokin seviyelerinin serolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi ve kordon kanı <i>in vitro</i> koloni oluşturma potansiyeline etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

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		
	ŞİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<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:04-120-16	Tarih: 22 Şubat 2016		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları 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"/>	M. Mellî
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	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 type="checkbox"/>	M. Soykan
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi 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"/>	S. Öztürk
Prof.Dr.Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	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"/>	S. Demirer
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	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"/>	Ş. Şengül
Prof.Dr.İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	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"/>	İ. İlhan
Prof.Dr.Serap SIVRI	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"/>	S. Sivri
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk 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"/>	Z. Şenocak
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 checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	B. Çakır
Doç.Dr.Süha YAĞCIOĞLU	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"/>	S. Yağcıoğlu
Doç.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 type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	D. Öztuna
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	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"/>	S. Koçak
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 type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	N. Kutlay
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	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"/>	Ö. İlgili
Mühübe SUTAY	İşletme	-	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"/>	M. SUTAY

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ  
İmza:

M. Mellî

24 Şubat 2016

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
ASLI GİBİDİR

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Hasan Yalım Akın

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 29.01.1989

**Medeni Hali:** Bekar

**Askerlik Durumu:** Tecilli (06.03.2018 tarihine kadar)

### **İletişim Bilgileri:**

#### **Adres:**

Ahmet Taner Kışlalı Mah. 2919. Sok.

Kuşak Sitesi 2. Blok No:15

Çankaya / ANKARA

**Ev Tel.:** 0 312 241 38 59

**Cep Tel.:** 0 537 277 21 53

**E-posta:** [yalim\\_akin@hotmail.com](mailto:yalim_akin@hotmail.com)

[hyakin@ankara.edu.tr](mailto:hyakin@ankara.edu.tr)

**Yabancı Dil:** İngilizce (ileri düzey), Almanca (başlangıç)

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** ODTÜ Geliştirme Vakfı Özel Lisesi (2003-2006)

**Lisans:** İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (2007-2013)

### **Görev Aldığı Projeler:**

- İnsan Göbek Kordon Kanı Hematopoetik Kök Hücrelerinin *Ex Vivo* Şartlarda Çoğaltılması-TÜBİTAK 1001 Proje no:113S261, Ekim 2013-2015.
- Kordon Kanından Kök Hücre Eldesi İçin Kullanılan Otomatize Sepax (Biosafe) Sistemi ile Yeni Geliştirilen Manuel Filtrasyon Bazlı Deplesyon Sisteminin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankası- Kaneka (Kaneka Pharma Europe N.V.) ortak projesi, 2014-2015.
- Killer Immunoglobulin Like Receptor Genotipinin Kordon Kanı Kaynaklı Doğal Öldürücü Hücrelerinin In Vitro Anti Miyelom Yanıtı Etkisi ve Otolog Anti Miyelom Etki İle Karşılaştırılması. TÜBİTAK 3501 Proje no:115S579, Ekim 2015-2016 (Bursiyer).
- Kordon Kanı, Maternal Plazma ve Amniyon Sıvısındaki Sitokin Seviyelerinin Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi ve Kordon Kanı *in vitro* Koloni Oluşturma Potansiyeline Etkisi, TÜBİTAK 1001 Proje no:116S738, Ocak 2016-2018.
- Kordon Kanından Biyoteknolojik Hücresel Ürün Geliştirme Altyapı Projesi, Kalkınma Bakanlığı Destekli Proje, Proje no: 2016K121120, 2016-2019 (Bilimsel Proje Uzmanı).

## ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN BASILMIŞ BİLDİRİLER

- Katlan DC, **Akin HY**, Atakul BK, Varli B, Yurdakul P, Koç A, Beksaç M, Söylemez F. Attitude Of Turkish Women Towards Umbilical Cord Blood Donation And Storage: Knowledge, Concerns, Decisions. 12<sup>th</sup> World Congress of Perinatal Medicine, 3-6 Kasım 2015, Madrid, İspanya, sözlü sunum.
- Yurdakul P, Gencer EB, **Akin HY**, Sato N, Fricke C, Beksaç M. Comparison of Red Blood Cell and Plasma Depletion Efficiencies of Two Methods from Cord Blood. Automated Sepax (Biosafe) and Manual Celleffice CB (Kaneka). 10-14 Haziran 2015, 20th Congress of European Hematology Association (EHA), Viyana, Avusturya. Poster No: ref: 841-100394-105779-286286.
- Yurdakul P, Gencer EB, **Akin HY**, Dalva K, and Beksaç M. *Ex vivo* Expansion of Human Cord Blood: Comparison of Enhancers. BMT Tandem Meetings 2016, 18-22 Şubat 2016, Hawaii, ABD.
- Yurdakul P, Gencer EB, **Akin HY**, Dalva K, Katlan DC, Beksaç S, Beksaç M. *Ex vivo* Expansion of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells (HSC) with Valproic Acid or Notch-Ligand +/- Fibronectin. ISCT 2016, 25-28 Mayıs 2016, Singapur.
- Yurdakul P, Gencer EB, **Akin HY**, Dalva K, Katlan DC, Beksaç S, Beksaç M. Notch-Ligandı +/- Fibronektin, Valproik asit +/-, Nikotinamid ile Kordon Kanı Kök Hücrelerinin *Ex Vivo* Ekspansiyonu. 42. Ulusal Hematoloji Kongresi, 19-22 Ekim 2016, Antalya, Sözlü Sunum.
- **Akin HY**, Yurdakul P, Katlan D.C, Örgül G, Beksaç M.S, Beksaç M. Maternal ve Fetal Serum Örneklerinde Hematopoietik Sitokinler Olan Kök Hücre Faktör (Stem Cell Factor=SCF) ve Granülosit Koloni Stimule Edici Faktör (G-CSF) Düzeylerinin ve in vitro Etkilerinin Karşılaştırılması Analizi. IV. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, 28-30 Nisan 2017, Gaziantep, Türkiye.
- **Akin HY**, Yurdakul P, Aydın G, Dalva K, Beksaç M. *Ex vivo* Expansion of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells (HSCs) with Valproic Acid (VPA) or Neurotrophic Factor (NTF). International Society for Cellular Therapy (ISCT) 2016, 3-6 Mayıs 2017, Londra, İngiltere.

### Diğer Akademik Eğitim Faaliyetleri:

#### **Katıldığı Ulusal / Uluslararası Eğitimler:**

- Ankara Üniversitesi Deney hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, 2014.
- Biosafe Sepax Serisi Kan Ayırma ve İnceleme Uygulama Eğitimi, 2014.
- Hemosoft Kordon Kanı Bankası Bilgi Yönetim Sistemi Eğitimi, 2014.
- Biyoteknoloji Enstitüsü “Proje Hazırlama, Yazma ve Yürütme Eğitimi”, 2015.
- Biosafe User Group Meeting Training Program, 2015.
- Syllab IceCube Serisi Bilgisayar Kontrollü Kademeli Dondurucu Sistemleri Eğitimi, 2016.



### **Katıldığı Ulusal / Uluslararası Kongre ve Sempozyumlar:**

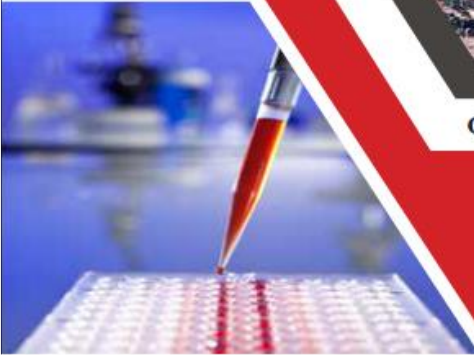
- Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü 2014 Toplantısı, 19 Kasım 2014, Ankara.
- 5. Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi, 16-19 Nisan 2015, Antalya.
- "Cord Blood Establishments Accreditation", Technical Assistance on Alignment in Human Tissues and Cells (European Union Project), 4-8 Mayıs 2015, İstanbul.
- XI. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Therapeutic Peptides and Antibodies: Design & Manufacturing Workshop, 20-22 Mayıs 2015, Ankara.
- 5<sup>th</sup> Turkish- US Cytometry Workshop, ISAC, 1-4 Ekim 2015, Ankara.
- TÜBA-Kök Hücre Tedavilerine Güncel Yaklaşımlar Sempozyumu, 20 Ekim 2015, Ankara.
- Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü 2015 Toplantısı, 21 Kasım 2015, Ankara.
- IV. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, 28-30 Nisan 2017, Gaziantep.
- International Society for Cellular Therapy (ISCT) 2016, 3-6 Mayıs 2017, Londra, İngiltere.

## 10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

- **Akın HY**, Yurdakul P, Katlan D.C, Örgül G, Beksaç M.S, Beksaç M. "Maternal ve Fetal Serum Örneklerinde Hematopoietik Sitokinler Olan Kök Hücre Faktör (Stem Cell Factor=SCF) ve Granülosit Koloni Stimule Edici Faktör (G-CSF) Düzeylerinin ve *in vitro* Etkilerinin Karşılaştırılmalı Analizi", IV. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, 28-30 Nisan 2017, Gaziantep, Türkiye.



# IV. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi



Gaziantep, 28 - 30 Nisan - Tuğcan Hotel

# 2017





## IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

### Maternal ve Fetal Serum Örneklerinde Hematopoietik Sitokinler Olan Kök Hücre Faktör (Stem Cell Factor=SCF) ve Granülosit

**Yazarlar** : Öğrenci H. Yalın Akın, Pınar Yurdakul, Doruk C. Katlan, Gökçen Örgül, M.Sinan Bekaş, Meral Bekaş

**Kurum** : ANKARA ÜNİVERSİTESİ

#### GİRİŞ - AMAÇ

İnsan hematopoietik kök hücreleri (HKH) ve bu hücrelerin proliferasyon ile diferansiyasyonunu düzenleyen sitokinler kemik iliği (Kİ), çevre kanında (PK) ve göbek kordon kanında (KK) bulunur. HKH naklinde kısa dönemli yapılanma sağlayan CD34+ HKH'lerin engraftman kapasitelerinin in vitro belirlenmesine yönelik kullanılan en yaygın yöntem Colony-Forming Unit (CFU) testleridir (Radke vd., 2013). CFU testleri, laboratuvar ortamında Kİ koşullarının yarı-kati besiyerinde taklit edilmesi ve ortama dışarıdan eklenen hematopoietik sitokinler aracılığıyla HKH'lerin proliferasyon ve farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi temeline dayanır. Bu testlerde kültür ortamına başlıca Stem Cell Factor (SCF), Granulocyte - Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte, Macrophage - Colony Stimulating Factor (GM-CSF) olmak üzere çeşitli sitokin kokteylleri eklenerek hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma süreçleri kontrol edilmektedir. Günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan sitokin kaynağı, rekombinant insan proteinleridir. Bu proteinler, standart özelliklere sahip olmaları, hassas konsantrasyonlarda kullanılabilirliği yönünden avantajlı olmakla beraber, çok düşük miktarların pahalı eldesi ve saklama koşullarının zorluğu açısından dezavantajlıdır (Tekkate vd., 2011). Oysa günümüzde kullanılan, eldesi kolay, doğal otolog sitokin kaynakları bir seçenek olarak bu soruna çözüm oluşturabilir. Sınırlı sayıda araştırmada maternal ve fetal dolaşımında, amniyon sıvısında (AS) hematopoietik sitokinler ve interlökinlerin düzey analizi ile hematopoiezi etkileyecek yüksek düzeyde sitokin varlığı gösterilmiştir. Doğuma yaklaşan günlerde anne kanında sıklıkla gözlenen lökositöz da destekleyici bir bulgudur. Bu çalışma, gönüllü bağışçılardan elde edilen maternal plazma, KK plazma ve AS'deki, hematopoiezde kritik rol oynayan SCF ve G-CSF sitokin düzeylerinin serolojik yöntemlerle belirlendiği ve bu kaynakların in vitro KK koloni potansiyeline olan etkisinin araştırıldığı bir ön çalışmadır.

#### METOD

Çalışmada 25 gönüllü bağışçıdan KK, maternal kan ve AS örnekleri toplanmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı, sitokin düzeylerinin serolojik belirlenmesi amacıyla -20oC'de saklamaya alınmış, kalan örnekler ise bekletilmeksizin CFU-GM testlerinde kullanılmıştır.

KK mononükleer hücreleri (MNC), Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) içerisinde, 1-5x10<sup>5</sup> hücre/ml konsantrasyonda hazırlanarak, seri dilüsyonları yapılmış otolog KK plazması/maternal plazma/AS eklenen sitokinsiz MethoCult (StemCell Technologies) besiyerlerinde inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise aynı konsantrasyonda KK kaynaklı MNC, rutin kullanımda olan zengin besiyerine ekilmiştir. 37oC'de, %5 CO<sub>2</sub>liortamda 14 gün inkübasyon sonrası koloni sayımları gerçekleştirilmiştir.



## IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

Saklanan örneklerdeki SCF ve G-CSF sitokin düzeyleri, 5 farklı dilüsyonda standart, pozitif ve negatif kontroller dahil edilerek human SCF ve G-CSF ELISA Kit (R&D Systems) ile üreticinin önerdiği protokol doğrultusunda belirlenecektir.

### BULGULAR

CFU-GM koloni oluşturma testlerinde pozitif kontrol grubunda beklenildiği şekilde CFU-GM kolonileri oluşmuş, ancak KK plazması, maternal plazma ve AS'nin seri dilüsyonlar halinde uygulandığı hücre kültürlerinde koloni gözlenmemiştir.

KK, maternal plazma ve AS örneklerinde SCF ve G-CSF sitokin düzeyleri ELISA testi ile belirlenecek ve sonuçlar maternal kandaki lökosit konsantrasyonları ile karşılaştırmalı olarak poster sunumunda paylaşılacaktır.

### SONUC

Belirlenen alternatif sitokin kaynaklarının CFU-GM testlerinde etkinliği olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç, bu kaynaklardaki sitokin karışımlarının granülosit-makrofaj serisi koloni stimülasyonunu inhibe ettiğini veya örneklerdeki hematopoietik sitokinlerin diğer enflamatuvar sitokinlere oranla daha düşük konsantrasyonlarda olduğunu düşündürmektedir.

Bu doğrultuda çalışmanın devamında KK plazması, maternal plazma ve AS'deki SCF ve G-CSF sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldığında en yüksek ve potent otolog sitokin kaynağının tespiti takiben hematopoietik sitokinlerin membran filtre yardımıyla konsantre edilerek HKH proliferasyonunda rekombinant sitokin kokteyllerine alternatif olarak kullanılması ve daha ekonomik ve etkin bir alternatif olarak rutin kullanıma girmesi hedeflenmektedir.

---

### ANAHTAR KELİMELER

Kordon kanı, Maternal plazma, Amnion sıvısı, Hematopoietik stokinler,CFU