



T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT MİYELOİD
LÖSEMİLERİNDE KEMİK İLİĞİNDE KÖKEN ALAN
MEZENKİMAL STROMAL HÜCRELERİN BİYOLOJİK
VE İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlkay PİŞKİN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2015

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT MİYELOİD
LÖSEMİLERİNDE KEMİK İLİĞİNDEN KÖKEN ALAN
MEZENKİMAL STROMAL HÜCRELERİN BİYOLOJİK
VE İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlkay PİŞKİN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 1647 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2015

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Çocukluk Çağı Akut Miyeloid Lösemilerinde Kemik İliğinden Köken Alan
Mezenkimal Stromal Hücrelerin Biyolojik Ve İmmünolojik Özellikleri

İlkay PIŞKIN

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi
07.09.2015

Danışman
Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER
Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU
Doç. Dr. Sevil ÇAYLI
Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN
Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK



Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gerekten tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER
Enstitü Müdürü



Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

07.09.2015



İlky PİŞKİN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. H. Meltem Özgüner'e,

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesinde benden desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ahmet Çevik Tufan, Sayın Prof. Dr. Fahri Bayıroğlu, Sayın Prof. Dr. Özen Özensoy Güler, Sayın Doç. Dr. Sevil Çaylı, Sayın Doç. Dr. Ahmet Çarhan ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ender Şimşek'e

Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hilal Göktürk ve Arş. Gör. Tuba Özdemir, Arş. Gör. Ebru Alimoğulları, Arş. Gör. Gülsüm Yarloğlu'e

Tez çalışmam süresince, bilgi ve tecrübeleri ile gerek yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan Bio. Yasin Köksal'a ve Lab. Tekn. Elif Canal Çakmak'a Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk-Hematoloji doktoru Sayın Uzm. Dr. İkbal Ok Bozkaya ve flow-sitometri analizlerinde bana yardımcı olan Biyokimya laboratuvar sorumlusu Sayın Uzm. Dr. Fatma Karaca Kara, Sayın Serap Çağlı ve Sayın Emre Arslan'a

Tez çalışmamda ve hayatımda desteğini bir an olsun benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Emine Terzi olmak üzere Arş. Gör. Beyza Ecem Öz, Arş. Gör. Elif Ercan, Arş. Gör. Tuba Kevser Arkan, Mol. Bio. Yeter Dilek ve Bio. Bilgesu Ersan'a,

Çalışmalarım süresince büyük bir özveri ile beni destekleyen ve her zaman yanımda olan hayatımı paylaştığım çok sevgili eşim Emre Pişkin'e ve sevgili aileme anneme babama ve canım kardeşim İlker'e en içten saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akut Lösemiler.....	3
2.1.1. Akut miyeloid lösemi	4
2.2. Hematopoetik hücrelerin gelişimi	7
2.3. Kemik iliği mikroçevresi	9
2.3.1. Endosteal niş	9
2.3.2. Vasküler niş	12
2.4. Endosteal ve Vasküler niş arasındaki ilişki	14
2.5. Nişlerin dışında bulunan hematopoetik kök hücreler	15
2.6. Kök hücre	16
2.6.1. Mezenkimal stromal hücre/Mezenkimal kök hücre.....	17
2.7. Mezenkimal stromal hücrelerle etkileşen immünitede görevli hücreler	24
2.7.1. T Hücreler	24
2.7.2. B Hücreler.....	25
2.7.3. Dendritik hücreler	25
2.7.4. NK Hücreleri.....	26
2.7.5. Monositler	26
2.7.6. Nötrofiller	26
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	28
3.1. Çalışma ve örneklerin elde edilmesi.....	28
3.2. Dondurulmuş kriyoviyallerden kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin çözünmesi ve flasklara ekilmesi.....	29
3.3. Hücrelerin besiyeri değişimi.....	29
3.4. Hücrelerin Tripsin-EDTA ile flasklardan kaldırılması ve 6' lık kültür kaplarına ekimlerinin yapılması	30

3.5. Proliferasyon kapasitesi.....	31
3.6. Mezenkimal stromal hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin araştırılması.....	32
3.7. Periferik kandan ve kemik iliğinden mononükleer hücre (MNC) izolasyonu	35
3.8. Fitohemaglütinin ile <i>in vitro</i> PBMC proliferasyon assay ve Flow- sitometride T hücre belirteçlerinin okunması	36
3.9. Hücre canlılık testi.....	38
3.10. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. Mezenkimal stromal hücrelerin morfolojisi	41
4.2. Mezenkimal stromal hücrelerin çoğalma kapasitesi	42
4.3. Mezenkimal stromal hücrelerin farklılaşma kapasitesi	44
4.3.1. Adipojenik farklılaşma	44
4.3.2. Osteojenik farklılaşma	45
4.4. Flow sitometri sonuçları	46
4.5. Tripan blue boyası ile hücreysel canlılık sonuçları	55
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER.....	82
EK-1. HASTA ONAM FORMU	82
EK-2. ETİK KURUL FORMU	83
EK-3. ÖZGEÇMİŞ	84

ÖZET

Çocukluk Çağı Akut Miyeloid Lösemilerinde Kemik İliğinden Köken Alan Mezenkimal Stromal Hücrelerin Biyolojik ve İmmünolojik Özellikleri

Akut miyeloid lösemi (AML), çocukluk çağında sık görülen lösemi tiplerindendir ve kemik iliğinde anormal blastların birikimi ile karakterize edilmektedir. Çalışmamızda AML hastalarının kemik iliğinden alınan MKH'ler ile sağlıklı bireylerin kemik iliğinden alınan MKH'lerin biyolojik ve immünolojik karşılaştırılması yapıldı. Çalışmamız 7 AML hastası ve 7 sağlıklı verici ve 1 sağlıklı mononükleer hücre vericisi (MNC) olmak üzere toplam 15 birey üzerinden yürütülmüştür. MKH'lerin morfolojik, popülasyonun ikiye katlanması (PD), adipojenik ve osteojenik farklılaşması ve hücre sel canlılığı incelenmiştir. AML hastaları ve sağlıklı MNC vericisinin periferik kanlarından izole edilen MNC'lerin T hücre aktivasyon belirteçlerinden (CD3, CD4, C25, CD69 ve HLA-DR) kapılama pozitif/pozitif olanların yüzdelerine flow sitometri cihazı ile bakılmıştır. En son deney aşamasında MNC ile etkileşime giren MKH'nin hücre sel canlılıkları yüzde de değerlendirilmiştir. PD değerlerinin AML hastaları ile sağlıklı bireylerde benzer olduğu tespit edilmiştir ($z= 1.074$; $p=0.394$). PHA eklenen ve PHA eklenmeyen kuyucuklarda, CD değişken değerlerine ait sonuçlar benzerdir ($p>0.05$). AML hastalarına ait kuyucuklarda hücre sel canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir ($\chi^2 = 2.184$; $p=0.823$). Sağlıklı bireyler için elde edilen hücre sel canlılık değerleri tüm kuyucuklar için benzerdir ($\chi^2 = 10.714$; $p=0.057$). Kuyucuk 2'de sağlıklı bireyden elde edilen değerler, AML hastalarından elde edilen hücre sel canlılık değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($z= 2.246$; $p=0.026$).

Anahtar Kelimeler: Adipojenik, akut miyeloid lösemi, fitohemaglutinin, hücre sel canlılık, mezenkimal stromal hücre, osteojenik

ABSTRACT

The Biological and Immunological Properties of Mesenchymal Stromal Cells Derived From Bone Marrow in Childhood Acute Myeloid Leukaemia

Acute myeloid leukaemia (AML) is one common type of childhood leukaemia and is characterized by the accumulation of abnormal blasts in the bone marrow. In this study, mesenchymal stromal cells derived bone marrow of acute myeloid leukaemia patients and healthy individuals was compared in respect of biological and immunological features. This research was carried out with 7 AML patients, 7 healthy individuals and 1 healthy MNC individual totally 15 individuals. Morphological, population doubling (PD), adipogenic and osteogenic differentiation and cell viability of MSCs were examined. AML patients and healthy individual of MNCs isolated from peripheral blood, T cell activation markers (CD3, CD4, C25, CD69 and HLA-DR) gated positive / positive was analyzed by percent in the flow cytometry apparatus. In the latest experiment, MSCs interact with MNCs that cellular viability was assessed as percent. AML patients with PD value was found to be similar in healthy individuals ($z = 1.074$; $p = 0.394$). PHA added and not added to the wells, the results of CD variable values were similar ($p > 0.05$). Cellular viability value in patients with AML in the wells was determined that there was no difference of statistical significance ($\chi^2 = 2,184$; $p = 0.823$). The cell viability values obtained for healthy individuals were similar for all wells ($\chi^2 = 10,714$; $p = 0.057$). Well 2 is the cell viability values obtained in the healthy individuals groups were statistically significantly higher than the cell viability values obtained in AML patients ($z = 2.246$, $p = 0.026$).

Keywords: Adipogenic, acute myeloid leukaemia, phytohemagglutinin, cell viability mesenchymal stromal cells, osteogenic

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α -kemokin	:Alfa-kemokin
ALL	:Akut lenfoblastik Lösemi
AML	:Akut miyeloid lösemi
Ang-1	:Anjiopoetin-1
ANLL	:Akut non-lenfositik Lösemi
APC	:Antijen sunan hücreler
APL	:Akut promiyelositer lösemi
AT	:Adipoz doku
AUL	:Akut Farklılaşmamış Lösemi
B7-1 (CD80)	:Ko-stimülatör moleküller B7-1
B7-2 (CD86)	:Ko-stimülatör moleküller B7-2
CD	:Farklılaşma kümesi
CXCR3	:CXC kemokin reseptör 3
CCR5	:C-C kemokin reseptör tip 5
COX-1	:Siklooksijenaz-1
COX-2	:Siklooksijenaz-2
CFU	:Koloni oluşturan birim
CFU-E	:Eritrosit koloni oluşturan birim
CFU-GM	:Granülosit ve monosit kolon oluşturan birim
CXCL12	:Kemokin C-X-C motif ligand 12
CXCL12	:CXC kemokin ligand 12
CXCR4	:C-X-C kemokin reseptör tip 4
cAMP	:Siklik adenzin monofosfat
DS	:Down sendromu
DC	:Dendritik hücre
EDTA	:Etilendiamin tetra asetik asit
FBS	:Fötal Sığır serumu
FAB	:Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırması

FLT3	:Reseptör-tip tirozin kinaz 3
FasL	:Fas ligand
FGF-4	:Fibroblast büyüme faktörü-4
GM-CSF	:Granülosit-Makrofaj koloni uyarıcı faktör
HKH	:Hematopoetik kök hücre
HLA-DR	:İnsan lökosit antijeni-DR
HGF	:Hepatosit büyüme faktörü
HLA-G	:İnsan lökosit antijen G
HO-1	:Hem oksijenaz-1
IDO	:İndolamin 2,3 dioksijenaz
IL	:İnterlökin
IgM	:İmmunoglobulin M
IgG1	:İmmunoglobulin G1
ICAM-1	:İntersellüler adezyon molekülü-1(ICAM-1)
ISCT	:Uluslararası Kök Hücre Terapisi
IFN- γ	:İnterferon-gama
İnv	:İnversiyon
JCML	:Çocukluk kronik miyelojen lösemi
Kİ	:Kemik iliği
M-CSF	:Makrofaj-koloni uyarıcı faktör
MKH	:Mezenkimal kök/stromal hücre
MHC	:Büyük doku uygunluk kompleksi
MDS	:Miyelodisplastik sendrom
MNC	:Mononükleer hücre
Nes+	:Nestin+ hücreler
NK hücre	:Doğal öldürücü hücre
NO	:Nitrik oksit ve
PD	:Popülasyonun ikiye katlanması
PHA	:Fitohemaglütinin
Ph1 pozitif	:Philadelphia kromozom pozitif

PBMC	:Periferik kan mononükleer hücre
PGE-2	:Prostaglandin E2
PPAR γ	:Peroksizom proliferatör-aktifli reseptör- γ
PBS	:Fosfat tamponu
ROS	:Reaktif oksijen türleri
STRO-1	:Mezenkimal kök hücre belirteci-1
SCF	:Kök hücre faktörü
SDF-1	:Stromal-kaynaklı faktör-1
SM α A	:Düz kas α -aktin
t	:Translasyon
THPO	:Trombopoetin
TCR	:T hücre reseptörü
TNF- α	:Tümör nekrozis faktör-alfa
Treg	:T düzenleyici hücre
VCAM-1	:Vasküler hücre-adezyon molekülü-1
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Çocukluk AML’inde tekrarlayan genetik lezyonların frekansları.....	7
Şekil 2.2.	Hematopoez basamaklarındaki hücrelerin görünümü.....	8
Şekil 2.3.	Kemik iliği mikroçevresi.....	9
Şekil 2.4.	Trabeküler kemik kavitesindeki hemotopoetik nişlerin lokalizasyonu.....	10
Şekil 2.5.	Kemik iliği homeostazı sırasında durgun fazda endosteal ve aktif perivasküler HSC nişleri gösteren bir model	14
Şekil 2.6.	Monosit/makrofaj deplesyonu ya da G-CSF ile uyarımdan sonra durgun fazda endosteal ve aktif perivasküler HKH nişlerini gösteren model.....	16
Şekil 2.7.	Mezenkimal kök hücrelerin genel özellikleri.....	17
Şekil 2.8.	Mezenkimal stromal hücreler.....	18
Şekil 2.9.	Mezenkimal kök hücrelerin doku tamiri özellikleri.....	20
Şekil 2.10.	MKH’lerin immüsupresyon özellikleri	21
Şekil 2.11.	Doğal bağışıklık sisteminde MKH’lerin immüsupresyonu.....	22
Şekil 2.12.	Kazanılmış bağışıklık sisteminde MKH’lerin immüsupresyonu	23
Şekil 3.1.	Kryoviyaller ve Flasklar.....	29
Şekil 3.2.	Tripsin-EDTA solüsyonu	30
Şekil 3.3.	Olympus CKX41 markalı invert mikroskop.....	33
Şekil 3.4.	Fitohemaglutinin ile MNC aktivasyonu	36
Şekil 3.5.	Flow-sitometri cihazı.....	37
Şekil 3.6.	Fitohemaglutinin ile <i>in vitro</i> PBMC proliferasyon assay.	38
Şekil 3.7.	Hücre sel canlılık testine ait ışık mikroskop görüntüsü 40x büyütme	39
Şekil 4.1.	AML hastası ve sağlıklı bireylerin MKH’lerinin invert mikroskop görüntüleri	41
Şekil 4.2.	AML hastasına ait hücre kültürü görüntüleri	42
Şekil 4.3.	AML hastası ve sağlıklı bireylerden elde edilen logaritmik PD değerlerine ait ortalamalar.....	44
Şekil 4.4.	MKH’lerin adipojenik farklılaşması	45
Şekil 4.5.	MKH’lerin osteojenik farklılaşması.....	46
Şekil 4.6.	Sağlıklı birey no:12’den izole edilen MNC’lerin PHA ile uyarılması sonucu elde edilen flow sitometri sonuçları.....	47

Şekil 4.7. Sağlıklı birey no:12'den izole edilen MNC'lere PHA eklenmeden elde edilen flow sitometri sonuçları.....	48
Şekil 4.8. AML hastasının no:5'ten elde edilen MNC'lere PHA ile uyarılmasından elde edilen flow sitometri sonuçları	49
Şekil 4.9. AML hastası no:5'ten izole edilen MNC'lere PHA eklenmeden elde edilen flow sitometri sonuçları.....	50
Şekil 4.10. Sağlıklı MNC vericisinden elde edilen hücrelerin PHA ile uyarılmasından elde edilen flow sitometri sonuçları.....	51
Şekil 4.11. Sağlıklı MNC vericisinden elde edilen hücrelerin PHA eklenmeden elde edilen flow sitometri sonuçları	52
Şekil 4.12. PHA eklenen ve PHA eklenmeyen durumlarda AML hastalarının belirtilen değişken değerlerinin kutu çizgi grafiği.	54
Şekil 4.13. AML hastası no:1'e ait kuyucuklardaki hücrelerin invert mikroskop görüntüleri	56
Şekil 4.14. Sağlıklı birey no:1'e ait kuyucuklardaki hücrelerin invert mikroskop görüntüleri	56
Şekil 4.15. Belirlenen kuyucuklarda AML hastaları ile sağlıklı bireyler için elde edilen yüzde hücre canlılık değerlerine ait kutu-çizgi grafiği.....	58
Şekil 4.16. AML hastaları ve sağlıklı bireyler için belirlenen kuyucuklarda yüzde hücre canlılık için elde edilen değerlere ait kutu-çizgi grafiği	59
Şekil 5.1. PHA eklenen ve PHA eklenmeyen T25'lik flaskların inkübasyon sonrası T aktivasyon ortanca değerlerine ait sütun grafiği	64
Şekil 5.2. PHA eklenen ve PHA eklenmeyen T25'lik flaslardaki T aktivasyon belirteçleri kapılama +/- yüzdelik değerleri sütun grafiği	65
Şekil 5.3. AML hastaları ve sağlıklı bireylere ait hücre canlılık değerlerine ait yüzdelik sütun grafiği	66

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	AML’de French-American-British (FAB) sınıflandırması.....	5
Tablo 2.2.	AML’lerin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması	6
Tablo 2.3.	Mezenkimal stromal hücreyi tanımlayan kriterler	19
Tablo 3.1.	AML hastalarının tanı anındaki ve sağlıklı bireylerin yaş, ortalama ve cinsiyet profilleri	28
Tablo 4.1.	AML hastaları ve sağlıklı bireylerin logaritmik PD değerleri.....	43
Tablo 4.2.	AML ve sağlıklı birey PD2 sonuçlarının karşılaştırılması	43
Tablo 4.3.	Blastik Transformasyon testinin flow sitometri sonuçlarının yüzdelerlik değerleri	53
Tablo 4.4.	AML hastalarının PHA eklenen ve PHA eklenmeyen gruplarında belirtilen değişken değerlerinin karşılaştırılması	54
Tablo 4.5.	Mezenkimal stromal hücrelerin hücre canlılığı yüzdelerlik sonuçları.....	55
Tablo 4.6.	Her bir kuyuda AML ve Sağlıklı birey sonuçlarının karşılaştırılması..	57

1. GİRİŞ

Akut miyeloid lösemi (AML), olgunlaşmamış hematopoetik kök hücrelerde bir dizi genetik değişiklik sebebi ile normal büyüme, olgunlaşma ve farklılaşmanın bozulması ve periferik kanda anormal miyeloblastların birikimi ile karakterize edilir (1). Bu hücreler kemik iliğinde birikerek normal kan hücrelerinin yapımını engeller (2).

Her yıl tanısı konulan AML, yeni tanı lösemilerin yaklaşık % 20'sini oluşturmaktadır (3). AML' nin gelişimi genel olarak çeşitli risk etmenlerine bağlıdır. Bu etmenler, yaş, hematolojik ve genetik hastalıklar ve bunların yanında virüsler, radyasyon, kimyasallar ve özellikle kemoterapidir (4).

Mezenkimal stromal hücrelerin (MKH) malignan hematolojik hastalıkları içine alan çoğu hastalık gruplarında potansiyel kullanımlarının keşfedilmesi ilgi uyandırmıştır (5). Embriyonik ve non-embriyonik kök hücrelerin, birçok hastalık tipleri için potansiyel terapötik yaklaşımlar olduğu düşünülmektedir. Yetişkin kök hücresi (MKH) kendine özgü biyolojik özellikleri nedeniyle rejeneratif tıp alanında büyük ilgi çekmiştir (6). Ayrıca MKH'lerin adipoz doku, periferik kan, umbilikal kord ve plasentadan izole edilebildikleri gösterilmiştir. MKH'ler *in vitro* çoğalma kapasitesine sahiptir ve bu özellikleri hücresel tedavide yeterli sayıya ulaşmalarını sağlamaktadır (7).

MKH'ler kemik iliğinde, non-hematopoetik stromal hücre gruplarını örneğin endotelial hücreler, kondrositler, adipositler ve osteoblastları oluşturma yeteneğindedirler (5). International Stem Cell Therapy (ISCT) MKH'leri tanımlamak için kaynaklarından bağımsız olarak üç minimal özelliği önermiştir: 1. Standart kültür koşullarında plastiğe yapışma, 2. CD105, CD 90 ve CD73 gibi spesifik olmayan belirteçlerin ekspresyonu, CD19 ya da CD79 α , CD11b, CD14, CD45, CD34, sınıf-II majör histokompatibilite kompleksi moleküllerini (MHC-II, asıl olarak HLA-DR vb.) eksprese etmemesi. 3. *in vitro*da spesifik uyarı altında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara differansiye olabilmeleri gerekir (8).

Farklı kaynaklardan elde edilen MKH popülasyonlarını karakterize etmek için kullanılacak çeşitli ek immünojenetik belirteçleri (CD29, CD44, CD146, CD166, CD271 gibi) vardır. MKH'lerin diğer fenotipik karakteristiği interferon- γ (IFN- γ) uyarısından sonra kostimülatörlerin (CD80, CD86, CD40 ve CD40L gibi) ekspresyon eksikliği göstermesidir (8). MKH'lerin eksprese ettikleri en yaygın bilinen yüzey belirteçleri STRO-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, SSEA-1 ve SSEA-4 aynı zamanda bu hücreler CD31, CD34, CD45, CD80, CD86 ve HLA-DR negatiftir (9).

Deney aşamalarımızda MKH'lerin morfolojik yapısına, popülasyon ikiye katlanma (PD) değerlerine, adipojenik ve osteojenik farklılaşmasına ve mononükleer hücrelerle ko-kültüre edilmesinden sonra hücresel canlılıklarına bakılmıştır. Ayrıca fitohemagglütinin (PHA) ile uyarılan ve uyarılmayan mononükleer hücrelerin (MNC) flow-sitometri cihazında CD3, CD4, CD25, CD69 ve HLA-DR T aktivasyon belirteçleri analiz edilmiştir. MKH-MNC ko-kültürlerinin hücresel etkileşiminden sonra MKH'lerin hücresel canlılık yüzdelik değerleri ve MKH'lerin immünsupresyon ve immünmodülatuar etkileri incelenmiştir.

Çocukluk çağı akut lösemilerinde kemik iliğinden köken alan mezenkimal stromal hücrelerin biyolojik ve immünolojik özelliklerini ortaya koyarak hastalık patogenezindeki olası rollerini aydınlatmak ve kemik iliği mikroçevresi ile mezenkimal kök hücrelerin ilişkisini anlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Lösemiler

Lösemi en fazla görülen pediatrik malignasidir ve halen çocukluk çağı kanserlerinde en sık rastlanılan ölüm sebebidir (10). Akut lösemiler, hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonları sonucu gelişen ve lösemik hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma kusuru göstermeleri ile karakterize edilen klonal bir hastalık grubudur. Bu süreçte normal kan hücrelerinin (eritrosit, lenfosit, monosit vb.) yapılamaması ve buna ek olarak lösemik hücrelerin aşırı çoğalma yeteneği göstererek kemik iliğini, periferik kanı ve diğer dokuları infiltre ederek kemik iliğinin malign bir hastalık grubunu oluşturmaktadır (11, 12).

Akut lösemi tanımı için French-Amerikan-British (FAB) kriterlerine göre kemik iliğinde bulunan blast yüzdesi, tüm nükleer hücrelerin %30'unun üzerinde olmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre bu oranın %20 olması yeterli bir durumdur (12, 13, 14, 15). Akut lösemiler, tüm çocukluk çağında görülen lösemilerin %97'sini oluşturmaktadır.

1. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) (%75)
2. Akut myeloid lösemi (AML) (%20) ya da Akut non-lenfositik lösemi (ANLL) olarak da adlandırılmaktadır.
3. Akut farklılaşmamış lösemi (AUL) (<%0.5)
4. Akut bifenotipik lösemi (AMLL)
 - a) Akut lenfoblastik lösemi ≥ 2 miyeloid-ilişkili antijenleri (MY+ ALL)(ALL olgularının %6'sı) eksprese ederler.
 - b) Akut miyeloid lösemi ≥ 2 lenfoid-ilişkili antijenler (LY+ AML)(AML olgularının %17'si) eksprese ederler.

Kronik lösemiler, çocukluk çağı lösemilerin %3'ünü oluşturmaktadır ve iki tipi bulunmaktadır:

1. Philadelphia kromozom pozitif (Ph1 pozitif)
2. Juvenil kronik miyelojen lösemi (JCML) (16).

2.1.1. Akut miyeloid lösemi

Lösemi, tanıların yaklaşık %30'unu oluşturan en yaygın pediatrik kanserlerdendir. Akut lösemilerin iki ana alt tipi bulunur. Bunlar Akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve Akut miyeloid lösemi (AML) dir. Çocukluk çağı lösemi tanılarının yaklaşık olarak %18'ini daha az sıklıkla görülen AML oluşturur. İki alt grubun etiolojisinde, risk faktörleri ve insidans, epidemiyolojik çalışmalar ve her iki hücre soyunun oldukça farklı olduğu görülmektedir. Progenitör hücrelerin sayısının artırılması ve olgun kan hücreleri sayısının azaltılması, AML farklılaşmasında bir bloğa yol açan hematopoetik progenitör hücrelerin transformasyonu ile gelişir (17).

ALL ve AML, sırasıyla kemik iliğinde biriken miyeloid progenitörlerin ya da olgunlaşmamış B ve T hücrelerin klonal yayılmasıyla karakterize edilirler. Çocukluk döneminde, % 80 olarak kesin tedavi ulaşan ALL, AML'ye göre daha olumlu bir prognoza sahiptir. Çocuklukta görülen AML, lösemi vakalarının %15-20 oluşturmakta ancak akut lösemili tüm çocuk hasta ölümlerinin % 30-40'dan sorumludur (18).

15 yaşın altında tanı alan çocuklar için beş yıllık sağkalım oranı Amerika'da 2002-2008 yılları arasında % 64.3 olduğu tahmin edilmektedir. AML alt tipleri % 22 ile % 90 arasında değişen beş yıllık sağkalım beklentilerinden çok farklı prognoza sahiptir. Yüksek sağkalım oranları görülen APL'li çocuklar (all-trans-retinoik asit ve arsenik trioksit duyarlılığı sebebiyle) ve diğer özel mutasyonlara sahip çocuklarda yüksek sağkalım oranları görülmektedir. FLT3-ITD, monozomi 7,del5q mutasyonları ve zayıf hastalık cevaplarında düşük sağkalım oranları görülmektedir (17).

French-American-British (FAB) sınıflandırmasında AML için dominant hücre tipine göre miyeloid, myeloid-monositik, monositik, eritroid ve megakaryositik olmak üzere beş alt grup vardır. Miyeloid hücre tipinde olgun hücre yüzdesine ve myeloblastın evresine göre dört alt grup vardır. Morfolojik, immunofenotipik ve sitokimyasal ölçütlere göre sekiz AML alt grubu tanımlanmıştır (18, 20, 21). FAB sınıflandırmasına göre AML'nin alt tiplerinden M6 ve M7 dışında tanı için istenen, kemik iliğinde (Kİ) > %30 blastla rastlanmasıdır. FAB sınıflandırmasına göre, AML hastaları morfolojik, blast olgunlaşma derecesi ve kimyasal özelliklerine göre 11 alt gruba ayrılmıştır. 11 farklı grup Tablo 2.1'de gösterilmiştir. WHO, FAB sınıflandırmasını sitogenetik ile kombine ederek oluşturmuştur. Örneğin, sitogenetik

alt gruplar t (8;21), inv (16) ve t (15;17) olumlu sonuçla tutarlı ilişkilendirilmiştir. Aksine, 11q23 kromozom translokasyonu, sıklıkla pediatrik AML hastalarında zayıf prognozla ilişkilidir (18).

Tablo 2.1. AML'de French-American-British (FAB) sınıflandırması (18)

Alt Tip	Tanımlama
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositer lösemi
M3V	Akut varyant promiyelositer lösemi(mikrogranuler)
M4	Akut miyelomonositer lösemi
M4Eo	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi
M5a	Akut monoblastik lösemi
M5b	Akut monositer lösemi
M6	Akut eritrolösemi
M7	Akut megakaryoblastik lösemi

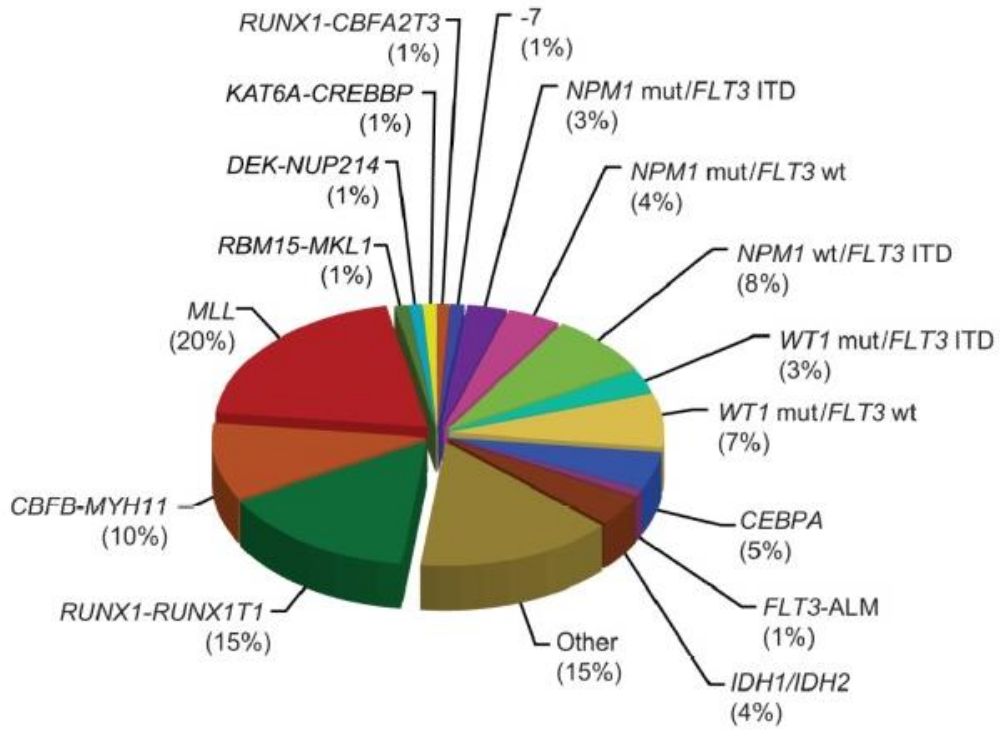
WHO akut lösemiler için birçok parametreyi içeren sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırmada morfolojik, sitogenetik, moleküler genetik, immünofenotipleme ve biyolojik özellikler dikkate alınmıştır (21). Tablo 2.2'de AML'nin WHO sınıflandırması yer almaktadır.

AML gelişimindeki en yaygın genetik faktör trizomi 21'dir. Down sendromlu çocuklar (DS), pediatrik AML'de yüksek risk taşırlar ve Akut megakaryositik lösemi olarak bilinen AML alt tipini 500 kat daha fazla risk olarak taşırlar. Pediatrik AML hastalarının çok az bir kısmı diğer genetik sendromlarla ilişkilidir. Bunlar; Fanconi anemisi, Bloom sendromu, Ataksi telenjektazi, Shwachman-Diamond sendromu, Noonan sendromu, Ağır konjenital nötropeni, Ailesel monozomi 7, Ailesel trombosit bozukluğu ve Diskeratozis konjenitadır (17).

Tablo 2.2. AML'lerin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması (22, 23, 24)

Tekrarlayan sitogenetik translokasyonlu AML'ler
<ul style="list-style-type: none">• T(8;21) AML1(CBFα)ETO ilişkili AML. İyi prognozlu• APL [t(15;17)ilişkili AML ve varyantları; PML/RARα]. İyi prognozlu• Kemik İliğinde anormal eozinofillerle karakterize AML [inv(16)(p13;q22) veya t(16;16)(p13;q11); CBFβ/MYH11X]. İyi prognozlu• 11q23 (MLL) anomalileriyle ilişkili AML. Kötü prognozlu
Çoklu dizi displazisi gösteren AML
<ul style="list-style-type: none">• Genellikle kötü prognozludur.• Öncesinde MDS olan AML• Öncesinde MDS olmayan AML
İlaça bağlı AML ve myelodisplastik sendromlar
<ul style="list-style-type: none">• Genellikle kötü prognozludur.• Alkilleyici ajanlarla ilişkili• Epipodofillo toksin ilişkili (bazıları lenfoid olabilir)
Diğer tipler
<ul style="list-style-type: none">• Başka türlü kategorize edilemeyen AML• Minimal farklılaşma gösteren AML• Olgunlaşma göstermeyen AML• Olgunlaşma gösteren AML• Akut miyelomonositik lösemi• Akut monositik lösemi• Akut eritroid lösemi• Akut megakaryositik lösemi• Akut bazofilik lösemi• Miyelofibrozla giden akut panmiyeloz

Prognostik faktörlere bakılırsa yeni tanı AML'de, hasta yaşı ve kromozom durumu, tedavi kararlarının temelini oluşturan iki önemli faktördür. Son zamanlarda, çeşitli moleküler temelli prognostik faktörler, FLT3 tirozin kinaz gen uzunluğu (ya da ITD) mutasyonunun (konstitütif aktivasyonuna yol açan juxtamembrane bölgesinde 3-30 aminoasit tekrarı) ters etkisi ve kromozom 11'in uzun kolundaki MLL geninin dublikasyonu tanımlanmıştır (1). Şekil 2.1'de pediatrik AML hastalarında tekrarlanan genetik lezyonların sıklıkları verilmiştir.



Şekil 2.1. Çocukluk AML’inde tekrarlayan genetik lezyonların frekansları (25)

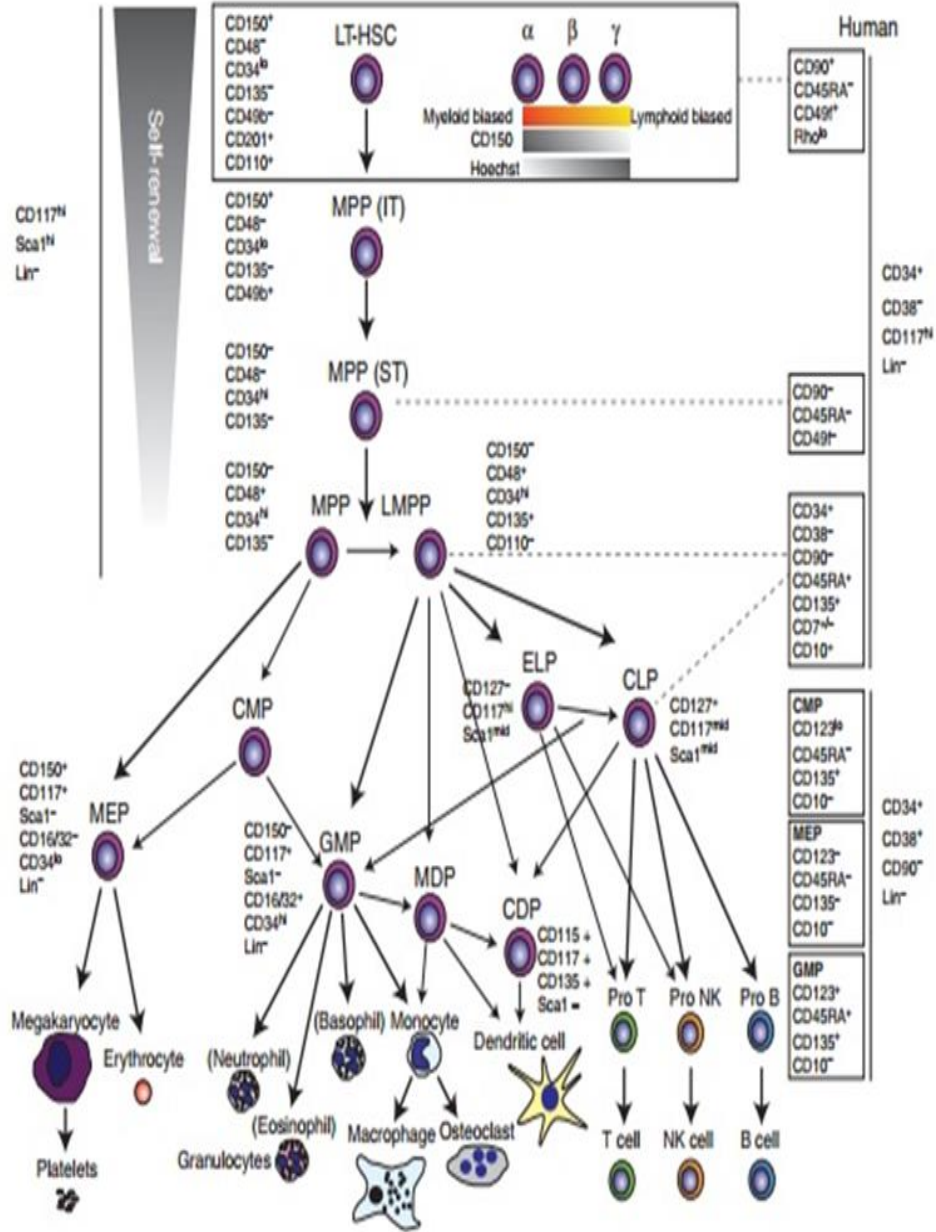
(ALM, aktivasyon loop mutasyonu; ITD, internal tandem duplikasyonu; mut, mutasyon; wt, yabancıl tip)

2.2. Hematopoetik hücrelerin gelişimi

Erişkin dönemde kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerden (HKH) dolaşım sisteminde görülen tüm kan hücreleri gelişmektedir. HKH’ler pluripotent özelliğe sahip olduğundan ötürü birçok hücre tipine farklılaşabilmektedir ve kendi kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Hücreler farklılaşmaya başladıklarında kendilerini yenileyebilme özelliklerinde azalma görülmektedir (26, 27).

İlk olarak lenfoid-miyeloid seriler birbirinden ayrılmaya başlar ve ortak lenfoid progenitör hücre ve ortak miyeloid progenitör oluşur. Bu hücreler kültüre edildiklerinde oluşturacakları özelleşmiş hücreye koloni oluşturan birim denir. CFU-E eritrositleri, CFU-GM granülosit ve monositleri oluşturur. Miyelositik hücre serisi miyeloblasttan gelişir ve bazofil, eozinofil, nötrofil, eritrosit ve trombositler gelişir. Şekil 2.2.’de hematopoetik kök hücreden gelişen progenitör hücreler, ara formda bulunan hücreler ve dolaşım sistemine katılan olgun kan hücreleri gösterilmiştir. Kök hücre faktörü, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), interlökin-3 (IL-

3), trombopoetin ve eritropoetin gibi bazı büyüme faktörleri hematopoetik sistemin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Bu faktörlerin kontrollü salınımları, kök hücrelerin kendisini yenilemesini, progenitör hücrelerin farklılaşmasını ve dolaşımdaki hücelere dönüşümlerini sağlamaktadır (26, 27).

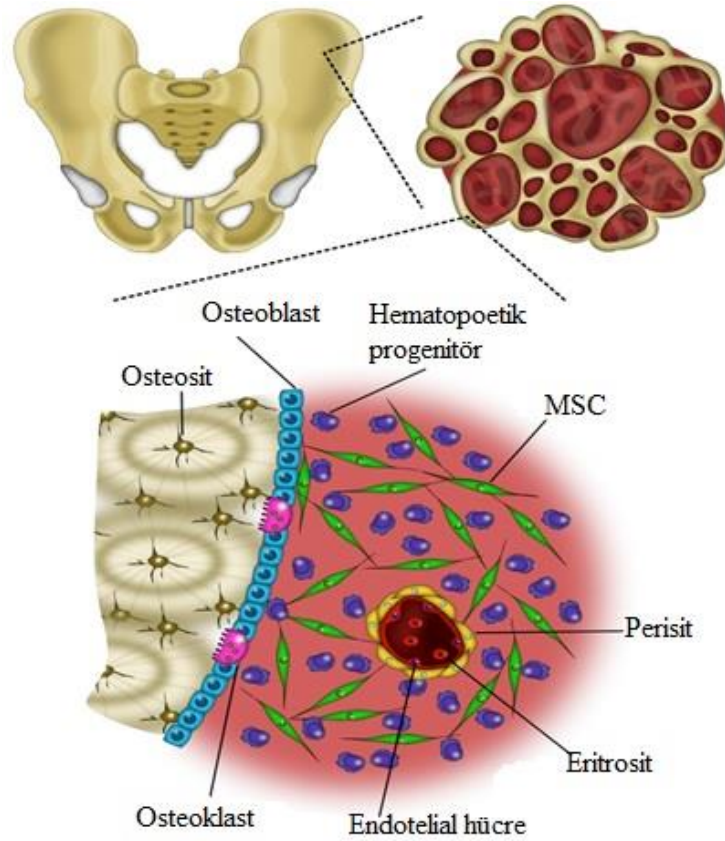


Şekil 2.2. Hematopoez basamaklarındaki hücrelerin görünümü (28)

2.3. Kemik iliği mikroçevresi

2.3.1. Endosteal niş

Yapılan çalışmalarda, farklılaşmamış hematopoetik hücrelerin endosteal kemik yüzeyine yakın yerde lokalize oldukları tersine farklılaşmış olan hücrelerin ise kemik iliği merkezi eksenine doğru hareket ettikleri gösterilmiştir. Endosteum, kemik ve kemik iliği arasındaki arayüz olmakla birlikte ve doku hasarına cevap olarak hematopoezi yeniden oluşturan ve mobilize edebilen HKH'lerin rezervuarını oluşturur. Kemik, sert ve katı bir doku olmasına rağmen, endosteal niş öyle değildir; kişisel ve sistemik düzenlenme altında plastisite sunmaktadır (29). Şekil 2.3'de kemik iliği mikroçevresi görülmektedir



Şekil 2.3. Kemik İliği Mikroçevresi (30)

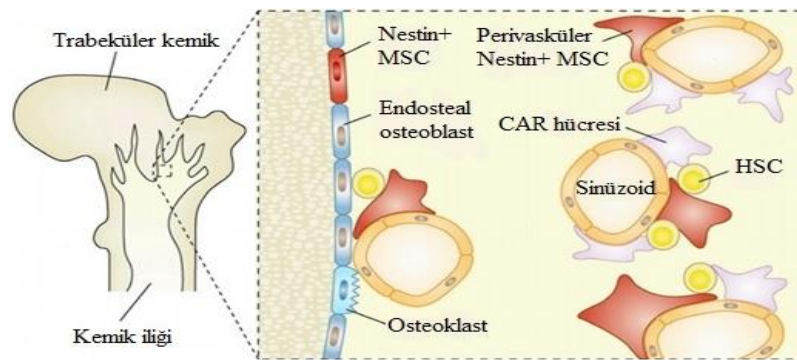
Endosteal niş bölgesinin tanımlanmasından sonra, endotelial alanda bulunan hücreler nişin hücresel içeriğini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, heterojen hücre

populasyonları kemikte- uzanan olgunlaşmış hücrelerden, osteoblastlar ve preosteoblastları da içeren hücreler ise endosteal bölgede bulunmaktadır (29, 31). Endosteal nişin önemli hücresel bileşenleri aşağıda verilmiştir.

- 1) Osteoblastik hücreler
- 2) Endotelyal hücreler
- 3) Osteoklastlar

2.3.1.1. Osteoblastik hücreler

Osteoblastlar, kemik dokudaki kemik mineralizasyonunda önemli rol oynarlar ve matriks üretiminden sorumludur. Bununla birlikte, osteoblastlar ya matriks tarafından çevrenir ve osteositlere dönüşür ya da geri dönüşebilen bir işlemle kemikte-uzanan hücreleri oluştururlar (29, 32). Kemiği oluşturan osteoblastik hücreler yüksek verimleri nedeniyle hematopoetik dokuların hematopoezi için önemli rol oynamaktadırlar. Şekil 2.4'te trabeküler kemik kavitesindeki hematopoetik nişlerin lokalizasyonu verilmiştir. Primer insan osteoblastlarının *in vitro* koşullarda hematopoeze katılma olasılıklarını arttıran primitif CD34+ hematopoetik progenitörlerin proliferasyonunu stimule ettikleri gösterilmiştir (29, 33). Endosteal nişte bulunan HKH'lerin bakımı ve düzenlenmesine katkıda bulunan osteoblastik hücreler çok sayıda hücresel sinyalizasyon moleküllerini sentezlemektedir.



Şekil 2.4. Trabeküler kemik kavitesindeki hematopoetik nişlerin lokalizasyonu (30)

Kemokinler ve onların reseptörleri HKH'lerin davranışlarını kontrol etmektedir. En iyi bilinen kemokin stromal-derived faktör-1 (SDF-1)'dür, kemokin C-X-C motif ligand 12 (CXCL12) olarak da bilinmektedirler. SDF-1 reseptör, C-X-C

kemokin reseptör tip 4 (CXCR4)'tür ve HKH'lerde ve progenitörlerde eksprese edilmektedirler (34).

Alfa-kemokinler, organ hemostazisinde, embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve primitif hematopoetik progenitörler olarak işlev görürler. SDF-1 de alfa-kemokinlere aittir (35).

SDF-1, hematopoetik ve endotelial hücreleri içeren çeşitli dokularda geniş bir şekilde eksprese edilen CXCR4 reseptörünü dengelemektedir. Kalbin ventiküler septum oluşumunu, kemik iliği miyelopoezini ve B-hücre lenfopoezini de düzenleyen SDF-1/CXCR4 sinyalleri, embriyonik gelişim boyunca önemli bir role sahiptir (36).

Paratiroid hormonunun salınması ile osteoblast aktivasyonunu belirgin şekilde arttıran HKH'ler, Notch reseptörlerinin ligandını sentezlerler. HKH'deki Notch reseptörlerinin aktivasyonu, *in vitro* koşullarda kendi kendini yenileyebilme yeteneğinde artışa sebep olmasına rağmen farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (37).

Osteopontin, osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks glikoproteinidir. Osteopontin, osteoblastik nişte HKH'lerin adezyonunu destekler ve HKH'lerin proliferasyonunu negatif şekilde regüle eder, sessiz fazda kalmalarına katkı sağlamaktadır (38).

Trombopoetin (THPO) ve angiopoetin (Ang-1), MPL ve Tie2 hücre reseptörlerine bağlanır ve HKH'lerde eksprese edilirler. Bu sitokinler fare modellerinde, THPO ve Ang-1'nin kemik iliğindeki HKH'lere zarar verebileceği ve sayılarını azaltabileceği düşünülmektedir (34).

Hem osteoblastlarda hem de HKH'lerde N-kaderin eksprese edilir ve kemik iliği görüntüleme çalışmalarında SNO hücrelerin (*spindle-shape-lining osteoblastlar*) N-kaderin interaksiyonları boyunca HKH'lerle ilişki kurdukları tespit edilmiştir (39).

Erken faz HKH karakterizasyon çalışmaları, osteoblastlar tarafından sentezlenen bir büyüme faktörünün keşfine yönlendirmiştir. Bu büyüme faktörü kök hücre faktörü olarak adlandırılır ve *in vitro* kendi kendini yenileyebilmeyi, *in vivo* HKH aktivitesini düzenlemektedir. HKH'ler, bir transmembran reseptörü tirozin kinaz, kök hücre faktör reseptörü eksprese eder ve SCF'ye bağlanabilir. Ayrıca HKH düzenlenmesi için önemli intrasellüler sinyalleri aktive etmektedir (40).

Wnt sinyal yollarının çeşitli bileşenlerin, HKH'lerin kendi kendini yenilemesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Wnt sinyalleri, kemik oluşumunda ve endosteal yüzeylerin genişlemesinde önemlidir (41).

2.3.1.2. Endotelial hücreler

Endotelial hücreler, HKH mikroçevresinde önemli rol oynamaktadır. *In vivo* ve doku görüntülerinde HKH'ler endotelial hücrelerin yanında lokalize olmuşlardır. Ayrıca, endotelial hücreler, *ex vivo* da insan primitif hematopoetik hücrelerin sayısını artıran çözünebilen faktörler salgırlar (42).

2.3.1.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar, osteoblastları yönlendiren bir işlemle çok sayıda granülosit-makrofaj progenitor hücrelerin füzyonuyla oluşur. Osteoklastlar kondrositler ya da osteoblastlar tarafından oluşturulan mineralize kemik matriksini yeniden absorbe ederler ve endosteal nişte lokalize olurlar. Osteoklastların endosteal niş bileşenlerin bozunmasına sebep oldukları ve hematopoetik progenitor hücrelerin mobilizasyonunu uyardıkları rapor edilmiştir (43).

Osteoklastlarca sentezlenen enzimler, endosteal nişten HKH'lerin salınmasından sorumludur. Bu enzimler, HKH'ler ve onların nişleri arasındaki ilişkileri arttıran faktörleri inaktive ederler (32).

2.3.2. Vasküler niş

Hematopoez ve vaskülarizasyon, gelişim boyunca aynı anda meydana gelir. Gerçekte, embriyonik dönemde HKH'ler ve endotelial hücreler ayrı progenitor hücrelerden Hemangioblast denilen hücrelerden köken alır ve hematopoezin ontojenisiyle yakın ilişkilidir (44).

Vasküler nişte, HKH'lerin engraftmanı, mobilizasyonu ve yerleşmeleri için gerekli olan önemli faktörleri ürettikleri gösterilmiştir. Endotelial hücreler megakaryositlerle yakın ilişkili olmakla beraber vasküler hücre-adezyon molekülü-1

(VCAM-1), onların progenitörleri olan VLA-4 kemotaktik faktörlere cevap olarak, stromal hücre-kökenli faktör-1 (SDF-1) ve fibroblast büyüme faktörü-4 (FGF-4) eksprese ederler, böylelikle megakaryosit olgunlaşması ve platelet oluşumu için bir niş oluştururlar (45).

Mezenkimal hücre özellikleri işlevine sahip olan niş hücreleri:

1. CXC kemokin ligand 12 (CXCL12)-CAR hücreleri
2. Nestin+ mezenkimal kök hücreler (46).

2.3.2.1. CAR Hücreleri

Son yıllarda bu hücrelerin SDF-1 (CXCL12)'i yüksek düzeylerde salgıladıkları gösterilmiştir ve CXCL12-bol retiküler (CAR) hücreler olarak adlandırılmıştır. Fenotip olarak bu hücreler VCAM-1, CD44, platelet-kökenli büyüme faktör reseptörü (PDGFR α ve PDGFR β) eksprese ederler ve ayrıca adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitesine sahip oldukları bilinmektedir (46).

Histokimyasal analizlerde, tüm kemik iliği sinüzoidal endotelial hücreleri, CAR hücrelerinin bir kısmı tarafından kuşatılmıştır. Bununla birlikte, CAR hücreleri, pan-endotelial marker platelet/endotelial hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1)/CD31 ya da düz kasta düz kas α -aktin(SM α A) eksprese etmezler. CAR hücreleri, endotelial hücreler ve düz kas hücrelerinden farklıdır (47).

Fare modellerinde, difteri toksini kullanılarak yapılan CAR hücreleri depleasyonu, total HKH sayısı gibi lenfoid ve eritroid progenitörlerin döngülerinde azalmaya neden olmaktadır. HKH'lerin çoğalmasından ziyade sessiz fazlarının düzenlenmesi CAR hücreleri tarafından yapılmaktadır. CAR hücrelerinin ablasyonu, osteoblastlar ya da endotelial hücreler gibi diğer niş hücre bölümlerini etkilemezler (34).

2.3.2.2. NES+ Hücreler

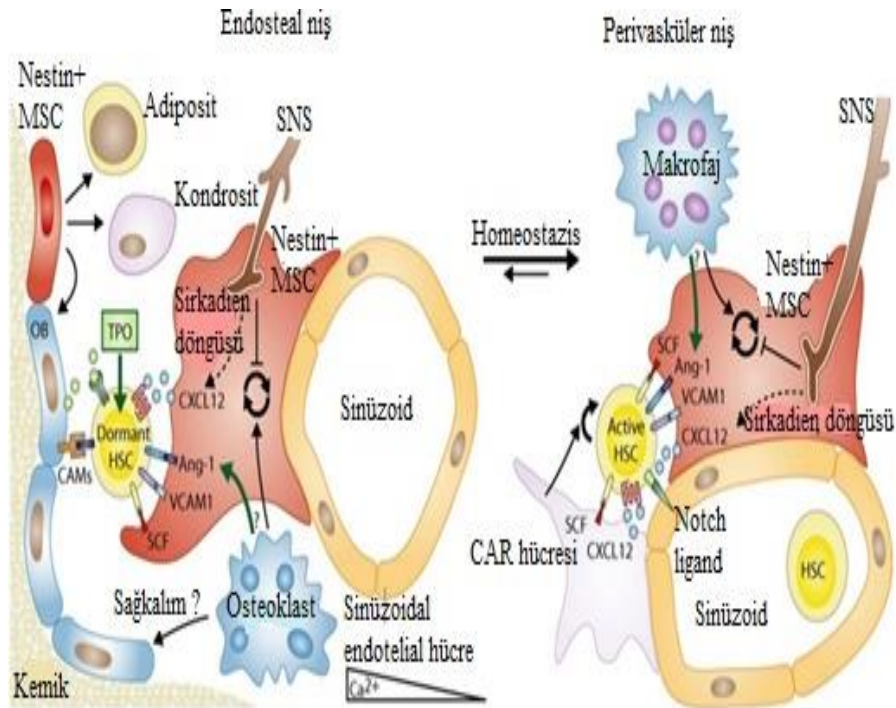
Nestin, orijinal olarak nöral progenitörün belirteci olan bir ara filament proteindir. Ekspresyonu daha sonra progenitör hücrelerin ve endotelial hücrelerin birçoğunda tespit edilmiştir (47). NES+ MKH'ler, adipositlere, osteoblastlara ve

kondroblastlara farklılaşabilirler ve onların HKH regülasyonu G-CSF [CXCL12, SCF, angiopoietin, IL-7 ve vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1)] eksprese ederek HKH'lerin yeteneklerinin azaltılmasının düzenlenmesi ile modifiye edilir (48). Nestin+ hücrelerin osteoblastları da içeren çeşitli mezenkimal hücre hatlarına çok yönlü farklılaşabilmesi gösterilmiştir (33).

Nestin+ hücreler, HKH'lerin regülasyonunu içeren genleri de yüksek düzeyde eksprese ederler: Cxcl12, c-kit ligand, angiopoietin-1, interlökin-7, vasküler adezyon molekül-1 ve osteopontin (46).

2.4. Endosteal ve Vasküler niş arasındaki ilişki

Endosteal niş, kemik boşluğunun iç yüzeyinde lokalize olmuştur, osteoblastlarca zengindir ve sessiz fazda uzun-dönem HKH'ler için rezervuar olarak görev yapmaktadır. Bunun yanısıra, vasküler niş kan damarlarını döşeyen endotelial hücrelerden oluşur, kısa-dönem HKH'lerin farklılaşma ve çoğalma için ortam sağlamaktadır (Şekil 2.5). Her iki nişte, hematopoetik homeostazın korunmasında ya da hasardan sonra yenilenmesinde beraber davrandıkları bilinmektedir (38).



Şekil 2.5. Kemik iliği homeostazı sırasında durgun fazda endosteal ve aktif perivasküler HKH nişleri gösteren bir model (30)

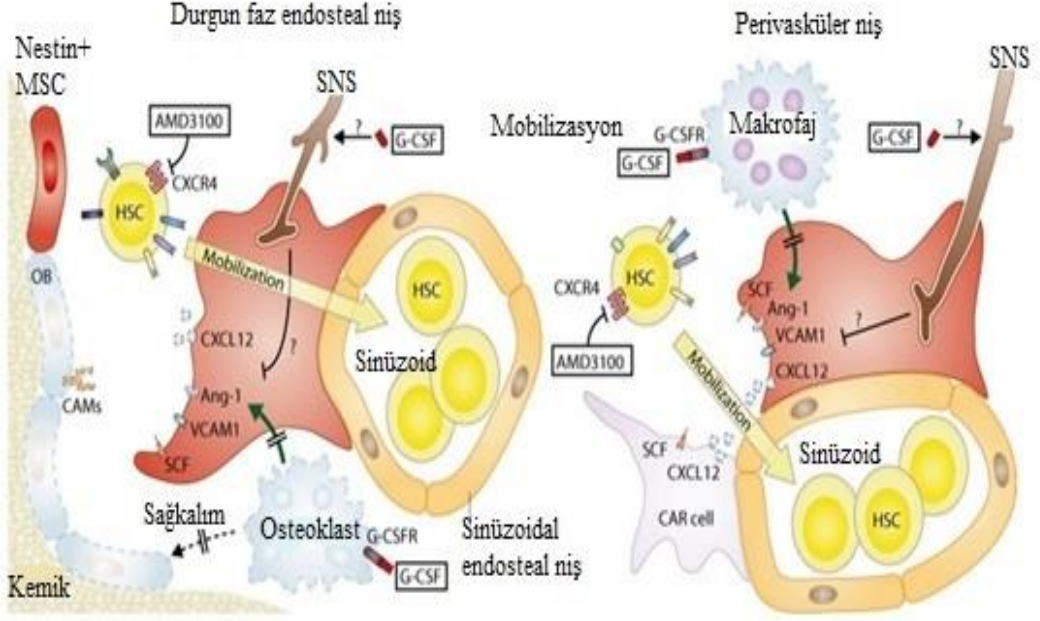
HKH'lerin iki tür nişi anatomik ve fizyolojik olarak tanımlanmıştır. Elde edilen verilere göre endosteal ve vasküler nişlerin her ikisinin de lokasyon ve işlev olarak çakıştığı bilinmektedir. Üç boyutlu görüntülerde, trabeküler kemiklerin yüzeylerinde vasküler yapılar bol miktarda bulunmaktadır ve bu damarlar endosteal yüzeylerde, trabeküler bölgenin içinde birbirleriyle eşleşmektedir (48).

Her iki niş arasındaki en önemli fark oksijen düzeyleridir. Hipoksik koşulları endosteal nişten yüksek olan vasküler nişte, HKH'ler vasküler nişe hareket ederler ve hematopoezi yenilemek yerine hücre döngüsüne devam ederler. HKH'ler, tekrar G0 fazda tutulması öngörölmüş olan endosteal nişe geri dönerler (49).

2.5. Nişlerin dışında bulunan hematopoetik kök hücreler

Yetişkin insanlarda HKH'lerin büyük bir çoğunluğu kemik iliğinde bulunur, ancak HKH'ler dikkate değer hareketlilik gösterirler. Özel sinyallere yanıt olarak, sırasıyla mobilizasyon ve homing olan süreçlerde endosteal nişe HKH'ler yeniden girebilir ve çıkabilirler (50).

SDF-1/CXCR4 ekseninin modülasyonunu içeren G-CSF ile uyarılmış mobilizasyon daha sonra gösterilmiştir. Bu sayede SDF-1 düzeylerinin azaltılması ve onun reseptörü olan CXCR4 arttırılması kök hücre mobilizasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte, önerilen kanıtlara rağmen, G-CSF'in mobilizasyon etkisiyle kapasitesini değiştirerek, periferal kan ve kemik iliği arasında SDF-1(CXCL12) gradientini modifiye ettikleri bilinmektedir. HKH'lerin salınımı ve bunu kontrol eden mekanizmaların neler olduğu kullanıldığı tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (51). Şekil 2.6'da Monosit/makrofaj deplesyonu ya da G-CSF ile uyarımdan sonra durgun fazda endosteal ve aktif perivasküler HKH nişlerini gösteren model verilmiştir.



Şekil 2.6. Monosit/makrofaj depleasyonu ya da G-CSF ile uyarımdan sonra durgun fazda endosteal ve aktif perivasküler HKH nişlerini gösteren model (30)

2.6. Kök hücre

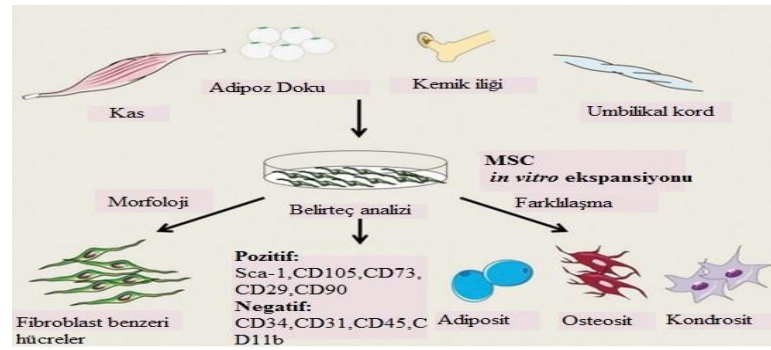
Kök hücrelerin biyolojik işlevlerine göre tanımlandıkları bilinmektedir. Henüz farklılaşmamış hücreler olarak kendi kendilerini yenileyebilme yetenekleri sayesinde kök hücre havuzunun devamını sağlamaktadırlar. *In vivo* koşullarda birden farklı işlevsel hücrelere farklılaşabilirler (52, 53, 54). Kök hücre transplantasyonu gerçekleştirilen hastada ömür boyu kalma yeteneğine sahiptirler (52, 54).

Embriyogenezde ve post natal evrede kök hücrelerin kritik öneme sahip oldukları bilinmektedir. Çevresel uyarılara cevap olarak farklılaşmamış bir hücrenin fenotipini değiştirmesine plastisite ve buna ek olarak da kök ya da progenitör hücrenin bir veya daha fazla olgunlaşmış hücreye farklılaşabilme yeteneğine potansi denilmektedir. Kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş grup altında tanımlanmaktadır. Fötal dokular hariç, vücudun herhangi bir hücresine dönüşebilen kök hücrelere pluripotent; vücudun birkaç tipteki hücresine dönüşebilen kök hücrelere multipotent; sadece bir hücre tipine dönüşebilen hücrelere unipotent hücreler denmektedir (52,55).

2.6.1. Mezenkimal stromal hücre/Mezenkimal kök hücre

Mezenkimal stromal hücreler (MKH), plastik yüzeylere yapışan, uygun şartlarda çok farklı hücre tipine dönüşebilen, morfolojik olarak fibroblast hücrelere benzeyen ve kendi kendini yenileyebilme özelliklerine sahip hücrelerdir. MKH'lerin dokularda lokalize olan olgun hücreleri üretebildikleri de bir çok çalışmada da gösterilmiştir (9).

MKH'nin, kemik iliğinden kolayca izolasyonlarının yapılabilmesi ve kültür kaplarındaki plastik yüzeye yapışmalarıyla karakterize edildikleri bilinmektedir. MKH'ler, fetal ve erişkin evrelerde ilk olarak kemik iliğinden, umbilikal kordon kanı ve kordon stromasından izole edilmiştir. Ayrıca amniyon sıvısından, diş pulpasından, adipoz dokulardan, sinoviyal sıvıdan ve plasentadan da izole edilmiştir (52, 56).



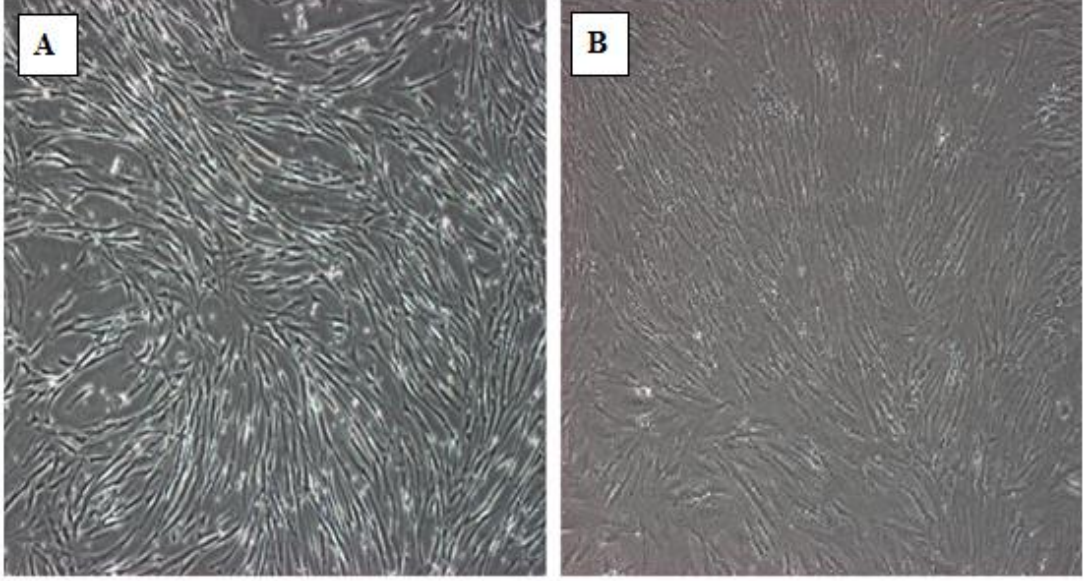
Şekil 2.7. Mezenkimal kök hücrelerin genel özellikleri (57)

MKH'ler aynı zamanda da multipotent MKH olarak da bilinmektedir ve *in vivo*, *in vitro* şartlar altında vücudun çok farklı doku ve hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bu yapılar; kemik, tendon, kıkırdak, kas, ligament, yağ, bağ, dermis ve Kİ stromasıdır (52, 58). Şekil 2.7'de mezenkimal kök hücrelerin genel özellikleri görülmektedir.

Doku mühendisliğinde, hücresel tedavilerde, bazı hastalıkların önlenmesinde, yüksek çoğalma hızından ve yapılan akademik ve araştırma tabanlı çalışmalarda MKH kullanımları ile ilgili etik ve yasal problemlerin eksiklikleri nedeniyle en çok merak uyandıran tercih edilen hücre grubu olmuştur (9).

Son yıllarda MKH'ler özellikle hematopoezi desteklemesi ve multipotent karakter taşıması nedeniyle dikkati üzerine çeken hücre grubu olmuştur.

İmmünespresif özellik taşıdıkları bilimektedir (59). Şekil 2.8'deki MKH'ler AML hastası no:1'den kültüre edilip görüntülenmiştir.



Şekil 2.7. Mezenkimal stromal hücreler

(A)AML hasta birey no:1'e ait MSC'ler (B)Sağlıklı verici no:1'den alınan MSC'ler.*Sağlık Bakanlığı Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji Hastanesi Kök hücre işleme ve saklama laboratuarında Olympus CKX41 marka invert mikroskopta 40x'lik görüntüsü alınmıştır.

MKH'ler kemik iliği mikroçevresinin önemli bir bileşenidir ve ayrıca HKH'lerin proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenleyen ve destekleyen bir yapıya sahiptir. MKH'lerin iki önemli özelliği; birincisi transplantasyon durumunda verici hücre kaynağı olması, ikincisi ise *in vitro* şartlarda da hem otolog hem de allojenik MKH'lerin lenfosit proliferasyonunu azaltmaları ve *in vivo* şartlarda da sistemik tabanlı immünespresyona sebep olmalarıdır. Buna ek olarak MKH'ler monositlerin dendritik hücrelere (DC) ve potent durumdaki antijen-sunucu hücrelere differansiyasyonlarını baskılayabilir. Sonuç olarak MKH'lerin immünolojik olarak da çok yönlü tepkileri ortaya çıkmaktadır (5).

MKH'ler sitokin ve kemokin gibi immün modülatuar salgılayarak doku tamirine, inflamasyonlu ve hasarlanmış dokulara da etki ederler. Akut doku hasarlarında özellikle akciğer, kalp, karaciğer ve böbreklerde MKH'lerin yararlı oldukları belirlenmiştir (52, 60).

En yaygın bilinen MKH'lerce eksprese edilen hücre yüzey belirteçleri STRO-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, SSEA-1 ve SSEA-4 pozitif iken CD31, CD34, CD45, CD80, CD86 ve HLA-DR için negatiftir (9).

MKH'leri tanımlamak için Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (ISCT)'nin belirlediği kriterler Tablo 2.3' de verilmiştir.

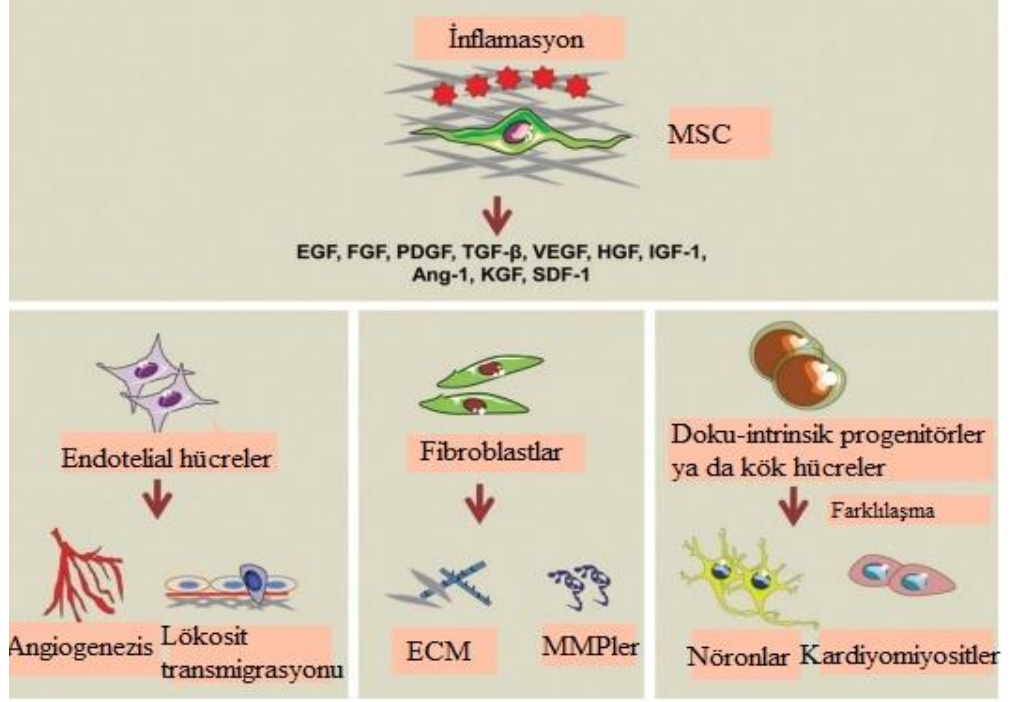
Tablo 2.3. Mezenkimal stromal hücreyi tanımlayan kriterler (61)

1	Standart kültür ortamında plastiğe yapışmaları
2	Fenotip Pozitif ($\geq\%95+$) CD105 CD73 CD90
	Negatif ($\leq\%2+$) CD45 CD34 CD14 veya CD11b CD79a veya CD19 HLA-DR
3	<i>In vitro</i> kültür ortamında osteoblast, kondroblast ve adipositlere farklılaşabilme yeteneği

2.6.1.1. Mezenkimal stromal hücrelerin immünmodülatuar özellikleri

Literatürde MKH'lerin klinik üzerinde önemli etkileri mevcuttur. Bu hücrelerin hem doğal hem de kazanılmış immün sistemlerde görev alan lenfositlerle aralarındaki etkileşimleri sonucunda immünsupresif ve anti-inflamatuar etkilerinin güçlü olduğu görülmektedir. MKH'ler; T-hücre proliferasyonunu, B hücre işlevlerini, NK hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini baskılar ve dendritik hücrelerin (DC) aktivasyonunu, olgunlaşmasını ve farklılaşmasını önlemektedir (62).

MKH'lerin potansiyel olarak hücre-hücre interaksiyonunda parakrin etkiler sayesinde immün cevapları düzenledikleri bilinmektedir. Parakrin etkiyle IL-6, IL-10, indolamin 2,3 dioksijenaz (IDO), transforming büyüme faktörü (TGF- β), prostaglandin E2 (PGE-2), hepatosit büyüme faktörü (HGF), nitrik oksit (NO) ve hem oksijenaz-1 (HO-1) gibi çözünebilen immün modülatuarların salınmasına sebep olmaktadır (63) (Şekil 2.9). IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α ve INF- γ gibi inflammatuar moleküllere cevap olarak, MKH'ler bağışıklık hücrelerinin pek çok tipleri arasında karmaşık bir geri besleme mekanizması ile çalışır. Bu mekanizma bir dizi büyüme faktörleri ve anti-inflamatuar proteinler salgılar (64).



Şekil 2.8. Mezenkimal kök hücrelerin doku tamiri özellikleri (57)

MKH'ler inflamasyon durumunda T hücreler, doğal katil hücreler (NK hücreleri), B hücreler, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler de dahil olmak üzere, pek çok bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını ve işlevini önlemektedir (64).

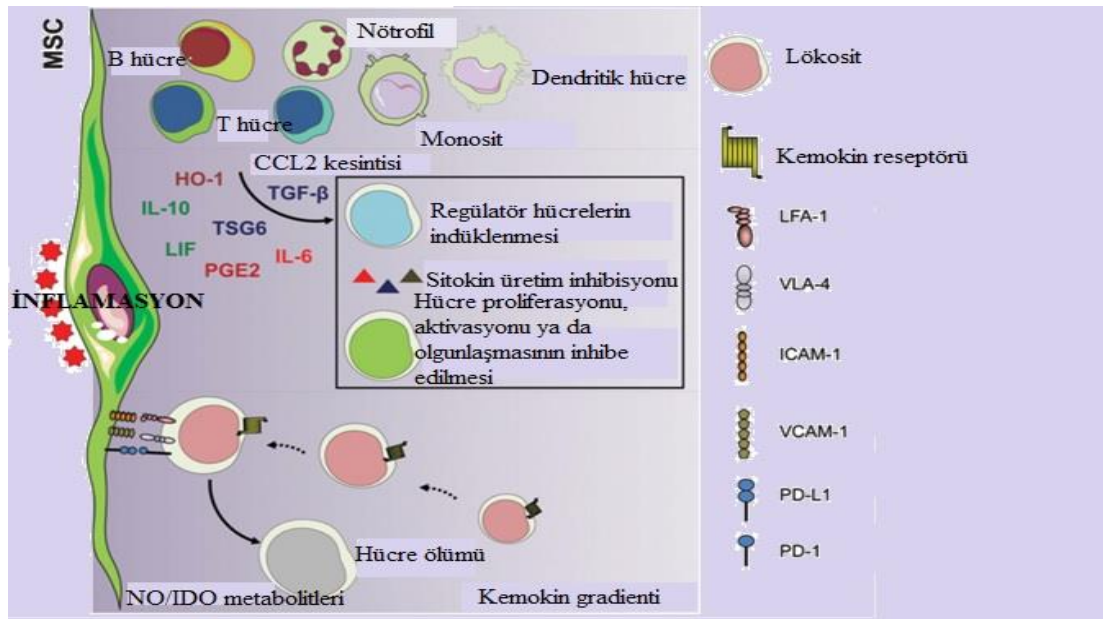
MKH'ler, MHC sınıf I orta derece veya düşük seviyede ve MHC sınıf II antijen ekspresyonları, ko-situmulator moleküller B7-1 (CD80) , B7-2 (CD86), CD40 ya da CD40L ve FasL yokluğu ile karakterize edilen immüntolerans fenotipi uyarır (63).

Bunlardan başka, hücre-hücre etkileşimi ve çözünebilir faktörlerin üretimini sayesinde MKH'ler, üretilen düzenleyici T hücreler (Treg) tarafından immünsupresif çevreyi uyarırlar. MKH'lerin *in vitro*, *in vivo* ve çeşitli modellerde Treg'leri indüklenme yetenekleri gösterilmiştir. Ayrıca, *in vivo* Treg'lerin gelişimini destekleyebilmesi sağlayan IL-10 salgılayan plazmositoid dendritik hücreleri de uyarırlar. Bu gözlemler MKH'lerin doğrudan aktif bağışıklık hücrelerini baskılayarak ve dolaylı Treg'leri toplayarak bağışıklık düzenlenmesinde anahtar düzenleyiciler olarak bulunduğu önerilmektedir (62).

2.6.1.2. Mezenkimal stromal hücrelerin immünsupresyon özellikleri

MKH'lerin hedef immün efektör hücreler üzerinde geniş bir çalışma alanı vardır ve inflamatuvar cevapları sırasında doğal ve kazanılmış bağışıklık hücrelerinin temel işlevlerini inhibe ederler (65). TNF- α , IL-1 α ya da IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerden birisiyle olan IFN- γ kombinasyonu, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), CXCR3 ligandı ve CCR5 ligandları gibi kemokin adezyon molekül ekspresyonu MKH'lerin yüksek seviyelerde immünosupresif faktörlerin salgılanmasını stimüle eder (57).

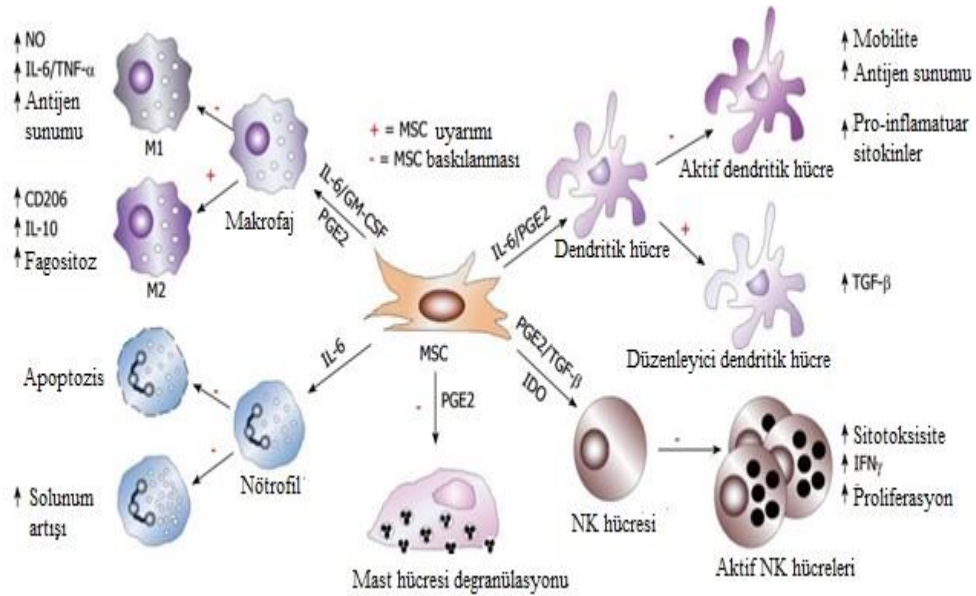
MKH'lerin immün işlevlerini düzenleyen kesin mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, hücre-hücre etkileşimi için gerekenler açık olmasa da bu işlevleri içeren birkaç çözünebilir faktör tanımlanmıştır. MKH'ler tarafından salgılanan ve en çok çalışılan çözünebilir moleküller ve sitokinler; indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), prostoglandin E2 (PGE2), transforming büyüme faktör-beta (TGF- β), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve interlökin-10 (IL-10). Ayrıca, son birkaç yıl içinde, insan lökosit antijen G (HLA-G) gibi diğer moleküller MKH'lerin immünmodülatuar özellikleri ile ilişkili bulunmuştur (65). Şekil 2.10'da MKH'lere ait immünsupresyon özellikleri göstermiştir.



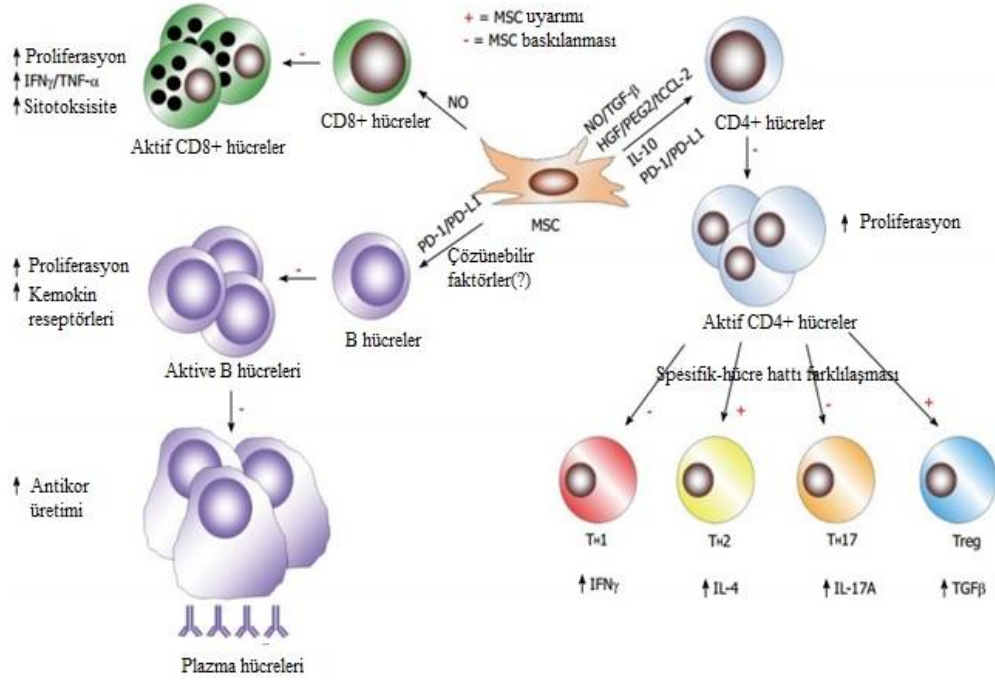
Şekil 2.9. MKH'lerin immünsupresyon özellikleri (57)

MHC sınıf I ekspresyonu zayıf olmasına rağmen, NK hücreler aracılı hücre ölümlerinden MSC'leri korumaktadır. Ayrıca MHC sınıf II ekspresyon eksikliği bu hücrelerin CD4 hücreler tarafından immün tanıma sisteminden kaçmasına imkan sağlamaktadır. İlginç bir şekilde, hem MHC sınıf I ve MHC sınıf II molekülleri INF- γ varlığında upregüle olabilirler, hatta bu koşullarda MKH'ler immünojenik cevabı uyarmazlar. Ayrıca kostimülatör molekül CD40, inflamasyon koşullarında MKH'ler üzerinde artış gösterebilmektedir (66). Şekil 2.11'de MKH'lerin doğal bağışıklık sistemi üzerine Şekil 2.12'de kazanılmış bağışıklık üzerine etkileri gösterilmiştir.

CD40 ekspresyon artışına rağmen, T hücreler tam olarak aktive olmaz. Çünkü diğer moleküller de bu aktivasyon için gereklidir. Ko-stimülatör sistem, inhibitör moleküller tarafından sıkıca regüle edilirler (67). Örneğin, inflamatuvar koşullar altında, inhibitör molekül CD274 (ayrıca PD-L1 olarak bilinir) artışına sebep olur ve ekspresyonu MKH tarafından CD40 ekspresyonunu dengelemek için bir mekanizmada kullanılabilir (66).



Şekil 2.10. Doğal bağışıklık sisteminde MKH'lerin immünsupresyonu (68)



Şekil 2.11. Kazanılmış bağışıklık sisteminde MKH'lerin immünsupresyonu (68)

Seminal çalışmada, Nicola ve arkadaşları MKH'lerin hem karışık lenfosit kültürlerinde hem de poliklonal aktivatörlerin [IL-2 ya da PHA] varlığında T-lenfosit proliferasyonunu inhibe edebilirler. Ayrıca, MKH'ler tarafından hem CD4 hem de CD8 T hücreler eşit şekilde inhibe edilirler ve bu etki doza bağlıdır (69).

Başlangıçta, MKH'ler MHC-bağımsız bir mekanizma yoluyla T hücre çoğalma proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (70). Ayrıca, MKH'ler T-hücre apoptozisini uyarmamaktadır ve hücre döngüsünün G0 fazında T-hücrelerin durmasına MKH -T hücre temasına yol açmaktadır (66).

Bazı çalışmalarda, lenfositler üzerinde MKH'lerin yalnızca anti-proliferatif etkisi oluşur, sessiz koşulda olmasına rağmen, MKH, T-hücresinin hayatta kalmasını destekler. Gerçekte, MKH'lerin T-hücre aktivasyonunu stimüle etmediği iyi bilinmektedir. Bazı çalışmalar şunu gösteriyor ki; diğerleri bu belirteçlerin ifadesinde hiçbir değişiklik bulmazken, MKH'ler aktivasyon belirteçlerinin ekspresyonunda bir azalmaya sebep olur. Birlikte ele alındığında, MKH'lerin immün cevaptan kaçma yeteneği ve T-hücre proliferasyonunu modüle etmek için hücre tedavilerde kullanılmaları bu hücreleri çekici adaylar haline getirmektedir (66).

2.7. Mezenkimal stromal hücrelerle etkileşen immünitede görevli hücreler

2.7.1. T Hücreler

T hücre proliferasyonunun MKH-aracılı inhibisyonu oldukça detaylı tanımlanmıştır. *In vitro* MKH'ler ne olursa olsun lenfositlerde uyarılan sinyal yolu (örn. alloantijen-mitojen- ya da anti-CD3/anti CD28-aracılı uyarı) ile T hücre proliferasyonunu inhibe edebilir. Aynı ya da farklı donörlerden elde edilen T hücreler ve MKH'lerin ko-kültürlerinde benzer verimliliğe sahip olduğu gösterildiği gibi bu immün modülasyonda antijen karşılaştırılmasını gerektirmez (69, 70).

Mezenkimal kök hücreler tarafından hangi mekanizmalarla T hücrelerin immüsupresyonunu uyardıkları karışıktır ve salgılanan çeşitli efektör moleküller bu işlevle bağlantılıdır.IDO, PGE2, TGF- β ve HGF bu süreçte önemli rol oynamaktadır (65).

MKH'lerde,IDO yapısal olarak ifade edilmez, ama esas olarak, IFN- γ inflamatuvar sitokinler ile uyarılması sonucunda, transkripsiyonu önemli ölçüde artar (72).MKH'lerde IDO bir kez eksprese edildiğinde, bu enzim triptofanın yıkılmasını katalizler ve T hücreler üzerine MKH'lerin immünmodülatuar özelliklerini indükler (73).PGE2 siklooksijenaz 1 ve 2 (COX-1,COX-2) tarafından yağ asitlerinden sentezlenir ve T hücreler üzerine immüsupresyon özellikleri detaylı olarak çalışılmıştır. PGE2, IL-2 ve IFN- γ sekresyonunu azaltır ve T hücre çoğalması engellenmesine yol açan siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerini artırır. MKH tarafından üretilen PGE2 ve proinflamatuvar faktörlerin salgılanmasını artırır (74).

MKH'lerde COX-2 'nin kimyasal inhibisyonu ve T hücre ko-kültürlerinde PGE2 seviyelerini azaltır ve MKH odaklı immüsupresyonda kısmi bozulma ile sonuçlanır (75). TGF- β 'nin immüsupresyondaki rolü tam olarak bilinmemektedir. TGF- β 'nin farklı izoformları immün düzenlenme ile bağlantılı olmasına rağmen, ko-kültürlere nötralize antikolarlar ya da yalnızca karışık lenfosit reaksiyonu (MLR) eklenerek gösterildiğinde, diğer yayımlar bu fonksiyonu ekarte etmişlerdir (76).MKH'lerde eksprese edilen HGF, MKH-aracılı immüsupresyonda önemli rol oynamasına rağmen hala tam olarak bilinmemektedir. HLA-G5, erişkin MKH'ler

tarafından eksprese edilir ve salgılanırlar ve CD4 + CD25 + Foxp3 + regülatör T hücreleri ve IL-10 de dahil olmak üzere bir mekanizma ile, aktive edilmiş T hücreleri üzerinde MKH'lerin immünosupresif etkiler ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (65).

2.7.2. B Hücreler

MKH'ler B hücrelerin proliferasyonunda inhibitör etki yaratırlar ve bu hücrelerin plazmositlere terminal farklılaşmasını baskılayabilirler (78, 79). Ayrıca, B hücreler MKH'lerle ko-kültüre edildiklerinde B hücrelerin kemokin reseptör ve ligandlarının (CXCR4, CXCR5, CXCL12 ve CXCR4) sentezinin azaltılması sayesinde MKH'ler B hücrelerin kemotaktik özelliklerini inhibe edebilirler (77).

B hücre işlevi üzerinde MKH'lerin immünosupresif etkisi *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. MKH'lerden kültür mediumuna salınan humoral faktör (ler) T-hücre-bağımlı ve T hücre-bağımsız antijenler ile aşılınmış farelerde antijen-spesifik IgM ve IgG1 sekresyonunu bastırma yeteneğine sahiptir (78). Bu çalışmalar önceki çalışmaları teyit ettiği gibi MKH'lerin karışık lenfosit kültürlerine ya da MKH'lerin ko-kültürlerine eklenen ve periferal kandan saflaştırılan B hücreler, IgM, IgG ve IgA üretimini baskılar (9).

2.7.3. Dendritik hücreler

MKH'lerin, DC'lerin farklılaşması, olgunlaşması ve işlevlerini etkileyebilme yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir (79, 80, 81). Dendritik hücreler en etkili antijen sunan hücreler olarak kabul edilir, kişisel ve yabancı antijenlere (82) karşı hücrel ve humoral cevapları yönetmede önemli rola sahiptir. MKH'ler ve süpernatantları, dendritik hücrelerin endositozisi ile ilişkilidir, IL-12 salgılama kapasitelerini etkiler ve alloreaktif T hücreleri aktive ederler (79).

Gözlemlenen benzer sonuçlarda MKH'ler periferal kandaki monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını önlemiştir. Dendritik hücre sekresyon profili, IL-10 gibi anti-inflamatuar moleküllerin üretimini uyararak ve IL-12 ve TNF gibi pro-inflamatuar sitokilerin salınmasını inhibe ederek MKH'ler tarafından değiştirilebilir (9).

2.7.4. NK Hücreleri

MKH'ler, NK hücrelerinin proliferasyonunu, sitokin sekresyonunu ve sitotoksitesini inhibe edebilir. MKH'ler tarafından PGE2 ve TGF- β sekresyonu, sitokin üretiminde azalma ve antiproliferatif etki ile bağlantılıdır (65).

NK hücreleri, doğal bağışıklığın en önemli efektör hücreleri olarak kabul edilir ve ayrıca MKH'lerin immünmodülatuar potansiyeli tarafından etkilenirler. MKH'ler NK hücreleri ile ko-kültüre edildiklerinde (interlökin-2 tarafından uyarılan), bu hücrelerden IFN- γ sekresyonunda azalma görülür (83).

2.7.5. Monositler

Monositlerin immün regülasyonunda MKH'lerin rolü olarak hem farklı olgunlaşma basamaklarını hem de APC olarak işlevlerini etkilediği düşünülmektedir. İlk olarak, MKH'ler efektör DC doğru farklılaşma ve olgunlaşmayı bozmaktadır. Ayrıca CD1a, CD40, CD80, CD86 ekspresyonunda azalma, makrofaj farklılaşması boyunca monositlerdeki MHC sınıf II indüksiyonunu ve olgunlaşmayı takiben CD86 yüzey belirtecini bozar (86, 87).

İkinci olarak olgun DC'lerde bazı verilere göre MKH'ler monositlerin fagositik işlevlerine müdahale eder ve T hücreleri aktiveleştirirler (89). Ayrıca, MKH'ler tarafından salgılanan IL-6, PGE2 ve makrofaj-koloni uyarıcı faktör (M-CSF) (86, 88) gibi sitokinler, dendritik hücrelerin sitokin profilini değiştirebilir. Dendritik hücrelerin uyarılması sonucu anti-inflamatuar sitokin IL-10 salgılanır ve IL-12 ve TNF- α sekresyonunu azaltır, anti-inflamatuar çevreyi oluşturur ve ayrıca diğer immün hücrelerin işlevini etkiler (89).

2.7.6. Nötrofiller

MKH'lerin nötrofiller üzerindeki iki ana etkisi inflamatuvar aktivitede artış ve bu hücrelerin ömür uzunluğunda artıştır. Önceki çalışmalar hem dinlenme halinde hem de IL-6 salgılayan MKH'ler tarafından aktive edilmiş nötrofillerdeki kendiliğinden apoptoz hızındaki düşüşü göstermiştir. Nötrofillerdeki apoptoz, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile pozitif bağlantılıdır. Bundan dolayı, MKH'ler gibi ROS

üretimini engellediği gösterilmiştir. İnflamatuar aktivitesinde azalmaya yol açar ve nötrofillerin hücresele solunumdaki başlangıcını önemli ölçüde azaltır (65).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma ve örneklerin elde edilmesi

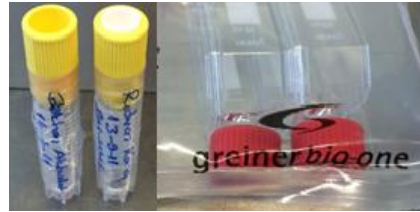
Sağlık Bakanlığı Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji Hastanesi Kök Hücre İşleme ve Saklama laboratuvarı'nda 2011-2014 yılları arasında Hematoloji Kliniğine başvuran ve AML tanısı konulmuş 7 birey, sağlıklı 7 birey ve 1 sağlıklı MNC bireyi çalışma gruplarını oluşturmuştur (Tablo 3.1). 2-17 yaş aralığında bulunan hasta bireyler ile 3-51 yaş aralığındaki sağlıklı vericilerin kemik iliği örnekleri, standart dondurma protokolleri uygulanarak saklanmıştır. Ayrıca kemik iliği örneklerini çalışabilmek için hasta onam formları alınmıştır. Çalışmanın yürütülebilmesi için etik kurul onayı 2014-062 nolu protokol kodu ile Ankara Çocuk Sağlığı Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji hastanesinden alınmıştır.

Tablo 3.1. AML hastalarının tanı anındaki ve sağlıklı bireylerin yaş, ortanca ve cinsiyet profilleri

Total AML hastalarının sayısı	7
Ortanca yaş (yaş aralığı)	13 (2-17)
Cinsiyet	
Erkek	3
Bayan	4
AML immüfenotip	
AML	5
AML M2	0
AML M4	1
AML MDS	1
Total sağlıklı donör sayısı	7
Ortanca yaş (yaş aralığı)	10 (3-51)
Cinsiyet	
Erkek	6
Bayan	2
Sağlıklı MNC donör sayısı	1
Ortanca yaş (yaş aralığı)	31
Erkek	0
Bayan	1

3.2. Dondurulmuş kriyoviyallerden kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin çözünmesi ve flasklara ekilmesi

- -196 °C 'de sıvı azot tankında saklanan AML hastası ve sağlıklı bireye ait kemik iliği mezenkimal stromal hücrelerin bulunduğu kriyoviyallerin (Bkz. Şekil 3.1) içine %10 FBS içeren PBS'den 1 ml yavaş yavaş eklendi.
- 15 ml'lik tüpe 2 ml %10 FBS içeren PBS konuldu. Pastör pipeti yardımı ile kriyoviyallerden örnekler çekilerek 15 ml'lik falkon tüplerin içerisine aktarıldı.
- Örnek kalmaması için tüplerdeki solüsyonla kriyoviyalin içerisi tekrar yıkandı.
- 3000 rpm'de 15dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerde az bir miktar kalıncaya kadar süpernatant kısımları atıldı. Tüpler homojenize edildi.
- Üzerine 10 ml medium konularak T75'lik flasklara (greiner bio-one) ekim yapıldı. Eğer hücre sayısı az ise 5 ml medium konularak T25'lik flasklara (greiner bio-one) ekim yapıldı.



Şekil 3. 1. Kryoviyaller ve Flasklar

3.3. Hücrelerin besiyeri değişimi

- İnkübatörde tutulan içerisinde MKH'lerin bulunduğu T25'lik flasklar, 3-4 günde bir besiyerinin değişimine ihtiyaç duymaktadır. Deneye başlamadan önce laminar air flow çalıştırılmıştır ve kabin içinde sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

- İnkübatörden alınan flasklar kabin içerisine alınır, önceden kabin içerisine yerleştirilmiş atık kabına flaskların içeriği pastör pipeti ile boşaltılır.
- Flaskların içerisine 5 ml kültür mediumu pastör pipeti ile aktarılır. (Her kullanımda pastör pipeti steril olanla değiştirilmiştir) Besiyeri değiştirilen flasklar dezenfektanla silinip inkübatöre kaldırılmıştır.

3.4. Hücrelerin Tripsin-EDTA ile flasklardan kaldırılması ve 6' lık kültür kaplarına ekimlerinin yapılması

- Pasaj 1'deki AML hastası ve donörünün T25'lik flasklarda bulunan kültürlerinin süpernatat kısımları laminar flow içerisindeki atık kabına pastör pipeti ile atılmıştır.
- Flasklar PBS ile tekrar tekrar yıkanmıştır. PBS ile yıkanan flasklardaki solusyon atık kabına alınmıştır.
- Flaskların içerisine Biochrom AG Tripsin-EDTA (Şekil 3.2) solüsyonu 5 ml pastör pipeti ile pipetlenmiştir. Zaman kaybetmeden 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatör içerisine alınmıştır.
- 10-15 dk sonra inkübatörden alınan flasklardaki hücrelerin, flask zemininden ayrıldığından emin olmak için mikroskopta bakılmıştır. Zemine tutunan hücreler hala var ise tekrar inkübatöre konulup birkaç dakika daha beklenilmiştir. Daha sonra mikroskopta tüm hücrelerin zeminden ayrıldığına emin olunduktan sonra 15ml'lik tüplere flaskın tüm içeriği pipetlenmiştir.



Şekil 3.2. Tripsin-EDTA solüsyonu

- Flaskların içerisine 10cc FBS ve 90 cc PBS içeren solüsyondan 5 ml daha pipetlenip tüm flask tekrardan yıkanarak tüm içerik tripsin-EDTA ve kalkan hücrelerin bulunduğu tüplere aktarılmıştır. Böylelikle hücreler daha verimli şekilde toplanmıştır.
- 15 ml'lik tüpler 3000rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra süpernatantlar atılarak tüplerin dibindeki az bir solüsyonda çöken hücreler süspansiyon edilmiştir. İyice homojenize olan tüpler FBS ile 2 ml kadar sulandırılarak içerisinde 200µl örnek, üzerinde hastanın adını yazdığı 2ml'lik ependorf tüplere alınmıştır.
- Ependorf tüplerdeki örneklerin hemogram sayımları yapılmıştır. Hemogram sonuçlarına göre çekirdekli hücre sayıları hesaplanarak 6'lık kültür kaplarında (greiner bio-one cell star) herbir kuyucuğa 50000 MKH gelecek şekilde ekimleri yapılmıştır.
- Ekimleri yapılan mikro-plateler hücrelerin üremesi için etüve kaldırılmıştır.

3.5. Proliferasyon kapasitesi

MKH'lerin proliferasyon kapasitelerine bakabilmek için pasaj 1'deki ve pasaj 2'deki hemogram sayımları dikkate alınmıştır. Pasaj ilerletme aşamaları deneyimiz pasaj 2'de sonlandırıldığı için devam edilmemiştir.

Proliferasyon kapasitesi hesaplanması aşağıda verilen denklemle ifade edilmektedir:

$$\text{Population doublings(PDs)} = (\log_{10} N) / (\log_{10} 2)$$

N toplanan hücrelerin/ekilen hücelere oranını ifade etmektedir (90).

3.6. Mezenkimal stromal hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin araştırılması

Adipojenik farklılaşma aşamaları:

- AML hastası ve sağlıklı bireylerin kemik iliklerinden izole edilen mezenkimal stromal hücrelerin farklı hücrelere farklılaşabilme yeteneklerini analiz edebilmek için ticari olarak satılan MesenCult Adipogenic Diff Medium Human (Stem cell) kullanılmıştır.
- AML hastası ve sağlıklı bireylerin MKH'leri ilk olarak T25'lik flasklara (greiner bio-one) ekimi gerçekleştirildi. 3-4 günde bir besiyerleri değiştirildi.
- Hücreler konfluent hale geldiğinde MesenCult Adipogenic Diff Medium Human (Stem cell) kitinden 2 ml, kültür mediumumuzdan da 8 ml eklenerek 10 ml'lik farklılaşma besiyeri hazırlandı.

Kültür medium içeriği:

- ✓ DMEM %50(BiochromAG)
- ✓ FBS %10(BiochromAG)
- ✓ MCDB %40(BiochromAG)
- ✓ Penisilin/Streptomisin %1
- Deney süremizin on beşinci gününde hazırladığımız adipojenik medium eklendi. Bir hafta sonra medium tekrar değiştirildi.
- Otuz günün sonunda Olympus CKX41 (Şekil 3.3) marka invert mikroskopta hücrelerin farklılaşmasına bakıldı. Hücrelerde farklılaşma net olarak görüldüğü için boyama aşamasına geçilmiştir.

Adipojenik boyama aşamaları:

- Adipojenik fiksasyon aşamasında flasklardaki medium boşaltıldı ve PBS ile yıkandı.

- PBS içeriği boşaltılıp ve 2 ml %10'luk formol (Sigma-Aldrich) eklendi. Oda ısısında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi.
- Adipojenik boyama aşamasında %10'luk formol boşaltılıp, 2 ml %60'luk isopropanol'de 5 dk bekletildi.
- Süre sonunda %60'luk isopropanol (Sigma-Aldrich) boşaltılıp ve 2 ml Oil Red O boyası eklenerek 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonucunda Oil Red O (Sigma-Aldrich) boşaltılıp yerine Hematoksilen boyası eklenerek 1 dk bekletildi.
- Süre sonunda musluk suyuyla flask zemini yıkanıp ve hücrelerin Olympus CKX41 markalı invert mikroskopta görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Olympus CKX41 markalı invert mikroskop

Osteojenik farklılaşma aşamaları:

- AML hastası ve sağlıklı bireylerin kemik iliklerinden izole edilen MKH'lerin farklı hücelere farklılaşabilme yeteneklerini analiz edebilmek için ticari olarak satılan Osteogenic Stimulatory kit Human (Stem cell) kullanılmıştır.

- AML hastası ve sağlıklı bireyin MKH'leri ilk olarak T25'lik flaslara (greiner bio-one cellstar) ekimi gerçekleştirilir. 3-4 günde bir besiyerleri değiştirildi.
- Hücresler konfluent hale geldiğinde Osteogenic Stimulator Human (Stem cell) kitinden 7,5ml supplement, 5 µl Dexametazon ve 175µl β-gliserofosfat 50ml'lik tüpe eklendi. Bu solüsyonun üzerine 42,5 ml medium eklendi. (Medium içeriği daha önce adipojenik farklılaşma bölümünde verilmiştir).
- Hazırlanan solüsyon en fazla 1 ay içerisinde tüketilmelidir. Deney süremizin on beşinci gününde hazırladığımız osteojenik farklılaşma mediumu eklendi. Bir hafta sonra medium tekrar değiştirildi.
- Otuz günün sonunda Olympus CKX41 marka invert mikroskopta hücrelerin farklılaşmasına bakılmıştır. Hücreslerde farklılaşma net olarak gözlenmektedir.

Osteojenik boyama aşamaları:

- Osteojenik fiksasyon aşamasında flaslardaki medium boşaltılıp ve PBS ile yıkandı.
- PBS içeriği boşaltılıp ve 1 ml %4'lük etanol (Sigma-Aldrich) eklendi. Oda ısısında 30dk inkübasyon gerçekleştirildi.
- Süre sonunda etanol (Sigma-Aldrich) boşaltılıp Alizarin Red (Santa Cruz Biotech) oda sıcaklığında 20 dk bekletildi.
- İnkübasyon sonucunda Alizarin Red (Santa Cruz Biotech) dökülerek flask tekrardan PBS ile yıkanır.
- PBS atılıp musluk suyuyla flask zemini yıkanmıştır ve Olympus CKX41 markalı invert mikroskopta görüntülenmiştir.

3.7. Periferik kandan ve kemik iliğinden mononükleer hücre (MNC) izolasyonu

Periferik kandan Mononükleer hücre izolasyonu (Dansite gradient yöntemi) aşamaları;

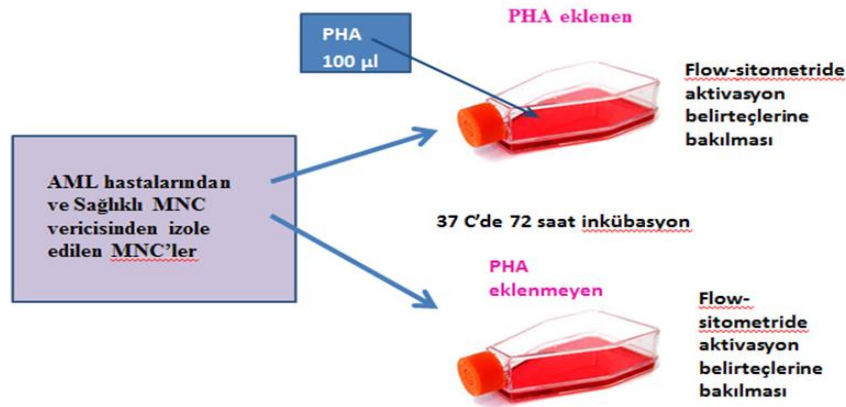
- Laminar air flow, içerisinde işlem yapmadan önce dezenfektan solüsyonla temizlenmelidir. İşleme başlamadan önce steril eldiven kullanılmalıdır. Servis ve kliniklerden enjektör içerisinde gelen kemik iliği örnekleri laminar air flow içerisine alınır. Enjektörde gelen örnek tüp içerisine yatay bir şekilde hemoliz edilmeden boşaltılmalıdır.
- Kemik iliği veya periferik kanlar, örnek miktarı kadar PBS (Phosphate Buffer Saline) ile seyreltilir. Fikol boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alındı ve seyreltilen ürün fikolün üzerinde tabaka oluşturacak şekilde yavaş yavaş ve eğik bir şekilde eklendi. Tüp içerisindeki örnek tekrar 1500rpm'de 25 dk santrifüj edildi.
- MNC'ler çok dikkatli bir şekilde toplanıp steril 15 ml'lik falkon tüpe alındı. Üzerine PBS eklenip 5-10 dakika santrifüj edilip hücre sayımı yapıldı. Sayım sonucuna göre T25 ve T75 'lik flasklara ekim yapıldı veya kryoviyallerde donduruldu.
- Flask ve kryoviyallerin üzerine ürüne ait bilgiler isim, tarih ve diğer bilgiler yazıldı.
- Sayım sonucu yetersiz olan hücreler, çözünme sonrası hücresel canlılık düşüşünden dolayı dondurulmayıp ekim yapılmıştır. Hücre sayısı yeterli olan MNC'lere, kryoprotektanlar (freezing solüsyonu) eklenerek dondurulmuştur.

3.8. Fitohemaglütinin ile *in vitro* PBMC proliferasyon assay ve Flow-sitometride T hücre belirteçlerinin okunması

Çalışmamızda sağlıklı gönüllülerden periferik kanlar alınıp ficol kullanılarak MNC hücre izolasyonları yapılmıştır. İzolasyonu yapılan hücreler hemogramda sayımları yapılarak yaklaşık total çekirdekli hücrelerin sayısı bulunmuştur. 6'lık kültür kaplarının her bir kuyucuğuna MKH'ler daha önceden kültüre edilip ve hemogramda sayımları yapılarak 50000 MKH olacak şekilde eklenmiştir. 1. kuyucuk kontrol olarak kalmıştır ve hiçbir işleme tabii tutulmamıştır.

Periferik kandan dansite gradient yöntemi ile izole edilen MNC'ler hemogram sayım sonuçları hesaplanarak 6'lık kültür kabının 4. kuyucuğuna 50000 MKH üzerine 1:1 oranında yeni hazırlanmış 50000 MNC gelecek şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı bireyden elde edilen MNC'lere blastik transformasyon testi yapılabilmesi için iki T25'lik flaslara, izole edilen MNC'ler eklenmiştir. Flaslardan birine 100µl PHA eklenmiştir. Diğer T25'lik flaska PHA eklenmemiştir.

37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda 2.well'e PHA eklenmiş MNC hemogramda sayılıp 50000 MNC olacak şekilde eklenmiştir. 5.kuyucuğa PHA eklenmeyen MNC, hemogramda sayılarak 50000 MNC olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. 3. ve 6. Kuyucuklarda AML hastası bireyin daha önceden 196 °C'de saklanan MNC hücreleri ya da AML hastası bireyin -80°C'de saklanan periferik kan örnekleri çözündürülüp dansite gradient yöntemi ile MNC izolasyonları yapıлып eklenmiştir (90).



Şekil 3.4. Fitohemaglütinin ile MNC aktivasyonu

İzolasyon sonunda çözümlü hemogramda sayımı gerçekleştirildikten sonra iki T25'lik flaska ekimler yapıp birinin içerisine 100µl PHA eklenmiştir. Diğer T25'lik flaska PHA eklenmemiştir. 37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır (91). İnkübasyon sonunda 3. kuyucuğa PHA eklenmiş MNC, hemogramda sayılıp 50000 MNC olacak şekilde eklenmiştir. 6. kuyucuğa PHA eklenmeyen MNC, hemogramda sayılarak 50000 MNC olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı bireylerden elde edilen MNC ve AML hastası bireyden elde edilen MNC deneyleri eş zamanlı gerçekleştirilmiştir.

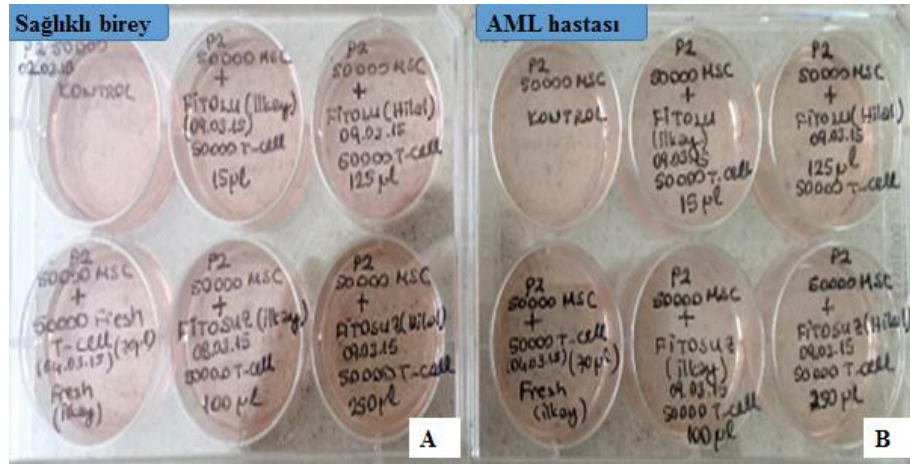


Şekil 3.5. Flow-sitometri cihazı (91)

Flow-sitometri hücrelerin büyüklüğü, vizkozitesi ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre düzeyinde araştırma imkanı sağlamaktadır. Süspansiyon haline getirilmiş hücrelerin hücre zarlarında bulunan yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B ve T lenfositlerin alt grup tayinlerinin belirlenmesinde, lösemi ve lenfoma tiplendirmesinde, apoptoz, fagositoz, otoantikor tayininde, DNA analizinde, hücresel canlılığın belirlenmesinde ve kromozom analizi gibi birçok önemli deneysel aşamalarda kullanılmaktadır (92).

Çalışma prensibinde hücreler lazer ışınlarından geçirildikten sonra ultrasonik vibrasyon uygulanır. Ultrasonik vibrasyon, akış durumundaki hücresel süspansiyonu damlacıklara ayırır ve bu damlacıklarda hücreler bulunur. Nötr, + yüklü ve – yüklü damlacıklar elektriksel alan içerisinden geçirilir ve taşıdığı yüke göre saptırma plakları sayesinde birbirinden ayrılarak izole edilip analiz gerçekleştirilir (92).

PHA eklenmiş ve eklenmemiş tüm T25'lik flasklardaki örnekler kuyucuklara ilave edilmeden önce Flow-sitometri (Beckman Coulter navios) cihazında (Şekil 3.5) CD3, CD4, CD25, CD69 ve HLA-DR T hücre yüzey belirteçlerine bakılmıştır. Çalışmamızda MKH-MNC ko-kültüründe T hücrelerin (MNC hücrelerin büyük çoğunluğunu T lenfositler oluşturduğu için) MKH'ler üzerindeki immünolojik etkilerine bakmak hedeflenmiştir. Bir haftalık bir inkübasyondan sonra tüm kuyucuklar Tripsin-EDTA ile kaldırılıp hemogramları sayılıp hücresel canlılıklarına Tripan blue boyası ile bakılmıştır. Şekil 3.6 'da A'da sağlıklı birey no:9'un 6'lık kültür kaplarına ekimi yapıldıktan sonraki görüntüleri ve B'de AML hastası no:6'nın 6'lık kültür kaplarına ekimi yapıldıktan sonraki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.6. Fitohemaglutinin ile in vitro PBMC proliferasyon assay

(A)Sağlıklı birey no:9'un 6'lık well-plateelere ekiminin yapıldıktan sonraki görüntüleri. (B) AML hastası no: 6'nın 6'lık well-plateelere ekiminin yapıldıktan sonraki görüntüleri

3.9. Hücre canlılık testi

Hücresel canlılık testlerinde toksik etki sonucu kültürlerde canlı olarak kalan hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Testlerde hücre zarının bütünlüğünün bozulması sebebi ile hücre içine absorbe olan tripan blue, eritrosin vb. boyalarla işlem gerçekleştirilir. Hücre zarı zarar görmeyen hücrelerin boyayı absorbe etmedikleri bilinmektedir. Deneyde kullanılan tripan blue boyası vital olmayan bir

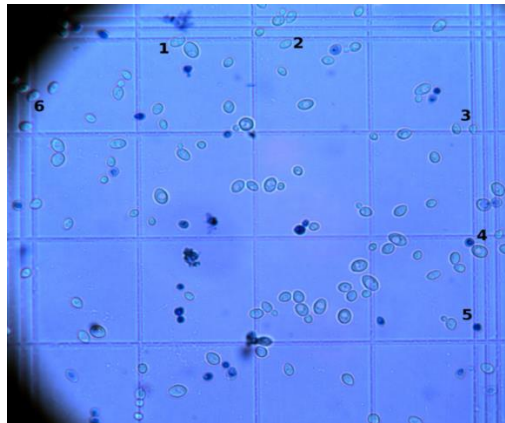
boyadır ve negatif yüke sahiptir. Şekil 3.7’de hücrel canlılık testine ait ışık mikroskobu görüntüsü verilmiştir. (93).

Canlı olmayan hücrelerin boyayı absorbe etmesi ışık mikroskobunda görüntülenmelerine imkan sağlamaktadır. Deney aşamasında hücrelerin hızlı bir şekilde sayımlarının yapılması gerekmektedir (94, 95).

Hücrel viabilite testini kullanarak T hücrelerle etkileşime giren MKH’lerin hücrel canlılıkları, yüzdelik sayımları hesaplanarak analiz edildi. 6’lık kültür kaplarından tripsin-EDTA ile kaldırma işlemi sonunda elde edilen hücreler ependorflara alındı. Üzerlerine hangi kuyucuktan ve hangi bireye ait olan 6’lık kültür kabından alındığı yazıldı. Kontrole ait örnekten 50 µl, tripan blue boyasından da 50µl olacak şekilde 1:1 oranında karıştırıldı.

Thoma lamının üzerine lamel konuldu ve karıştırılan solüsyon thoma lamı ve lamel arasına eklendi. Ölü hücreler tripan blue (Sigma Alderich) boyasını hücre içeriğine aldığı için mavi renkte görüldü. Canlı hücreler boyayı almadığı için beyaz renkli görüldü. Olympus CX31 markalı ışık mikroskobunda ölü hücrelerin ve canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Tüm işlemler her bir kuyucuk için gerçekleştirildi ve yüzde hücre viabiliteleri hesaplandı. Aşağıdaki matematiksel ifade de canlı hücre oranı hesaplaması verilmiştir.

Canlı hücre oranı (%) = $\frac{\text{Boya almamış hücrelerin sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$



Şekil 3.7. Hücrel canlılık testine ait ışık mikroskop görüntüsü 40x büyütme (96)

Sitokin analizi yapabilmek için kuyucuklardaki süpernatantlar ependorf tüplere alınıp derin dondurucuya (-18 °C) konuldu. Tripsinizasyon sonrası MKH hücreleride önce hemogram analizi yapıp freezing solüsyonları eklenerek kademeli olarak donduruldu ve en son aşama olarak -196 °C'de tutulmaktadır.

3.10. İstatistiksel Analizler

Araştırmada yer alan değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilks testi ile değerlendirildi. Değişkenler normal dağılım göstermediğinden ve denek sayısı az olduğundan tanımlayıcı istatistiklerinin gösteriminde ortanca (minimum-maksimum) değerleri kullanıldı. Ek bilgi olarak ortalama \pm standart sapma değerleri verildi.

Her bir kuyucukta AML hastaları ile sağlıklı bireylerden elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında ve PD2 değerlerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı.

AML hastaları ve sağlıklı bireylerin kuyucuklarından elde edilen değerlerinin farklılık gösterip göstermediğinin incelenmesinde Kruskal-Wallis parametrik olmayan varyans analizinden yararlanıldı.

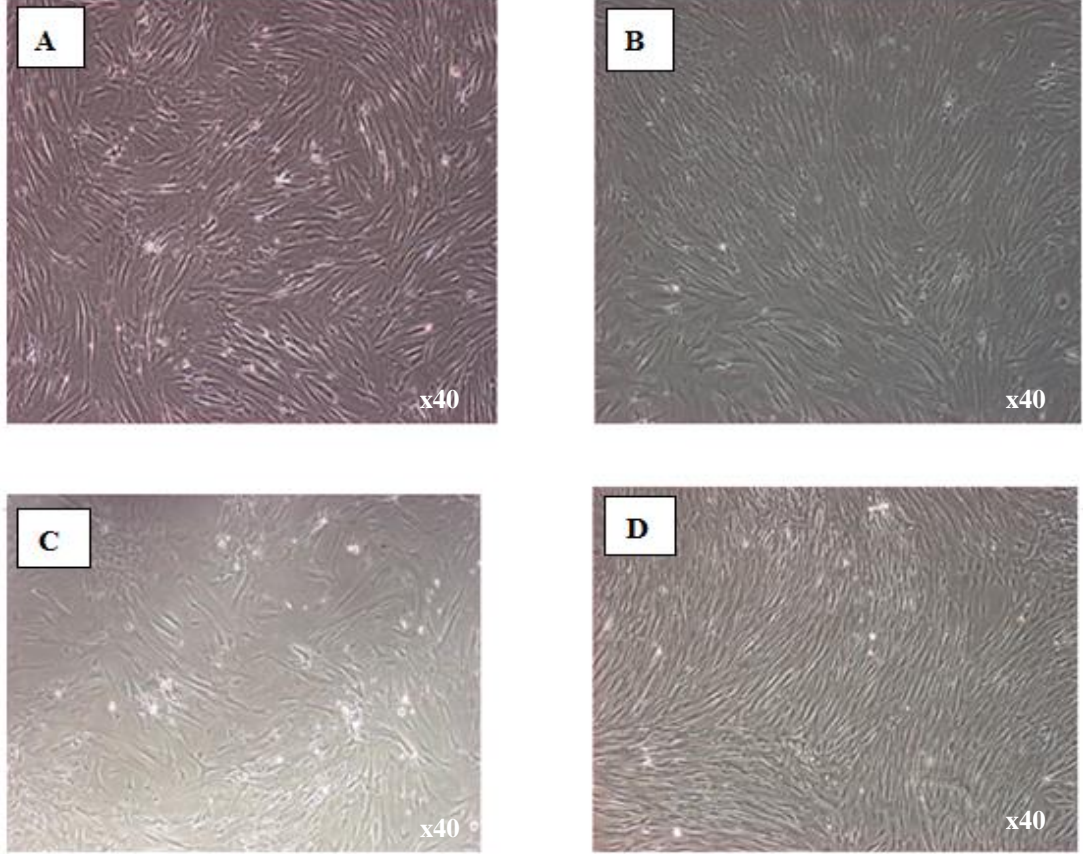
AML hastalarının PHA eklenen ve PHA eklenmeyen gruplarında elde edilen CD3/CD69, CD3/HLA-DR ve CD4/CD25 değerlerinin farklılık gösterip göstermediği Mann Whitney U testi ile incelendi.

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ve MS-Excel 2007 programları kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

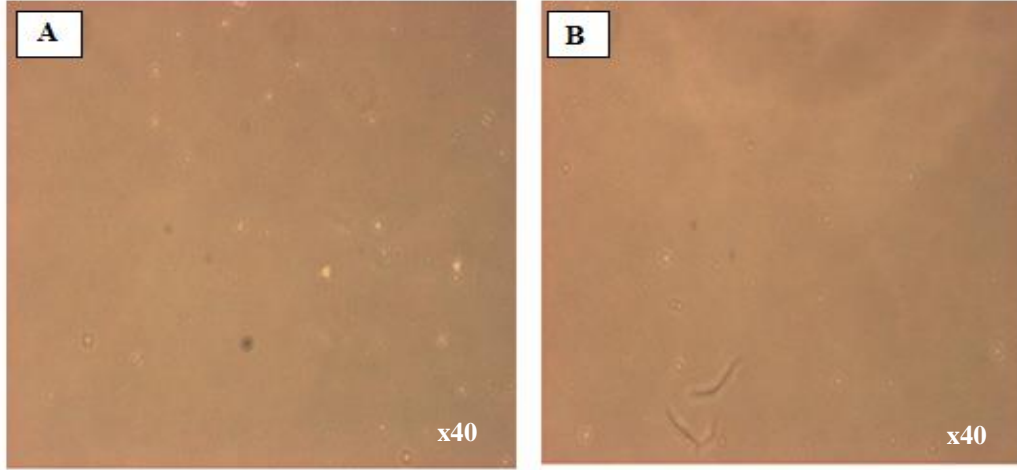
4.1. Mezenkimal stromal hücrelerin morfolojisi

MKH'lerin hücre kültürü görüntüleri Olympus CKX41 marka invert mikroskopla çekilmiştir. Tüm MKH'ler T25'lık flasklarda standart hücre kültür yöntemleri uygulanarak 37⁰C'de inkübe edilmiştir ve haftada iki kez besiyerleri değiştirilmiştir. Yapılan morfolojik analizde hem AML hastalarına ait hem de sağlıklı vericilere ait görüntülerin benzer olduğu görülmüştür. Her iki görüntüde plastik yüzeye yapışan, iğ şeklinde uzantılı ve fibroblast benzeri hücreler görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. AML hastası ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin invert mikroskop görüntüleri (A)AML hastası birey no:1'den alınan MKH'lerin mikroskopik görüntüsü 40x büyütme. (B) Sağlıklı birey no:7'den alınan MKH'lerin mikroskopik görüntüsü 40x büyütme. (C)AML hastası birey no:6'dan alınan MKH'lerin mikroskopik görüntüsü 40x büyütme. (D)Sağlıklı birey no:9'dan alınan MKH'lerin mikroskopik görüntüsü 40x büyütme (Olympus CKX41)

Hücre kültürü aşamalarında MKH'lerin morfolojik açıdan birbirine benzeyen hücreler olarak görülmesine rağmen bazı hastaların hücre kültürü aşamalarında MKH hücrelerin üremediği gözlemlendi. Şekil 4.2'de AML hasta no:7' a ait olan hücre görüntüsünde deney duplike edilmesine rağmen üreme gözlenmemiştir.



Şekil 4.2. AML hastasına ait hücre kültürü görüntüleri

(A) AML hasta no: 7'ye ait olan hücre kültürü görüntüsü. (B) Hücre kültürü tekrarlandıktan sonra tekrar invert mikroskopta çekilen görüntüsü. 40x büyütme (Olympus CKX41)

4.2. Mezenkimal stromal hücrelerin çoğalma kapasitesi

AML hasta ve sağlıklı bireylere ait olan populasyon doubling (PD) değerlerine ulaşabilmek için 6'lık kültür kaplarına ekimi yapılan hücreler hemogram cihazında ölçülmüştür. Tüm kuyucuklara pasaj 1 olan 50000 MKH hücrenin ekimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanan hücreler Tripsin-EDTA ile muamele edilip tüm hücreler kalktıktan sonra yeniden hemogram cihazında sayımları gerçekleştirilmiştir. Bulunan değerler pasaj 2 olarak gösterilmiştir (Tablo 4. 1). Pasaj 1 ve pasaj 2'den elde edilen değerler daha önceden materyal metot kısmında anlatılan PD değeri hesaplama formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. AML hastaları ve Sağlıklı bireylerin logaritmik PD değerleri

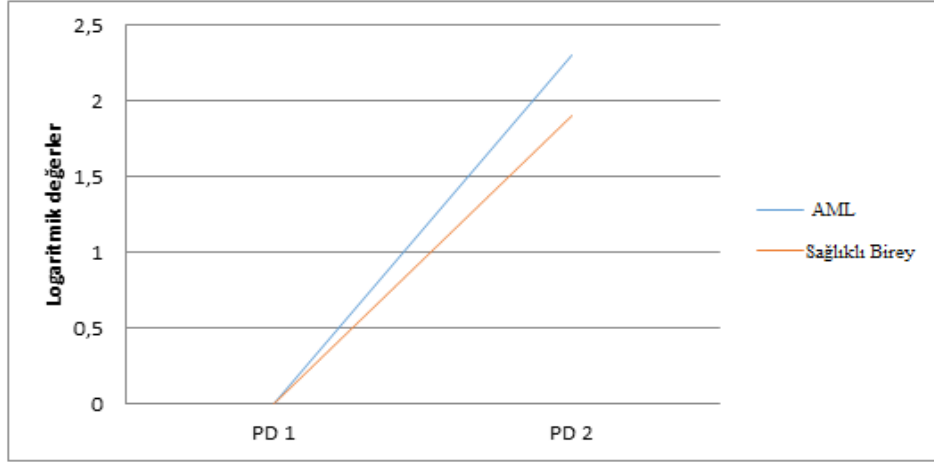
ID	Pasaj 1	Pasaj 2	PD1	PD2
1	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00
2	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00
3	50000 MKH	300000 MKH	0	2,58
4	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00
5	50000 MKH	400000 MKH	0	3,00
6	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00
7	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00
8	50000 MKH	100000 MKH	0	1,00
9	50000 MKH	100000 MKH	0	1,00
10	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00
11	50000 MKH	600000 MKH	0	3,58
12	50000 MKH	200000 MKH	0	2,00

PD2 değerlerinin AML hastaları ile sağlıklı bireylerde benzer olduğu tespit edilmiştir ($z= 1.074$; $p=0.394$). İki grupta elde edilen ortancalar benzerdir (Tablo 4.2). Şekil 4.3’de PD1 ve PD2 için iki grupta ortalamalardaki değişim gösterilmiştir.

Tablo 4.2. AML ve sağlıklı birey PD2 sonuçlarının karşılaştırılması

	AML		Sağlıklı Birey		z	p
	Ortanca (min; mak)	Ort±SS	Ortanca (min; mak)	Ort±SS		
PD2	2.0 (2.0; 3.0)	2.3 ± 0.4	2.0 (1.0; 3.6)	1.9 ± 0.9	1.074	0.394

Pasaj 2’de bulunan MKH’ler Tripsin-EDTA ile 6’lık kültür kaplarından kaldırıldıktan sonra Tripan blue boyası ile hücre sel canlılığa bakılmıştır. Bu sebeple hücrelerin pasajlanması bu aşamada durdurulmuştur.

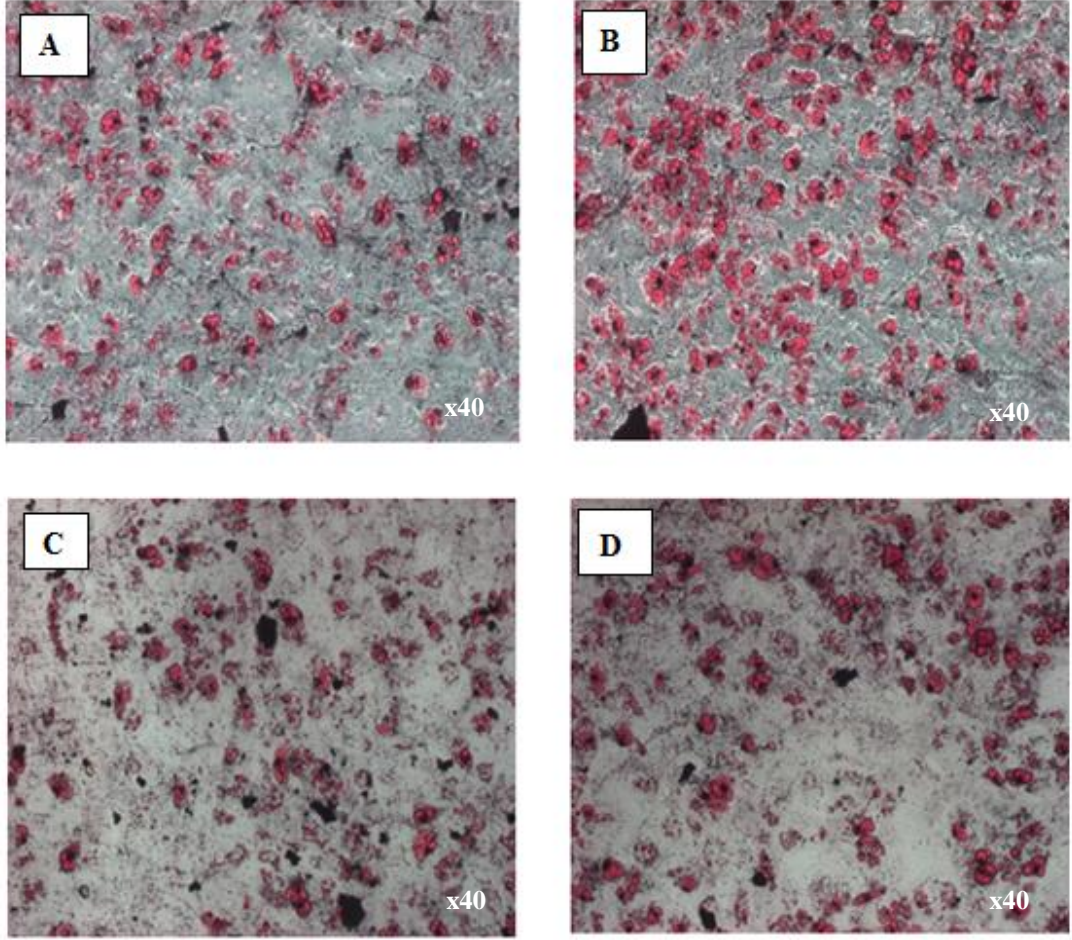


Şekil 4.3. AML hastası ve Sağlıklı bireylerden elde edilen logaritmik PD değerlerine ait ortalamalar

4.3. Mezenkimal stromal hücrelerin farklılaşma kapasitesi

4.3.1. Adipojenik farklılaşma

AML hastalar ve sağlıklı bireylerin kemik iliklerinden elde edilen MKH'lerin adipojenik hücrelere farklılaşmasını gösterebilmek için MesenCult Adipogenic Diff Medium Human (Stem cell) kiti kullanılmıştır. Yapılan deney aşamaları ve inkübasyon süresi sonunda Olympus CKX41 marka invert mikroskopta 40x'lik büyütmede çekilmiştir (Şekil 4.4) Adipositlere dönüşen MKH'lerin içindeki yağ damlacıklarının Oil Red O boyası ile boyanması sonucu mikroskopta boyayı alan hücreler kırmızı renkte olduğu görölmektedir.

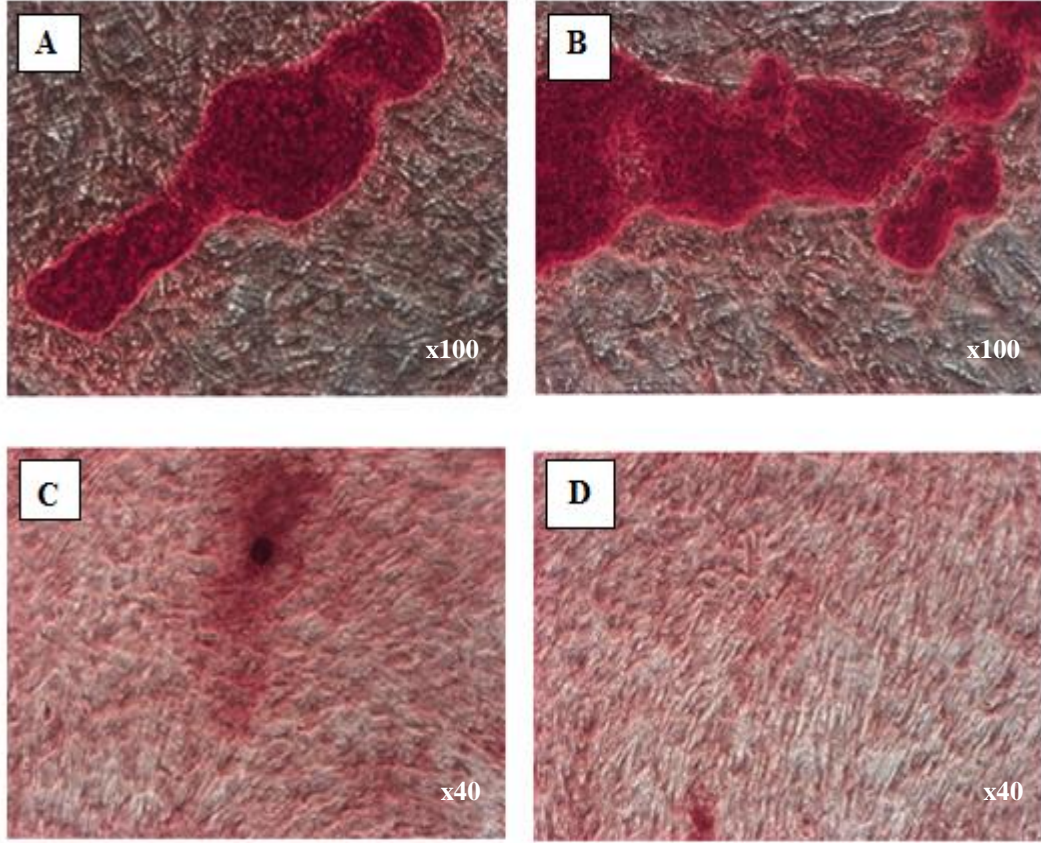


Şekil 4.4. MKH'lerin adipojenik farklılaşması

(A ve B) Sağlıklı birey no:11'den alınan MKH adiposit hücrelerine farklılaşması ve yağ damlacıklarının oil red o ile boyanması 40x büyütme. (C ve D) AML hastası birey no:5'ten alınan MKH adiposit hücrelerine farklılaşması ve yağ damlacıklarının oil red o ile boyanması 40x büyütme (Olympus CKX41)

4.3.2. Osteojenik farklılaşma

MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını gösterebilmek için Osteogenic Stimulatory kit Human (Stem cell) kiti kullanılmıştır. Çalışılan örnekler AML hastaları ve onların sağlıklı bireylerden elde edilen kemik iliği kaynaklı MKH'lerden elde edilmiştir. Yapılan deney aşamaları ve inkübasyon süresi sonunda hücrelerde bulunan kemik mineralleri Alizarin Red ile boyanmıştır. Hücre görüntüleri Olympus CKX41 marka invert mikroskopta 40x'lik büyütmede çekilmiştir (Şekil 4.5).

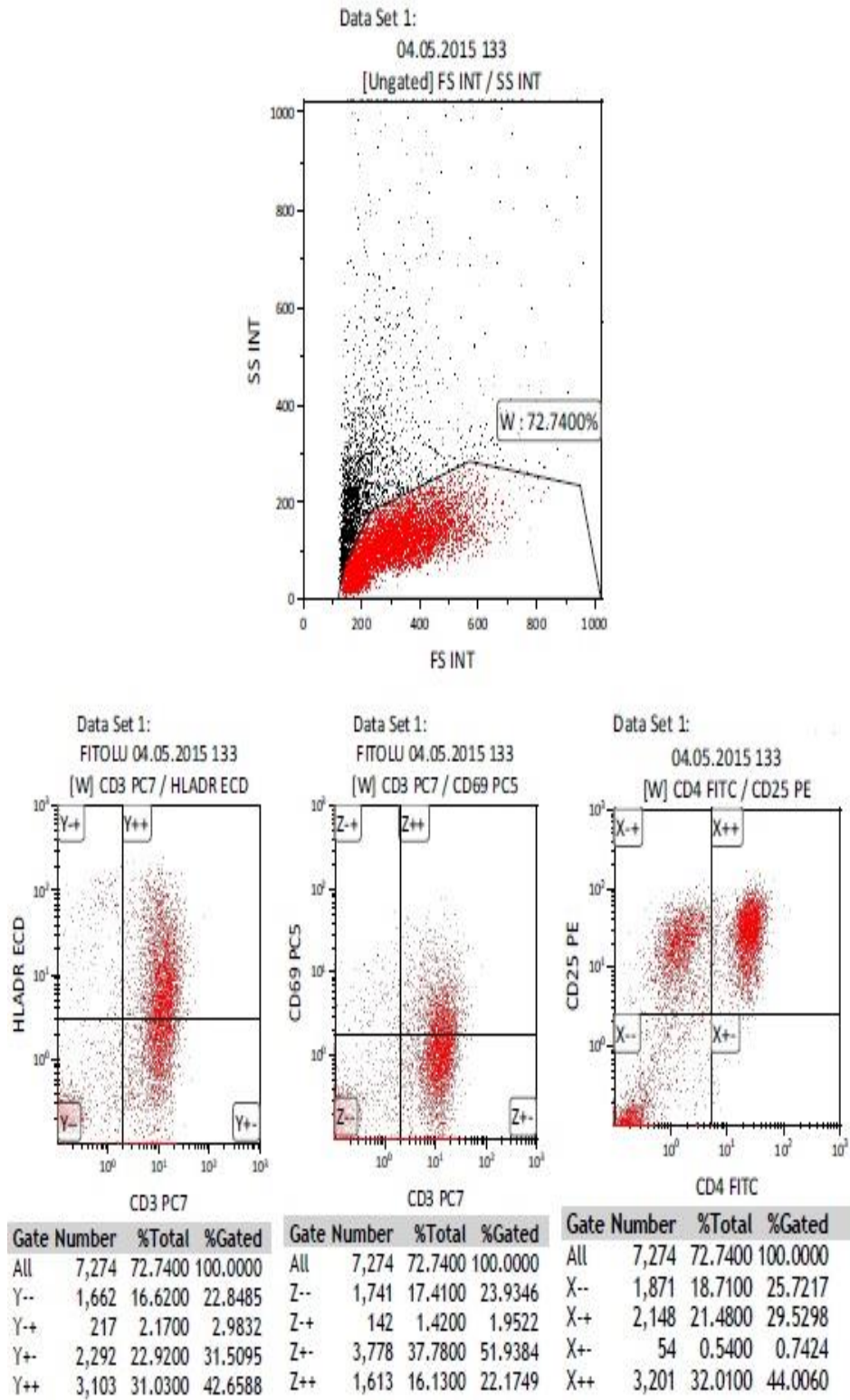


Şekil 4.5. MKH'lerin osteojenik farklılaşması

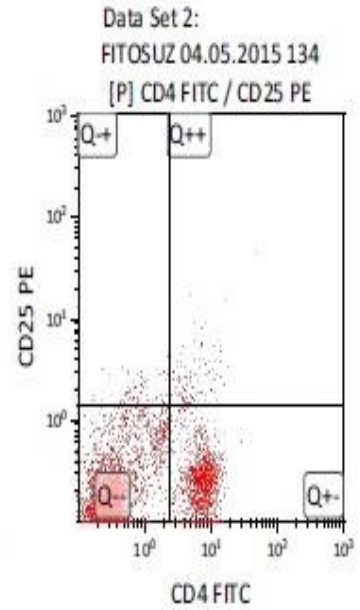
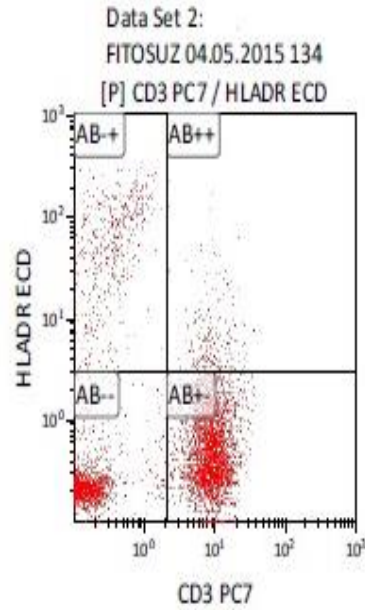
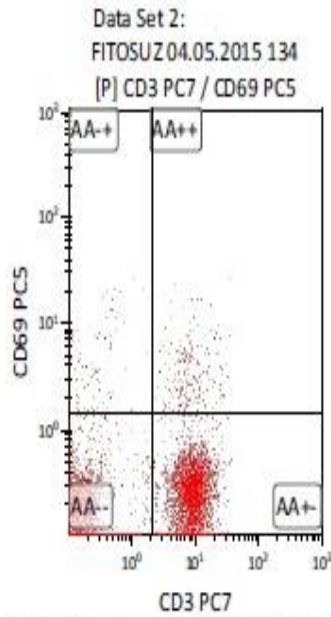
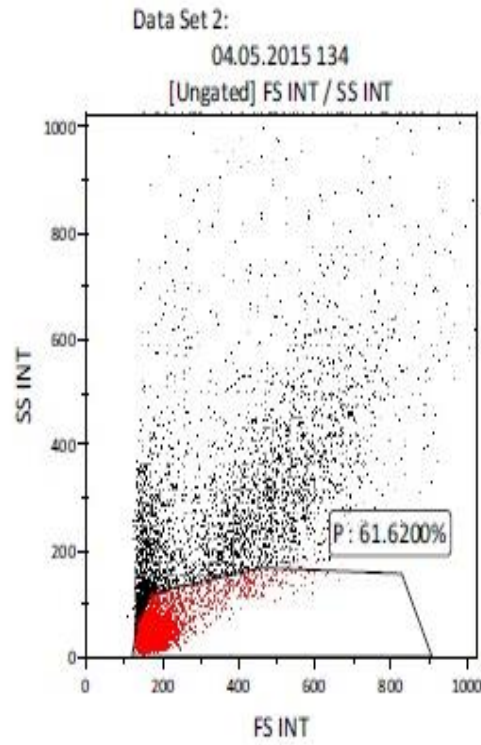
(A ve B) Sağlıklı birey no:11'den alınan MKH'lerin osteosit hücrelerine farklılaşması sonucu hücrelerde biriken kemik minerallerinin Alizarin red ile boyanması 100x büyütme. (C ve D) AML hastası birey no:5'ten alınan MKH'lerin osteosit hücrelerine farklılaşmasının sonucu hücrelerde biriken kemik minerallerinin Alizarin red ile boyanması 40x büyütme Olympus CKX4.

4.4. Flow sitometri sonuçları

6'lık kültür kaplarına PHA eklenen ve içerisine PHA eklenmeyen AML hastalarının periferik kanlarından izole edilen MNC'ler T25'lik flasklarda 72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda T hücre aktivasyon belirteçlerine (CD3/CD69, CD3/HLA-DR, CD4/CD25) bakılması için flow-sitometri (Beckman Coulter navios flow cytometer) cihazında immünolojik analizi gerçekleştirilmiştir. AML hastaları, sağlıklı bireyler ve sağlıklı MNC vericisinden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6 – Şekil 4.11).



Şekil 4.6. Sağlıklı birey no:12'den izole edilen MNC'lerin PHA ile uyarılması sonucu elde edilen flow sitometri sonuçları

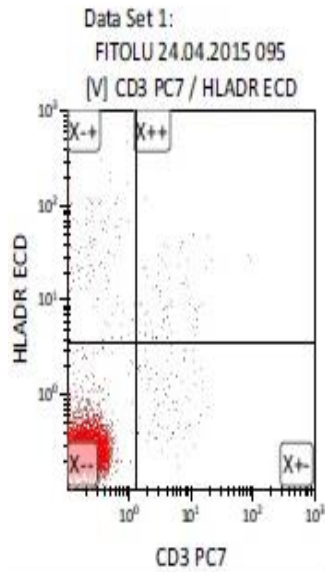
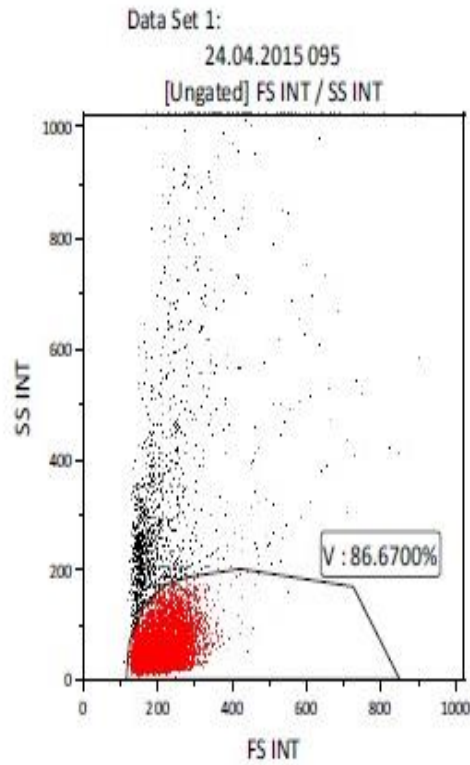


Gate Number	%Total	%Gated
All	6,162	61.6200
AA--	2,757	27.5700
AA+	122	1.2200
AA-+	3,081	30.8100
AA++	202	2.0200

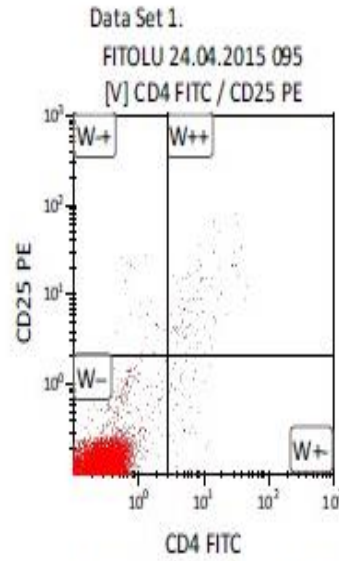
Gate Number	%Total	%Gated
All	6,162	61.6200
AB--	2,223	22.2300
AB+	662	6.6200
AB-+	3,047	30.4700
AB++	230	2.3000

Gate Number	%Total	%Gated
All	6,162	61.6200
Q--	4,626	46.2600
Q+	100	1.0000
Q-+	1,328	13.2800
Q++	108	1.0800

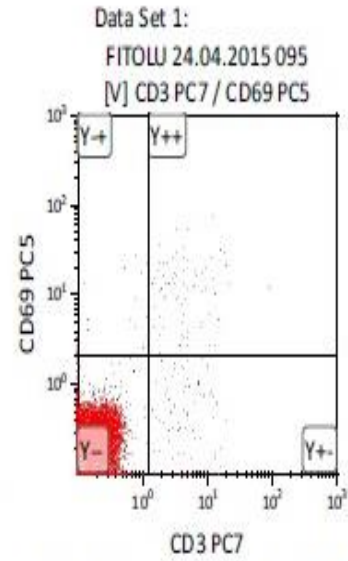
Şekil 4.7. Sağlıklı birey no:12'den izole edilen MNC'lere PHA eklenmeden elde edilen flow sitometri sonuçları



Gate Number	%Total	%Gated
All	8,667	86.6700
X--	8,314	83.1400
X+-	204	2.0400
X+-	82	0.8200
X++	67	0.6700

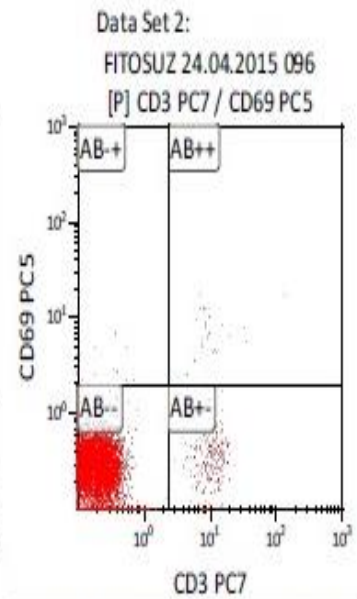
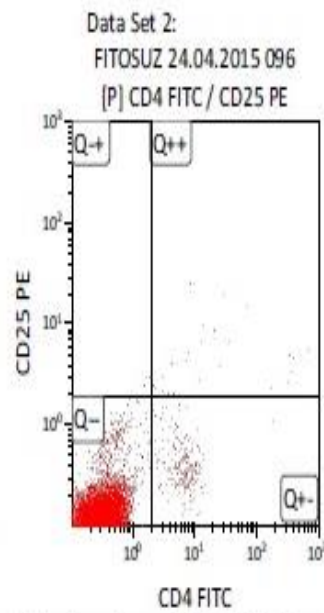
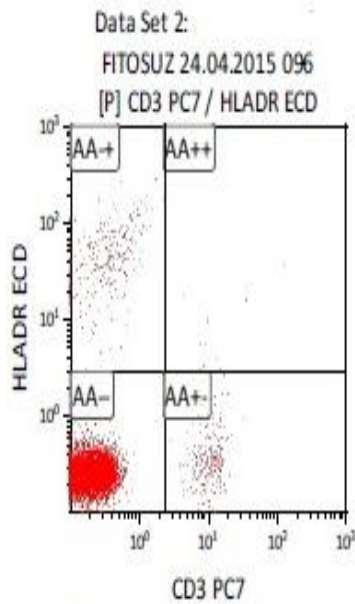
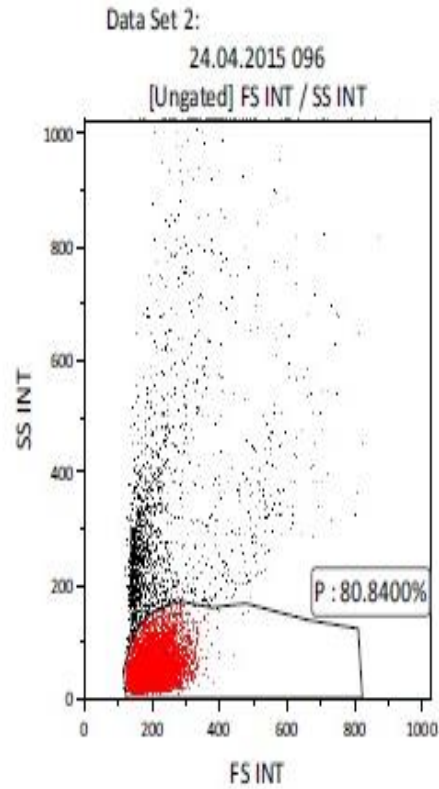


Gate Number	%Total	%Gated
All	8,667	86.6700
W--	8,504	85.0400
W+-	20	0.2000
W+-	59	0.5900
W++	84	0.8400



Gate Number	%Total	%Gated
All	8,667	86.6700
Y--	8,494	84.9400
Y+-	24	0.2400
Y+-	76	0.7600
Y++	73	0.7300

Şekil 4.8. AML hastasının no:5'ten elde edilen MNC'lere PHA ile uyarılmasından elde edilen flow sitometri sonuçları

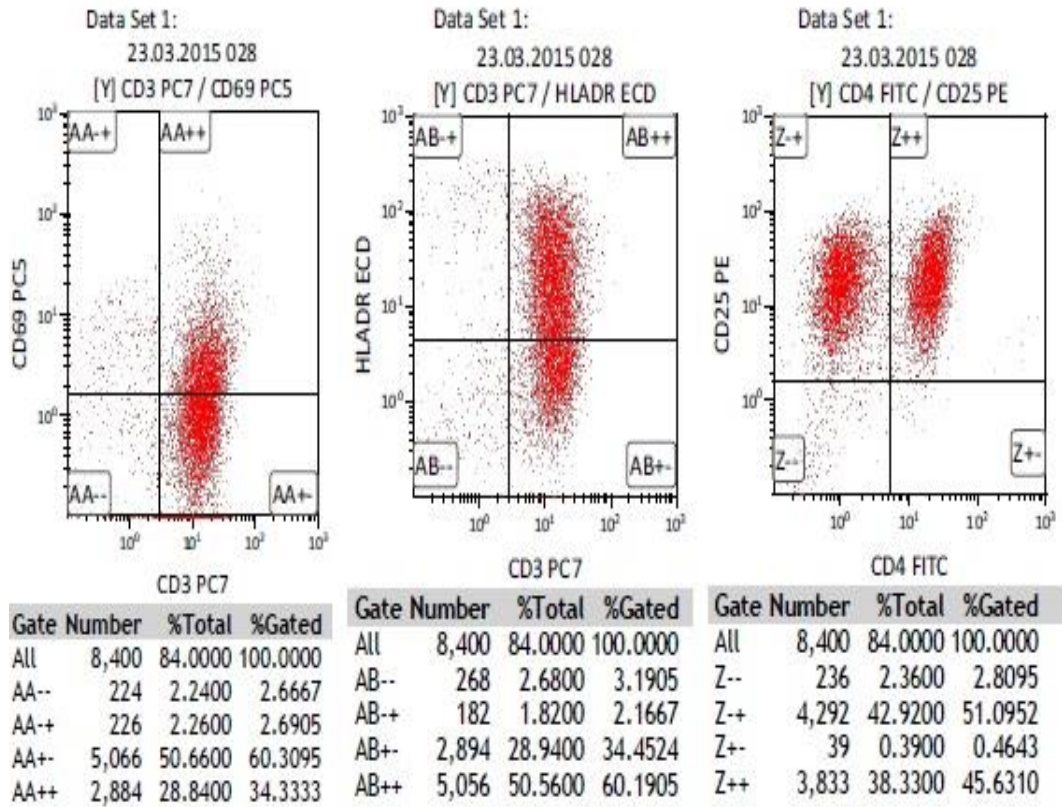
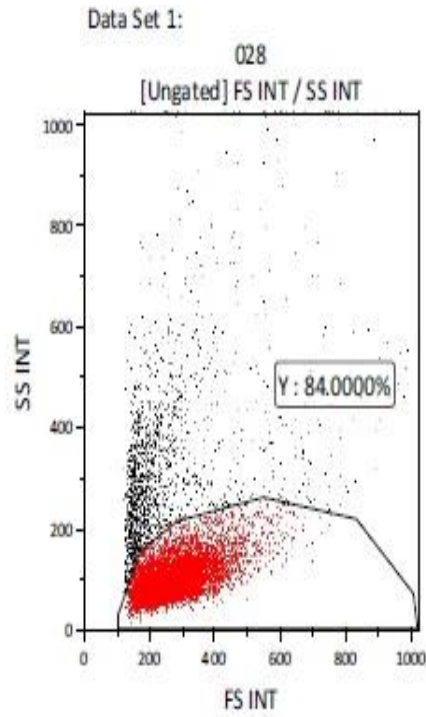


Gate Number	%Total	%Gated
All	8,084	80.8400
AA--	7,517	75.1700
AA+-	292	2.9200
AA++	264	2.6400
AA++	11	0.1100

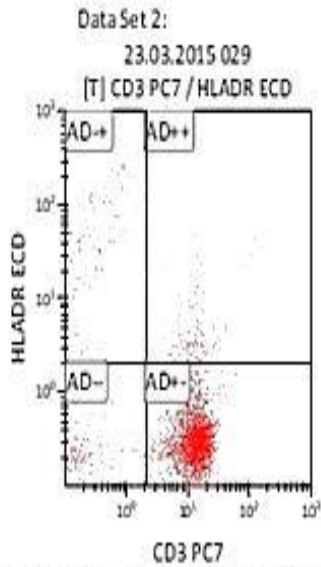
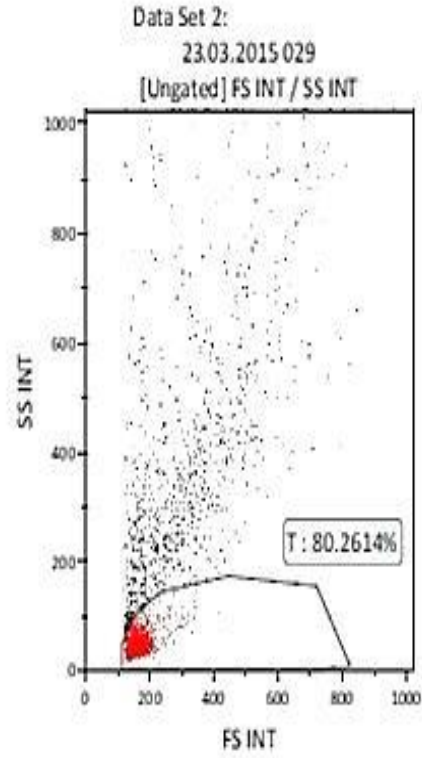
Gate Number	%Total	%Gated
All	8,084	80.8400
Q--	7,830	78.3000
Q+-	5	0.0500
Q++	224	2.2400
Q++	25	0.2500

Gate Number	%Total	%Gated
All	8,084	80.8400
AB--	7,792	77.9200
AB+-	19	0.1900
AB++	247	2.4700
AB++	26	0.2600

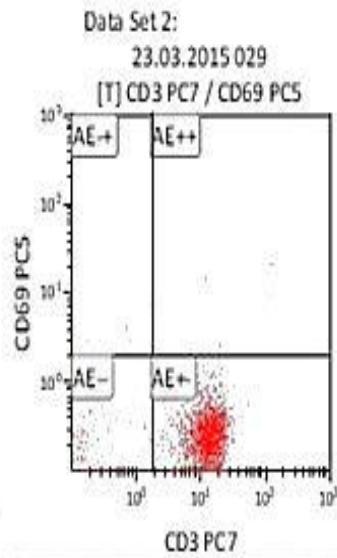
Şekil 4.9. AML hastası no:5'ten izole edilen MNC'lere PHA eklenmeden elde edilen flow sitometri sonuçları



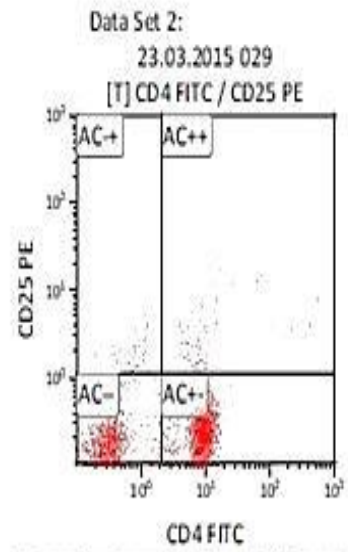
Şekil 4.10. Sağlıklı MNC vericisinden elde edilen hücrelerin PHA ile uyarılmasından elde edilen flow sitometri sonuçları



Gate Number	%Total	%Gated
All	4,115	80.2614
AD--	327	6.3780
AD+-	133	2.5941
AD++	3,513	68.5196
AD++	142	2.7697



Gate Number	%Total	%Gated
All	4,115	80.2614
AE--	435	8.4845
AE+-	24	0.4681
AE++	3,642	71.0357
AE++	14	0.2731



Gate Number	%Total	%Gated
All	4,115	80.2614
AC--	1,531	29.8615
AC+-	78	1.5214
AC++	2,398	46.7720
AC++	108	2.1065

Şekil 4.11. Sağlıklı MNC vericisinden elde edilen hücrelerin PHA eklenmeden elde edilen flow sitometri sonuçları

Flow sitometri cihazında analizleri gerçekleştirilen örnekler T aktivasyon belirteçlerinden pozitif/pozitif olanlar alınarak her iki membran yüzey belirtecini eksprese eden mononükleer hücrelere bakılmıştır. Tablo 4.3’de görüldüğü üzere verilerde kapılama yüzdesi pozitif/pozitif ve PHA’lu ve non-PHA’lu olanlar istatistiksel olarak incelenmiştir.

Tablo 4.3. Blastik Transformasyon testinin flow sitometri sonuçlarının yüzdelik değerleri

ID	CD3/CD69	CD3/CD69	CD3/HLA-DR	CD3/HLA-DR	CD4/CD25	CD4/CD25
	+/+ PHA eklenen	+/+PHA eklenmeyen	+/+PHA eklenen	+/+ PHA eklenmeyen	+/+ PHA eklenen	+/+PHA eklenmeyen
1	43,7008	0	46,4567	5,7637	4,428	1,1184
2	12,2164	0,378	34,0045	2,8349	30,0411	2,7254
3	0	1,7544	0	1,7544	3,6364	2,924
4	4,5738	2,7411	5,6133	2,6396	9,8753	16,0406
5	0,8423	0,3216	0,773	0,1361	0,9692	0,3093
6	1,8905	0,7797	1,0945	0,4548	2,2886	2,3392
7	34,3333	0,3402	60,1905	3,4508	45,631	2,6245
8	25,1533	47,9665	14,7291	20,9596	17,0692	31,991
9	22,1749	3,2782	42,6588	3,7326	44,006	1,7527
10	43,1957	3,4069	45,67	4,8242	43,2305	3,734

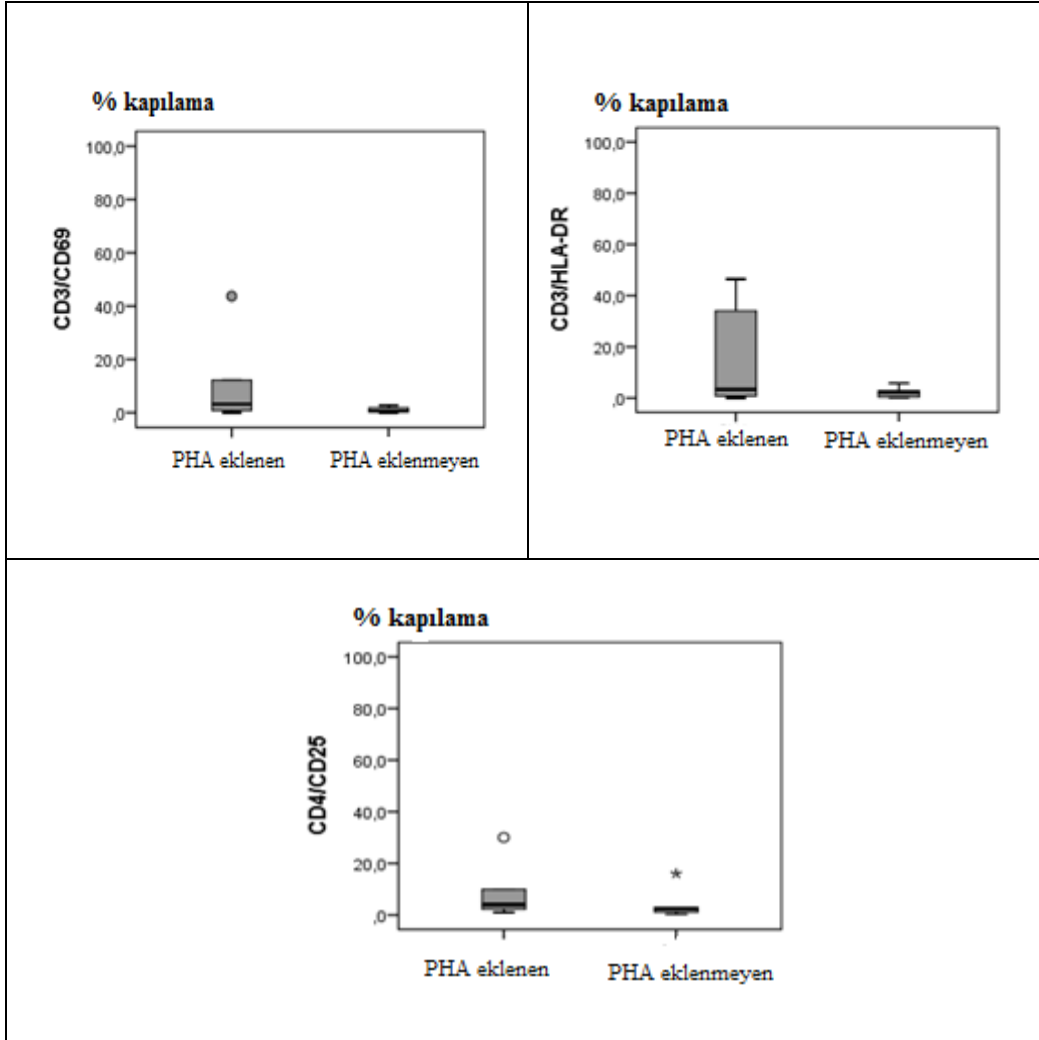
AML hastalarının PHA grubunda CD3/CD69 değerlerine ait ortanca 3.232 (min= 0.000; mak= 43.701) iken PHA eklenmeyen grubunda CD3/CD69 değerlerine ait ortanca 0.579 (min= 0.000; mak= 2.741) olarak elde edilmiştir (z= 1.524; p=0.132).

AML hastalarının PHA grubunda CD3/HLA-DR değerlerine ait ortanca 3.354 (min=0.000; mak= 46.457) iken PHA eklenmeyen grubunda CD3/HLA-DR değerlerine ait ortanca 2.197 (min=0.136; mak= 5.764) olarak elde edilmiştir (z=0.480; p=0.669).

AML hastalarının PHA grubunda CD4/CD25 değerlerine ait ortanca 4.032 (min= 0.969; mak= 30.041) iken PHA eklenmeyen grubunda CD3/CD69 değerlerine ait ortanca 2.532 (min=0.309; mak=16.041) olarak elde edilmiştir (z=0.961; p=0.394). PHA eklenen ve PHA eklenmeyen gruplarında belirtilen değişken değerlerine ait sonuçlar benzerdir (p>0.05) (Tablo 4.4; Şekil 4.12).

Tablo 4.4. AML hastalarının PHA eklenen ve PHA eklenmeyen gruplarında belirtilen değişken değerlerinin karşılaştırılması

	PHA eklenen		PHA eklenmeyen		z	p
	Ortanca (min; mak)	Ort±SS	Ortanca (min; mak)	Ort±SS		
CD3/CD69	3.232 (0.000; 43.701)	1.537 ± 16.840	0.579 (0.000; 2.741)	0.996 ± 1.048	1.524	0.132
CD3/HLA-DR	3.354 (0.000; 46.457)	14.657 ± 20.292	2.197 (0.136; 5.764)	2.264 ± 2.038	0.480	0.669
CD4/CD25	4.032 (0.969; 30.041)	8.540 ± 10.968	2.532 (0.309; 16.041)	4.243 ± 5.867	0.961	0.394



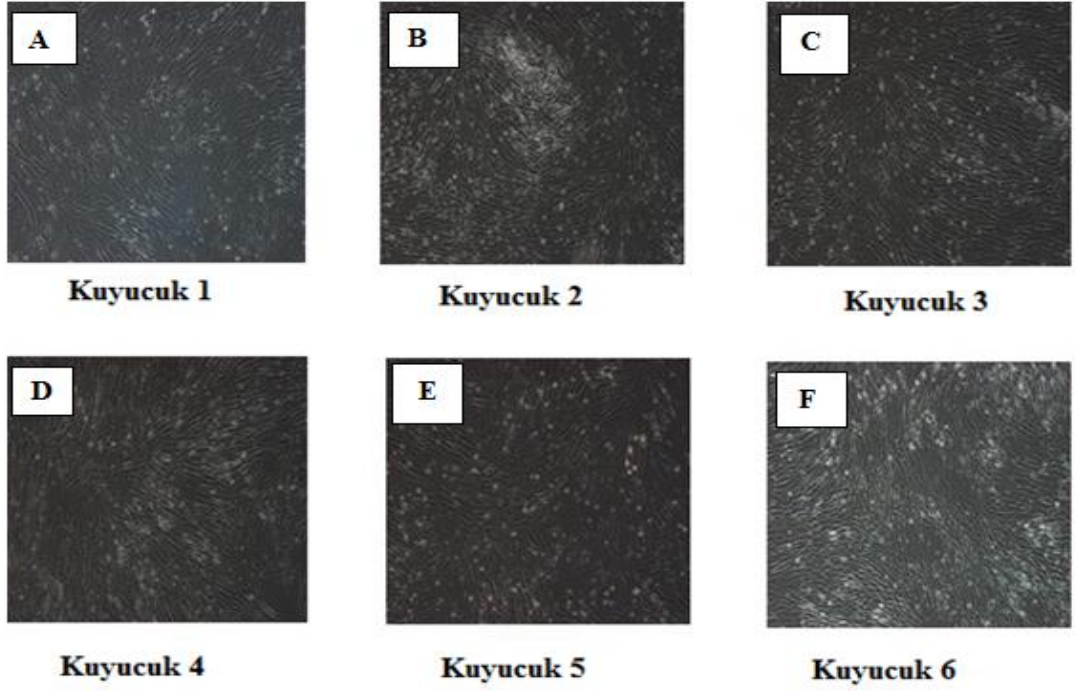
Şekil 4.12. PHA eklenen ve PHA eklenmeyen durumlarda AML hastalarının belirtilen değişken değerlerinin kutu çizgi grafiği

4.5. Tripan blue boyası ile hücresel canlılık sonuçları

MKH-MNC ko-kültürlerinin sonucunda MNC hücrelerin MKH'ler üzerinde hücresel canlılık olarak nasıl etkilendiklerini saptayabilmek için pasaj 2'de sonlandırılan kuyucuklara Tripsin-EDTA konulmuştur. Daha sonra kültür kabının plastik yüzeyinden ayrılan hücreler birçok deneysel aşamadan geçirildikten sonra Tripan Blue boyası ile boyanarak hücre canlılığına bakılmıştır. Boyayı hücre içine alan hücreler mavi renkte, boyayı almayan canlı hücreler ise beyaz renkte Olympus CX31 markalı ışık mikroskobunda görüntülenmiştir. Tablo 4.5'te AML hastası ve sağlıklı bireylerin hücresel canlılık değerleri yüzdece verilmiştir.

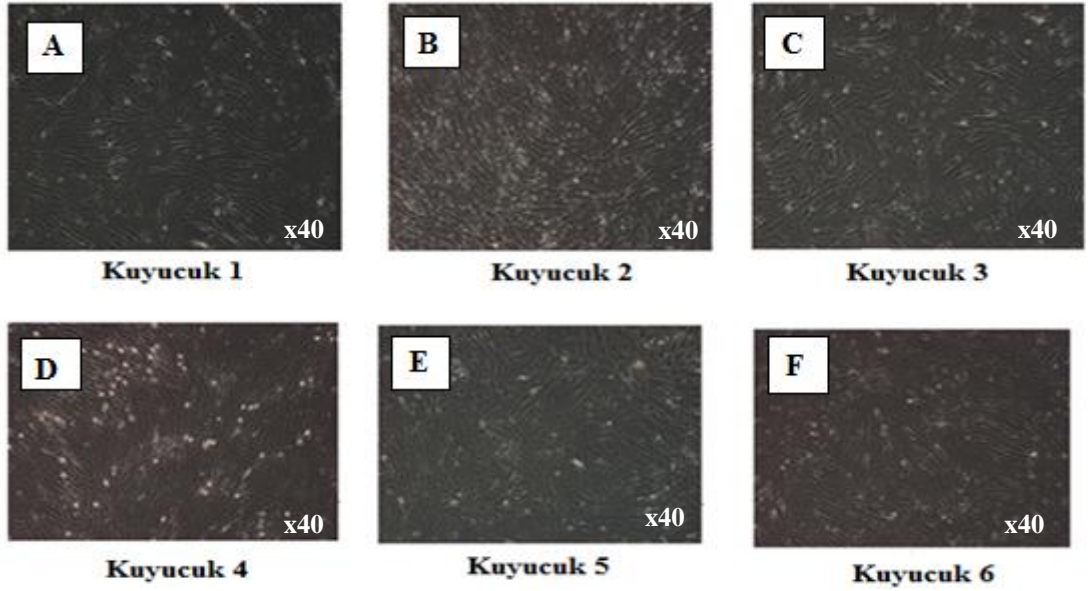
Tablo 4.5. Mezenkimal stromal hücrelerin hücre canlılığı yüzdelik sonuçları

ID	Grup	Kuyucuk 1	Kuyucuk 2	Kuyucuk 3	Kuyucuk 4	Kuyucuk 5	Kuyucuk 6
1	AML hastası	53,3	61,2	56,4	56,5	80,3	78,1
2	AML hastası	94,3	79,3	92,5	87,5	73,9	86,9
3	AML hastası	75,0	55,6	66,7	70,8	66,7	60,0
4	AML hastası	61,4	64,7	65,5	56,9	78,7	79,0
5	AML hastası	73,9	80,8	81,0	86,1	64,7	81,3
6	AML hastası	68,0	66,7	80,3	75,4	81,8	73,0
7	Sağlıklı birey	68,0	90,5	77,7	68,9	75,9	65,6
8	Sağlıklı birey	73,9	90,0	76,7	83,6	72,9	73,5
9	Sağlıklı birey	62,5	90,5	76,6	84,4	74,3	86,9
10	Sağlıklı birey	56,3	86,7	80,0	51,3	70,8	74,4
11	Sağlıklı birey	76,7	88,1	85,4	78,5	84,3	78,1
12	Sağlıklı birey	79,0	61,8	80,0	68,4	56,5	63,6



Şekil 4.13. AML hastası no:1'e ait kuyucuklardaki hücrelerin invert mikroskop görüntüleri

A) Kontrol grubu, B) 50000 MSC üzerine sağlıklı MNC vericisinden PHA eklenen 50000MNC, C) 50000 MSC üzerine AML hasta PHA eklenen 50000MNC, D) 50000 MSC üzerine izole edildiği gün eklenen 50000 MNC, E) 50000 MSC üzerine sağlıklı MNC vericisinden PHA eklenmeyen 50000MNC, F) 50000 MSC üzerine AML hasta PHA eklenmeyen 50000MNC



Şekil 4.14. Sağlıklı birey no:1'e ait kuyucuklardaki hücrelerin invert mikroskop görüntüleri

A) Kontrol grubu, B) 50000 MSC üzerine sağlıklı MNC vericisinden PHA eklenen 50000MNC, C) 50000 MSC üzerine AML hasta PHA eklenen 50000MNC, D) 50000 MSC üzerine izole edildiği gün eklenen 50000 MNC, E) 50000 MSC üzerine sağlıklı MNC vericisinden PHA eklenmeyen 50000MNC, F) AML hasta PHA eklenmeyen 50000MNC

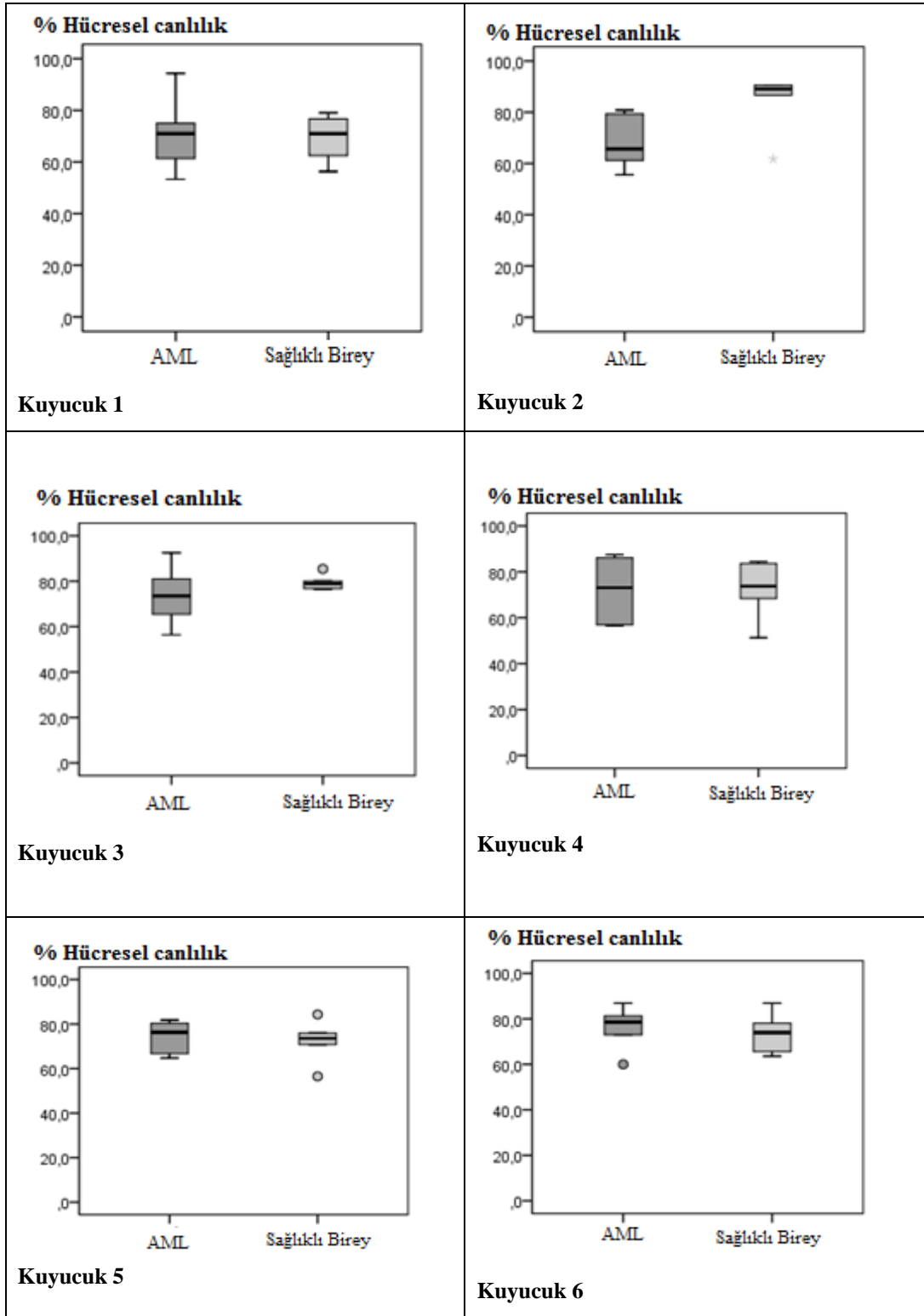
Kuyucuk 2’de, sağlıklı bireylerden elde edilen değerler AML hastalarında elde edilen değerlerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($z= 2.246$; $p=0.026$). AML hastaları için ortanca 65.70 (min= 55.60; mak= 80.80) iken, AML donör grubu için 89.05 (min= 61.80; mak= 90.50) olarak elde edilmiştir (Tablo 4.6.) (Şekil 4.15).

Çalışmamızda diğer kuyucuklarda AML hastaları ile sağlıklı bireylerin hücre canlılığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Kuyucuk 3’ de AML hastaları için ortanca 73.50 (min= 56.40; mak= 92.50), sağlıklı birey için ortanca 78.85 (min= 76.60; mak= 85.40)’ dır ($z= 0.321$; $p=0.818$).

Tablo 4.6. Her bir kuyuda AML ve Sağlıklı birey sonuçlarının karşılaştırılması

	AML		Sağlıklı birey		z	p
	Ortanca (min; mak)	Ort±SS	Ortanca (min; mak)	Ort±SS		
Kuyucuk 1	70.95 (53.30; 94.30)	70.98 ± 14.01	70.95 (56.30; 79.00)	69.40 ± 8.80	0.161	0.937
Kuyucuk 2	65.70 (55.60; 80.80)	68.05 ± 10.04	89.05 (61.80; 90.50)	84.60 ± 11.27	2.246	0.026
Kuyucuk 3	73.50 (56.40; 92.50)	73.73 ± 13.16	78.85 (76.60; 85.40)	76.40 ± 3.31	0.321	0.818
Kuyucuk 4	73.10 (56.50; 87.50)	72.20 ± 13.57	73.70 (51.30; 84.40)	72.52 ± 12.49	0.320	0.818
Kuyucuk 5	76.30 (64.70; 81.80)	74.35 ± 7.23	73.60 (56.50; 84.30)	72.45 ± 9.09	0.320	0.818
Kuyucuk 6	78.55 (60.00; 86.90)	76.38 ± 9.21	73.95 (63.60; 86.90)	73.68 ± 8.51	0.643	0.589
χ^2; p	2.184; 0.823		10.714; 0.057			

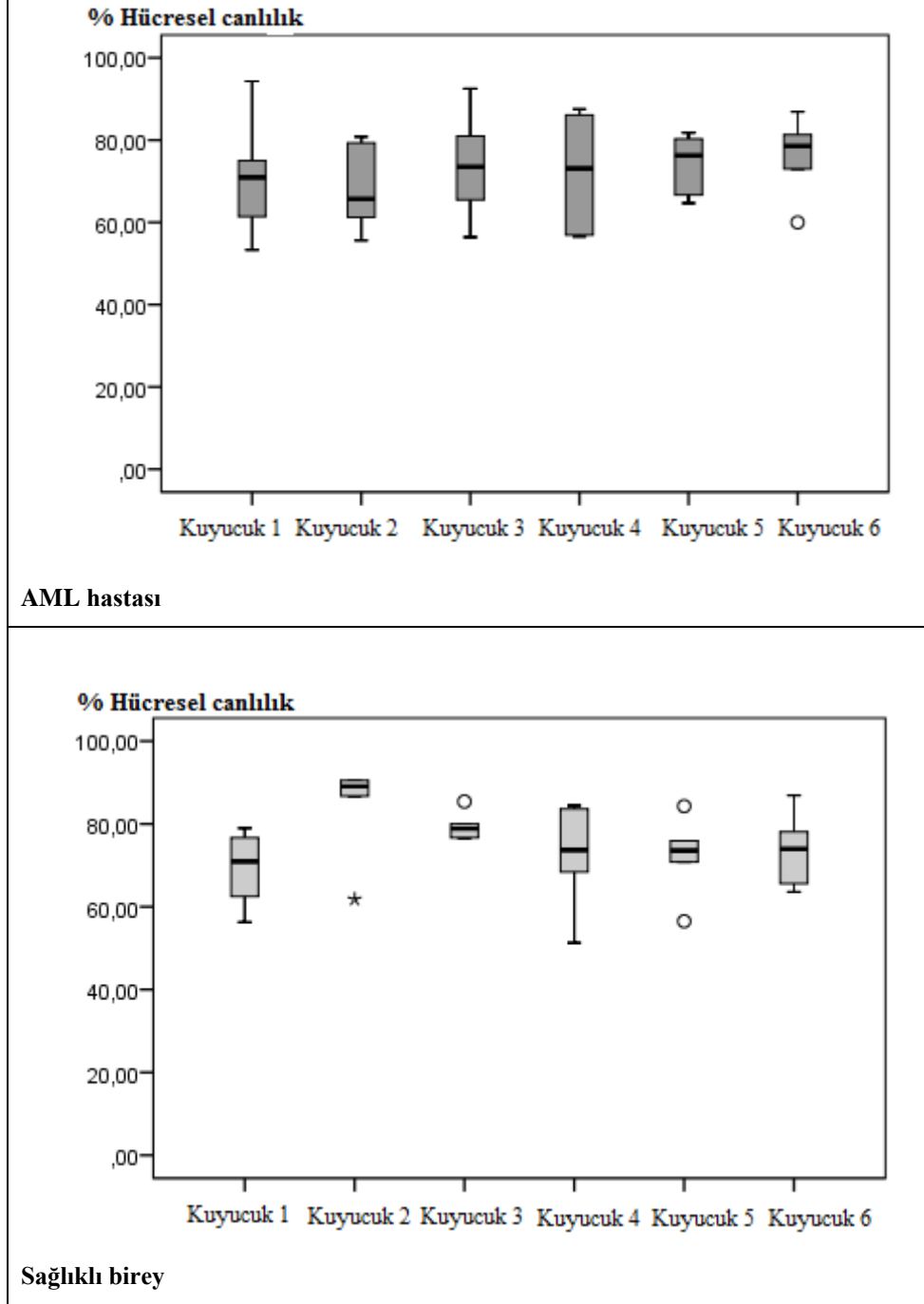
AML hastalarında kuyucuklardan elde edilen hücresel canlılık yüzdeleri değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir ($\chi^2 = 2.184$; $p=0.823$). Sağlıklı birey için elde edilen hücresel canlılık yüzdeleri tüm kuyucuklar için benzerdir ($\chi^2= 10.714$; $p=0.057$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Belirlenen kuyucuklarda AML hastaları ile sağlıklı bireyler için elde edilen yüzde hücresel canlılık değerlerine ait kutu-çizgi grafiği

Şekil 4.15’de AML hastaları ve sağlıklı bireylere ait hücre canlılığı sonuçlarının kolaylıkla yorumlanabilmesi için kutu-çizgi grafikleri verilmiştir. Bu

değerler kuyucuklardaki hücrelerin minimum ve maksimum ortanca değerleri değerlendirilerek hazırlanmıştır. Şekil 4.16'da ise ayrı ayrı hazırlanan kutu-çizgi grafikleri birleştirilip yeniden bir kutu-çizgi grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 4.16. AML hastaları ve Sağlıklı bireyler için belirlenen kuyucuklarda yüzde hücresel canlılık için elde edilen değerlere ait kutu-çizgi grafiği

5. TARTIŞMA

Çalışmamız Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji Hastanesi Kök Hücre İşleme ve Saklama laboratuvarında 7 AML hastası, 7 sağlıklı birey ve 1 sağlıklı MNC vericisi olmak üzere 15 birey üzerinden gerçekleştirilmiştir. AML hastaları ve sağlıklı bireylerden izole edilen MKH'lerin morfolojik özellikleri, MKH'lerin popülasyon ikiye katlanma değerleri (PD değerleri), PHA ile uyarılan ve uyarılmayan MNC hücreleri ile ko-kültürleri ve immünolojik etkileşimleri incelenmiştir. Ayrıca CD3, CD4, CD25, CD69 ve HLA-DR T hücre aktivasyon belirteçleri Flow-sitometri cihazında analiz edilmiştir. MKH-MNC ko-kültür etkileşimi sonucunda hücre canlılık değerleri tripan blue boyası ile ışık mikroskopunda sayımları yapılarak belirlenmiştir. Sayım sonuçlarına göre MKH'lerin hücre canlılık, immünsupresyon ve immünmodülasyon özellikleri değerlendirilmiştir.

Çocukluk çağı AML, tüm pediatrik akut lösemilerin %15-20'sini temsil etmektedir. Destekleyici bakım ve yoğunlaştırılmış kemoterapi sebebi ile son yıllarda sağkalım oranları % 70'in üzerinde artış göstermiştir (97).

Akut miyeloid lösemi (AML) moleküler olarak heterojen bir hastalıktır. Pediatrik AML, erişkin tip AML ile karşılaştırıldığında genetik ve epigenetik profilinde farklılıklara sahiptir. Somatik ve epigenetik değişiklikler miyeloid lökomogeneze katkı sağlamaktadır ve tanıdan relapsa kadar gelişebilmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojileri AML biyolojisine yeni bakış açıları sağlamaktadır (98).

MKH'ler Kİ'nde ilk kez keşfedilen heterojen ve primitif hücrelerdir. Doku homeostazın sürdürülmesinde varsayılan rollere sahiptir. *In vivo* koşullarda MKH belirteçlerinin olmaması ve *in vitro* gözlemlerle karşılaştırılması, deney sonuçlarının yorumlanmasını sınırlandırmaktadır (99).

MKH'ler multipotent hücrelerdir ve kondroblastlara, adipositlere ve osteositleri içeren çoğu hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Bu hücreler Kİ, adipoz doku, kordon kanı ve plasenta gibi çeşitli fetal ve erişkin tip dokularda bulunabilmektedir (100). Yapılan bir çalışmada MKH'lerin multipotent hücreler

oldukları ve *in vivo* ve *in vitro* koşullarda çok farklı hücre tiplerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir (58, 101). Adipojenik ve osteojenik farklılaşmanın düzenlenmesinde Peroksizom proliferatör-aktifli reseptör- γ (PPAR γ) ve Runt-ilişkili transkripsiyon faktör 2 (Runx2) gibi iki önemli transkripsiyon faktörü görev yapmaktadır. Bu iki transkripsiyon faktörü genellikle osteojenezis ve adipojenizisin en önemli düzenleyicileridir (101).

Farklılaşma aşamalarında kullanılan MesenCult Adipogenic Diff Medium Human (Stem cell) ve Osteogenic Stimulatory kit Human (Stem cell) içeriğindeki besiyeri, büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler MKH'lerin adipojenik ve osteojenik hücelere farklılaşmasını indüklemektedir. Bu sebeple adipositlerin içerisinde bulunan lipid damlacıkları oil red o ile boyanarak ve osteositlerin içerisinde bulunan kalsiyum vb. minerallerinin alizarin red ile boyanması invert mikroskopta görüntülenmelerine imkan sağlamıştır.

Çalışmamızda AML tanısı almış çocuklarda Kİ mikroçevresinde hematopoeze destek veren MKH'ler biyolojik ve immünolojik olarak karakterize edilmiştir. Yapılan analizlerde AML hastaları ve sağlıklı bireylere ait MKH'lerin uygulanan standart hücre kültürü uygulamalarından sonra invert mikroskop görüntülerinde her iki grubun morfolojik olarak birbirine benzediği görülmüştür ve yapılan literatür sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Yapılan bir çalışmada da ALL'li hastalar ve sağlıklı bireylerin kemik iliği kaynaklı MKH'leri arasında morfolojik olarak farklılık olmadığı rapor edilmiştir (90).

Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada BM ve AT kaynaklı adheren hücreler çeşitli koloniler oluşturmaktadır ve çeşitli şekillerde (diskoidal düz, üçgen benzeri ve uzun) heterojen morfoloji göstermektedir. Üç pasaj sonrasında, her iki hücre tipinde nispeten homojenlik görüldüğü ve bol sitoplazmalı ve büyük çekirdekleri ile fibroblast-benzeri morfolojiye sahip oldukları gösterilmiştir. BM ve AT doku kaynaklı MKH'ler birbirine paralel büyüme ya da vorteks-benzeri model gösterdikleri ve yapılan son pasajda hücrelerde morfolojik farklılıklar saptanmadığı rapor edilmiştir (102).

2013 yılında Conforti ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ALL hastaları ve sağlıklı vericilerinin pasaj 1'den pasaj 5'e kadar olan PD değerlerini Student's T test ile değerlendirilmiştir. ALL hastalarının PD değerleri (ALL-

MSC=8.89, SD±0.87, p<0.001) sağlıklı bireylerin PD değerlerinden (HD- MSC=12.12, SD±1.09) anlamlı bir şekilde düşük proliferasyon kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (90).

Kümülatif PD (CPD) araştırmalarında, BM kaynaklı MKH'lere göre AT kaynaklı MKH'lerin her pasajda daha yüksek sayılara ulaştığı analiz edilmiştir (p<0.05). BM-MKH'lere oranla AT-MKH'lerin yüksek proliferatif kapasitesi olduğu gösterilmiştir. Pasaj 5'te AT-MKH ve BM-MKH'lerin CPD değerleri sırasıyla 13.7 ± 0.5 ve 17.2 ± 0.3 'dir (P < 0.01) (102).

Bir makalede ALL tanılı 7 çocuktan elde edilen BM-MKH'lerin proliferasyon kapasitesi hatalı bulunmuştur (103). Yaşlı bireylerden HD-MKH'ler, genç sağlıklı MKH'lerle karşılaştırıldığında daha düşük proliferasyon ve sağkalım gösterdiği bildirilmektedir (104).

MKH'lerin hemogram cihazında pasaj 1 ve pasaj 2'deki ekilen ve toplanan hücrelerin sayısı ölçülmüştür. İstatistiksel analiz sonuçları literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında bu hücrelerin PD değerleri farklı bulunmuştur. Bunun nedeninin hücrelerin pasaj 2'de sonlandırılmış olması yani pasaj ilerletme aşamalarının yapılamaması ve AML hastalarından izole edilen MKH'lerin sağlıklı bireylerden elde edilen MKH'lere göre konfluent olma durumunun daha geç zamanda meydana gelmesinin bu olasılığı güçlendirdiği düşünölmektedir.

Son yıllarda, MKH'lerin biyolojik özelliklerinin klinikte AML tedavisi için potansiyel olarak uygulanması dünya çapında araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu özelliklerin arasında en çok ilgi çekenini bu hücrelerin immün düzenleyici potansiyele sahip olmasıdır. MKH'ler immün sistem hücreleri üzerinde hareket edebilme yeteneğine sahiptir ve T hücrelerin çoğalmasını ve işlevlerini inhibe etme kapasitesine sahiptir (100).

PHA, farklı hücre membran glikoproteinlerine çapraz bağlanabilme yeteneği gösteren ve lenfositlerin poliklonal aktivasyonuna öncülük eden bir lektindir (79). PHA tarafından TCR, CD3 ve CD2 çapraz bağlanması T hücrelerin aktivasyonunda ilk sinyali taklit etmesine rağmen, PKC aktivasyonunu devam ettirmektedir. Ayrıca sitoplazmik kalsiyum seviyesini arttırdığı bilinmektedir ancak bu sonuç T hücre

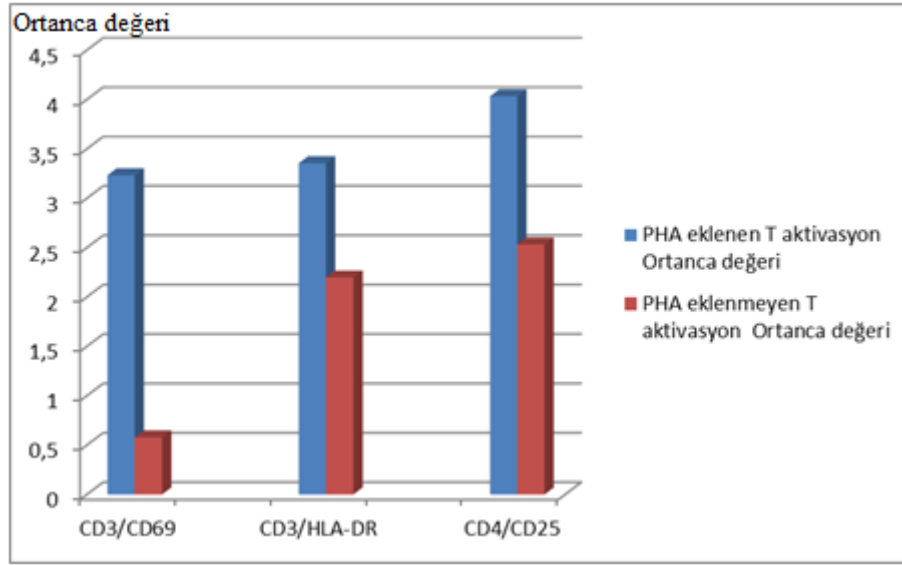
aktivasyonunu teşvik etmeye yeterli değildir, proliferasyonları için, buna bağlı olarak da T hücreler tarafından IL-2 ifadesi için de gerekli olan antijen sunan hücreler aracılığıyla yardımcı sinyallerin verilmesi gereklidir (105, 106, 107, 108).

Erken aktivasyon belirteci CD69, aktivasyondan 4 saat sonra NK, B ve T hücre yüzeylerinde eksprese edilmektedir. IL-2 ve TNF- α transkripsiyonu üzerinden bu olayı gerçekleştirir. T hücre plazma zarı üzerinde IL-2'e yüksek afinite sağlayarak hücre aktivasyonundan 12-24 saat sonra, IL-2 reseptörünün α alt ünitesinin ekspresyonu arttırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak 40 ile 60 saat sonra T hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonu başlamaktadır (109, 110, 111, 112).

Yapılan bir çalışmada da, *in vitro* olarak poliklonal-indüklenmiş allojenik PBMC'lerin proliferasyonunun inhibe edilmesinin ALL-MKH ve sağlıklı verici MKH'lerinde eşit etki gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, sitokin ve büyüme faktör analizleri anti-inflamatuar sitokinlerde artışa ve pro-inflamatuar sitokinlerde azalmaya ve büyüme faktörlerinde hem sağlıklı vericide hem de ALL-MKH'inde *in vitro* koşullarda azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. ALL hastalarından izole edilen MKH'ler, sağlıklı vericilerin MKH'leri ile benzer anti-inflamatuar etki gösterirler (90).

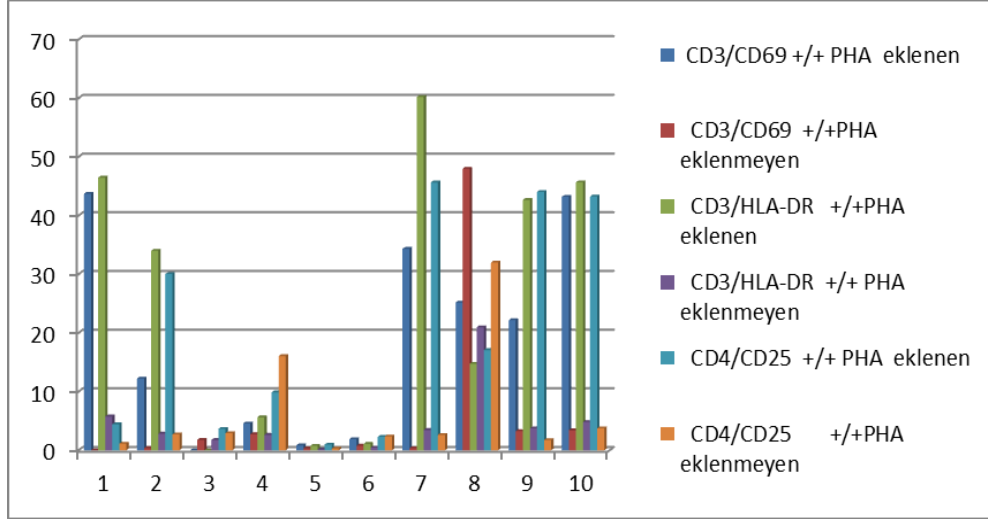
Çalışmamızın immünolojik aşamasını oluşturan AML hastası ve sağlıklı MNC vericisinin periferik kanlarından izole edilen MNC'lerin PHA ile uyarılması ve flow-sitometri cihazında CD3, CD4, CD25, CD69 ve HLA-DR gibi T hücre aktivasyon belirteçlerine bakılması önem arz etmektedir. Şekil 5.1'de PHA eklenen ve PHA eklenmeyen T25'lik flaskların inkübasyon sonrası T aktivasyon ortanca değerlerine ait sütun grafiği verilmiştir. PHA ile indüklenen MNC'lerin MKH'lerle ko-kültüre edilmesi immünsupresyon özelliğe sahip MKH'lerin hücre sel canlılık değerlerini yüzde hesaplayıp yorumlanmasına yardımcı olmaktadır.

Bu özgün çalışmada *in vitro* koşullarda herbir kuyucukta ko-kültüre edilmiş MKH'lerin immünolojik olarak baskılanması ya da indüklenmesine hangi kuyucuktaki etkileşimin neden olduğu hücrelerin canlılık sonuçlarına göre yorumlanabilmektedir. Şekil 5.2'de ise PHA eklenen ve PHA eklenmeyen T25'lik flasklardaki T aktivasyon belirteçleri kapılama +/- yüzdelik değerleri sütun grafiği verilmiştir.



Şekil 5.1. PHA eklenen ve PHA eklenmeyen T25'lik flaskların inkübasyon sonrası T aktivasyon ortanca değerlerine ait sütun grafiği

Farklı çalışmaların sonuçlarına göre MSC'ler karışık lenfosit kültürleriyle ko-kültüre edildiklerinde, T hücre proliferasyonunu baskırlar. Kök hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda hücre kültürüne ilave edildiği zamandan beri, MKH'lerin inhibitör etkileri doz-bağımlıdır ve inhibisyonları daha belirgindir. Benzer şekilde, MKH'lerin bu eşsiz yeteneği majör histokompatilite kompleksinden bağımsız olarak T hücre allocevaplarını inhibe etmesidir ve benzer sonuçlar otolog ya da allojenik MKH'ler kullanıldığında da elde edilmiştir. MKH'ler ko-stimülatör moleküllerle transfekte edildiklerinde ya da potent pro-inflamatuar sitokin IFN- γ eklenmiş kültür besiyeri kullanıldığında allojenik MKH'ler T hücre proliferasyonunu indüklemeye uygun olmazlar. Aksine T hücreler allojenik periferal kan mononükleer hücreler (PBMC) ile interlökin-1 α , interlökin-1 β ve TNF gibi antijen sunan hücre sitokinleri, allojenik MKH'lere cevap veren T hücre proliferasyonuna kuvvetli şekilde cevap verirler (9).

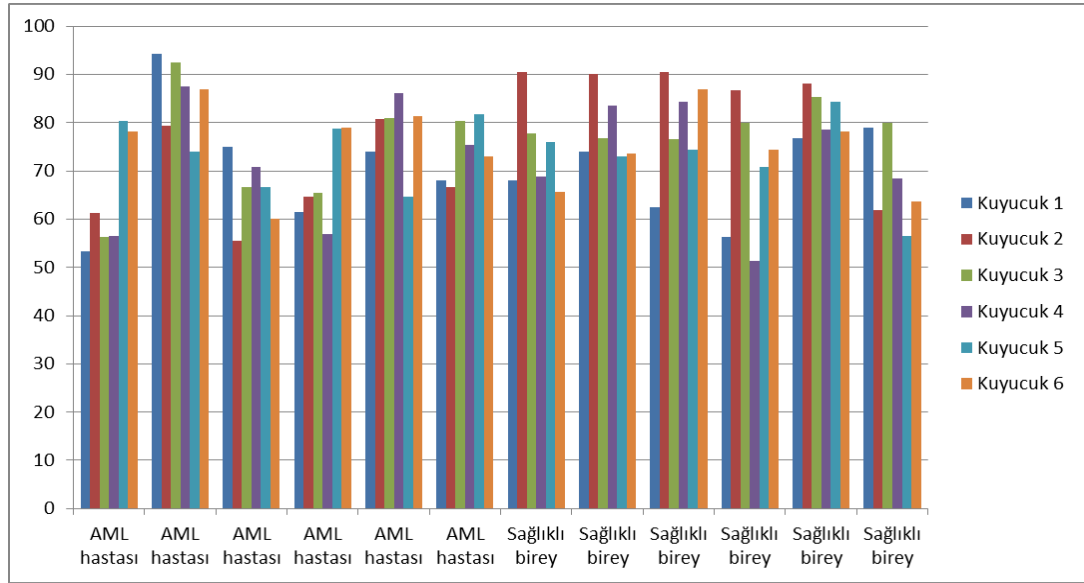


Şekil 5.2. PHA eklenen ve PHA eklenmeyen T25'lik flaslardaki T aktivasyon belirteçleri kapılama +/+ yüzdelik değerleri sütun grafiği

MKH'lerin T hücre proliferasyonunu, aktivasyonunu ve IL-2 ekspresyonunu inhibe etme yeteneği literatürde tanımlanmıştır. Ayrıca bir başka özelliği diğer sitokinlerin ekspresyonunu düzenlemek ve CTL sitolitik fonksiyonunu azaltmaktır. Bu özellikler, en azından kısmen, MKH'ler tarafından üretilen çözünebilir faktörler TGF- β , PGE2, IDO, lösemi inhibe edici faktör (LIF), HLA-G5, galectin, jagged-1, adozin ve semaforin-3A ve/ ya da MKH'lerin yüzey proteinleri HLA-G1, PD-L1, CD200 ve B7-H4 ve T hücrelerdeki reseptörler ile arasındaki etkileşim ve bildirilmiştir (101). Ribeiro ve diğer bilim adamlarının önceki çalışmalarında, PHA uyarılı MNC, antijen-sunan hücrelerini aktive eden IFN- γ ve IL-2 ekspresyonunu indükler ve IL-1, -6, -12 ve TNF- α ekspresyonlarının artmasına katkıda bulunmaktadır. Benzer şekilde, farklı dokulardan gelen tüm MKH'ler CD4 + ve CD8 + T hücrelerinin aktivasyonu bastırma yeteneği göstermektedir (101).

Bochev yayınladığı makalede kemik iliği kaynaklı ve adipoz doku kaynaklı MKH'lerin PHA-uyarılan MNC'lerle ko-kültüre edildiklerinde, B hücresi lenfoblast özelliklerinin edinimi ve ilerlemesini aktif olmadıkları dönemden aktif erken dönemlerine kadar inhibisyon yaptıkları gösterilmiştir. Özellikle adipoz dokudan izole edilen örneklerin kemik iliği kaynaklı olanlara göre B hücrelerden salgılanan immunoglobulin (Ig) üretimini yüksek düzeyde inhibe ettikleri gösterilmiştir (113). Bazı çalışmalarda, B hücre proliferasyonu, aktivasyonu, plazma hücrelerine farklılaşması ve/ya da Ig üretimi üzerine MKH'lerin inhibisyonu, insan BM-MSK ve

p38 MAPK ve ERK1/2 fosforilasyonu ile ilişkili olan hücre döngüsünün G0/G1 fazında B lenfosit uyarımını bloke ettiği gösterilmiştir (101,114).



Şekil 5.3 AML hastaları ve sağlıklı bireylere ait hücresel canlılık değerlerine ait yüzdeler için sütun grafiği.

Hücresel canlılığın ölçümü tüm hücre kültürü aşamalarında önemli bir role sahiptir. Bazen toksisite deneyi gibi birçok çalışmanın ana amacını oluşturmaktadır (115). Çalışmamızda tripan blue boyası kullanılarak MKH'lerin PHA ile uyarılan ve uyarılmayan MNC'ler ile etkileşimi incelendikten sonra MKH'lerin hücresel canlılık yüzdelere bakıldı. Sonuç olarak sağlıklı bireylere ait kuyucuklarda yüzde verilen canlılık değerleri istatistiksel olarak $p=0.057$ bulunmuştur. Bu değer istatistiksel anlamlılık düzeyi $p>0.050$ 'ye yakın bir değerdedir.

Sağlıklı bireye ait 2.kuyucukta hücresel canlılık, AML hastasına ait 2. kuyucuktaki ortanca değerinden yüksek bulunmuştur ve istatistiksel anlamlılık değerinden düşük bulunmuştur ($p=0.026$) (Tablo 4.6). AML hastalarına ait kuyucuklar kendi aralarında ($\chi^2 = 2.184$; $p=0.823$) ve sağlıklı bireylere ait kuyucuklar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($\chi^2= 10.714$; $p=0.057$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.16). Hücresel canlılık deneyimiz diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kendi özgün değerini korumaktadır. İleriki dönemlerde çalışmamızda uyguladığımız deneyler daha da geliştirilerek ve genetik açıdan zenginleştirilerek hastalık patogeneze katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda sonuç olarak aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- AML hasta ve sağlıklı bireylerin kemik iliklerinden izole edilen MSC'lerin morfolojik olarak birbirine benzediği, fibroblast benzeri ve plastik yüzeye yapışan hücreler olduğu gözlemlendi.
- AML hasta ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin pasaj 1 ve pasaj 2 deki PD değerlerinin matematiksel ifadesinde iki grubunun logaritmik olarak PD2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).
- AML hasta ve sağlıklı bireylerin MKH'lerinin adiposit ve osteositlere farklılaşma gösterdikleri gözlemlendi. Adipositlerin içerisindeki lipid damlacıklarının oil red o boyası ile boyanması ve osteositlerin içerisindeki minerallerin alizarin red ile boyanması sonucu MKH'lerin farklılaşabilme kapasiteleri invert mikroskopta görüntülendi.
- İstatiksel olarak AML hastası ve sağlıklı bireyden elde edilen MNC hücrelerinin PHA eklenen ve PHA eklenmeyen kültürlerinin flow-sitometrik analiz sonuçlarında CD3/CD69, CD3/HLA-DR ve CD4/CD25 T hücre aktivasyon belirteçleri pozitif/pozitif kapılama yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).
- AML hasta ve sağlıklı bireylere ait 6'lık kültür kaplarındaki kuyucuklara PHA ile uyarılan ve uyarılmayan MNC eklenmiş MKH'lerin hücre sel canlılığına tripan blue ile boyanarak bakıldı.
- Sağlıklı MNC hücre vericisinin MKH ile etkileşimi sonucunda sağlıklı bireye ait 2. Kuyucuk, AML hastasına ait 2.kuyucuğa göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p=0.026$). AML hastaları ve sağlıklı bireylerin kuyucukları kendi aralarında karşılaştırıldığında hücre sel canlılık açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu çalışmamızda kemik iliği mikroçevresini oluşturan hücrelerin bir grubunu oluşturan MKH'lerin MNC'lerle ko-kültüründen sonra bu hücrelerin arasında etkileşim olması beklenmektedir. Bu etkileşimin tek yönlü olamayacağı açıktır. İleri ki çalışmalarda MNC ile ko-kültüre edilecek olan MKH'lerin hücre yüzey protein profillerindeki değişikliklere bakılması planlanmaktadır.

Günümüzde hücrenel tedavi alanında hekimlerimizce uygulanan tedaviler MKH'lerin bilinmeyen yönlerini ve hastalıkların patogenez mekanizmalarını kolaylıkla anlamamıza yardımcı olup kişiye özel hücrenel tedavilerinde gelişmesine ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Stone RM, O'donnell MR, Sekeres MA. Acute Miyeloid Leukemia, *American Society of Hematology*, 2004, no: 1, 98-117.
2. Leukaemia foundation, Understanding acute myeloid leukaemia (AML), *booklet*, 2012, s.10-60.
3. Anak S, Uysalol E. Akut Miyeloid Lösemi (AML), derleme, *Çocuk Dergisi*, 2012, 12(4):153-158.
4. Deschler B. *Acute myeloid leukemia, Cancer*, 2006, 107(9):2099-107.
5. Zhao ZG, Liang Y, Li K, Li WM, Li QB, Chen ZC, Zou P. Phenotypic and Functional Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Bone Marrow of Normal Adults and Patients with Hematologic Malignant Diseases, *Stem Cells and Development*, 2007, 16(4): 637-648.
6. Bayati V, Hashemitabar M, Gazor R, Nejatbakhsh R, Bijannejad D. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow- and adipose-derived stem cells: a comparative study. *Anat Cell Biol*, 2013; 46:113-121.
7. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, concise review, *Stem Cells* 2007; 25:2739-49.
8. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells and Development*. 2012, 21(14): 2724-2752.
9. Machado CV, Telles PDS, Nascimento ILO. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells, *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2013; 35(1):62-7.

10. Vedi A, Ziegler DS. Antibody therapy for pediatric leukemia, *Frontiers on oncology*. 2014, volume 4, article 82.
11. Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. In: Williams Hematology, Eds: Beutler E, Lichtman MA, Coller BC, Kipps TJ, New York. *Mc Graw-HillCo*, 1995, pp: 272-98.
12. Kenneth B, Philip RD. Clinical manifestation of acute myeloid leukemia. Hematology Basic Principles and practise (Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen H, Silberstein). 4th edition. Pennsylvania, *elsevier Churchill Livigstone*. 2005, 1071-1097.
13. Pui CH. *Acute lympho blastic leukemia*. Williams Hematology (Lichtman M, Beutler E, Seligsohn U). 7th edition. New York, *Mcgraw Hill*. 1321-1342, 2006.
14. Lee RG, Foerster j, Lukens J, et al (Eds): Wintrobe's Clinical Hematology, 10th Ed, Baltimore, *Williams & Wilkins*, 1999.
15. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999, 341(14):1051-62.
16. Sandler DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol*. 1997, 24:3–16.
17. Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. Epidemiology of Childhood Acute Myeloid Leukemia, *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60(5):728–733.
18. Ferretti E, Cocco C, Airoidi I, Pistoia V. Targeting acute myeloid leukemia cells with cytokines, *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 92, 2012.
19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985, 103(4):620-5.

20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO) ,*Br J Haematol*, 1991, 78(3):325-9.
21. Altınok B. Akut miyeloid lösemide WNT sinyal yolağındaki genlerin DNA mikroarray analizi ile tanımlanması, Doktora tezi, Ankara Biyoteknoloji Enstitüsü, 2011, Ankara.
22. Yeral M. Donör aferez ürünündeki CD34+hücre sayısı ve Lenfosit alt gruplarının allogenic periferik kök hücre nakli sonuçları üzerindeki etkisi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim dalı, Hematoloji Bilim dalı, Yan Dal Uzmanlık tezi, 2009, Ankara.
23. Brunning RD. Classification of acute leukemias. *Semin Diagn Pathol*, 2003, 20(3):142- 53.
24. Vardiman JW, Harris, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 2002; 100(7):2292-302.
25. Rubnitz JE, Inaba H. Childhood Acute Myeloid Leukaemia, *Br J Haematol*, 2012 November; 159(3): 259–276.
26. Guyton AC, Hall JE. Blood Cells, Immunity and Blood Clotting. Textbook of Medical Physiology, Ed: Guyton AC, Hall JE, 10th edition, ABD, W.B. Saunders Company, 2000, 382-401.
27. Bulakbaşı T. İlaç Direnci gelişen kronik miyeloid lösemi olgularında BCR-ABL1 T315I mutasyonları ve AHI1 gen ifadenme düzeylerinin belirlenmesi, Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim dalı, Uzmanlık tezi, 2009, Ankara.
28. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012; 4:a008250.
29. Bydlowski SP, Levy D, Ruiz MLJ. Hematopoietic Stem Cell Niche: Role in Normal and Malignant Hematopoiesis, Chapter 2, *in.Stem cell biology in*

normal life and diseases, ed. Kamran Alimoghaddam, ISBN 978-953-51-1107-8, May 8, 2013.

30. Trumpp A, Ehniger A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in., *J. Exp. Med.* Vol. 208 No. 3 421-428.
31. Oh IH, Kwon KR. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations, *Stem Cells*, 2010, 28, 1243-1249.
32. Ter Huurne M, Figdor CG, Torensma R. Hematopoietic stem cells are coordinated by the molecular cues of the endosteal niche. *Stem Cells Dev.* 2010, 19, 1131-1141.
33. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011, 32, 315-320.
34. Lilly AJ, Johnson WE, Bunce CM. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int.* 2011.
35. Ratajczak MZ, Zubasurma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia.* 2006, 20, 1915-1924.
36. Chotinantakul K, Leeanansaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res.* Volume 2012 (2012), Article ID 270425, 16 pages.
37. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnumfinney B, Kobayashi H, Hooper AT, Seandel M, Shido K, White IA, Kobayashi M, Witte L, May C, Shawber C, Kimura Y, Kitajewski J, Rosenwaks Z, Bernstein ID, Rafii S. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011, 6, 251-264.

38. Guerrouahen BS, Al-hijji I, Tabrizi AR. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int.* (2011). 2011; 2011:375857.
39. Coskun S, Hirschi KK. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010, 90, 229-242.
40. Audet J, Miller CL, Eaves CJ, Piret JM. Common and distinct features of cytokine effects on hematopoietic stem and progenitor cells revealed by dose-response surface analysis. *Biotechnol Bioeng.* 2002; 80, 393-404.
41. Renström J, Kröger M, Peschel C, Oostendorp RA. How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010; 184, 7-15.
42. Frisch BJ, Porter RL, Calvi LM. Hematopoietic niche and bone meet. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2008; 2, 211-217.
43. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat. Med.* 2006; 12, 657-664.
44. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006, 116, 1195-1201.
45. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, De Sauvage F, Rafii S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med.* 2004, 10, 64-71.
46. Nakamura-Ishizu A, Suda T. Hematopoietic stem cell niche: An interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim Biophys Acta.* (2012). 2013 Feb; 1830(2):2404-9.

47. Sugiyama T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012, 11, 201-206.
48. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011, 12, 643-655.
49. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, & Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2007, 104, 5431-5436.
50. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006, 6, 93-106.
51. Lymperi S, Ferraro F, Scadden DT. The HSC niche concept has turned. Has our knowledge matured? *Ann N Y Acad Sci*. 2010, 1192, 12-18.
52. Tekin A. T.C.Sağlık Bakanlığı Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Hematoloji Onkoloji Yan dal uzmanlık tezi, 2013, Ankara.
53. Horwitz EM, Le Blanc, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005; 7:393-5.
54. Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev*, 2005; 1:53-9.
55. Bonfanti P, Barrandon Y, Cossu G. 'Hearts and bones': the ups and downs of 'plasticity' in stem cell biology. *EMBO Mol Med*. 2012; 4:353-61.
56. Dela Rosa O, Lombardo E. Modulation of adult Mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential Mediators *Inflamm*. 2010; 2010:865601.
57. Ma S, Xie N, WLi B, Yuan YS, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells, Review, *Cell Death and Differentiation*, 2014, 21,216–225.

58. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9:641-50.
59. Zhi-Gang Z, Wei-Ming L, Zhi-Chao C, Yong Y, Ping Z. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with hematological malignant diseases, *Leuk Lymphoma*, 2008;49(11):2187-95.
60. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010; 19:667-79.
61. Dominici M, et al. Minimal Criteria for defining multipotent Mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-7.
62. Nayoun K, Seok-Goo C. Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Korean J Intern Med* 2013; 28:387-40.
63. Lotfinejad P, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Majidi J, Baradaran B, Immunomodulatory Nature and Site Specific Affinity of Mesenchymal Stem Cells: a Hope in Cell Therapy, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2014; 4(1), 5-13.
64. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine, Review *Experimental & Molecular Medicine*, 2013; 45, e54.
65. Dorronsoro A, Fernández-Rueda J, Fechter K, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Trigueros C. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications, *Hindawi Publishing Corporation Bone Marrow Research*, 2013; Volume Volume 2013 (2013), Article ID 203643, 8 pages.
66. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming, *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 8, no. 4, 2012; 1188–1198.

67. Briones J, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications, *Bone Marrow Research*, vol. 2011; Article ID 976793, 7 pages.
68. Glenn JD, Whartenby KA, Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy, *World J Stem Cells* 2014; 6(5): 526-539.
69. Nicola MD, Carlo-Stella C, Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood*, vol. 99, no. 10, 2002; pp. 3838–3843.
70. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex, *Scandinavian Journal of Immunology*, 2003, vol.57,no.1,pp.11–20.
71. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 2005; vol. 105, no. 7, pp. 2821–2827.
72. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells, *Clinical and Experimental Immunology*, 2007; vol. 149, no. 2, pp. 353–363.
73. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Abener WD, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation, *Blood*, v2004; vol. 103, no. 12, pp. 4619–4621.
74. Sakata D, Yao C, Narumiya S. Prostaglandin E2, an immunoactivator, *Journal of Pharmacological Sciences*, 2010; vol. 112, no. 1, pp. 1–5.
75. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood*, 2005, vol. 105, no. 4, pp. 1815–1822.

76. Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes, *Scandinavian Journal of Immunology*, 2004;vol. 60, no. 3, pp. 307–315.
77. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006; 107(1):367-72.
78. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu C, Kuroda Y, Kandeel F. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation, *Exp Hematol*. 2009; 37(5):604-15.
79. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004; 13(3):263-71.
80. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009; 113(26):6576-83.
81. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005; 105(10):4120-6.
82. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Elsevier; 2007. 566 p.
83. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105(4):1815-22.
84. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008; 111(3):1327-33.

85. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005; 2:8.
86. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25 high FOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008; 26 (1):212-22.
87. Bassi EJ, Aita CA, Câmara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*. 2011; 3(1):1-8.
88. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008; 371(9624):1579-86. Comment in: *Lancet*. 2008; 371(9624):1553-4.
89. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999; 181(1):67-73.
90. Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, Li Pira G, Moretta F, Proia A, Contoli B, Genovese S, Ciardi C, Avanzini MA, Rosti V, Lo-Coco F, Locatelli F, Bernardo ME. Biological, Functional and Genetic Characterization of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Pediatric Patients Affected by Acute Lymphoblastic Leukemia, *Plos one*, 2013; Volume 8, Issue 11, e76989.
91. <http://www.naviosnow.com/us/wpcontent/uploads/2010/09/instruments01e1.png> erişim tarihi 26 Ağustos 2015.
92. Deniz G., Yılmaz MT, Yıllar G. Flow-sitometri ve Tıpta kullanımı, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, yenilenmiş 2.baskı, 2004, İstanbul.s:1-10.

93. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri, Derleme, Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. Cilt:21, Sayı: 2, Yıl: 2011, Sayfa: 141-149.
94. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd edition; Wiley-Liss, New York.2000.
95. <http://webb.deu.edu.tr/arlalab/images/protokoller/tript.pdf> Erişim tarihi:04 Eylül 2015.
96. <https://eurekabrewing.files.wordpress.com/2012/07/yeastcount.jpg> Erişim tarihi: 04 Eylül 2015.
97. Jasmijn DE de Rooij, C. Michel Zwaan, Marry van den Heuvel-Eibrink. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management, *J Clin Med.* 2015 Jan; 4(1): 127–149.
98. Tarlock K, Meshinchi S. Pediatric acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications of genomic variants.*Pediatr Clin North Am.* 2015 Feb; 62(1):75-93.
99. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2015 Mar 5;16(3):239-53.
100. Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int.* 2014;2014:216806.
101. Ribeiro A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells, Rev, *Stem Cell Research & Therapy*, 2013; 4:125.

102. Stein PH, Singer A. Similar co-stimulation requirements of CD4⁺ and CD8⁺ primary T helper cells: role of IL-1 and IL-6 in inducing IL-2 secretion and subsequent proliferation. *Int Immunol* 1992, 4:327–335.
103. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro, *Cell Biol Int*, 2008,32:384–393.
104. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, LópezA, BenitoA, OcioE, Sánchez-GuijoFM, CañizoC, SanMiguelJF. The effect of mesenchymal stem cellson the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes.*Haematologica*, 2008; 93:1301–1309.
105. Hackett RJ, Davis LS, Lipsky PE. Comparative effects of tumor necrosis factor-alpha and IL-1 beta on mitogen-induced T cell activation. *J Immunol*, 1988; 140:2639–2644.
106. Kuhweide R, Van Damme J, Lorre K, Baroja ML, Tsudo M, Ceuppens JL: Accessory cell-derived helper signals in human T-cell activation with phytohemagglutinin: induction of interleukin 2-responsiveness by interleukin 6, and production of interleukin 2 by interleukin 1, *Cytokine* 1990; 2:45–54.
107. Simms PE, Ellis TM. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996; 3:301–304.
108. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3⁺ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. *Exp Gerontol*, 1999; 34:79–93.

109. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, 2002; 99:4087-4093.
110. Del Poeta G, Del Principe MI, Zucchetto A, Luciano F, Buccisano F, Rossi FM, Bruno A, Biagi A, Bulian P, Maurillo L, Neri B, Bomben R, Simotti C, Coletta AM, Dal Bo M, de Fabritiis P, Venditti A, Gattei V, Amadori S. CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study, *Haematologica*, 2012; 97:279–287.
111. Dimitriou H, Linardakis E, Martimianaki G, Stiakaki E, Perdikogianni CH. Properties and potential of bone marrow mesenchymal stromal cells from children with hematologic diseases. *Cytotherapy*, 2008, 10:125–133.
112. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells, *Bone*, 2003; 33:919–926.
113. Li C, Wu W. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy, *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6(1): 55.
114. Matur İ, Solmaz S. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar, *Arşiv*, 2011; 20:168.
115. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;740:1-61.

8. EKLER

EK-1. HASTA ONAM FORMU

KEMİK İLİĞİ NAKLİLİK TOPLANMASI ONAM FORMU	
<p>Yakınıma/kardeşıme/çocuğum.....'a mevcut hastalığı nedeniyle PERİFERİK KAN KÖK HÜCRE /KEMİK İLİĞİ NAKLİ gerekli olduğuDr.....tarafından anlatıldı.hastalığının şu an geçerli tedavi yöntemleri ile tedavi edilebilme şansının olmadığını veya çok düşük olduğunu; ancak periferik kan kök hücre /kemik iliği nakli ile sağlıklı yaşam şansının olabileceğini konusunda bilgi verildi. Bu amaçla, kök hücre kaynağı olarak benden/ yakınımdan aferez yöntemi ile periferik kan kök hücrelerinin/kemik iliği toplanacağı belirtildi. Toplama işlemi ve riskleri hakkında bilgi verildi.</p> <p>Doktorumla konuştuktan ve yukarıdaki bilgilerin anlatılmasından sonra yapılacak işlem ile ilgili soru sormak ve doktorumla sorularımı tartışmak için gerekli zamanım oldu ve sorularıma yeterli yanıt aldım. İşlem ile ilgili daha sonra aklıma takılacak herhangi bir konuda doktorum ile konuşabilme imkânına sahip olduğuma dair bilgi verildi.</p> <p>Bu bilgiler ışığı altında hiçbir baskı altında kalmadan bilincim açık olarak benden (veya yakınımdan) periferik kan kök hücre/kemik iliği toplanmasına izin veriyorum. Bu işlemlerin başarıyla tamamlanması için gerektiği kadar işlemin tekrarlanıp yeterli miktarda kan/ilik alınmasına ayrıca bu konudaki araştırmalar için de alınan kandan 5-10 ml' nin/ ilikten 1-3 ml kullanılmasına da izin veriyorum. Kök hücre transplantasyonu işlemini ilgilendiren hasta veya vericiye ait bilgilerin kayıt tutulmak üzere EBMT (Avrupa Kemik İliği Transplantasyon komitesi) veya benzeri kuruluşlara gönderilmesine izin veriyorum. Formda bulunan tüm boşluklar imzamdanda önce doldurulmuştur.</p>	
HASTANIN (ALICININ)	
Adı Soyadı : Tanısı :	Dosya no:
VERİCİNİN	
Adı Soyadı : Doğum tarihi :	Akrabalık derecesi:
HASTANIN ANNESİ/YAKINI Adı, soyadı : İmza:	HASTANIN BABASI/YAKINI Adı, soyadı: İmza:
Tarih:	Tarih:
Yukarıda adı yazılı hasta yakınına yapılacak işlemin gerekleri, uygulanması ve riskleri ile ilgili açıklamalar yapılmıştır ve hasta yakını tüm sorulara yeterli yanıt aldığını imzası ile onaylamıştır.	
TANIK Adı Soyadı: İmza:	BİLGİLENDİREN DOKTOR Adı Soyadı: İmza:
Tarih:	Tarih:
FORM NO: 214 İLK YAYIN TARİHİ: 14.04.2010 REV. NO: 01 REV. TARİHİ:03.11.2010	

EK-2. ETİK KURUL FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çocukluk Çağı Akut Miyeloid Lösemilerinde Kamik İliğinden Köken Alan Mezenkimal Stromal Hücrelerin Biyolojik ve İmmünolojik Özellikleri
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2014-062

DÜĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	13.10.2014	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	13.10.2014	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU	13.10.2014	01	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DÜĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SEGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" 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"/>					
	DiĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BELGELERİ	Karar No:2014-062	Tarih: 13.10.2014					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuruya dosyası ile ilgili belgeler araştırılması/çalışılması gerektiği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel salıncak bulunmadığına ilişkin etnik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmaları/çalışmaları için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Fatma DEMİREL

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Fatma DEMİREL	Çocuk Endokrinolojisi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Namık Yapar ÖZBEK	Çocuk Hematolojisi ve Onkolojisi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Can Naci KOCABAŞ	Çocuk Akciği ve İmmünolojisi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yavuz SANİSOĞLU	Biyoistatistik	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Meltem ÖZGÜNER	Histoloji ve Embriyoloji	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sema EMİR	Çocuk Onkolojisi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <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"/>	
Doç. Dr. Cahide YILMAZ	Çocuk Nörolojisi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <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"/>	
Doç. Dr. Sinan CANAN	Fizyoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	F <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. H. Tuğrul TIRYAKI	Çocuk Cerrahi	Ankara Çocuk Sağlığı ve Hast. Hem. Onk. E.A.H.	F <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"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Fatma DEMİREL
İmza:

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

EK-3. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: İlkey Pişkin
Doğum tarihi	: 01.01.1984
Doğum yeri	: İstanbul
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	: T.C. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı, Bilkent yolu 3. Km. Bilkent/ANKARA
Tel	: 0312 3241555
E-mail	: icorumluoglu@ybu.edu.tr
EĞİTİM	
Lise	: Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans	: T.C. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Kanser Biyolojisi Programı
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi düzeyde
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Histoloji & Embriyoloji Derneği (2014/--)	