

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ İLE
KARAKTERİZASYONU VE BLASTLARDA ENDOTEL KÖK
HÜCRE ORANININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Sinan KÜTÜK**

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER**

Yüksek Lisans Tezi

**KASIM 2019
KAYSERİ**

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ İLE
KARAKTERİZASYONU VE BLASTLARDA ENDOTEL KÖK
HÜCRE ORANININ ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Sinan KÜTÜK

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2018-8037 kodlu proje ile desteklenmiştir**

KASIM 2019
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

SİNAN KÜTÜK

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Akut miyeloid lösemilerin akım sitometre ile karakterizasyonu ve blastlarda endotel kök hücre oranının araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

SİNAN KÜTÜK

Danışman

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

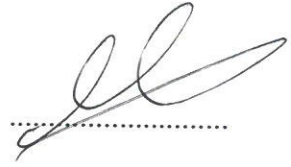
KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER danışmanlığında **Sinan KÜTÜK** tarafından hazırlanan “**Akut miyeloid lösemilerin akım sitometri ile karakterizasyonu ve blastlarda endotel kök hücre oranının araştırılması**” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **İmmünoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

JÜRİ İmza

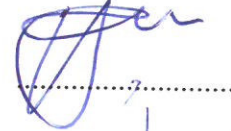
Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER
(Erciyes Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı)



Üye: Prof Dr Ali ÜNAL
(Erciyes Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı)



Üye: Prof Dr Bülent ESER
(Erciyes Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı)



Üye: Prof. Dr. İnsu YILMAZ
(Erciyes Üniversitesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı)



Üye: Dr Öğt Üyesi Mustafa NİSARİ
(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi)



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü yönetim Kurulunun/...../..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresi ve tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım aynı zamanda danışmanlığımı yapan, değerli hocam İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e,

Tez yazım süresince katkı ve önerileri için HÜSEYİN AVCILAR hocama ve Hematoloji Bilimdalının Öğretim Üyesi Hocalarıma,

Tez çalışmalarım süresince, desteğini esirgemeyen flow laboratuvarında beraber çalıştığım Biyolog HURİYE ÇELİKZENCİR, Biyolog Esra AKPINAR Biyolog RABİYA NAYIR'a ayrıca Aferez Ünitesi personellerine,

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu süreçte bana gösterdikleri sabırdan dolayı eşim NURAY KÜTÜK ve AİLEME sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ İLE
KARAKTERİZASYONU VE BLASTLARDA ENDOTEL KÖK HÜCRE**

ORANININ ARAŞTIRILMASI

SİNAN KÜTÜK

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ekim 2019

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

KISA ÖZET

Endotel kök hücre (EKH) akut myeloid lösemi (AML) hastalarında metastatik olma özelliği ile ilişkili bir prognostik markırdır. Çalışmamızda kemik iliği (Kİ) ve periferik kan örneğinden yapılan akım sitometrik immün-fenotiplendirme ile EKH ve AML blastik hücre ilişkisini araştırdık.

Bu amaçla kemik iliği örneğinde blast hücrelerin oranı > %50 den fazla olan, yeni tanı 24 erişkin AML hastası çalışmaya dâhil edildi. Ayrıca normal kemik iliği olarak blast olmayan 24 örnek kontrol örneği olarak seçildi. AML hasta örneklerinde blastik hücreler kapılanarak 1×10^6 blast sayımı yapıldı. Blastlar EKH belirteçleri olan CD31, CD133, C144, CD309, CD146 ile işaretlenerek ekspresyon düzeyleri ve hücre sayıları akım sitometri ile ölçüldü. Ayrıca blastlardaki lösemik kök hücre sayısına CD38-, CD34+ hücre sayıları ölçüldü.

Hasta grubunda CD146+, CD144+ EKH sayısı 65.0 (40.0-203.0) kontrol grubunda ise 10.5 (6.3-29.0) olarak bulundu ($p < 0.001$). Hasta grubunda CD309+ EKH sayısı 92.0 (60.0-187.0) kontrol grubunda ise 6.0 (3.0-10.0) olarak bulundu ($p < 0.001$). Hasta grubu CD34+, CD31+, CD146+ EKH sayısı 73.0 (47.0-153.0) iken kontrol grubunda 11.0 (6.3-30.0) olarak bulundu ($p < 0.001$). Hasta örneğinde CD38-, CD34+ lösemik kök hücre sayısı 610 (61,5-1550) bulundu. Bu değer AML blastların %0.06 sını lösemik kök hücrenin oluşturduğunu gösterdi.

Sonuç olarak çalışmamız ile AML kemik iliği blast örneklerinde %0.06 oranında lösemik kök hücre olduğu ve %0.009 EKH olduğunu anlaşıldı. Bu veriler ışığında AML örneklerinde prognoz izlemi mümkün olabilir.

Anahtar Kelimeler: CD34, CD133, AML, EKH

**CHARACTERIZATION OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA BY CURRENT
CYTOMETRY AND INVESTIGATION OF ENDOTHELOT STEM CELL
RATE IN BLASTS**

Sinan KÜTÜK

ErciyesUniversity, GraduateSchool of Health Sciences

Department of Immunology

Master of Science Thesis, Ekim 2019

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ABSTRACT

Endotelial stem cell (ESC) is a prognostic marker associated with metastasis in patients with acute myeloid leukemia (AML). In our study, we investigated the relationship between and ESC and AML blastic cell from bone marrow (BM) and peripheral blood sample by flow cytometric immunophenotyping.

For this purpose, 24 adult AML patients with a diagnosis of blast cells > 50% in the bone marrow sample were included in the study. In addition, 10 non-blast specimens were selected as normal bone marrow as control samples. 1×10^6 blast enumeration by flow cytometry were performed by counting blastic cells in AML patient samples. Blasts were labeled with ESC markers CD31, CD133, C144, CD309, CD146 and expression levels and cell numbers were measured by flow cytometry. In addition, CD38-, CD34 + cell counts were measured on the number of leukemic stem cells in blasts.

The number of CD146 +, CD144 + ESCs was 65.0 (40.0-203.0) in the patient group and 10.5 (6.3-29.0) in the control group ($p < 0.001$). The number of CD309 + ESCs was 92.0 (60.0-187.0) in the patient group and 6.0 (3.0-10.0) in the control group ($p < 0.001$). The number of CD34 +, CD31 +, CD146 + ESCs was 73.0 (47.0-153.0) in the patient group and 11.0 (6.3-30.0) in the control group ($p < 0.001$). In the patient sample, the number of CD38-, CD34 + leukemic stem cells was found to be 610 (61.5-1550). This value showed that leukemic stem cells accounted for 0.06% of AML blasts.

As a result, in our study, it was found that 0.06% leukemic stem cells and 0.009% ESCs were found in AML bone marrow blast samples. In the light of these data, prognosis monitoring may be possible in AML samples.

Keywords: CD34, CD133, AML, EKH

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Endotel Kök Hücre ve Akut Myeloid Lösemi	3
2.1.1. Endotel Kök Hücreler	3
2.1.2. Akut Myeloblastik Lösemi Tanımı.....	3
2.2. Endotel Kök Hücreler ve Kaynağı	6
2.2.1. Endotel Kök Hücrelerin Kemik İliğinden Mobilizasyonu	9
2.2.2. Vasküler Patolojilerde Endotel Kök Hücrelerin Yeri	11
2.2.3. Endotel Kök Hücre ve Kök Hücrelerin Genel özellikleri	13
2.3. Kök Hücre Çeşitleri.....	15
2.3.1. Bölünme, Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücre Gruplandırılması	15
2.3.2. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Gruplandırılması.....	16
2.3.4. Hematopoetik Kök Hücre (HKH).....	17
2.4.1 Osteoblastik Niş.....	19

2.4.2 Vasküler Niş,	19
2.5 Lösemik Kök Hücre.....	20
2.6 Endotel Kök Hücrelerin Yüzey Markırları	22
2.7. Blastik Hücre.....	25
2.8. Lösemi ve Tanımı.....	26
2.9. Akut Myeloblastik Lösemi Tanımı	27
2.9.1. AML Subtipleri ve İmmünofenotipleme.....	28
2.9.2 AML Sıklığı, İnsidansı, Risk Faktörleri.....	33
2.9.3 Morfoloji	35
2.10. Anjiogenez ve Hematopoetik Neoplazma.....	35
2.11. Akım Sitometri	36
2.11.1. Cihazın Temel Bileşenleri.....	37
2.11.2. Akım Sitometrinin En Çok Kullanıldığı Alanlar.....	41
2.11.3. Akım Sitometrinin İmmun Fenotiplemede Kullanımı.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Alet ve Ekipman.....	44
3.2. Plastik Sarf Malzemeleri.....	44
3.3. Kitler ve Kimyasal Maddeler	44
3.4. Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları.....	45
3.4.1. Endotel Hücrelerin Akım Sitometri ile Tanımlanması	45
3.4.2 Akım Sitometrinin Okuma ve Analiz İçin Hazırlanması.....	45
3.4.3. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları;.....	46
3.4.4. Hasta Örnekleri ve Kontrollerde Endotel Hücre Sayısının Akım Sitometri ile Hesaplanması	46
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	47

4. BULGULAR	48
4.1. Kontrol Grubunun Özellikleri	49
4.2. Kontrol Grubunda Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Ekspresyon Analiz ve Endotel Kök Hücre Miktarının Ölçülmesi.....	50
4.3. Akut Miyeloid Lösemilerin Akım Sitometre İle Karakterizasyonu	54
4.3.1. AML Hastaları ve Özellikleri	54
4.3.2. AML Hasta Örneklerinde Blastik Hücrelerin Akım Sitometri İle Karakterizasyonu.....	55
4.4. Hasta örneklerinde (AML Blastlarda) Lösemik Kök Hücreler (CD38-,CD34+ Hücre) ve CD133+ Ekspresyon Durumu.....	57
4.5. AML Blastlarda Endotel Kök Hücre Sayısının Hesaplanması	61
4.6. Hasta ve Kontrol Örneklerindeki Endotel Kök Hücre Sayısının Karşılaştırılması ..	66
4.7. Endotel Kök Hücre Sayılarının Blastlarda ve Kontrollerde Karşılaştırılması,	69
4.8. Kontrol Grubundaki Endotel Kök Hücrelerin Aralarındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi	69
4.9. Hasta Grubunda Endotel Kök Hücrelerin Aralarındaki Korelasyonun Araştırılması	71
4.10. Hasta Örneklerinde Lösemik Kök Hücre Sayısının Değerlendirilmesi (CD38-,CD34+ hücre).....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	73
6. KAYNAKLAR.....	77
EKLER	
ÖZ GEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
ASM	: Akım Sitometri
BMSC	: Kemik İliği Stromal Hücresi
CD	: Cluster of Differentiation
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
EKH	: Endotel Progenitör Hücreler
FAB	: Fransız-Amerikan-British
FITC	: Florescein İsotiyosiyanat
G-CSF	: Granülosit Koloni Stimülan Faktör
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Stimülan Faktör
GVH	: Graft Versus Host
GVHH	: Greft Versus Host Hastalığı
HKH	: Hemaopoetik Kök Hücre
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
KDR	:Kinaz İnsert Alan Reseptörü
Kİ	:Kemik İliği
KLL	:Kronik Lenfositik Lösemi
KML	:Kronik Miyeloid Lösemi
LKH	:Lösemik Kök Hücre
MDR	: Çoklu İlaç Direncinin
MDS	: Miyelodisplastik Sendromlar
MFI	: Mean Floresan İntensite
MPO	: Myeloperoksidaz

eNOS	:Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
NSE	: Nonspecific Esterase
PI	: Propidium Iodide
SDF-1	:Stromal Hücre Faktörü
TK	: Timidin Kinaz
VEGF	: Vasküler Endotel Growth Faktör
VEGFR2	:Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü 2
WHO	: World Health Organization

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Hematopoetik Kök Hücrelerin Kemik İliğinde Dağılımı (Erişkin).....	14
Tablo 4.1. Sağlıklı kontrol grubunun yaş ve cinsiyet göre dağılımı.....	51
Tablo 4.2. Kontrol grubunda akım sitometri ile analiz sonucu bir milyon hücre içerisindeki endotel kök hücre hücre sayıları.....	53
Tablo 4.3. Kontrol ek grup (kemik iliği) da bir milyon hücre içerisindeki endotel kök hücre sayıları.....	54
Tablo 4.4. Çalışmaya dahil olan AML hastaların yaş, cinsiyet ve yaşam durum listesi	55
Tablo 4.5. AML hasta örneklerinde blastik hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu.....	57
Tablo 4.6. Hasta örneklerinde blastlardaki bir milyon hücre içerisindeki CD34+,CD133+ hücreler ve lösemik kök hücre sayısı (CD38-,CD34+).....	58
Tablo 4.7. Blastik hücrelerde endotel kök hücre sayım sonuçları	63
Tablo 4.8. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması	70
Tablo 4.9. Kontrol Grubundaki Endotel Kök Hücrelerin Aralarındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi.....	71
Tablo 4.10 Hasta grubundaki endotel kök hücrelerin aralarındaki korelasyonun değerlendirilmesi	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Endotel hücrelerin yaşam süreçleri	8
Şekil 2.2. Endotel Progenitör Hücrelerin (EPH) kökeni ve farklılaşması..	9
Şekil 2.3. EKH'ler kemik iliğinden başlayarak fonksiyonlarını yerine getirecekleri bölgeye göç edene kadar birçok mediyatör ile etkileşime girerler...	12
Şekil 2.4. Kemik iliğinde hematopoetik ve endotel Kök Hücrelerin yerleşimi ve dolaşıma çıkışındaki yüzey belirteçleri.....	15
Şekil 2.5. Kök hücre sınıflandırması.	11
Şekil 2.6. Lösemik kök hücre oluşumu.....	21
Şekil 2.7. Normal ve Blastik hücre görüntüsü	26
Şekil 2.8. AML MO.....	30
Şekil 2.9. AML M1.....	30
Şekil 2.10. AML M2.....	31
Şekil 2.11. AML M3 Hipergranüler	31
Şekil 2.12. AML M3 Hipogranüler	31
Şekil 2.13. AML M4	32
Şekil 2.14. AML M5.....	32
Şekil 2.15. AML M6.....	33
Şekil 2.16. Akım Sitometri Erciyes Üniversitesi, Aferez ünitesi, Akım sitometri laboratuvarı, Beckman Coulter, Navios, 2019	37
Şekil 2.17. Akım sitometri cihazı temel bileşenleri	38
Şekil 2.18. Akış sisteminden hücrelerin tek tek geçişi ve lazerin hücreye odaklanması.....	39
Şekil 2.19. Akım sitometride FS,SS görüntüsü,.....	40
Şekil 2.20. Flow sitometride florokromla işaretlenmesi.....	41
Şekil 4.1. AML blastik hücrelerinde Endotel kök hücre sayımı iş akış şeması	50

Şekil 4.2. Endotel kök hücrelerin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi	52
Şekil 4.3. AML hasta örneğinde akım sitometri ile immün fenotiplendirme,	56
Şekil 4.4. CD45 Dim de yerleşik blastlardaki CD34+ ve CD133+ oranının hesaplanması ve CD38-,CD34+ hücre sayısının analiz yöntemi	59
Şekil 4.5. Blastik hücrelerde elde edilen CD34+ ve CD133+ hücre yüzdeleri korelasyon analizi.....	60
Şekil 4.6. Blastik hücrelerde (CD38-, CD34+), CD133+ ekspresyon durumu.....	61
Şekil 4.7. Blastik hücrelerde (CD38-,CD34+) ve CD34+ ekspresyonu	61
Şekil 4.8 Endotel kök hücrelerin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi.....	62
Şekil 4.9. Blast içerisindeki endotel kök hücrelerde (CD309+) ve (CD146+, CD144+) hücre hücre sayılarını karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.10 Blast içerisindeki endotel kök hücrelerde (CD31+,CD146+) ve (CD146+,CD144+) hücre sayılarını karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.11 Blast içerisindeki endotel kök hücrelerde (CD31+,CD146+),CD309+ hücre sayılarını karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.12. Hasta ve kontrol örneklerindeki endotel kök hücre (CD146+,CD144+hücre) sayısının karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.13. Hasta ve kontrol örneklerindeki endotel kök hücre (CD309+ hücre) sayısının karşılaştırılması	68
Şekil 4.14. Hasta ve kontrol örneklerindeki endotel kök hücre (CD31+,CD146+ hücre) sayısının karşılaştırılması	69
Şekil 4.15. Kontrol grubu EKH'in karşılaştırılması	71
Şekil 4.16. Hasta grubu EKH'in karşılaştırılması	72
Şekil 4.17. Hasta örneklerinde Lösemik kök hücre(CD38-,CD34+ hücre) sayısının görüntüsü	73

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akım sitometri ile immünofenotiplendirme, akut myeleoid lösemi (AML) tanısında, subtiplendirmesinde ve blast yüzdesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Endotel kök hücreler (EKH) vaskülarizasyonda görev olan hematopoetik kök hücre orjinli kök hücrelerdir. EKH'ler kemik iliğinde olgunlaşıp, dolaşıma çıkarak vasküler hasarın olduğu bölgelerde yoğunlaşıp hasarın tamir edilmesinde ve damarlaşmada merkezi rol alırlar. EKH'ler kemik iliğinden çıktıktan sonra hücre yüzey belirteçlerinde değişiklikler geçirerek olgun endotel hücrelere dönüşürler. EKH'in kanser doku metastazlarındaki rol aldığı bilinmektedir. Bu çalışmada AML tanısı alan hastalarda EKH'lerin AML blast hücreleri içerisindeki yüzdesi araştırılacaktır. Bu amaçla blast hücrelerin oranı %50 üzerinde olan ve kemik iliği (Kİ) yeterli düzeyde (5cc) olan yeni tanı almış 24 erişkin AML hastası çalışmaya dâhil edilecektir. Bu hastalardan alınan Kİ örneklerindeki blastik hücrelerde Endotel Kök Hücre belirteçleri olan CD31,CD133,CD144,CD309,CD146 kullanılarak ekspresyon ölçümü ve hücre sayımı akım sitometri ile yapılacaktır.

Dolaşımdaki endotel kök hücreyi seçebilmek için akım sitometride özgün paneller oluşturulacaktır. Hasta ve kontrollerden elde edilen örneklerde aynı gün içerisinde EKH sayısal ölçümü ve yüzey ekspresyon analizi (CD144, CD133, CD144, CD34, CD309, CD146, CD45 gibi ile anjiyogenez markırları ile hücre sayımı yapılacaktır. Her örnek, akım sitometride çalışılırken eşdeğer antikordardan oluşan izotipik kontroller kullanılacak ve akım sitometrik verilerde sağlıklı bir karşılaştırma yapılacaktır.

Son yıllarda, AML tanısında kemik iliği ve kandan yapılan immün-fenotiplendirmelerde endotel kök hücre ilişkisi dikkat çekici olarak izlenmektedir. EKH'in AML hastaların prognozunda ve takibinde önemli olduğu gösterilmiştir. Özellikle kemik iliği nakil sonrası graft versus host hastalığı (GVHD) gelişiminde rolü olabileceği düşünülmektedir. Yeni AML hastalarının tanı ve tedavi sürecinin daha sağlıklı izlenmesi için blastlar içerisindeki EKH yüzdesi önemlidir.

Bu araştırma ile EKH sayımının AML hastalarında bir takip parametresi olarak kullanılabilmesi için akım sitometri analiz panelleri oluşturulacaktır. Beraberinde toplumumuza uygun sağlıklı kontrol verileri oluşturulacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endotel Kök Hücre ve Akut Myeloid Lösemi

2.1.1. Endotel Kök Hücreler

Endotel kök hücreler olgun endotel hücrelerine farklılaşabilen ve neovaskülarizasyona katkıda bulunabilen yüksek proliferatif potansiyele sahip kök hücrelerin bir alt tipidir. EKH'ler çoğunlukla erişkinlerde kemik iliğinde bulunur, periferik kanda, ayrıca fetal karaciğerde ve göbek kordon kanında da bulunurlar.

Kan damarı oluşumu, normal doku büyümesi ve iyileşmesi ile tümörün ilerlemesi dâhil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynar. Vaskülojenez, kan damarlarının yeni oluşturulduğu işlemdir ve anjiyogenez, mevcut kan damarı ağının genişlemesi ve yeniden şekillenmesidir. Hem vaskülojenez hem de anjiyogenez, embriyonik gelişim sırasında ortaya çıkar. Yetişkin yaşamında, büyüyen, yaralı ve iskemik dokunun hayatta kalması için revaskülarizasyon esastır. Uzun yıllar boyunca, yeni vasküler ağların gelişmesinden sorumlu olan tek mekanizmanın anjiyogenez olduğuna inanılıyordu. Anjiyogenez süreci, çoklu endojen pro ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge ile düzenlenir. Bunlar arasında fibroblast büyüme faktörü ve VEGF familyası üyeleri bulunur. Bu faktörlerde ve dengelerinde değişiklik yapılması kanserin ilerlemesine neden olabilir; pro- ve antianjiyogenik faktörlerin dengesizliği “anjiyogenik bir geçiş” i aktive eder. Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, stromal hücreler ve parankimal hücreler de dâhil olmak üzere anjiyogenik anahtara katılımcılar olarak çeşitli hücre tipleri tanımlanmıştır (Asahara T, Murohara T, Sullivan A., et al., 1999).

2.1.2. Akut Myeloblastik Lösemi Tanımı

Akım sitometri uygulamaları ile nötrofil, monosit, eozinofil gibi myelo-monositik seride yer alan hücrelerin gösterilmesine ek olarak hücrelerin matürasyon düzeyinin niceleyici olarak gösterilebilmektedir. Bu durum AML tanısında sıklıkla tercih edilmesine neden

olmuştur. Akım sitometri ile blastik hücrelerin normal hücrelerden ayrı olarak kapılanması ve kantitatif olarak tanımlanması mümkündür. Bu test ile hücrelerin büyüklük, sitoplazmik granüller yapı ve yüzey antijenlerinin ekspresyon düzeyi konusunda veri elde edilir. Bu sayede yapılan immünfentiplendirme işlemi ile blast ve normal hücrelerin matürasyon düzeyi ayrı ayrı belirlenebilir. Bu veriler ışığında yapılan Fransız-Amerikan-British(FAB) sınıflandırmasında blastik hücre gruplarının özgül antijen ekspresyon düzeyleri ve morfolojik özelliklerine göre olmak üzere sekiz farklı AML subtipi(M0-7) ve bazı variant fenotipler oluşturulmuştur. Bu sınıflandırmada akım sitometrik analizlerden elde edilen birçok parametre kullanılabilir. Ancak en önemlilerinden bazıları, blastik hücrelerin; hücre yüzdesi, SSC düzeyi, CD45 ekspresyonu, MPO ekspresyonu, myeloid antijen ekspresyon düzeyi (CD13, CD16, CD15, CD117, CD34), monositik antijen ekspresyonları (CD14, CD33, HLA-DR), lenfoid aberan ekspresyonlardır (CD7,CD2). Bu parametrelerin birbiri ile karşılaştırmalı olarak analizi blastik hücrelerin karakteri hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu nedenlerle akım sitometri uygulamaları son yıllarda AML tanısında vazgeçilmez unsurlardan biri haline gelmiştir.

Akut lösemiler, hemotopoetik kök hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu gelişen ve lösemik hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma kusuru göstermeleri ile normal kan hücrelerinin yapılamaması, aşırı çoğalma kabiliyeti gösteren lösemik hücreleri kemik iliğini, periferik kanı ve takiben diğer dokuları istila etmesi ile karakterize kemik iliğinin malign bir grup hastalığıdır (Beksaç, 2004). Hipokrat'ın lösemi belirti ve bulgularından bahsettiği bildirilmekle birlikte, lösemnin klinik bulgularının yeterince tanımı ilk kez 1827 yılında Velpau tarafından yapılmıştır. Ancak tanısal gelişmeler 1839–1845 yılları arasında olmaya başlamıştır. 17. yüzyılda Malpighi'nin mikroskobun önemini fark etmesi, hematoloji tarihinde önemli bir dönüm noktasını oluşturmuştur. Yaşamda olan hastada lösemnin ilk fark edilmesi 1845'de Carigie ve Bennett, ardından 1846'da Virchow tarafından olmuştur. 1847'de Virchow "leukemia" kelimesi ile hastalığın adını koymuştur (Head DR.2004). İyi tariflenmiş ilk akut lösemi olgusu Friedreich'e (1857) atfedilmekle birlikte, 1889'da ilk "acute leukaemie" tanımını kullanan Ebstein olmuştur (Beksaç M. 2004). 18. yüzyıl'da Ehrlich tarafından boya tekniklerini tanımlaması ve lökositleri granüllerine göre ayırımının yapılmasını takiben Naegli tarafından ilk miyeloblast ve miyelosit tanımı yapılmıştır (Beksaç M, 2004 Head

DR, 2004). 1913 yılında bir Türk hematoloğu olan Hasan Reşad Sığındı ile birlikte Schilling-Torgau ilk monositer lösemiye tanımlamışlardır (Beksaç M, 2004).

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orijinal akut lösemi FAB sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemilerin morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır. Ancak bu sınıflama immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır (Öz kalemkaş F, 2005). Akut lösemilerde; hücre yüzey antijenlerinin, sitogenetiğin öneminin fark edilmesi ve FAB sınıflamasının yeterli olmadığı gözlenmesi ile akut lösemilerin immünolojik sınıflamaları olan MIC ve EGIL gündeme getirmiştir (Cancer Genet Cytogenet, 1988). European Group for the Immunological Classification of Leukemias, (EGIL) sınıflamasında AML'ler MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117 miyeloid belirteçlerin ekspresyonu düzeylerine göre tanımlanmıştır. Akut lenfoblastik lösemiler de B-I pro-B hücreli, B-II common B hücreli ve B-III pre-B hücreli olarak 3 alt gruba ayrılmıştır (Matsuo Y, Drexler HG, 1998). Akut lösemilerde sitogenetik ve moleküler genetik anormalliklerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem arz etmesi nedeni ile yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiştir.

2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) akut lösemiler de dâhil olmak üzere hemopoietik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflama yapmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmış, akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de sınıflamaya dâhil edilmiştir (Head DR, 2004). WHO sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Akut miyeloid lösemiler: a. Tekrarlayan sitogenetik anormalliklerle seyreden AML, b. Çoğul seri displazisi ile seyreden AML, c. Tedaviye ikincil AML ve MDS, d. Tanımlanan gruplara girmeyen AML olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Lenfoid lösemiler ise: a. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, b. Prekürsör T-lösemi/lenfoma, c. Burkitt lenfoma/lösemi şeklinde üç gruba ayrılmıştır. Üçüncü grup olarak belirsiz serili akut lösemiler göz önüne alınmış ve bu grupta: a. Bifenotipik akut lösemi b. Farklılaşmamış akut lösemiler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

ASM, AML'nin FAB sınıflamasına göre gruplanmasında sitokimyasal yöntemlerin önüne geçmiştir. Özellikle M0 ve M7 olgularında tanı için immunolojik yöntemler gereklidir.

2.2. Endotel Kök Hücreler ve Kaynağı

Endotel hücrelerin yaşam süreçleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Nekroz, kopma ve apoptoz yolu ile damar civarını açık bırakan endotel hücreleri ya mevcut hücrelerin bölünmesi yolu ile ya da dolaşımdaki öncül hücrelerin yapışması yolu ile bu alanı kapatırlar. Normal şartlarda kanda ml başına 1-3 tane damar duvarından ayrılmış endotel hücre bulunur ve bu ayrılış endotel hücrelerin yerlerine yenilerinin gelmesine ihtiyaç vardır. Aşırı endotel yapımı ihtiyacı belirlediğinde ise mevcut hücrelerin bölünme hızı yeterli olmaz ve dolaşımdan öncül hücreler çağrılır.

Embriyonik EKH'ler veya anjiyoblastlar, göç eden mezodermal hücrelerden kaynaklanır. EKH'ler, endotelyal soy hücrelere çoğalma, göç etme ve farklılaşma kapasitelerine sahiptir, ancak henüz karakteristik olgun endotel markerleri edinmemişlerdir. Mevcut kanıtlar, hematopoetik kök hücrelerin (HKH'ler) ve EKH'lerin ortak bir prekürsörden (hemanjiyoblast) elde edildiğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda endotel progenitör hücrelerin endotel hücre belirteç proteini olan VEGFR- 2'yi ve hematopoetik kök hücre yüzey belirteci olan CD34'ü taşıdıkları gösterilmiştir (Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, et al., 2000). Bunun yanında her ne kadar düşük seviyede olsa da endotel hücreleri CD34 belirteci taşıyabildikleri için araştırmacılar endotel kök hücrelerin endotel hücrelerden ayrımını yapabilmek amacıyla daha özgün bir yüzey belirteci tanımlamaya ihtiyaç duymuşlardır. Çünkü endotel yüzeyindeki belirleyiciler, endotel hücrelerin olgunlaşması ile ya da aktive olması ile değişebilmektedir (Şekil 2.4). Endotel hücrelerine özgü en sık kullanılan yüzey belirleyicilerinden birisi olan ve melanoma hücrelerinde tanımlanan CD146 (melanoma hücre-adhezyon molekülü) endotel hücrelerinden başka düz kas hücreleri, trofoblastlar, veya aktive T hücrelerinde bulunabilir. Diğer endotel yüzey belirleyicisi olan CD144 (vasküler endotelyal kadherin) ise fetal karaciğer hematopietik doku hücrelerinde de tespit edilebilmişlerdir (Şekil 2.2).

Endotel kök hücreleri tanımlamakta veya daha doğrusu endotel hücreye dönüşme kabiliyeti taşıyan hücreleri tanımlamakta karşılaşılan bir başka zorluk da bu hücrelerin

kemik iliğinden başka hangi dokulardan köken aldığını ve bunların özelliğini ortaya koymaktır. Yapılan araştırmalarda yağ dokusunda ve kalp dokusunda yer alan bazı hücrelerinde endotel hücrelere dönüşebildiğini göstermiştir. Ancak bu hücrelerin kemik iliğinden mi köken aldığını, yoksa embriyonik gelişimden kalan ve bu dokularda bulunan hücreler mi olduklarını henüz tam olarak bilinmemektedir. Bugünkü bilgilerimizle endotel kök hücre primitif mezodermal kök hücrelerden köken alan ve endotel hücrelere dönüşme özelliği olan hücrelerdir

Endotel kök hücreleri; Yetişkinlerde var olan vasküler endotel hücrelerinin progenitörleridir. Anjiyojenik koşullarda yapışık, endotel benzeri bir fenotipi varsayabilecek dolaşımdaki mononükleer kan hücreleridir.

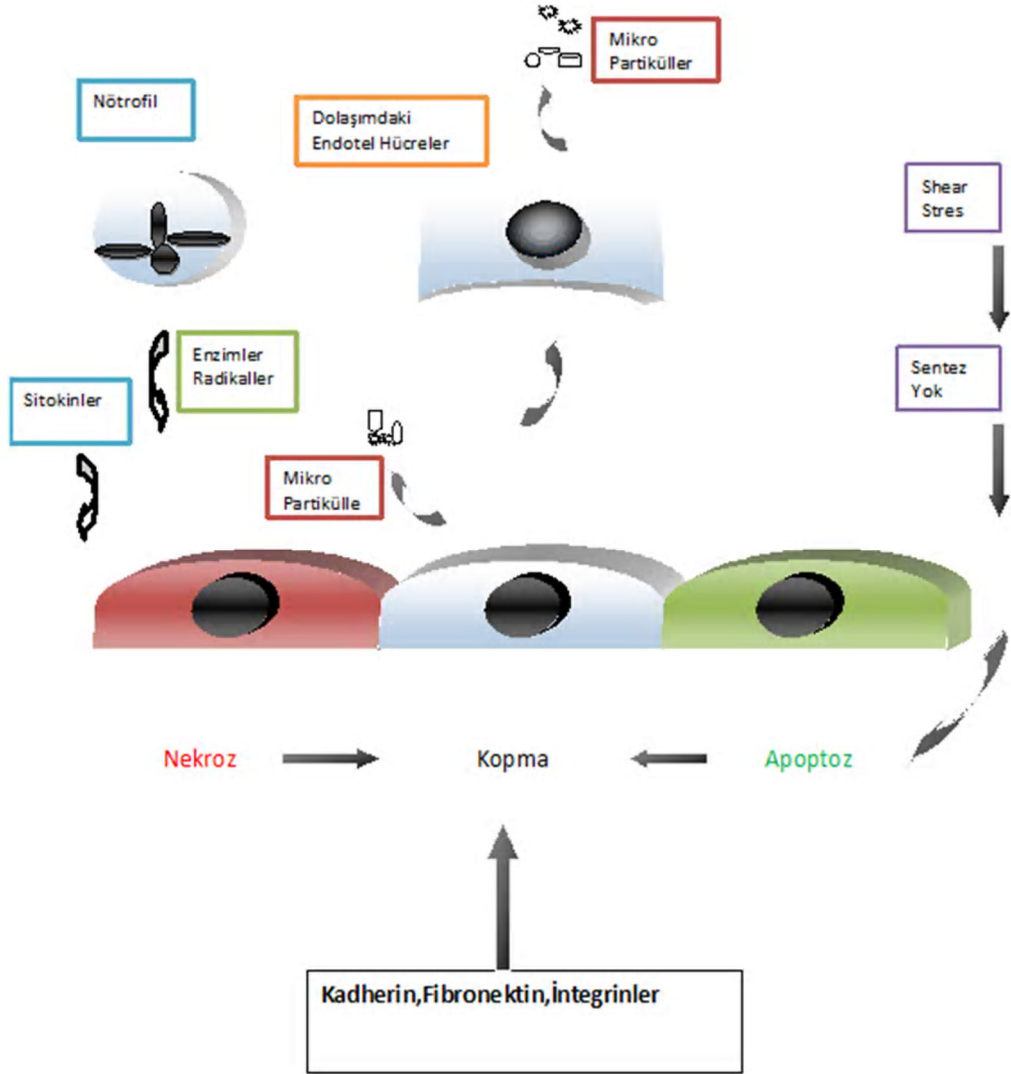
Normalde kemik iliğinin vasküler nişinde bulunur

Sağlıklı deneklerde dolaşımdaki endotel progenitörlerin bazal popülasyonu çok düşüktür, yani birkaç bin hücre / ml kan; Kemik iliğinde yerleşik endotel kök hücreleri, anjiyojenik sitokinler veya ilaçlar tarafından dolaşımda aktif olarak mobilize edilebilir.

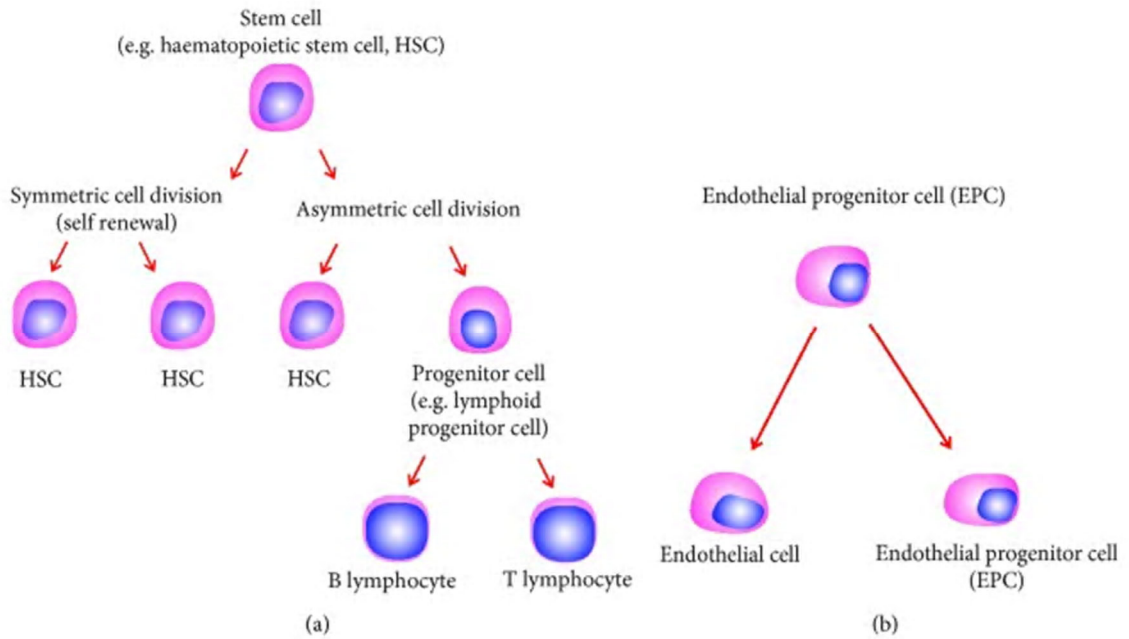
Embriyonik anjiyoblastların özelliklerine, yani, novo endotel kapiller tüplerini oluşturma kabiliyetine ve yüksek çoğalma kapasitesine sahiptir.

Rejenere doku veya tümörlerde özellikli olarak göçmek ve aktif anjiyogenez bölgelerine dahil etmek için ekstrasvasküler dokuya girebilir.

Yerinde alınan veya aşılınmış endotel kök hücreleri iskemik dokuların neovaskülarizasyonuna katkıda bulunur (Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al., 2003).



Şekil 2.1. Endotel hücrelerin yaşam süreçleri.



Şekil 2.2. Endotel Kök Hücrelerin (EKH) kökeni ve farklılaşması.

2.2.1. Endotel Kök Hücrelerin Kemik İliğinden Mobilizasyonu

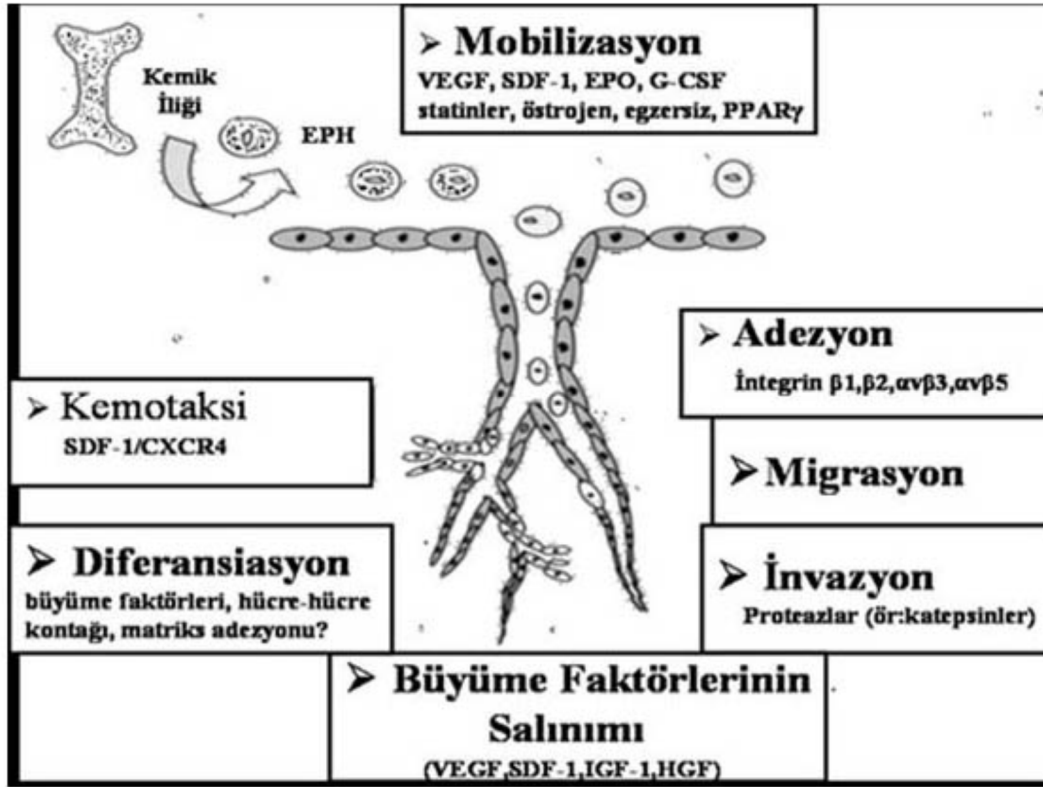
EKH'ler postnatal dönemde de var olan mononükleer hücrelerdir. Erişkin sağlıklı vasküler sistemde endotel hücrelerin bölünme hızları göreceli olarak düşüktür ($t_{1/2} \sim 3$ yıl) (Schwartz SM, Benditt EP., 1976). Normal koşullarda dolaşımda bulunan EKH'ler dolaşımdaki tüm hücrelerin $\sim 0,01\%$ 'ini oluşturmaktadır. Sağlıklı bir erişkinde EKH'ler belirli oranlarda endotel hücre bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur (Şekil 2.2).

EKH'ler kemik iliğinin vasküler bölgesinde depolanırlar ve sabit bir hızda dolaşıma geçerler. Aynı zamanda bu depo ihtiyaç halinde dolaşıma gerektiği kadar EKH sağlayan bir kaynak görevi de görür. EKH'lerin dolaşıma katılmalarını sağlayan birçok patolojik ve fizyolojik olay vardır. Bu olaylar sırasında ortaya çıkan aracı moleküller kemik iliğini uyararak EKH'leri dolaşıma doğru mobilize ederler. Bu olaylar içinde EKH dolaşıma katılmalarını arttıran en önemli sebep doku iskemisi ve doku hasarıdır. Bu patolojilerde hasarlı dokudan salınan VEGF-A, GM-CSF gibi mediyatörler kemik iliğinin sessiz bölgesinde yer alan EKH öncüllerini uyararak onların EKH hücrelere dönüşümünü hızlandırır (Tepper OM, et al., 2003). Kemik iliğinin sessiz bölgesinde oluşan EKH'ler çeşitli NO, matriks metalloproteinaz-9, sKitL mediyatör ve proteinlerin etkisiyle kemik iliğinin vasküler bölgesine geçerek burada çoğalırlar, dolaşıma katılmak

üzere hazır olurlar (Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. 2002) (Şekil 2.3). Bunların yanı sıra EKH'lerin kemik iliğinden mobilizasyonunda kemik iliği stromal hücrelerinde eksprese edilen endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesinin de etkili olduğu düşünülmektedir (Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al., 2003).

Akut vasküler travma olarak tanımlayabileceğimiz koroner arter operasyonu geçiren hastalarda yapılan araştırmada dolaşıma hızlı fakat geçici bir şekilde EKH akımı gözlenmiştir. Hasardan 6-12 saat sonra dolaşımda bulunan endotel kök hücre sayısı %50 artmış ve 2-3 gün içerisinde bazal düzeylerine dönmüştür. Benzer şekilde plazma VEGF düzeylerinin de yükselmesi VEGF'nin EKH'lerin mobilizasyonunda ve farklılaşmasında anahtar rol alır (Gill M, Dias S, Hattori K, et al., 2001).

Travmadan başka bölgesel iskeminin de EKH mobilizasyonunda güçlü bir endojen stimulatör olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Kemik iliğinden mobilize olan endotel kök hücreler hasarlı dokudan salınan (VEGF, SDF-1, MCP-1) gibi kemotaktik faktörler sayesinde hasarın olduğu bölgeye gelip burada hasarlı vasküler yapının tamirinde veya yeni vasküler oluşumunda görev alırlar (Ferrara N. 2000).

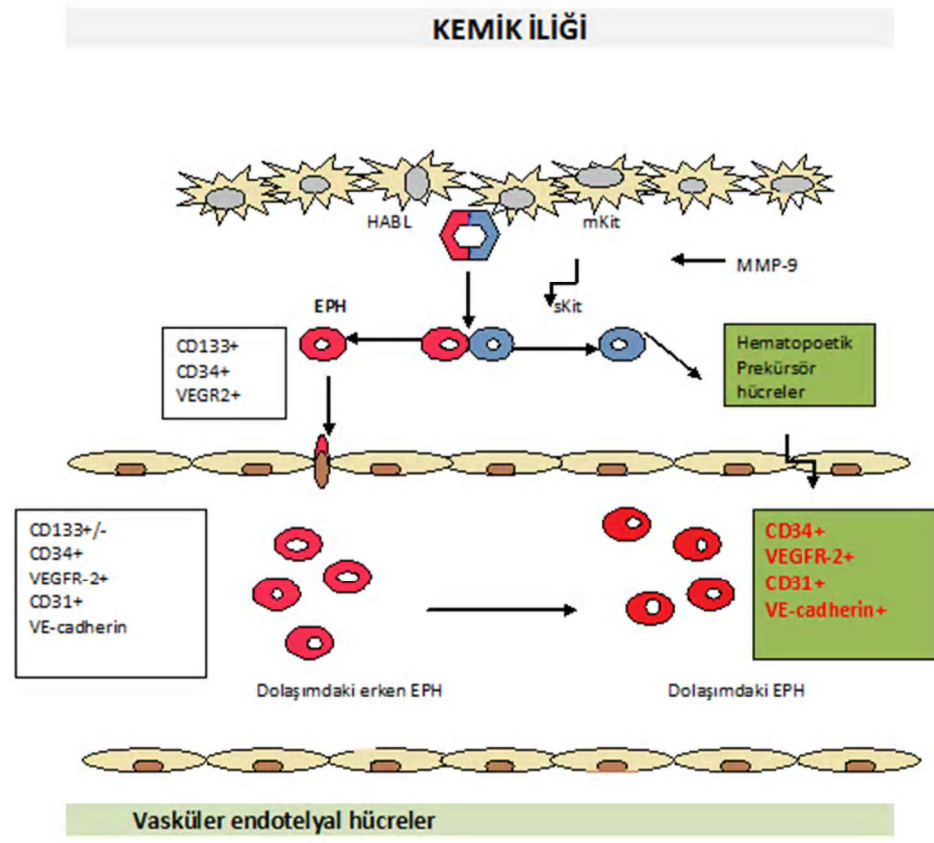


Şekil 2. 3 EKH'ler kemik iliğinden başlayarak fonksiyonlarını yerine getirecekleri bölgeye göç edene kadar birçok mediyatör ile etkileşime girerler. [C. Urbich, S. Dimmeler Endothelial Progenitor Cells *Circulation Research*. 2004;95:343.].

2.2.2. Vasküler Patolojilerde Endotel Kök Hücrelerin Yeri

Yeni damar oluşumunda çok önemli role sahip olan EKH'lerin damar hastalıklarında ne tip değişikliklere uğradığı da merak konusu olmuştur. EKH sayısında veya fonksiyonunda görülen değişiklikler birçok patolojiyle ilişkilendirilmiştir.

Tümöral oluşumlarda indüklenen yeni damar oluşumunda EKH'lerin rolü olduğu ispatlanmıştır. Asahara ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada tümörün periferinde bulunan vasküler ağda yoğun miktarlarda EKH'ler tesbit edilmiştir (Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al., 1999). Ayrıca tümör gelişiminde EKH'lerin önemli bir role sahip oldukları da gösterilmiştir (Lyden D, Hattori K, Dias S, et al., 2001). Bu bulgular araştırmacıları kanserde yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeye yöneltmiştir.



Şekil 2.4. Kemik iliğinde hematopoetik ve endotel kök hücrelerin yerleşimi ve dolaşıma çıkışındaki yüzey belirteçleri.

Dolaşımda bulunan EKH sayısının azlığı ile kardiyovasküler hastalık gelişimine yol açabilecek endotel tamir kapasitesinin düşüklüğü arasında ilişki bulunmuştur (Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al., 2003). Bir başka araştırmada koroner arter hastalarında EKH sayısının azaldığı ve göç etme kapasitesinin bozulduğu gösterilmiştir. EKH'lerde görülen bu patolojik değişikliklerin kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkili olabileceği de düşünülmektedir (Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al., 2001). Koroner arter hastalarında gözlenen bu değişikliklerin benzerlerini tip II diyabetli hastalarda da gözlemlemek mümkündür (Teper OM, Galiano RD, Capla JM, et al., 2002).

Yapılan araştırmalarla eritropoetin ve östrojenin endotel progenitör hücre mobilizasyonuna yol açtığı bunun yanında statinlerin de endotel kök hücre çoğalmasında ve göç etme kabiliyetini arttırdığı gözlemlenmiştir (Llevadot J et al., 2001). Tüm bunlara ek olarak yaşlanmayla birlikte endotel kök hücre sayısında ve fonksiyonlarında azalma birçok kez kanıtlanmıştır (Edelberg JM et al., 2002).

2.2.3. Endotel Kök Hücre ve Kök Hücrelerin Genel özellikleri

Tüm insanlar sadece bir hücre olarak başlar. Bu hücreye zigot veya döllenmiş yumurta denir. Zigot mitoz olarak bilinen hücre bölünmesine uğrar ve iki özdeş hücre oluşur. Bu hücreler totipotenttir ve yeni bir organizmaya dönüşme potansiyeline sahiptirler.

Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonel hücrelere totipotent hücreler denir. Totipotent hücreler mitoz sürecini tekrar eder, döllenmeden yaklaşık beş gün sonra hücre kümesi merkezde kavitasyona başlar ve blastosist üretilir. Blastosist yaklaşık 150 hücreli bir küredir. Dış tabakası trophoblast (sonunda plasentayı oluşturur), sıvı dolu bir boşluk - blastocoel ve iç kısımdaki hücre kümesi iç hücre kümesidir. Bu orta aşamada zigot ile fetüs arasındaki organizmaya embriyo ve iç hücre kümesindeki hücrelere embriyonik kök hücreler (EH) denir. Bu hücreler pluripotenttir ve insanlarda yaklaşık 220 farklı hücre tipinde üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) yol açabilir. Totipotent ve pluripotent hücreler arasındaki ana fark, totipotent hücrelerin hem plasenta hem de embriyoya yol açabileceğidir (Kaufman Ds et al., 2001).

Embriyo büyüdükçe bu pluripotent ESC'ler daha uzmanlaşmış, çok uçlu kök hücreler halinde gelişir. Çok kutuplu kök hücreler de uzmanlaşmamış hücrelerdir ve tüm kök hücrelerin aynı temel özelliklerine sahiptir. Uzun süre kendini yenilemek, özel amaç ve fonksiyonlarla özel hücrelere (terminal olarak farklılaşmış hücreler) gelişme yeteneğidir. Bununla birlikte, pluripotent hücrelerin aksine, multipotent hücreler daha sınırlı proliferatif ve farklılaşma potansiyeli ile karakterize edilir. Genellikle sadece orijinal doku ile aynı soydan hücre tipleri oluşturabilirler (Berfoot J. 2005).

Erişkin kök hücre yer aldığı dokunun hücre tiplerini üretmektedir. Örneğin kemik iliğindeki bir hematopoetik kök hücre eritrosit, lökosit ve trombosit gibi pek çok değişik kan hücresine kaynaklık etmektedir. Biraz daha özelleşmiş bu hücrelere multipotent hücreler adı verilmektedir. Sadece tanımlanan hücre tipine dönüşebilen hücreler de öncül (progenitor veya prekursor) hücreler olarak adlandırılmaktadır (şekil 2.5).

Kök hücreler geleneksel olarak üç özelliğe dayanarak karakterize edilmiştir:

- Kendi kendini yenileyebilirlik,
- Klonojenite,

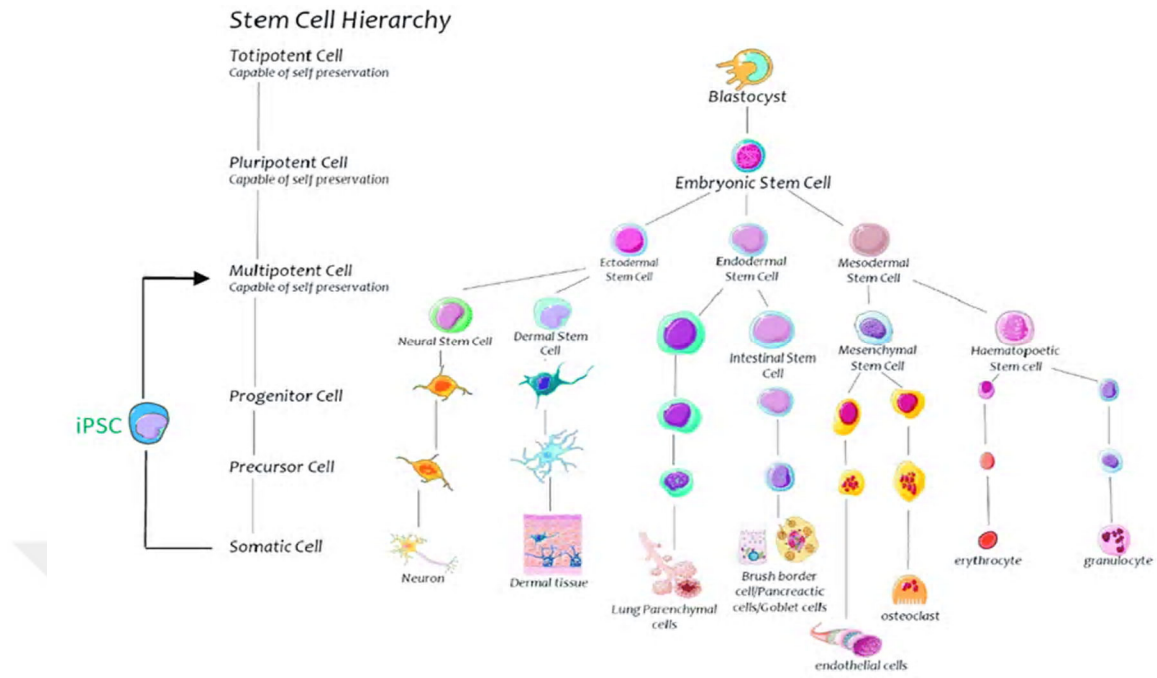
- Farklılaşma kapasitesi.

Progenitör hücrelerin kendi kendini yenileyebilmesi yetersizdir. EKH'ler benzersizdir, çünkü progenitörlerden farklıdır. Ancak kendi kendini yenileyebilirlik, klonojenlik ve farklılaşma kapasitesinin üçlüsüne sahip kök hücrelere benzerler.

Tablo 2.1. Kemik iliğinde hematopoetik seriye ait hücrelerin oransal dağılımı (Erişkin) (Dorothy E et al., 2004.)

Tablo 2.1. Hematopoetik Hücrelerin Kemik İliğinde Dağılımı (Erişkin)

Hücre	Kemik iliği
	%
Kök hücreler	1
Megakaryosit	1
Monosit	2
Dendritik hücreler	2
Lenfositler	15
Plazma hücreleri	1
Myeloid öncüleri	4
Granulositler	50-70
Eritrosit öncüleri	2
Eritrositler	10-20



Şekil 2.5. Kök hücre sınıflandırması (Dorothy E et al. 2004).

2.3. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler; aktif telomeraz enzim aktivitesi sayesinde uzun süre bölünebilen hücrelerdir. Diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan, en az bir benzer hücre oluşturabilme özelliğindedirler. Uygun sinyaller aldıklarında bir veya birden fazla hücre serisine ayrışabilirler ve işlevsel olarak bir dokuyu yeniden yapılandırabilirler (İnan, S.Özbilgin, 2009). Kök hücreler; bölünme, farklılaşma özellikleri ve kaynaklarına göre olmak üzere temel olarak iki farklı şekilde gruplandırılabilir.

2.3.1. Bölünme, Farklılaşma Özelliklerine Göre Kök Hücre Gruplandırılması

Kök hücreler bölünme farklılaşma özelliklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere 5 grupta toplanırlar.

Totipotent kök hücreler; oosit ve sperm birleştikten sonra zigot oluşur. Gelişimin dördüncü gününe kadar olan blastomerlerin her biri bir organizmayı tamamıyla yapacak özelliğe sahiptir. Totipotent hücreler organizmayı oluşturan özelleşmiş herhangi bir hücreye dönüşebilirler (Kansu, E. 2005). Erken embriyo ve zigot döneminde olan sekiz hücreye kadar olan blastomerler totipotent özelliğindedir (Karaşahin, T. 2012). Bir tek totipoten kök hücre 200 civarında somatik hücre özelliği olan karışık bir organizma oluşturma özelliğindedir (Yılmaz, O., Uçar, M. 2006).

Pluripotent kök hücreler; döllenme olduktan 4-5 gün sonra oluşan blastosiste ait hücrelere değişime başlayarak iki farklı seriye dönüşürler. Dış tabakada trofoektodermeye farklılaşır ve plasentayı oluşturur. İç kısımdaki hücreler ise embriyoyu oluşturur. İnsan embriyonik hücreleri dıştaki trofoektodermi kaldırarak embriyoyu oluşturacak olan iç kısımdaki hücre topluluğu elde edilir. Hücreler trofoektoderm kaldırılarak embriyoyu yapacak olan içteki hücre topluluğundan elde edilir. Bütün vücut hücrelerinin köken aldığı her üç germ yaprağı (mezoderm, endoderm, ektoderm) hücrelerine farklılaşabilen hücrelerdir. Fakat trofoblastları oluşturamaz (İnan, S.Özbilgin, 2009).

Multipotent kök hücreler; sınırlı sayıda hücreye dönüşebilme yeteneğine sahip olan kök hücrelerdir. Örnek olarak ise kordon kanından elde edilen kök hücreler uygun uyaranlarla nöronlara, kas hücrelerine diğer hücrelere dönüşebilirler (İnan, S.Özbilgin, 2009). Destek dokuların oluşturan hücreler mezenkimal yani multipotent kök hücre kaynaklıdır (Yılmaz, O. Uçar, M. 2006).

Oligopotent kök hücreler ise progenitör hücrelerin birkaç hücre şekline dönüşen hücre grubudur. Örnek olarak ise vasküler kök hücreler, miyeloid ve lenfoid hücrelerdir. Vasküler kök hücreler gerektiğinde düz kas hücresi gerektiğinde ise endotel kök hücreye dönüşme potansiyeline sahiptir (Smith, A. 2006).

Unipotent kök hücreler; sadece tek tip hücre tipine dönüşme potansiyeline sahiptir. Öncü hücrelere en iyi örnek ise hepatositler veya insan deri hücreleri sayılır. Öncü hücreler beyin ve karaciğer gibi organlarda, organ fonksiyon devamını ve organın bütünlüğünü sağlamak için ölen hücrenin yerini doldururlar (Beksaç, M. 2010).

2.3.2. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Gruplandırılması

Kaynaklarına göre kök hücreler iki grup altında toplanırlar bunlar; embriyonik ve embriyonik olmayan (yetişkin) kök hücrelerdir (Davila, J.C, et al., 2004). Embriyonik gelişimin erken evrelerinde blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir (Davila, J.C, et al ., 2004). Embriyonik kök hücreden elde edilen hücre kümeleri embriyonik cisimcikler olarak adlandırılmaktadır. Bunlar plasenta hariç olmak üzere ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir (Bongso, A.,Lee, E.H. 2005). Embriyonik kök hücreler sınırsız olarak kendi kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler, tüm fetal dokulara, erişkin kök hücrelerine ve bunların daha farklılaşmış progenitörlerine

farklılaşabilir (Bongso, A.,Lee, E.H. 2005). Embriyonik olmayan KH; bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendini yenileyebilme ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (Maynard, S., et al ., 2008). Embriyonik olmayan KH'lerin (dokuya özgü kök hücrelerin) yaşayan organizmadaki esas görevleri, içinde buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun bütünlüğünü sağlamaktır (Zur Nieden., et al ., 2001). Yapılan araştırmalarda erişkin kök hücrelerden pluripoten kök hücre karakteri gösterir (Rohwedel, J.,et al., 2001). En iyi bilinen bu hücrelere örnek ise hematopoetik kök hücrelerdir. Bunlar karaciğer, gastrointestinal sistem, deri, kan damarları gibi bölümlerde buldukları belirlenmiştir (Vishwakarma, A., et al., 2014). Hematopoetik hücreler yıkıma uğramış dokunun yeniden onarımından ve doku oluşumundan sorumludur (Blau, H.M., et al., 2001).

2.3.3. Kemik İliği Yapısı ve Hücreleri,

Uzun ve aksiyal kemiklerin merkezindeki boşluklarda yer alır ve trabeküler kemikteki vasküler sinüslerin çevrelediği adipoz hücreleri ile hematopoetik 5 doku adalarını içerir (Travlos, G.S. 2006). Kemik iliği mikro çevresinde kemik iliği incelendiğinde, hematopietik elemanlar, endotel öncü hücreleri mezenkimal hücreler düz kas ile iskelet kas hücreleri gibi *in vivo* osteoblasta, adipoz ve kondroblast dokulara farklılaşabilir (Majumdar, M.K., et al., 1998). Kemik iliği kök hücrelerinden beyin ve kas gibi diğer organlardan izole edilen hücre tipinin kültüre edilebileceği gösterilmiştir. Bu hücreler hematopoetik ve mezenkimal kök hücreleri olmak üzere iki grup kök hücreden oluşmaktadır (Wu, Y. et al., 2007). Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler stromal hücrelerle çevrili halde ve trabeküler bölgede bulunur, olgunlaştıklarında vasküler sisteme geçer; mezenkimal kök hücreler de kemik boşluğunda yer alır ve kondrosit, osteoblast, fibroblast, adiposit gibi stromal hücreleri oluştururlar (Muguruma, Y. et al., 2006).

2.3.4. Hematopoetik Kök Hücre (HKH)

HKH'ler fenotipik ve fonksiyonel seviyede en iyi tanımlanan erişkin kök hücre grubudur. Kendini yenileme ve bütün kan hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip farklılaşmamış, primitif hücreler olarak tanımlanmaktadır (Kiel, M.J. et al., 2005). Hematopoetik kök hücreler (HKH'ler), her tür olgun kan hücresine yol açan, kendini

yenileyebilen, çok noktalı progenitörlerdir (Erden, S. 2014). Kök hücreler, progenitör ve farklılaşmış hücrelerden oluşan hematopoetik sistem, günde 2×10^{11} ve ortalama bir insan hayatı boyunca 5×10^{15} 'den fazla eritrosit üretmektedir. Hematopoetik kök hücreleri kan hücrelerinden farklı olarak hepatositler, kardiyak miyositler, düz kas hücreleri gibi hücrelere de farklılaşabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Lagasse, E. et al., 2000). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise hematopoetik kök hücrelerdeki farklılaşmanın sadece hücre füzyonundan köken aldığı görülmüştür (Balsam, L.B. et al., 2004). Kök hücreler ilk önce embriyonik gelişim sırasında embriyonik ve ekstra embriyonik kan damarlarıyla yakın ilişki içinde ortaya çıkar, daha sonra plasenta, fetal karaciğer, dalakta ve daha sonra kemik iliğinde hematopoez görülür. Kemik iliği erişkin hematopoezinin ana bölgesidir, ancak HKH'ler ayrıca hematopoetik stres dönemlerinde dalak ve karaciğerde hematopoez yapabilir (Smith, J.N. et al., 2013). Kök hücrelerin göçünü, sessizliğini ve farklılaşmasını düzenleyen gibi süreçler için nişler önemlidirler. Nişlerde kemik iliğine özgül hücreler, stromal hücreler ve hücre-dışı matriks bileşenleri ile hematopoetik kök hücreler arasındaki bazı moleküller, faktörler sinyaller aracılığıyla gerçekleşen yüksek düzey etkileşimler hücre fonksiyonlarını ve karakteristiklerini düzenleyerek erişkin hematopoezinin dengede kalmasına neden olur. Bu süreçteki mekanizmalardan biri asimetrik ve simetrik hücre bölünmesi arasındaki dengenin sağlanmasıdır. Simetrik hücre bölünmesi, kök hücrenin benzer iki hücreye bölünmesi ve bu hücrelerin nişte kalması, asimetrik hücre bölünmesi ise kök hücre bölünmesiyle meydana gelen hücrelerden birinin nişte kalırken, diğerinin yeni hücreler oluşturmak üzere nişten ayrılmasıdır (Watt, F.M. Hogan, B.L. 2000). Kemik iliğinde osteoblastik (endotel) niş ve vasküler (endotelial) niş olmak üzere iki ayrı niş bulunmaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında, HKH'ler osteoblastik veya vasküler niş içinde bulunur. Osteoblastik niş, HKH bakımı için sakin bir mikro ortam sağlayabilir. Buna karşılık, vasküler niş mobilizasyon veya homing sırasında HKH transendotelial göçünü kolaylaştırır. HKH proliferasyonunu ve daha fazla farklılaşmasını destekleyebilir. HKH'lerin vasküler nişe alınması işlemi, endotel kaynaklı FGF-4 ve SDF-1'e bağlı olabilir. Hücreler osteoblastik nişten vasküler nişe doğru ilerledikçe daha yüksek FGF-4 ve oksijen konsantrasyon gradyanları içi alımda rol oynayabilir, HSC / HPC'lerin çoğalması ve farklılaşması. Trombositopeni gibi stres altında, SDF-1 ve VEGF, membranla ilişkili Kit ligandını çözünür Kit ligandına (sKitL) dönüştüren ve sırayla

HKH'lerin hücre döngüsüne girişini, vasküler niş mobilizasyonunu ve farklılaşmasını teşvik eden MMP-9'u aktive eder (Majumdar, M.K. et al.,1998).

2.4.1 Osteoblastik Niş

Uzun kemiklerin trabeküler alanında kemik ve kemik iliğini birbirinden ayıran endosteum, kemiğin medüller aktivitesine bakan kısım üzerinde osteojenik özellikteki tek sıralı hücreleri bulundurur. Hematopoetik kök hücreler, kemik oluşumunda rol alan osteoblastlar ve kemik rezorpsiyonunu sağlayan osteoklastlar bu kısımdadırlar. Uzun vadeli ve kısa vadeli olmak üzere 2 HKH sınıflandırması vardır. Uzun vadeli HKH'ler aylarca ve hatta ömür boyu hematopoezise katkıda bulunabilirler. Kısa vadeli HKH'ler birkaç hafta ile sınırlı bir hematopoezis kabiliyetine sahiptir. Osteoblastik hücrelerde, 2 farklı genetik yaklaşımla elde edilen artışın, stroma kültürlerinin erken hematopoezi destekleme kabiliyetinin artmasıyla, in vivo HKH'lerin uzun süreli hematopoezinde bir artış ve yeni hematopoetik nişlerin oluşmasıyla ilişkili olduğunu açıkça göstermiştir (Visnjic, D. et al., 2004). Transgenik farelerle yapılmış çalışmalarda osteoblastların kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin düzenlenmesindeki fonksiyonel önemi ve endosteumda kök hücre ile osteoblastların etkileşim içinde olduğu görülmüş; fakat hematopoezin devam ettiği karaciğer, dalak gibi osteoblastın bulunmadığı ekstramedüller bölgelerin varlığı nedeniyle tüm hematopoetik kök hücrelerin osteoblastlarla ilişkili değildir (Kiel, M.J. et al., 2005).

2.4.2 Vasküler Niş,

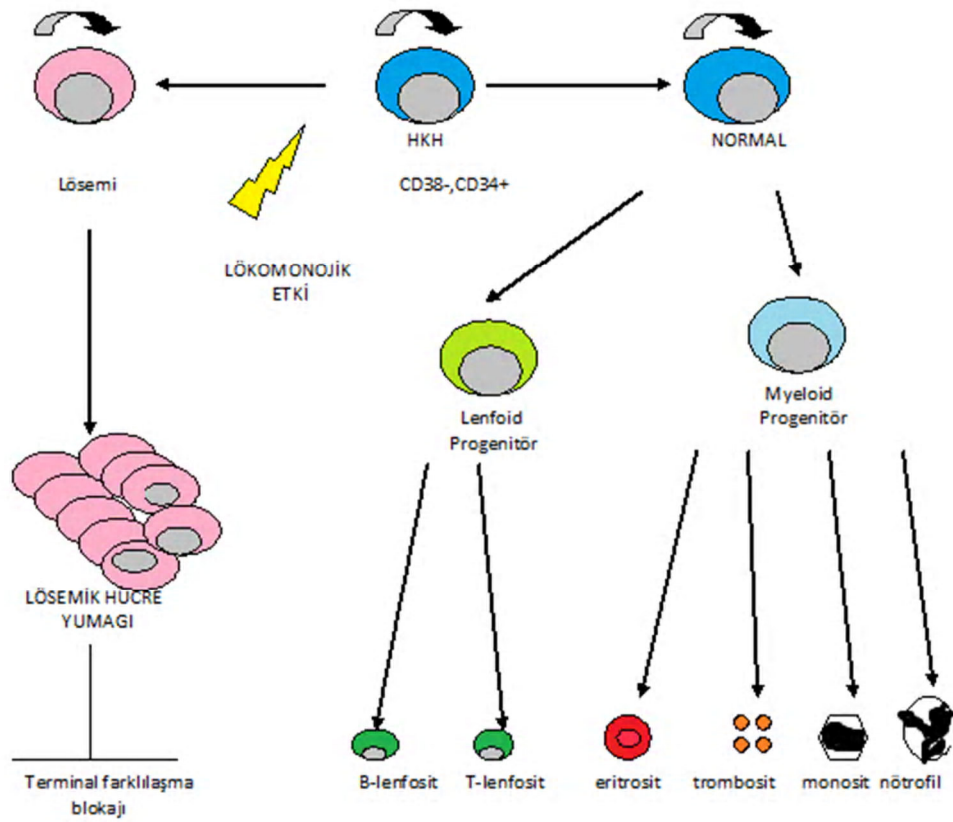
Vasküler niş bilinen osteoblastik niş ile birlikte alternatif bir HKH nişinin bir parçası olarak hareket etme potansiyeline sahip olduğu, osteoblastik nişin sakin bir mikro-ortam sağladığı, vasküler nişin proliferasyon ve daha fazla farklılaşmayı desteklediği önceden önerilen bir modeli destekleme potansiyeline sahiptir. Hematopoez ve vaskülarizasyon gelişim sırasında eş zamanlı olarak ortaya çıkar. Aslında HKH 'ler ve endotel hücreleri, embriyonik aşamadaki aynı progenitör hücrelerden (hemanjiyoblastlar olarak adlandırılır) türetilir, yolk sarısı kesesi, aort-gonad-mesonephros, plasenta, fetal karaciğer, dalakta meydana gelen hematopoesisin oluşumuyla yakından ilgilidir (Li, Z.,Li, L. 2006). Osteoblastik nişte aktif durumda olmayan HKH vasküler nişteki endotel hücrelerle birlikte çeşitli kan hücrelerine dönüşürler. Endotel hücreler ve hematopoetik kök hücrelerde ortak pozitif CD31+,CD34,CD133 hücreler arasındaki reseptör ligant

bağlantısının olduğunun göstergesidir. Hematopoetik ve endotel kök hücreler kemik iliği mikro çerçevesinde bol miktarda bulunurlar (Suda, T. et al., 2005)

Vasküler niş transendotel göçte HHK'lere hem eve dönüşte hem de mobilizasyon sırasında yardımcı olur. Vasküler niş dalakta olduğu gibi kemik iliği medüller boşluğunun dışında bulunan hücrelere atanır. Bu hücreler, kemik iliği nişi, baskı iliği baskılaması gibi stres altındayken bunun yerini alır. Ekstramedüller hematopoezi ile birlikte görülen splenomegali, hem insanlarda hem de hematopoetik yetmezliği olan genetik olarak mutant farelerde yaygın bir fenomendir. Bu gözlemlere dayanarak, endotel hücrelerinin, HKH genişlemesini desteklemek ve kemik iliği stres altındayken hematopoez için çok sayıda neslin üretilmesi için “yedek” bir niş olarak işlev görebilir (Salter, A.B. et al., 2009).

2.5 Lösemik Kök Hücre

Lösemi, kök hücrelerden oluşan progenitör hücrelerde veya hematopoetik kök hücrelerde ortaya çıkan mutasyonların sebep olduğu yapısal farklılaşma oluşması ile görülen bir hastalıktır. Birçok lösemi türünde olduğu gibi birbirini tamamlayan mutasyonlar lösemiye sebep olduğu gibi Kronik Miyeloid Lösemide (KML) olduğu gibi tek bir mutasyonda (“Philadelphia”kromozomu) lösemiye sebep olur (Reya T, et al., 2001).



Şekil 2.6. Lösemik kök hücre oluşumu

Lapidot ve ark. AML'li hastalarda yaptığı araştırmada LKH için ilk tanımlamayı yapmıştır. Bağışıklık sistemi baskılanan NOD/SCID farelere insan lösemik kök hücresi aktararak lösemi oluşturulması ile LKH hakkındaki veriler günden güne artış göstermektedir.

Fareler insan AML vakalarında görülen kimerik genler (MOZ-TIF2, NUP98- HOXA9) viral yolla verilip farelerde belli mutasyonları olan özgün lösemi tablosu oluşturulmuştur. Bonnet ve Dick adlı araştırmacılar ise LKH'nin CD34+CD38- yüzey markerlarına sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. LSH nadirdir, fakat bu hücreler lösemi oluştururlar. HKH ile LKH arasında hücre yüzey belirteçleri, apoptotik mekanizma ve kendisini yenileme yönünden farklılıklara sahiptirler (Bonnet D, Dick JE. 1997).

Niş içerisinde yerleşmiş ve uyku halinde olan kök hücreler mutasyona karşı korunan hücrelerdir. Gerekli durumlarda hızla çoğalma evrelerine girerler. Bu evre mutasyonun

en çok arttığı dönemdir. Hızla çoğalma evresinde ortamda pH değişikliği veya oksijen azlığı gibi istenmeyen olaylar mutasyon olasılığını artırır. Bu evrede ortaya çıkabilecek en küçük bir sorun önemli bir hastalığa sebep olabilir. Bu sebeple HKH'lerin olgun kan hücrelerine dönüşmesi çok iyi kontrol edilen bir durumdur. Çevresel faktörler veya metabolik nedenler hücre farklılaşmasını, çoğalmasını kontrol eden genler ve gen kontrol mekanizmalarındaki ortaya çıkan her mutasyon kansere sebep olabilir. Normal şartlarda normal hücrede bir sorun veya mutasyon oluşması ile hücre programlı hücre ölümüne (apoptoz) yönelir. Hücre ölümü için önemli ilk mekanizma olan kaspaz enzim sistemi aktif duruma gelir. Hücre bu yolla kendisini programlı olarak bilinçli bir hücre ölümüne yönelir. Hücrenin bu aşamada programlı hücre ölümünü yapamaması nedeniyle genellikle kanser oluşum mekanizmalarını aktif hale getirir. Apoptoza giremeyen hücre istenmeyen yönde ayrışır, ölümsüzleşir ve malign şekle döner (Patıroğlu T, Karakukcu M. 2009).

2.6 Endotel Kök Hücrelerin Yüzey Markırları

Endotel hücrelerde CD31, CD34, CD45, CD146, CD309, CD133, CD144, başlıca yüzey belirteçleri bulunur.

CD34: Kök hücre markırıdır. 34 antijeni, iki farklı ekstrasellüser domein ile yaklaşık 110 kDa'lık bir monomerik transmembran fosfo glikoproteindir. Yaklaşık 110 amino asitlik zar proksimal alanı, muhtemelen bir küresel konformasyon benimsemektedir. Yaklaşık 104 amino asitten oluşan NH₂-terminal alanı, hem N-bağlı glikanlar hem de sialile O-bağlı karbonhidratlar ile ağır bir şekilde glikozile edilir ve muhtemelen müsin benzeri glikoproteinlerin tipik bir genişletilmiş çubuk benzeri yapısını sergiler. CD34 antijeni, tüm soyların hematopoetik progenitör hücrelerinde, hem de en ilkel pluripotential kök hücrelerde eksprese edilir ve nesiller tarafından belirlenen progenitörler farklılaştıkça yavaş yavaş kaybolur. 34 antijeni, kılcal endotel hücreler üzerinde ve kemik iliği stromal hücreleri üzerinde de bulunur. Normal hematopoez sırasında, soy bağıllığı ve hücrenel olgunlaşma düzeyine bağlı olarak glikozilasyon varyasyonlarının oluştuğu düşünülmektedir (sciences BCl. 2017 Catalog).

CD146: S-Endo olarak da bilinen CD146 molekülü, immünoglobulin süper ailesine (IgS) ait, 118 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olan tek zincirli bir transmembran glikoproteindir. Hücre dışı yapı beş Ig benzeri alandan oluşur: iki V tipi ve üç C2 tipi Ig

benzeri alan. 146 antijeni IgS ailesinin hücre adezyon molekülleri ile ilgilidir ve varlığı tek tabakalı bütünlük bölgelerinde yoğunlaşır. CD146, endotelde yapısal olarak eksprese edilir ve ayrıca düz kas hücreleri ve orta trofoblastlar gibi diğer hücre tiplerinde de gözlemlenir. Periferal tam kan lökositleri arasında CD146 ekspresyonu saptanmaz, aktive edilmiş T-lenfositlerin alt kümesinde beklenir (sciences BCl. 2017 Catalog).

CD309: KDR (kinaz insert alan reseptörü) veya flk-1 (fetal karaciğer kinaz 1) olarak da adlandırılan CD309 antijeni VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) alıcı ailesine aittir. VEGFR-2 olarak bilinir ve VEGF ailesinin (VGEFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (kdr / flk-1), VGEFR-3'ün (flt-4)) üç hücre sinyal tirozin-kinaz reseptörlerinden biridir, vasküler gelişim ve vasküler geçirgenliğin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Bu reseptörler hücre dışı kısımlarında yedi immünoglobulin benzeri alan ve hücre içi kısımlarında iki tirozin kinaz alanı içeren transmembran proteinlerdir. KDR geni, 4q11-q12 kromozomunu eşler. CD309, VEGF için reseptördür, aynı zamanda VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E'yi de bağlar. VEGF endotel hücrede eksprese edilen 309'a bağlanma yoluyla endotel hücre proliferasyonunu indükler ve hücre göçünü teşvik eder. CD309 embriyogenezin erken aşamalarında ifade edilir. VEGF'nin, kan damarlarının permeabilizasyonunun yanı sıra anjiyogenezin in vivo olarak indüklenebildiği ve vaskülojenez regülasyonunda merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Hem hematopoietik hücreler hem de hemoangioblast olarak adlandırılan endotel hücreler için bir CD34 +/- CD309 + ortak prekürsörü tanımlayan CD34 pozitif hücrelerde ifade edilir (sciences BCl. 2017 Catalog).

CD31: İmmünoglobulin süper familyasına bağlı 130 kDa'lık bir transmembran glikoproteindir. Miyeloid soyun kök hücrelerinde, trombositlerde ve endotel hücre kavşaklarında ekspresyonu gösterilmiştir. CD31'in homofilik bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir. Aynı zamanda heterofilik etkileşimlere aracılık eder, özellikle CD31, lökositlerin, endotel hücre duvarı boyunca, alfa v beta 3 integrinine ve CD38'e yapışması yoluyla göçüne katılır. Ek olarak CD31, lökositlerde, intratostoplazmik tirozin kalıntıları 633 ve 686'nın fosforilasyonu ve SHP-1 ve SHP-2 ile tirozin fosfatazlarla birleşme yoluyla dışardan gelen sinyallemeye katılır. Çalışmalar, trombositlerin aktivasyonu ve agregasyonu için CD31 için benzer bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir (sciences BCl. 2017 Catalog).

CD133: Prominin-1 olarak da bilinen CD133 antijeni insanlarda PROM1 geni üzerinde kodlanmaktadır. Pentaspan transmembran glikoproteinler ailesinin bir üyesi olarak bilinen CD133 antijeni çok özel olarak hücrel protrüzyon bölgelerinde lokalizedir. Halen CD133'ün fonksiyonu net olarak bilinmemekle birlikte hücre membran topolojisinin bir organizatörü olarak görev almaktadır . CD133 antijeni, hematopoetik kök hücreler, endotelial progenitör hücreler, glioblastoma, nöronal ve glial kök hücrelerde, çeşitli pediatrik beyin tümörlerinde eksprese edilmektedir. Günümüzde CD133 yaygın olarak kanser kök hücrelerinin ve endotelial progenitör kök hücrelerin izolasyonunda kullanılmaktadır (sciences BCl. 2017 Catalog).

CD144: CD144 antijeni, kaderin protein grubunun alt tiplerinden olup, kaderin-5, tip-2, veya vasküler endotelialkaderin (VE-kaderin) olarak bilinmektedir (Horn PA, et al, 1999). İnsanlarda CDH5 geni üzerinde kodlanmaktadır. 6. kromozomun uzun kolunda 6 kaderin gen bölgesinden birinde lokalizedir. Kalsiyum bağımlı hücreler arası adezyon glikoproteinidir. CD144 klasik kaderin proteinleri gibi hücreler arası bilgi alışverişini homofilik hücrelerin birbiriyle adezyon kurmasını sağlamaktadır. Özellikle interselüler bağlantıların organizasyonu ve kohezyonun kontrolü için endotelial hücre fizyolojisinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Sanai N, et al, 2005). Hücreler arası bağlantıların bütünlüğü endotelial permeabilitesinin belirlenmesinde majör faktördür. Dolayısıyla sıkı bağlantıların oluşumunda temel rol oynayan VE-kaderin bu hususta belirleyicidir. Yapılan çalışmalar VE-kaderinin antikorlar ile bloklanması sonucu kültürde endotelial geçirgenliğin arttığını göstermiştir (Sanai N, et al., 2005).

CD45: CD45 antikor, molekül ağırlıkları 180, 190, 210 ve 220 kd olan pan lökosit antijenlerinin, CD45 ailesinin üyelerini tanıır. Aynı zaman da lökositlerde bulunan müşterek antijen (LCA) olarak da bilinir. CD45 antijeni olgun eritrositler ve bunların ara progenitörleri hariç, her tip hematopoetik hücrede eksprese edilir. Farklılaşmış hematopoetik olmayan dokuda saptanmamıştır. Stem-Kit Reagents'da kullanılan CD34 mab'nin adı, j33'dür. 1986 yılında Oxford, İngiltere'de gerçekleştirilen 3. İnsan Lökosit Farklılaşma Antijenleri üzerine HLDA çalışması sırasında CD45'e atanmıştır (Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al., 2010).

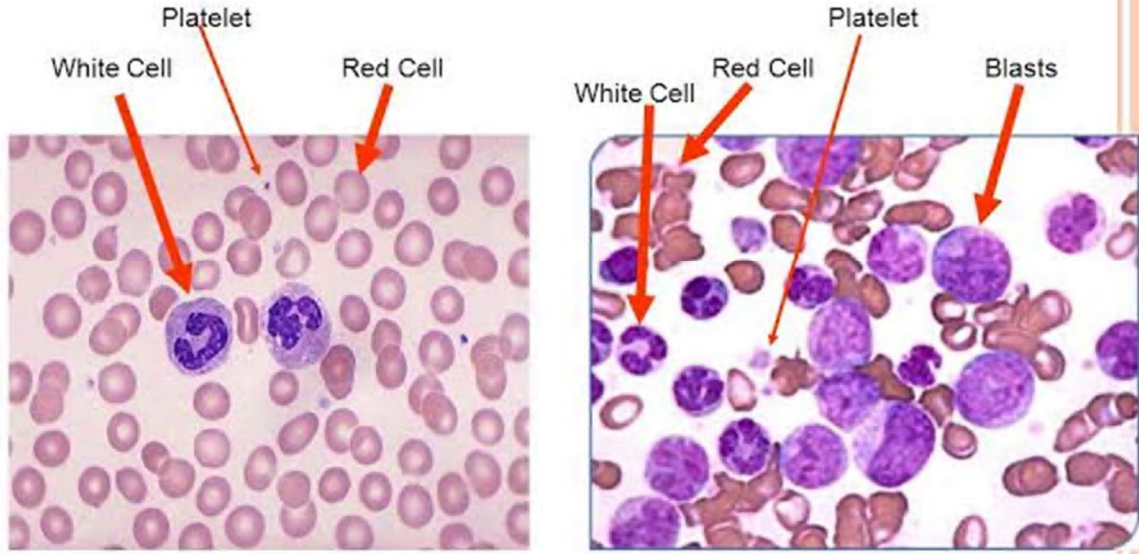
2.7. Blastik Hücre

Blast bir hücrenin olgunlaşmamış morfolojik olarak en genç şekline verilen isimdir. Örnek olarak ise monoblast, lenfoblast, miyeloblast proeritroblast, megakaryoblastlar gibi gruplardır. Lenfoid dizide ise bu durumdan farklı olarak görüntüsü ile olgun bir hücre olarak kabul edilen dar sitoplazmalı küçük lenfositler, immün bir uyararla karşılaştıkları zaman blastla dönüşerek immünoblast ve lenfoblast oluşur. Bu hücrelerden daha sonra yeni lenfositler oluşur. Blastların genel olarak ortak bazı morfoloji özellikleri vardır.

Blastik hücrelerin temel özellikleri:

- Olgun hücre dizileri genç hücre dizilerine göre daha küçüktür (nadir durumlar vardır; miyeloblastlar promiyelositlerden daha küçüktür, megakaryoblastlar megakaryositlerden çok daha küçüktürler).
- Genç hücrelerde hücrenin büyük bir bölümü çekirdekten oluşur sitoplâzma çok dardır. Bu nedenle genç hücrelerde çekirdek sitoplâzma oranı çekirdek lehinedir.
- Çekirdek kromatini ince ağsı bir görünümde, kromatin kabalaşmamıştır.
- Nükleoller tek ya da çok sayıda çekirdek içerisinde bulunurlar.
- Sitoplâzma farklı bir koyulukta bazofilik olarak boyanır.
- Blastik hücreler bölünerek olgunlaştıkça; sitoplâzmanın kapladığı alan artar böylece çekirdek küçülür; nükleoller kaybolur; çekirdek bazı dizilerde topaklaşır ve kromatin yapısı kabalaşır. Blast hücrelerine örnek olarak ise akut miyeloid hücrelerini gösterebiliriz (şekil2.7)(www.kanbilim.com).

PERİFERİK YAYMA



Şekil 2.7. Normal ve blastik hücre görüntüsü

2.8. Lösemi ve Tanımı

Lösemi, kemik iliğinin hematopoietik kök hücrelerinden kaynaklanan ve hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize bir malign bir hastalıktır. Normal hematopoezde, hematopoietik kök hücreler periferik kan hücrelerine (matür lenfosit, granülosit, monosit, eritrositler ve megakaryositler/trombositler) farklılaşır. Lösemide, çok sayıda lökosit kemik iliğindeki kök hücreden kontrolsüz olarak bölünerek çoğalır, ancak olgunlaşp, farklılaşamaz. Bu olgunlaşamayan hücreler kemik iliğinde çoğalarak normal hematopoietik hücrelerin yerini alır. Bu mekanizma tam anlaşılammış olmakla birlikte lösemide DNA hasarı olduğu düşünülmektedir. Kromozomlardaki yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonları ve sitogenetik değişiklikler normal hücrenin farklılaşma ve proliferasyonunun düzenlenmesini bozmaktadır (Fisher VL, Abramovitz LZ. 2006).

Lösemiler, kemik iliğinden köken aldığı hücre tipine göre miyeloid veya lenfoid, etkilenen hücrelerin farklılaşma derecesine göre akut veya kronik olarak sınıflandırılır. Bu şekilde lösemiler dört temel gruba ayrılır;

1. Akut Myeloblastik Lösemi (AML): İmmatür myeloid seri hücrelerinin (nötrofill, monosit, eozinofil) kontrolsüz artışıyla karakterizedir.

2. Kronik Myelositer Lösemi (KML): Matür myeloid seri hücrelerinin artışıyla karakterizedir.
3. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL): İmmatür lenfoid seri hücrelerinin (T, B.) kontrolsüz artışıyla karakterizedir.
4. Kronik Lenfositer Lösemi (KLL): Matür lenfoid seri hücrelerinin artışıyla karakterizedir.

2.9. Akut Myeloblastik Lösemi Tanımı

Akut miyeloid lösemi (AML) aynı zamanda akut lenfoblastik olmayan lösemi olarak da bilinir. Hematopoetik sistemin malin bir hastalığıdır. Bu ortaya çıkan durum kemik iliği, kan oluşumunun yerinde ve genel olarak olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin aşırı çoğalması eşlik eder. Normalde, tüm kan hücreleri çoğalır ve uyumlu bir dengede kendilerini yeniler. Karmaşık bir olgunlaşma sürecinden geçerler. AML, bu süreçte kontrolden çıkar ve beyaz kan hücreleri (lökositler) olan fonksiyonel hücelere artık olgun, ama hızlı ve kontrolsüz çoğalmaya başlar. Böylece bu lösemik hücreler kemik iliğini, periferik kanı ve diğer dokulara yayılırlar (Burness, M.L, Sipkins, D.A. 2010). Lösemi belirti ve bulgularından ilk Hipokrat bahsetmekle birlikte mikroskobunun keşfi ile birlikte hematolojide dönüm noktası olmuştur. “Leukemia” kelimesini ilk olarak Virchow tarafından kullanılmıştır (Sargın D. 2003). İyi tariflenmiş ilk akut lösemi olgusu Friedreich’e (1857) atfedilmekle birlikte, İlk akut lösemi tanımını kullanan Ebstein olmuştur. Naegli tarafından ise yeni tekniklerin tanımlanması ile birlikte lökositleri granüllerine ayrılması ile ilk miyeloblast ve myelosit tanımını yapmıştır (Burness, M.L, Sipkins, D.A.2010, Sargın D. 2003). Hasan Reşad Sığındı ile birlikte Schilling-Torgau 1913 yılında monositer lösemiye tanımlamışlardır (Burness, M.L, Sipkins, D.A. 2010). Fransız, Amerikan ve İngiliz hematologlar tarafından 1976 yılında akut lösemi FAB sınıflandırması oluşturulmuştur. FAB sınıflandırması nadir lösemi tiplerini içermeyen ve morfoloji ve sitokimyasal boyanma yöntemleriyle gruplandırma yapılan yöntemdir. Lösemide sitogenetik ve hücre yüzey antijenlerini öneminin fark edilmesi ile FAB birlikte MIC ve EGIL sınıflandırması yapılmıştır (Singh SK, 2004). EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias)’da akut lenfoblastik lösemiler 3 alt gruba ayrılmış bunlar; B-I pro-B hücreli, B-II commonB hücreli ve B-III pre-B AML ise daha fazla myeloid marker (MPO, CD13, CD33, CDw65, CD117) ile tanımlanmıştır (Zelenin, A.V., et al., 1984). Sitogenetik ve

moleküler genetik olumsuzlukların bariz gözlenmesi birlikte ve bunların prognostik önemlerinin artması ile yeni bir sınıflandırma yapılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) 2001 yılında akut lösemiler dâhil olmak üzere hematopoietik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflandırma yapmıştır. WHO bu sınıflandırmasında moleküler biyolojik özellikler, morfoloji, immünofenotiplendirme ve sitogenetik özelliklerini incelemiştir. Akut lösemi tanısı için blastik hücre oranını %30'dan %20 ye düşürmüştür (Sargin D. 2003) .

WHO'de miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olarak 3 ana grupta incelenmiştir.

AML:

- a. Tekrarlayan sitogenetik anomalilerle seyreden AML,
- b. Çoğul seri displazisi ile seyreden AML,
- c. Tedaviye ikincil AML ve MDS,
- d. Tanımlanan gruplara girmeyen AML olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

Lenfoid hücreler

- a. Prekürsör B-lenfoblastik lösemi/lenfoma,
- b. Prekürsör T-lösemi/lenfoma,
- c. Burkitt lenfoma/lösemi şeklinde 3 gruba ayrılmıştır.

Üçüncü grup olarak belirsiz serili akut lösemiler göz önüne alınmış ve bu grupta ise:

- a. Bifenotipik akut lösemi
- b. farklılaşmamış akut lösemiler olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır

ASM, AML'nin French-American-British (FAB) sınıflamasına göre gruplanmasında sitokimyasal yöntemlerin önüne geçmiştir. Özellikle M0 ve M7 olgularında tanı için immunolojik yöntemler gereklidir.

2.9.1. AML Subtipleri ve İmmünofenotipleme

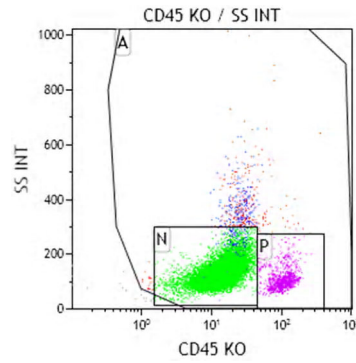
Yeni tanı akut lösemide köken ilişkisinin belirlenmesinde multiparametrelili flow sitometri kullanılır. AML göz önünde bulundurulduğunda bir markırın pozitif kabul edilebilmesi için eşik değeri yoktur. Birçok markır için genellikle kullanılan ölçüt, lösemik hücrelerin sunduğu markırın % 20 veya daha fazla olmasıdır, fakat seçilmiş

markırlar (sitoplazmik CD3, MPO, TdT, CD34, CD117) için alt sınır %10 olarak kabul edilmiştir. Minimal farklılaşma gösteren AML, kökeni belirlenemeyen akut lösemi veya akut megakaryoblastik lösemi tanısını koymada immünofenotipleme gereklidir. Vakaların çoğunda erken hematopoez ile ilişkili antijenler (örneğin CD34, CD38 ve HLA-DR) saptanırken erken myeloid ve monositik matürasyon markırları olmayabilir. MPO sitokimya tarafından negatif saptandığında, blastların en azından bir bölümünde flow sitometri tarafından pozitif saptanabilir. Akut megakaryoblastik lösemide, %20 veya daha fazla blast vardır. Bu blastların % 50 ve daha fazlası megakaryositik seriden köken alır. Megakaryoblastlar tipik olarak trombosit glikoproteinleri olan CD41, CD61 ve daha az sıklıkta CD42 taşırlar (Reyes M, 2002).

AML tanısı için, immünofenotipik çalışmalar yapılırken özellikle CD3, CD7, CD13, CD14, CD33, CD34, CD64, CD117, sitoplazmik MPO ve HLA-DR mutlaka bakılmalıdır ve cCD3 ve cCD79a gibi lenfoid hücrelerde çok özel yüzey belirleyicilerinin olmadığı gösterilmelidir. İmmünofenotipik çalışmalarda blast oranını belirlemek amacı ile CD45, CD34 veya CD117 kullanılmaktadır (Li Z, Li L. 2006).

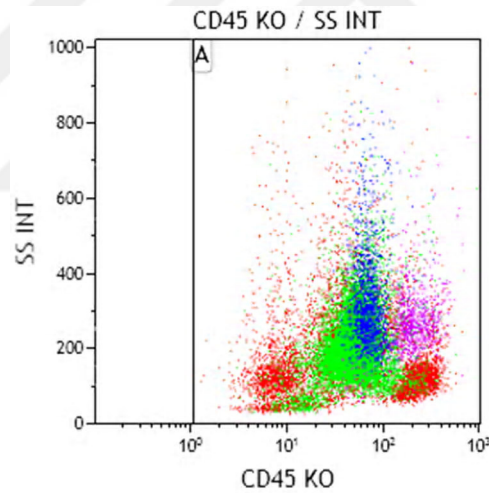
Tekrarlayan genetik anormallikleri olan bazı AML'ler, karakteristik immünofenotipik özelliklerle ilişkilidir. Örneğin t(8,21) ile birlikte olan AML'ler, lenfoid markır olan CD19'u sıklıkla sunarken, CD7 ve CD 56'ı daha az sıklıkta sunarlar. İnv(16) ile birlikte olan AML'ler T-köken ilişkili CD2 sunarlar. NPM1 mutasyonu ile birlikte olan AML'ler CD33 sıklıkla sunarken, CD34 ya hiç sunmazlar ya da daha az sıklıkta sunarlar (Gurman, G, ve ark., 1995).

AML MO: Büyüklük ve granül yapıları açısından lenfosit yapısında hücreler olup CD45/SS grafiginde lenfoblast bölgesinde lokalize olurlar. Fenotipik olarak CD13, CD33, CD34, CD117, HLA-DR antijenleri pozitifdir. CD13 pozitifliği CD33'ten daha fazla olabilir. Sitoplazmik myeloperoksidaz (cMPO) negatiftir. Şiddeti bazı olgularda düşük (zayıf bağlanma) olabilir (Schulman KA, et al., 1999).



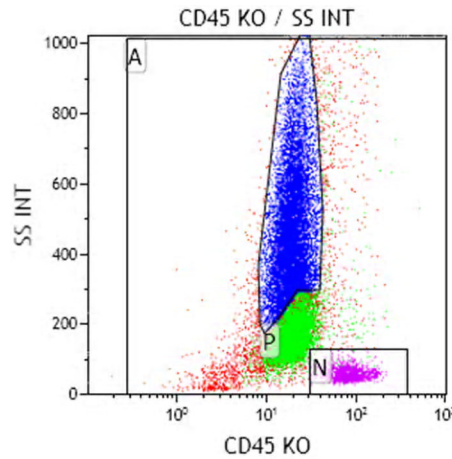
Şekil 2.8. AML M0

AML M1: Büyüklük ve granül yapıları AML M0 ile benzerlik gösterir. Blastlar M0 dan farklı olarak biraz granüllü olabilir. Fenotipik olarak CD13, CD33 ve HLA-DR pozitifdir. CD34 ve CD117 pozitifliği MO'dan daha azdır. AML M1 blastlarda MO'dan farklı olarak CD15 kısmı pozitifliği olabilir (Rogelio Paredes-Aguilera, et al., 2001).



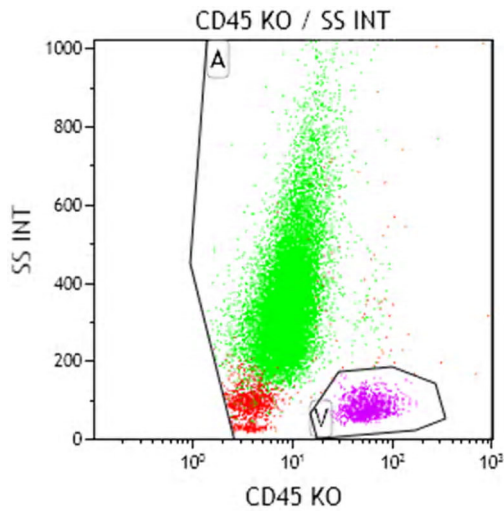
Şekil 2.9. AML M1

AML M2: AML M1'den en önemli farkı blast yüzdesidir. Ayrıca M2'de blastlar maturasyona bağlı olarak daha granüllüdür. CD45/SS myeloblast bölgesinde lokalize olurlar. Fenotik olarak M2 blastlar, M1'den daha düşük CD34 pozitifliği, daha fazla CD15 pozitifliği ile karakterizedir. Ayrıca CD13, CD33 ve HLA DR+ dir. Lenfoid antijenlerden CD19 pozitifliğinin olması sitogenetik olarak t(8;21) varlığı ile ilgilidir (Samir A. Kheiri, et al., 1998).

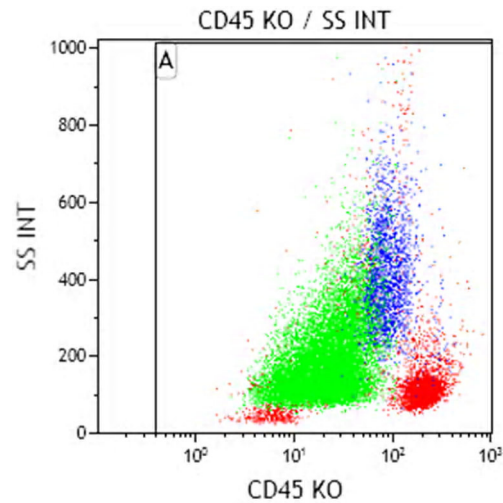


Şekil 2.10. AML M2

AML M3; hipergranüler veya hipogranüler olmak üzere morfolojik olarak iki farklı blast tipi görülebilir. Fenotipik olarak benzer antijen pozitiflikleri gösterirler (CD13, CD33, CD15 pozitif iken, HLA-DR ve CD34 genelde negatiftir). İki M3 tipi blastların birbirinden önemli farkı CD45/SS grafiğindeki lokalizasyondandır. Bazı mikrogranüler tip M3 blastlarda CD2 antijen pozitifliği olabilir. CD2 pozitifliğinin ve HLA-DR negatifliğinin olduğu M3 olgularında t(15;17) sitogenetik anomalisi görülebilir (Matthew Smith, et al., 2004).



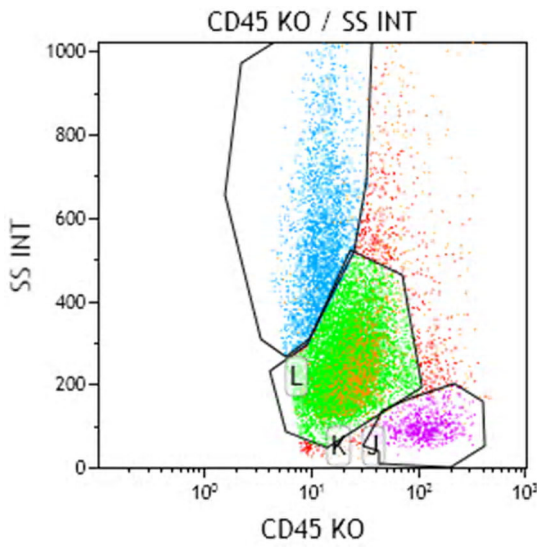
Şekil 2.11. AML M3 Hipergranüler



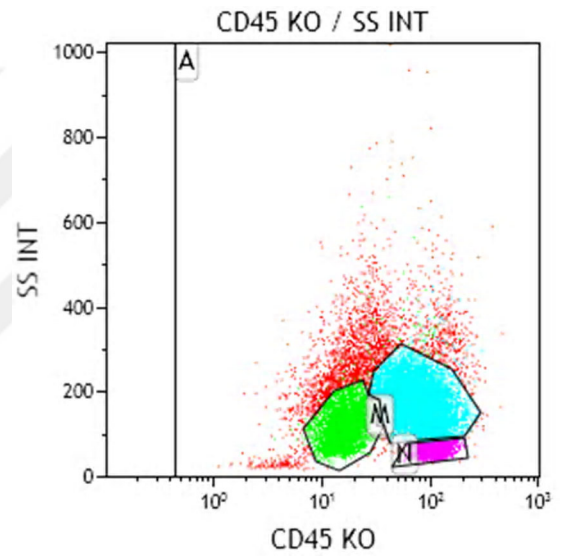
Şekil 2.12. AML M3 Hipogranüler

AML M4 M5: Her iki gruptaki blastların fenotipik özellikleri benzerdir. Ancak CD34 pozitifliği M4 te M5 ten daha fazladır. Blastlar MO'dakilerle karşılaştırıldığında çok

daha büyük ve granüllü hücrelerdir. CD45/SS grafiğinde monositik bölgede lokalize olurlar ve CD45 açısından normal monositlere göre daha zayıf bağlanırlar. Her iki grupta fenotipik açısından CD13, CD33, CD14 ve HLA-DR antijenleri pozitiftir. CD33 pozitifliği ve floresans şiddeti CD13'ten daha fazla olabilir. Ayrıca CD14 floresans şiddeti ve antijen pozitifliği normal monositlerden genelde daha etkilidir. Bazı M5 olgularında CD33, CD13 ve CD34 negatiftir. Ayrıca CD56 pozitifliği bazı M5 olgularında görülebilir. CD2 pozitifliği M4 ün bir alt grubu olan M4 Eo için çok önemli bir bulgudur (Renato Bassan, et al., 2004).

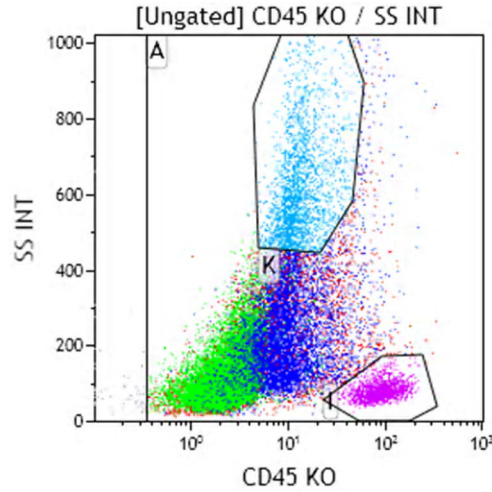


Şekil 2.13. AML M4



Şekil 2.14. AML M5

AML M6; Çok nadir görülen ve iyi karakterize edilememiş lösemi tipidir. HLA-DR ve CD34 pozitiftir. CD13 ve CD33 genelde pozitiftir. CD45/SS grafiğinde eritroid hücrelerle karışmış veya biraz üzerinde lokalize olurlar. CD235a (glikoforin A) pozitifliği önemlidir. Ancak normal eritroid hücrelerde de CD235a pozitifliği çok kuvvetli olduğundan, kullanılacak çalışma metoduna dikkat edilmeli ve en önemlisi CD34 pozitif hücreler üzerinde CD235a pozitifliğine bakılmalıdır (Yair Reisner, 2011).



Şekil 2.15. AML M6

AML M7; Megakaryoblastik lösemi nadir görülen bir lösemi tipidir. AML'lerin %3-5'ini oluşturur ve prognozu kötüdür. Megakaryoblastlar tipik olarak CD61 veya CD41 antijenlerinin pozitifliği ile tamamlanabilir. CD34 genellikle negatiftir (Yair Reisner, 2011).

2.9.2 AML Sıklığı, İnsidansı, Risk Faktörleri

2015 yılında ABD'de, 1.658.370 yeni kanser vakası ve 589.430 kanser ölümü olduğu tahmin edilmektedir. 2015'te yeni tanı konulan tahmini 20.830 AML vakasının 12.730'u erkek, 8.100'ü kadın olarak saptanmıştır ve AML nedeniyle tahmini ölen vaka sayısı ise 10.460 olarak saptanmıştır.

AML insidans oranı, gelişmiş ve endüstriyel şehirlerde daha fazladır. AML, en sık görülen lösemidir ve olasılığı 40 yaşından itibaren yaşla artar. ABD'de 65 yaş altında AML insidansı oranı 1.8/100.000 iken, 65 yaş ve üzerindeki yaşlarda insidansı 17/100.000'ye kadar çıkmaktadır. AML'de ortalama tanı yaşı 67'dir ve tanı alan hastaların %54'ü 65 yaş ve üstüdür. 56 yaşın üzerindeki hastalarda olumsuz sitogenetik insidansındaki artış kötü sonuçlara katkıda bulunur ve her bir sitogenetik risk grubunda tedaviye yanıt yaşla birlikte bozulur (Ozcelik T, ve ark. 2009).

AML insidansı, cinsiyet ve ırkla değişir. AML' de birçok ülkede erkek baskınlığı vardır. ABD'de erkek insidans oranı diğer tüm ülkelere göre önemli ölçüde daha fazladır. 2000 yılında, ABD' de AML siyah ırkta beyaz ırka göre daha fazla saptanmamışken 2000-2003 yılları arasında AML insidansı siyahlarda (3.2/100.000) beyazlardan (3.8/100.000) daha az saptanmıştır. Surveillance, Epidemiology, and End Result (SEER) çalışma

verilerinin sonuçlarına göre yaşa göre düzeltilmiş mortalite oranı beyazlarda (2.5/100.000), Afrika kökenli Amerikalılarda (2.0/100.000) oranla daha fazladır (Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, et al., 1987).

Genetik bozukluklar ve yapısal genetik kusurlar AML ile ilişkili önemli risk faktörlerindedir. Bu faktörler konjenital defektler (Down sendromu, Bloom sendromu, Monosomy 7 sendromu, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Neurofibromatosis, Konjenital dismorfik sendrom) ve kemik iliği yetmezlik sendromları (Fanconi anemisi, Dyskeratosis congenita, Shwachman-Diamond sendromu, Amegakaryositik trombositopeni, Blackfan-Diamond sendromu, Kostmann agranulositozis, Familial aplastik anemi) olarak ayrılabilir. Down sendromlu çocuklarda akut lösemi gelişme olasılığı 10 ila 20 kat artar (Clough L, Dugan N, Hulitt C, et al., 1998).

AML, ya hematopoietik multipotansiyel kök hücre ya da yönlendirilmiş hücrelerin bir seri somatik mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Somatik mutasyonlar, hastaların çoğunda kromozomal translokasyon sonucu gelişir. Translokasyonlara bağlı olarak protoonkogenler aktive edilir. Mutasyonlara uğramış genlere örnekler core binding factor (CBF), retinoic acid receptor (RAR), HOX (homeobox) ailesi, MLL (11q23 loküsünde) ve diğerleridir. Bu primer mutasyonlar AML geliştirmek için yeterli değildirler. Hücre proliferasyonunda artışa neden olan tirozin kinaz aktive edici mutasyonlar da gereklidir. Bu mutasyonlar arasında FLT3, Kit, N-ras, veya K-ras mutasyonları sayılabilir. Özellikle sekonder lösemi gelişmiş veya yaşlı AML'li hastaların %50-80'inde sonradan kazanılmış klonal kromozom bozuklukları bulunmuştur. AML'li hastalarda sıklıkla kromozom 5, 7, 9 veya Y kromozomunun kaybı veya delesyonu bulunmaktadır. AML'de t(8;21) (q22;q22), t(15;17)(q22;q11), trizomi 8 ve 21, 9. 11. ve 16. kromozomların diğer anormallikleri de sık olarak görülmektedir.

Çevresel faktörler de AML patogenezinde yer almaktadır. İyonize radyasyona maruz kalma AML ile ilişkilidir. Japonya'da atom bombası patlamasından sağ kurtulanlar arasında, 5-7 yıl sonra AML insidansındaki artış pik yapmıştır. Tedavi amacıyla uygulanan radyasyonun da sekonder AML riskini arttırdığı bulunmuştur. Çocukluk veya genç-yetişkinlik dönemindeki tümörlerinden sağ kurtulanlarda tedavi ilişkili myeloid lösemi gelişme insidansı rahatsız edici şekilde artmaktadır. Tedavi ilişkili myeloid lösemi, solid tümör veya hematolojik malignitesi olan hastalarda sitotoksik tedavinin iyi bilinen bir sonucudur. Tedavi ilişkili myeloid lösemiye neden olan

sitotoksik ajanlar iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar alkilleyici ajanlar (siklofosomid, melfalan) ve topoizomeras inhibitörleri (etoposid, doxorobusin, mitoksantron)'dir. Bazı kimyasallara kronik maruziyet AML gelişme riskini arttırmaktadır. Benzen, üzerinde en çok çalışılan ve en yaygın kullanılan lökomojenik ajandır Ayrıca sigara içiciliğinin de 60-75 yaş arası AML gelişme riskinde artış ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Strauss Rg, Ciaverella D, Gilcher Ro., et al., 1993).

2.9.3 Morfoloji

Kemik iliği aspirasyonu, AML şüphesi olan bir hastada tanısal değerlendirmenin rutin bir parçasıdır. Kan ve kemik iliği yaymaları morfolojik olarak May-Grünwald-Giemsa veya Wright-Giemsa boyasıyla incelenir. Kan yaymasında en az 200 lökosit, kemik iliği yaymasında 500 çekirdekli hücre sayılması önerilir. Bazı eritrolösemi vakaları ve t(15;17), t(8;21), inv(16) veya t(16;16) ile birlikte olan AML'ler hariç, AML tanısı için kan veya kemik iliğinde blast oranı %20 ve üzerinde olmalıdır.

Köken ilişkisini belirlerken bazı ülkeler, immünofenotiplemeden daha çok myeloperoxidase (MPO), Sudan black B (SBB) veya nonspecific esterase (NSE) boyalarının kullanıldığı sitokimya yöntemini kullanmaktadırlar. MPO bulunuşu (% 3 ve daha fazla blast varlığında) myeloid farklılaşmayı gösterir. Fakat MPO bulunmayışı myeloid kökenin olmadığını dışlanamaz. Çünkü erken myeloblast ve monoblast MPO ile boyanmayabilir. SBB, MPO ile paralel boyanma gösterir fakat daha az spesifiktir. NSE ile boyanma myeloblast ve monoblastlarda diffüz sitoplazmik aktiviteyi gösterir (Schumm, et al., 2019).

2.10. Anjiogenez ve Hematopoetik Neoplazma

Anjiogenes var olan damardan yeni damar oluşmasına denir. Anjiogenesis insan vücudunda hem doğal fizyolojik hem de patolojikte olabilen bir durumdur. Tümörler, dejeneratif moleküller göz hastalıklarında patolojik iken, yara iyileşmesi ve kadın menses durumlarında fizyolojiktir. Anjiogenesis'in moleküler mekanizmasının tam anlamıyla çözülmesi ile birlikte birçok hastalıkta özellikle tümörlerin tedavi yaklaşımları ve tedavilerinde başarı oranı artacaktır (Konukoğlu D, Turhan S. M. 2005).

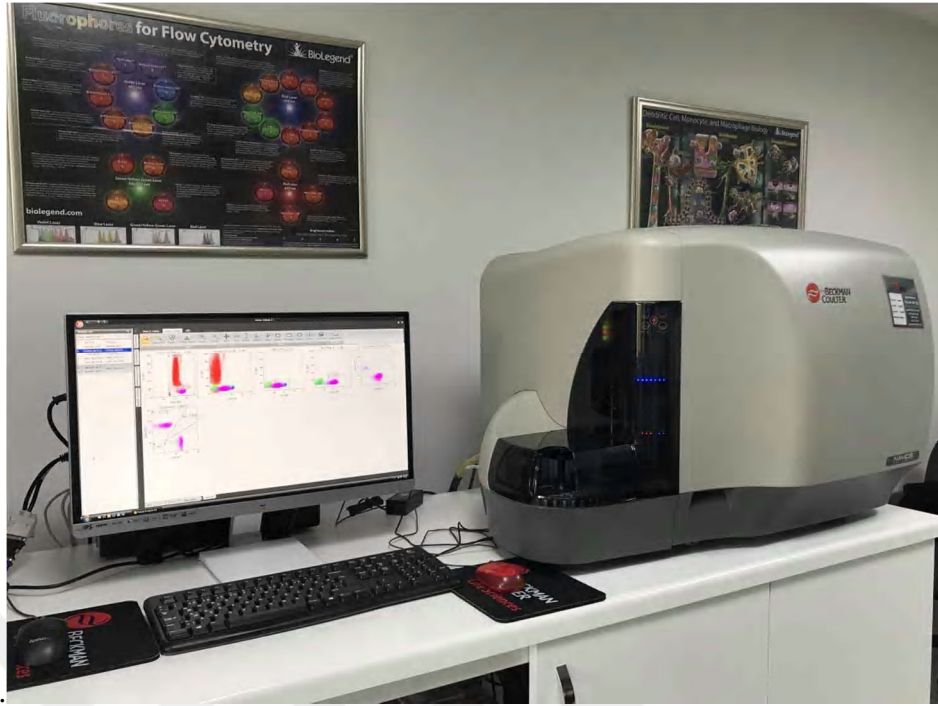
Tümörün anjiogenik aktivitesinin gücü ile tümörün büyümesi, kanamaya mehili ve uzak hücrelere yayılması (metastaz aktivitesi) ile ilgili potansiyeli etkileşim gösterdiği iyi bilinmektedir. Hemetopoetik neoplazmaların anjiogenik etkileşiminin olabileceği ise iyi

bir araştırma konusudur. Çünkü görünür bir doku stroması yokluğunda büyüyüp, vücut sıvılarında ve kan ile birlikte damarlarda dolaşmaktadırlar. Yalnız bu durum tam olarak kanıtlanmış bir durum değildir. Lösemi ile anjiogenesis arasındaki ilişkiyi ilk inceleyen yayın Perez ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılmıştır (Perez-Atayde AR, 1997). Padro ve arkadaşları ise 40 akut lenfoblastik lösemili hastalarda yaptığı çalışmada elde edilen bulgularda ise; kemik iliği biyopsi materyali ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hasta grubun ki çocuklarda mikro damar dantisitelerinin anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışmada hasta çocukların idrarında bFGF düzeyine bakıldığında kontrol grubuna oranlar hasta grubunda belirgin bir artış görülmüştür (Padro T, et al., 2000).Yeni tanılı 62 AML hastasında yaptıkları çalışma da akut lösemilerde artmış anjiogenezisi desteklemektedir.

2.11. Akım Sitometri

Akış sitometrisi, heterojen bir sıvı karışımındaki hücreleri saymak, sıralamak ve profillemek için lazer tabanlı teknolojiyi kullanan popüler bir hücre biyolojisi tekniğidir. Bir akış sitometre makinesini kullanarak, bir sıvı akımında askıya alınan hücreler veya diğer parçacıklar, tek bir dosya biçiminde bir lazer ışık ışınından geçirilir ve ışıkla etkileşim, ışık saçılımı, floresans yoğunluğu olarak elektronik bir tespit cihazı ile ölçülür. Bir floresan etiketi veya florokrom, hücresel bir bileşene spesifik olarak bağlansa, floresans yoğunluğu ideal olarak bu belirli hücre bileşeninin miktarını temsil eder.

Akış sitometrisi güçlü bir araçtır, çünkü saniyede binlerce partikülün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin eşzamanlı multiparametrik analizine izin verir. Bu onu süspansiyondaki hücrelerin analizi ve saflaştırılması için hızlı ve kantitatif bir yöntem yapar. Akışı kullanarak fenotip ve fonksiyonu belirleyebilir ve hatta canlı hücreleri sıralayabiliriz.



Şekil 2.16. Akım Sitometri laboratuvarı, Aferez ünitesi, Erciyes Üniversitesi Tıp fakültesi, (Cihaz; Beckman Coulter, Navios, 2019)

2.11.1. Cihazın Temel Bileşenleri

Akım sitometri cihazı

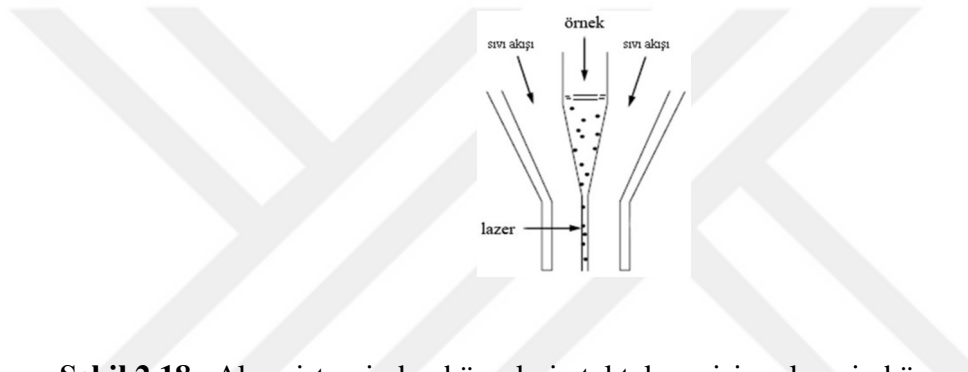
- Sıvı akış sistemi (fluidik sistem)
- Işık kaynağı (lazer)
- Filtreler ve sinyal dedektörleri(optik ve elektronik sistem)
- Cihazın verilerini analiz eden bilgisayar ve yazılım programın(soft ware) bulunduğu bilgisayar sisteminden oluşur.



Şekil 2.17. Akım sitometri cihazı temel bileşenleri

Akış Sistemi: Akışkanlar sistemi, numune akışkanının enjekte edildiği bir akış hücresi içerir. Akış hücresi, hücreleri veya parçacıkları tek bir dosyada dar bir kanaldan ve lazer kesişimine (ışık ışını) geçecek şekilde taşımak veya hizalamak için kılıf sıvısı gerektirir. Bu hidrodinamik odaklama, bir hücrenin aynı anda lazer sorgulamasıyla analiz edilmesini sağlar. (Şekil 2.18).

Optik Sistem, Dedektörler ve Filtreler: Çeşitli filtrelerden, ışık dedektörlerinden ve genellikle belirli bir frekansta tek bir dalga boyu üreten bir lazer çizgisi olan ışık kaynağından oluşur. Bu parçacıkların en az bir lazer ışını içinden geçirildiği yerdir.

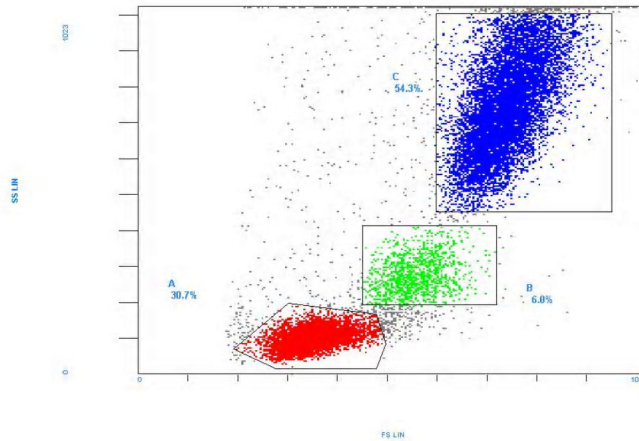


Şekil 2.18. Akış sisteminden hücrelerin tektek geçişi ve lazerin hücreye odaklanması

Lazerler, ultraviyole ile uzak kırmızı arasında değişen farklı dalga boylarında mevcuttur ve değişken güç seviyelerine de sahiptir (foton çıkışı / zamanı). Lazer ışını ile yapılan sorgulama, antikora konjuge edilmiş olan herhangi bir uyumlu flüoresan probu uyarır. Bu makine tarafından ölçülen anahtar parametreler arasında ileri ışık saçılımı (FSC), yan ışık saçılımı (SSC) ve floresan emisyon sinyalleri bulunur. İleri dağınık ışık (FSC), bir hücre tarafından ileri yönde kırılan ışıktır ve ışığın hareket ettiği ile aynı doğrultuda devam eder (tipik olarak lazer ışınının ekseninden 20° 'ye kadar). Bu sinyal, ileri saçılma kanalı (FSC) tarafından toplanır ve genellikle parçacık boyutunu belirlemek için kullanılır. Genellikle, büyük parçacıklar küçüklerinden daha fazla ileri ışık saçır ve daha büyük hücrelerin daha güçlü bir saçılma sinyali olur (Şekil 2.19).

Yandan dağınık ışık (SSC), hücreler tarafından kırılan ve orijinal yolundan farklı bir yönde hareket eden (uyarma hattına 90° açıyla ölçülen) ışıktır. Genellikle hücrelerin granülerliği ve karmaşıklığı hakkında bilgi sağlar. Düşük tanecikli ve karmaşıklığa sahip hücreler daha az yan saçılmış ışık üretirken, yüksek dereceli iç karmaşıklığa sahip yüksek taneli hücreler (nötrofiller gibi) daha yüksek bir yan saçılma sinyaline neden

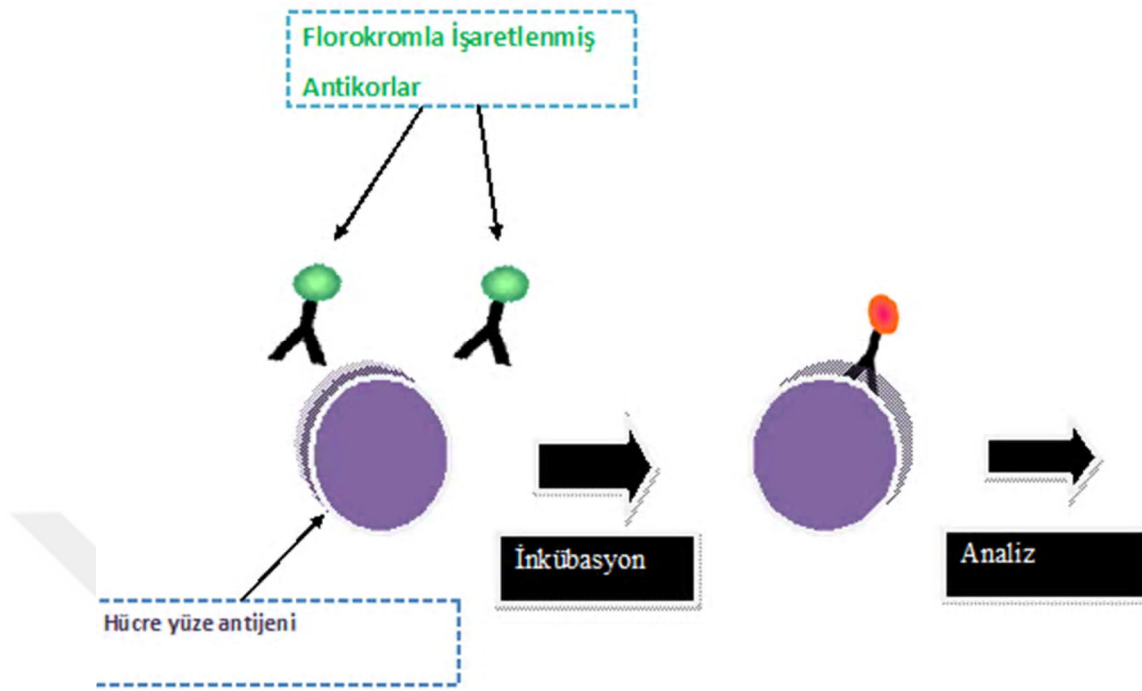
olur. Hücrelerin şekli ve boyutundan etkilenmesine rağmen, membranlara, sitoplâzmaya, çekirdeğe vb. karşı daha hassastır. Bu nedenle, ileri ve yandan saçılmış ışık algılaması kullanılarak hücre popülasyonları, hücre boyutu ve tanecilliğindeki karakteristik farklılıklara dayanarak sıklıkla ayırt edilebilir.



Şekil 2.19. Akım sitometride FS,SS görüntüsü,

İkinci olay ise hücre popülasyonları bazen FSC ve SSC'ye dayanarak ayrılabilir, ancak hücreler belirli bir proteini eksprese edip etmedikleri ile de ayrılabilir. Bu durumda, bir florokromlarla genellikle ilgilenilen proteini boyamak için kullanılır. Hedef proteinlerin tespiti için kullanılan florokromlar, uyumlu dalga boyunda bir lazer tarafından uyarıldıktan sonra ışık yayar. Bu florokromlarla etiketli hücreler veya partiküller ayrı ayrı tespit edilebilir. Her bir florokromlu boya veya etiket tipi, akış sitometri deneylerinin tasarlanması için önemli olan kendi karakteristik uyarma ve emisyon spektrumuna sahiptir. Günümüzde çok çeşitli florokromlar bulunmaktadır; örneğin, FITC, PerCP, APC, PE, Cy5.5, Alexa Fluors ve daha fazlası. Floresan olarak konjüge edilmiş antikorlar, genel olarak akış sitometrik analizi için hücre üzerindeki spesifik yapıları etiketlemek için kullanılmıştır (Şekil 2.20).

Akım sitometrik analiz, hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelerin monoklonal antikor ile işaretlenmesi, cihazın kalibrasyonu, örneklerin çalışılması, verilerin analizi ve raporlanması aşamalarını içermektedir. Akım sitometri, florokromla işaretlenmiş hücreleri sınıflarına göre ayıran bir sistemdir.



Şekil 2.20. Akım sitometride florokromla işaretlenmesi

Elektronik Sistem: Lazer ışığından geçen her hücre ayrı bir olay olarak algılanır. Ayrıca, algılanan farklı ışık türleri: ileri saçılma, yan saçılma ve belirli floresan emisyon dalga boylarına ayrı bir kanal atanır. Bu olayların her biri için veriler bağımsız olarak çizilir ve iki yöntemle gösterilebilir: histogramlar ve nokta grafikleri.

Histogramlar, yoğunluğun bir ekseninde çizildiği ve olay sayısının ayrı bir ekseninde çizildiği tek bir parametreyi karşılaştırır. Nokta çizimleri aynı anda birden fazla parametreyi karşılaştırabilir; burada her olay tek bir nokta olarak görüntülenir ve iki veya üç kanalın yoğunluk değerleri çeşitli ekseninde gösterilir.

Akım sitometri cihaz kullanım ve hazırlık çalışmaları

- Cihazla çalışmaya başlamadan ortam sıcaklığı optimum ($21-23C^0$) koşullarda olmalıdır.
- Cihazın sıvıları ve atık kabı kontrol edilmelidir. Atık kabı boş, iso flow (sheat fluid) dolu olmalıdır.
- Lazer ayarlarının optimum koşullarda olduğu kontrol edilmelidir (flow check mean değerleri 2-5 arasındadır) .
- Cihazın temizliği için çeşitli sıvılar verilmelidir. Bu sıvılar:

- Alkol
- Çamaşır suyu
- Cleanz
- Distile su

2.11.2. Akım Sitometrinin En ok Kullanıldığı Alanlar

akış sitometrisinde, çok sayıda çalışma alanına uygun çok sayıda teknik ve uygulama vardır.

- İmmünofenotipleme
- Antijene Özel Yanıtlar
- Hücre İçi Sitokin Analiz
- Çoğalma Analizi
- Apoptozis Analizi
- Floresan Protein Analizi
- Hücre Döngüsü Analizi
- Sinyal İletim Akışı Sitometrisi
- RNA Akışı Sitometrisi
- Hücre sıralaması
- Mutlak Hücre Sayımı
- Kantitatif Akış Sitometrisi

2.11.3. Akım Sitometrinin İmmun Fenotiplemede Kullanımı

İmmünofenotipleme, akış sitometrisinde en çok kullanılan uygulamadır. Birden fazla parametre için hücrelerin karışık popülasyonlarını eş zamanlı olarak analiz etmek için eşsiz akış sitometrisi yeteneğini kullanır. En basit haliyle, bir immünofenotipleme deneyi, hücre yüzeyindeki antijenlere karşı hedeflenen florokrom-konjuge antikorlarla boyanmış hücrelerden oluşmaktadır. Bu antijenlerin çoğuna İnsan Lökosit Farklılaşma Atölyeleri tarafından “farklılaşma kümesi” numaraları veya CD numaraları verilmiştir, böylece spesifik hücresel antijenlere karşı yönlendirilen monoklonal antikorları tanımlamak için ortak bir adlandırma kullanılır. Örneğin, CD3 “3 numaralı farklılaşma kümesidir” ve tüm T hücrelerinde bulunan T hücresi ortak reseptörünü tanımlamak için kullanılır.

Bağışıklık hücrelerinin çoğu, onları bir hücre popülasyonu olarak tanımlayan spesifik CD markörlerine sahiptir. Bu hücre markörlerine soy markerleri denir ve her immünofenotipleme deneyinde ek analiz için spesifik hücre popülasyonlarını tanımlamak için kullanılır. Örnekler T hücresi markerleri (CD3, CD4, CD8), B hücresi markerleri (CD19, CD20), monosit markerleri (CD14, CD11b) ve NK hücre markerleridir (CD56, CD161)

ASM ile immunfenotipleme yapmanın

Avantajları:

- Akış hızına bağlı olarak yüksek hızlı analizler (100.000 olay / seg);
- Tekil hücreleri ve çok sayıda hücreyi oluşturur;
- Eşzamanlı analiz çoklu parametreler;
- Küçük popülasyonları tanımlar;
- Fluresans yoğunluklarının ölçümü;
- Önceden tanımlanmış hücre popülasyonlarının sıralanması (70.000 / sn'ye kadar);
- Taşınabilir ekipmanlar

Dezavantajları:

- “Hücrelerin çevreleriyle olan ilişkileri gözlenemez.
- T hücreden zengin lenfomalarda ufak bir monoklonal B hücre klonunun tanınması mümkün olmayabilir.
- T hücreli lenfomaların aberan bir antijen (- örneğin bir panT hücre belirleyicinin kaybı/ azalması) bulundurmadıkları sürece tanınması mümkün olmaz.
- Aberan bir T hücre immunfenotipi, her zaman bir malinite göstergesi olmayıp; enfeksiyöz mononukleoz, reaktif dermatoz, enflamatuvar hastalıklarda da görülebilir.
- Akış sitometrisi tekniği bu hücrelerin sıvı akışından geçirilmesini gerektirdiğinden, analizi sadece hücre süspansiyon çözeltileriyle sınırlandırır.
- Hodgkin hastalığında neoplastik hücre sayısının az olması nedeniyle de tanıda ASM kullanımının bir yararı olmaz. Dezavantajları nedeni ile ASM sonuçlarının daima ışık mikroskobu verileri ile birlikte değerlendirilmesi gerekir. Klinik veriler, moleküler/sitogenetik çalışmalar da verilerin değerlendirilmesinde yardımcı olan

unsurlardır. ASM, morfolojik olarak şüphelenilen çeşitli hastalıkları doğrulamakta, hastalık alt tiplerinin belirlenmesinde, ayırıcı tanıda seçenekleri azaltmada, kullanılabilir. Bazı durumlarda morfoloji bilinmese de tanısal değerlendirilebileceği savunulmaktadır.”



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL 2018-8037 kodlu proje ile desteklenmiştir ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır. Çalışma; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji-Hematoloji Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvar'ına, yürütüldü.

3.1. Alet ve Ekipman

- Beckman coulter (BC) NAVİOS, 3 LAZER / 10 RENK akım Sitometre Cihazı, (BC, USA)
- Vorteks Cihazı (Dragon Labs .MX-S ve HEİDOLPH)
- Kalibre edilmiş standart pipetler(20 µl, 100 µl, 2 ml)
- 10-100µl otomatik pipet (Gilson, ABD)
- Pipetör100-1000 µl otomatik pipet (Gilson,ABD)
- Süre ölçer
- 4°2-8°C Buzdolabı (Profilo, Türkiye)
- Navios sisteminde kaluza kullanılmaktadır.

3.2. Plastik Sarf Malzemeleri

- 10-100 µl Kalibre edilmiş standart pipet uçları (ISOLAB)
- 100-1000 µl Kalibre edilmiş standart pipet uçları (ISOLAB)
- Plastik akım sitometri test tüpleri 12x75 mm
- Süzgeç

3.3. Kitler ve Kimyasal Maddeler

Flow sitometrik analiz için yapılan çalışmada kullanılan kitler ve kimyasal maddeler;

1. Hücre yıkama işlemlerinde kullanılan İsoflow (BC, 41116015)
 - Disodyum EDTA0,38 g/L

- Potastumklorid.....0,40g/L
 - Monosodyum fosfat0,19g/L
 - Disodyumfosfat1,95g/L
 - Sodyum filorid0,30g/L
2. Akım sitometre cihazının günlük yıkama işlemlerinde kullanılan Clenz (BC,8448222)
 3. Distile su
 4. Optilyse C Lysing Solution (Beckman Coulter, USA)
 5. CD31 FITC, CD146 PC5, CD144 PE, CD34 ECD/PC7, CD133PC5, CD309PC7, (Beckman Coulter, USA)
 6. CD45 KO (Beckman Coulter, USA)

3.4. Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları

3.4.1. Endotel Hücrelerin Akım Sitometri ile Tanımlanması

Örneklerde lenfoid hücre dağılımı (T, B, NK) ile ayrıca AMLve endotelyal kök hücrelerdeki yüzey markırların ekspresyon düzeyi ve hücre sayıları hesaplandı. Çalışmada, CD31FITC(Clon: 5.6E), CD34 ECD/PC7(Clon: 581), CD144PE(Clon: TEA 1/31), CD309PC7(Clon: KDR-1), CD146 PC5(Clon: TEA 1/34),CD133 APC(Clon: W6B3C1)markırları kullanıldı.

3.4.2 Akım Sitometrinin Okuma ve Analiz İçin Hazırlanması

- Cihaz butondan açılır
- Cytometer on açılır.
- Navios yazılım açılır.
- Cihaza yıkama tüpleri verilir.
- Lazer ayarlarını kontrol etmek amacıyla, cihaz ayar boncukları cihazdan geçirilir.
- Cihazda önceden hazırlanmış olan ve her kullanımda optimize edilen hücre okuma protokolü / paneli kullanılarak hücresel verilerin elde edilmesi.
- Analiz; elde edilen hücresel verilerin ilgili program kullanılarak işlenmesi analiz edilmesi sonuçlandırılmasıdır.

3.4.3. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları;

1. Her bir kontrol ve hastadan alınan 100 µL kan örneği ayrı akım sitometri test tüplerine eklendi.
2. Her bir örnek için 2 test tüpü kullanıldı. 1. Tüpe; CD31FITC, CD34 ECD, CD144 A750, CD146 PC5, CD309 PC7, markerları 5 'er µL eklendi. 2. Tüpe ise; CD45 KO, CD34 PC7, CD38 A750, CD133 PE 5 'er µL eklendi. Her bir örnek sayısı kadar flow tüpünde hazırlandı. Solüsyonun tam karışabilmesi için iyice vortekslendi. 20 dk inkübasyon işlemi uygulandı.
3. Her bir örnekten alınan 100 µL kan örneği üzerine lizis solüsyonundan 0,5 mL eklendi ve elde edilen karışım karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Süre sonunda tüm örneklere 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem üç kez tekrarlandı.
6. Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz yapıldı.
7. Analiz, Beckman Coulter Navios model akım sitometre cihazı ve Kaluza yazılımı programı kullanılarak yapıldı.
8. Kullanılan 2 tüpteki örnekler analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı. FL1' de kompanzasyon sıfır olarak seçildi ve okuma bir milyon hücre sayımı ile yapıldı.
9. Akım sitometrik analiz sonrasında hematopoetik ve endotel kök hücreler seçilerek sayısı hesaplandı.
10. Kullanılan kontroller için de aynı işlem basamakları kullanıldı.

3.4.4. Hasta Örnekleri ve Kontrollerde Endotel Hücre Sayısının Akım Sitometri ile Hesaplanması

Bu amaçla her bir kan örneğinden bir milyon hücre akım sitometri cihazında saydırıldı. Bu sayıdaki hücre içerisinde mevcut olan endotel kök hücre hücre oranı kapılama yapılarak sayı olarak hesaplandı.

Endotel Kök Hücre Sayısının Hasta ve Kontrollerde Hesaplanması

CD309 hücre sayısının hesaplanması; Hem hasta hem de kontrol örneklerinde aynı şekilde kapılama yapıp toplam hücre sayısından CD309 pozitif hücre değerleri verildi. CD45 dim kapılanır. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34⁺ hücre alanı kapılanıp CD309 /SS grafiinde CD34 kapısı alınıp CD34⁺ hücreler içinden CD309⁺ hücre değeri bulunup toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

CD146+,CD31⁺ hücre değerleri hesaplamak için; CD45 dim kapılanır. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34⁺ hücre alanı kapılanıp, CD31+CD146+ ortak pozitif olan bölümdeki sayı hesaplandı

CD34⁺ hücre değerleri hesaplamak için; CD34⁺ hücre değeri verilirken, CD45 dim kapılanır ve CD34/SS grafiinde kapısı seçildi. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34⁺ hücre alanı kapılanıp ve toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

CD144⁺ CD146+ hücre değerleri hesaplamak için; CD45 dim kapılanır. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34⁺ hücre alanı kapılanıp, CD144+CD146+ ortak pozitif olan bölümdeki sayı hesaplandı

CD38-,CD34⁺ hücre değerleri için; CD45 dim kapılanır. Daha sonra CD38- kısım kapılandı, CD38⁻ hücreler içinden CD34⁺ hücre değeri bulunup toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

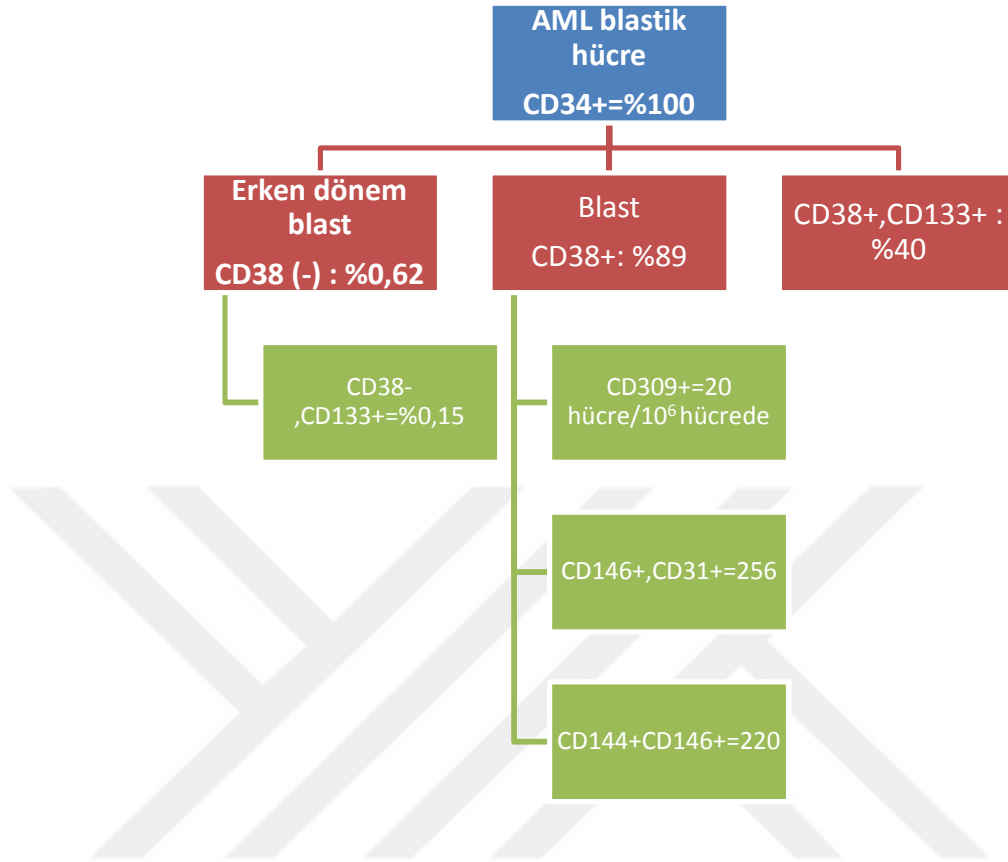
Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve Q-Q grafikleri ve Shapiro-wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için Mann-Whitney U testi uygulandı. Nicel veriler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Veriler TurcosaCloud (TurcosaLtdCo, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımında gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada AML blastik hücrelerin karakterizasyonu yapılarak blastlar içerisinde yer alan endotel kök hücrelerin yöntem kısmında belirtilen protokole göre sayımı akım sitometri yöntemi ile yapıldı. Bu işlem için blast bölgesinde CD45 dim kapısında bir milyon (1×10^6) hücrenin akım sitometri cihazından geçmesi ile gerçekleştirildi (şekil 4.1).

Blastik hücrelerden analiz grupları;

- CD38- CD34+hücreler,
- CD34+/CD133+ hücreler,
- CD34+/CD309+ (VEGFR-2) hücreler,
- CD34+/CD31+,CD146+ hücreler ve CD34+/CD146+,CD144+ hücrelerin bir milyon hücre içindeki sayısal değerleri kapılama ve analiz işlemi ile bulundu(şekil 4.1).



Şekil 4.1. AML blastik hücrelerinde endotel kök hücre sayımı iş akış şeması

4.1. Kontrol Grubunun Özellikleri

Erişkin kontrol grubu 18-71 yaş aralığında, median yaşı 45 olan, 11'si kadın ve 18'i erkek toplam 24 (periferik kan) + 5 (kemik iliği) kişiden oluştu. Kontrol grubunda yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 4,1'de gösterildi. Ayrıca kemik iliği örneği analiz edilen sağlıklı 5 kişi kontrol grubuna eklendi (Tablo 4.1'de). Kontrol grubunda yer alan kişilerin tamamında eşlik eden bir hastalık yoktu. Bu grupta endotel kök hücre sayımı periferik kan örneği ve kemik iliği kullanıldı. Kontrol kemik iliği grubunda tanısal amaçlı laboratuvara gönderilen ve blast oranı <%1 çıkan örnekler seçildi.

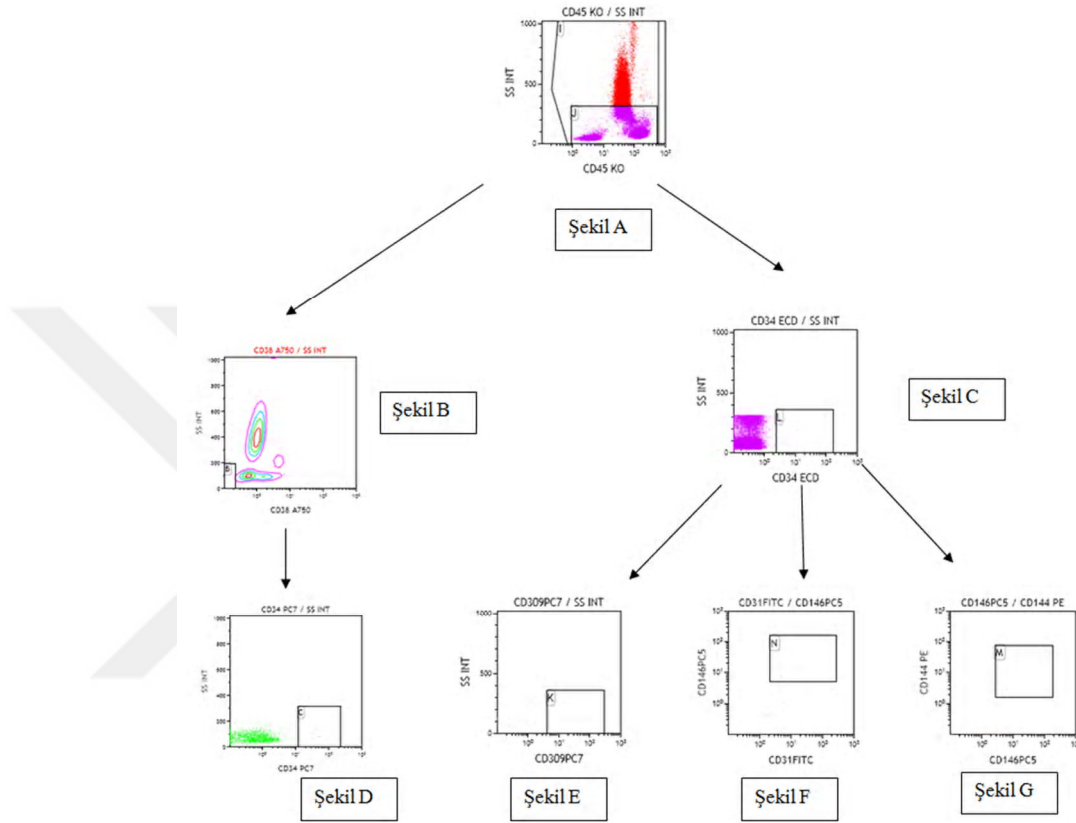
Tablo 4.1. Sağlıklı kontrol grubunun yaş ve cinsiyet göre dağılımı

Kontrol Adı	Kullanılan Örnek	Yaş	Cinsiyet
Kontrol 1	Periferik kan	65	E
Kontrol 2	Periferik kan	62	E
Kontrol 3	Periferik kan	72	K
Kontrol 4	Periferik kan	35	E
Kontrol 5	Periferik kan	35	E
Kontrol 6	Periferik kan	53	E
Kontrol 7	Periferik kan	45	K
Kontrol 8	Periferik kan	57	E
Kontrol 9	Periferik kan	55	E
Kontrol 10	Periferik kan	32	E
Kontrol 11	Periferik kan	45	E
Kontrol 12	Periferik kan	53	E
Kontrol 13	Periferik kan	36	E
Kontrol 14	Periferik kan	62	K
Kontrol 15	Periferik kan	40	K
Kontrol 16	Periferik kan	63	E
Kontrol 17	Periferik kan	55	E
Kontrol 18	Periferik kan	67	E
Kontrol 19	Periferik kan	72	K
Kontrol 20	Periferik kan	31	K
Kontrol 21	Periferik kan	74	E
Kontrol 22	Periferik kan	69	E
Kontrol 23	Periferik kan	63	E
Kontrol 24	Periferik kan	47	K
Kontrol Ek Grubu			
Kontrol 25	Kemik iliği	43	K
Kontrol 26	Kemik iliği	76	E
Kontrol 27	Kemik iliği	59	K
Kontrol 28	Kemik iliği	54	K
Kontrol 29	Kemik iliği	37	K

4.2. Kontrol Grubunda Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Ekspresyon Analiz ve Endotel Kök Hücre Miktarının Ölçülmesi

Bu çalışmada yöntem kısmında belirtilen protokole göre blastik hücrelerde yüzey ekspresyon analizi ile CD133, CD34 ve CD38 ekspresyonları ölçüldü. Ayrıca ilişkili yüzey markırları kullanılarak endotel kök hücre sayımı yapıldı. Sayım işleminde blast bölgesine (CD45 Dim kapısı) kapılama yapılarak akım sitometride bir milyon (1×10^6) hücre geçmesi beklendi. CD309+ (VEGFR-2) hücreler, CD31+,CD146+ hücreler ve CD146+/CD144+ hücrelerin, bir milyon hücre içindeki sayıları bulundu.

Toplam 29 kontrolde bir milyon hücre saydırılarak şekil 4.2’de gösterildiği gibi kapılama ile analiz yapılarak elde edilen hücre sayıları tablo 4.2 ve tablo 4.3 de listelendi.



Şekil 4.2. Endotel kök hücrelerin akım sitometri ile analizive kapılama stratejisi

şekil A: CD45 Dim bölgesi **şekil B:** CD38- hücre bölgesi, **şekil C** CD34+ hücre bölgesi, **şekil D:** lösemik kök hücre sayısı, **şekil E:** CD309+ hücre sayısı, **şekil F:** CD31+,CD146+ sayısı **şekil G:** CD146+,CD144+ sayısı

Tablo 4.2. Kontrol grubunda akım sitometri ile analiz sonucu bir milyon hücre içindeki endotel kök hücre sayıları

Hasta Adı	CD146 ve CD144 ortak +	CD309+	CD31+,CD146+
Kontrol 1	9	6	10
Kontrol 2	38	2	40
Kontrol 3	12	4	13
Kontrol 4	16	10	25
Kontrol 5	13	9	14
Kontrol 6	32	20	30
Kontrol 7	36	10	38
Kontrol 8	26	26	28
Kontrol 9	32	14	35
Kontrol 10	14	5	15
Kontrol 11	6	1	6
Kontrol 12	7	3	7
Kontrol 13	6	3	6
Kontrol 14	11	5	11
Kontrol 15	5	2	5
Kontrol 16	8	4	8
Kontrol 17	4	5	4
Kontrol 18	40	24	40
Kontrol 19	6	3	6
Kontrol 20	2	3	2
Kontrol 21	30	8	30
Kontrol 22	8	7	8
Kontrol 23	10	6	10
Kontrol 24	10	8	10

Tablo 4.3. Kontrol ek grup (kemik iliği) da bir milyon hücre içerisindeki endotel kök hücre sayıları.

Kemik iliği Kontrol	CD146 ve CD144 ortak +	CD309 +	CD31,CD146 ortak +
Kontrol 25	61	55	60
Kontrol 26	53	51	58
Kontrol 27	63	55	65
Kontrol 28	64	53	61
Kontrol 29	60	50	62

Hücre sayımında kullanılan kapılama işlem basamakları;

- A: Hücreler önce CD45 kapısına alınır.
- B: Seçilen hücrelerde CD38- kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.
- C: Seçilen hücrelerde CD309+ kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.
- D: Seçilen hücrelerde CD144+,CD146+ ortak pozitif kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.
- E. Seçilen hücrelerde CD31+,CD146+ ortak pozitif kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.

4.3. Akut Miyeloid Lösemilerin Akım Sitometre İle Karakterizasyonu

4.3.1. AML Hastaları ve Özellikleri

Çalışmaya kemik iliği örneğinde akım sitometrik immün fenotiplendirmede %50 ve üzeri blastik hücreye rastlanan 24 erişkin yeni tanı AML hastası dâhil edildi (tablo 4.4). AML hastalarının 16'sı 23-70 yaş aralığında ve medyan yaşı 45 olan kadın hasta, 8'i medyan yaşı 51,1 olan erkek hasta idi. Hastaların yaş, cinsiyetleri ve yaşam durumları tablo 4.4 gösterildi.

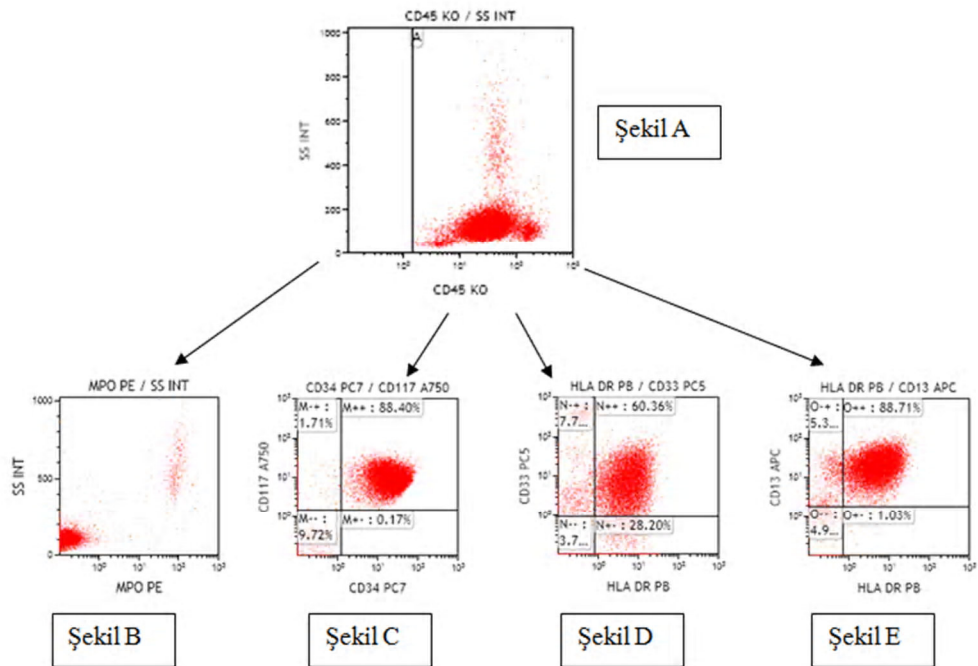
Tablo 4.4. Çalışmaya dâhil olan AML hastaların yaş, cinsiyet ve yaşam durum listesi

Hasta Adı	Yaş	Cinsiyet	Blast Yüzdesi	Yaşam
Hasta 1	93	K	%90	Ö
Hasta 2	23	E	%90	Y
Hasta 3	43	K	%85	Ö
Hasta 4	53	K	%98	Ö
Hasta 5	27	K	%75	Y
Hasta6	64	E	%65	Y
Hasta 7	65	E	%65	Y
Hasta 8	40	K	%90	Ö
Hasta9	66	K	%80	Ö
Hasta 10	45	E	%55	Ö
Hasta 11	66	E	%55	Y
Hasta 12	44	K	%90	Ö
Hasta 13	21	K	%75	Y
Hasta 14	47	K	%58	Ö
Hasta 15	28	K	%60	Y
Hasta 16	42	E	%90	Y
Hasta 17	60	K	%88	Ö
Hasta 18	31	K	%80	Ö
Hasta 19	45	E	%75	Y
Hasta 20	33	K	%50	Y
Hasta 21	59	E	%93	Y
Hasta 22	42	K	%89	Ö
Hasta 23	59	K	%60	Y
Hasta 24	71	K	%98	Ö

Ö: Ölü K: Kadın, E: Erkek,

4.3.2. AML Hasta Örneklerinde Blastik Hücrelerin Akım Sitometri İle Karakterizasyonu

Çalışmaya dâhil edilen ve AML tanısı alan 24 hastada akım sitometri ile AML panelinde fenotiplendirme yapıldı. AML panelinde CD117, CD13, CD33, MPO, HLA-DR antikorları yer aldı (Şekil4.3). Bu antikorlarla blastik hücre grubundaki yüzey ekspresyonları tablo 4.5 te verildi.



Şekil 4.3. AML hasta örneğinde akım sitometri ile immün fenotiplendirme,

A: CD45 bölgesi **Şekil B:** MPO- görüntüsü **Şekil C** CD34+,CD117+hücre oranı, **Şekil D:** CD33+,HLA DR+hücre oranı, **Şekil E:** CD13+,HLA DR+hücre oranı,

Tablo 4.5. AML hasta örneklerinde blastik hücrelerin akım sitometri ile karakterizasyonu

Hasta Adı	CD117	CD13	CD33	MPO	HLA DR
Hasta 1	%90	%90	%90	Negatif	%90
Hasta 2	%90	%90	%90	Negatif	%5
Hasta 3	Negatif	%85	%85	Negatif	%50
Hasta 4	%98	%98	%98	%98	%40
Hasta 5	%75	%75	%75	%75	%20
Hasta6	%65	%65	%65	%65	%65
Hasta 7	%65	%65	%65	Negatif	%65
Hasta 8	%80	%80	%80	Negatif	%5
Hasta 9	%80	%80	%80	%80	%15
Hasta 10	%55	%55	%55	%55	%40
Hasta 11	%55	%55	%55	%55	%55
Hasta 12	%90	%90	%90	Negatif	Negatif
Hasta 13	%75	%75	%75	%75	%75
Hasta 14	%58	%58	%58	%58	%58
Hasta 15	%60	%60	%60	Negatif	Negatif
Hasta 16	%90	%90	%90	%60	Negatif
Hasta 17	%88	%88	%88	%	Negatif
Hasta 18	Negatif	%80	%80	Negatif	%5
Hasta 19	%75	%75	%75	%45	Negatif
Hasta 20	%40	%72	%72	%40	%10
Hasta 21	%60	%93	%93	%45	Negatif
Hasta 22	%30	%90	%90	%90	Negatif
Hasta 23	Negatif	%60	%60	%60	Negatif
Hasta 24	%60	%90	%90	%90	%4

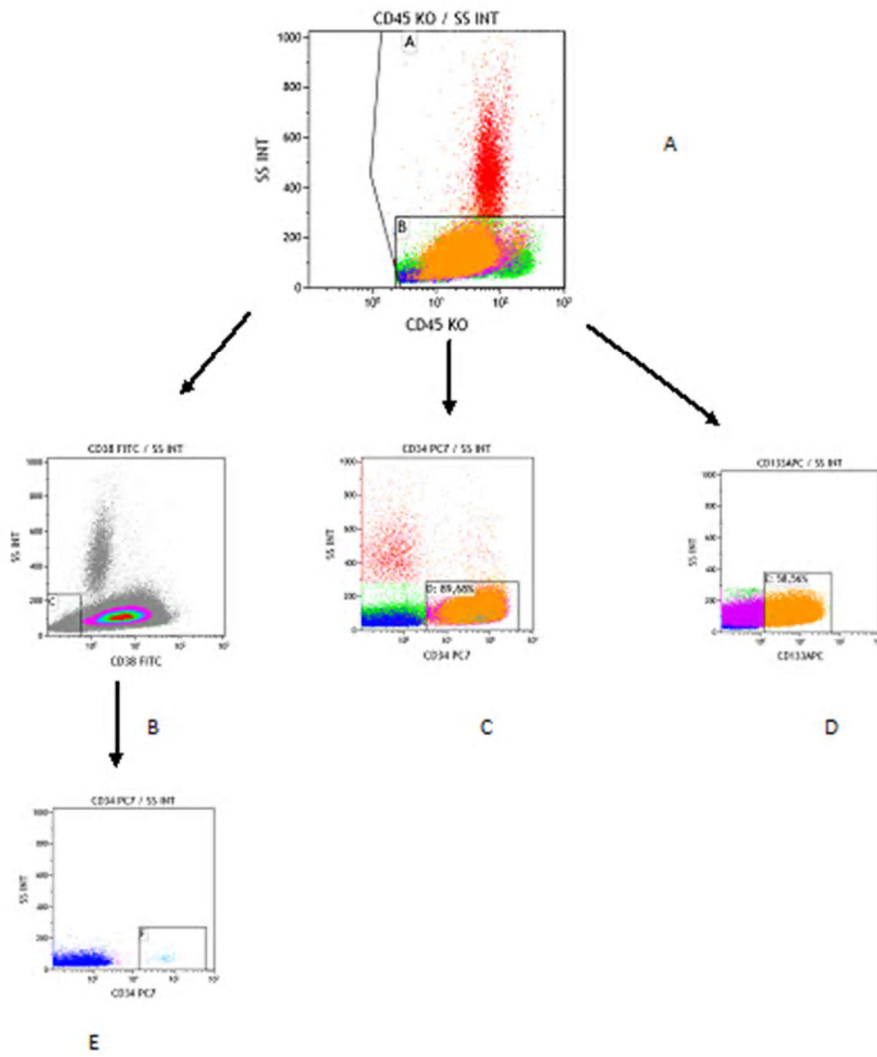
4.4. Hasta örneklerinde (AML Blastlarda) Lösemik Kök Hücreler (CD38-,CD34+ Hücre) ve CD133+ Ekspresyon Durumu

24 hasta örneğinde (CD38-,CD34+ hücre) Lösemik kök hücre sayısı ölçüldü. Medyan değer 61,5-1550 hücre aralığında medyan değer 610 olarak bulundu (Tablo 4.6)

Tablo 4.6. Hasta örneklerinde blastlardaki bir milyon hücre içerisindeki CD34+,CD133+ hücreler ve lösemik kök hücre sayısı (CD38-,CD34+)

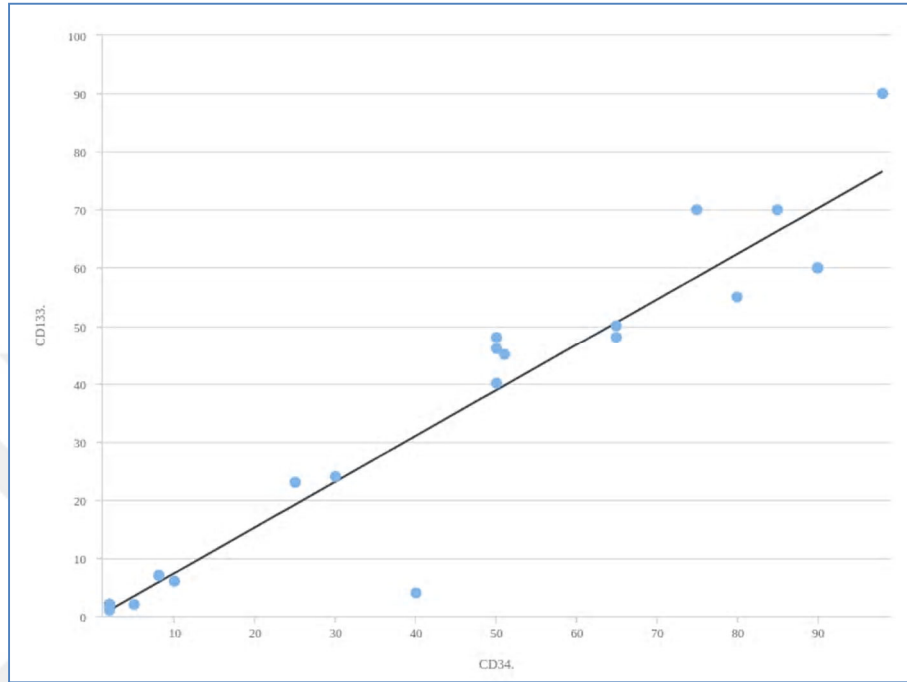
Hasta Adı	CD34	CD133	CD38-CD34+
Hasta 1	%90	%60	1300
Hasta 2	%90	%60	1400
Hasta 3	%85	%70	4400
Hasta 4	%98	%90	1400
Hasta 5	%75	%70	668
Hasta6	%65	%48	2200
Hasta 7	%50	%48	1880
Hasta 8	%80	%55	640
Hasta 9	%65	%50	180
Hasta 10	%51	%45	146
Hasta 11	%50	%40	992
Hasta 12	%30	%24	1600
Hasta 13	%40	%4	1852
Hasta 14	%50	%46	1800
Hasta 15	%25	%23	500
Hasta 16	%5	%2	8
Hasta 17	%10	%6	52
Hasta 18	%2	%2	90
Hasta 19	%8	%7	12
Hasta 20	%2	%2	140
Hasta 21	%2	%1	40
Hasta 22	%2	%2	580
Hasta 23	%2	%2	50
Hasta 24	%2	%2	24

Çalışmaya dâhil edilen 24 hastada blastik hücre karakterizasyonu sonucunda CD34+lığı %3-%100 Aralığında bulundu (Tablo 4.5). Örneklerde medyan CD34 ekspresyonu %40,7 ve CD133 ekspresyonu %31,5 bulundu. Ayrıca her örnek için yapılan korelasyon analizinde Şekil 4,4'te ise 1 nolu hastanın akım sitometrik analiz sonuçları örnek olarak gösterildi.



Şekil 4.4. CD45 Dim de yerleşik blastlardaki CD34+ ve CD133+ oranının hesaplanması ve CD38-,CD34+ hücre sayısının analiz yöntemi

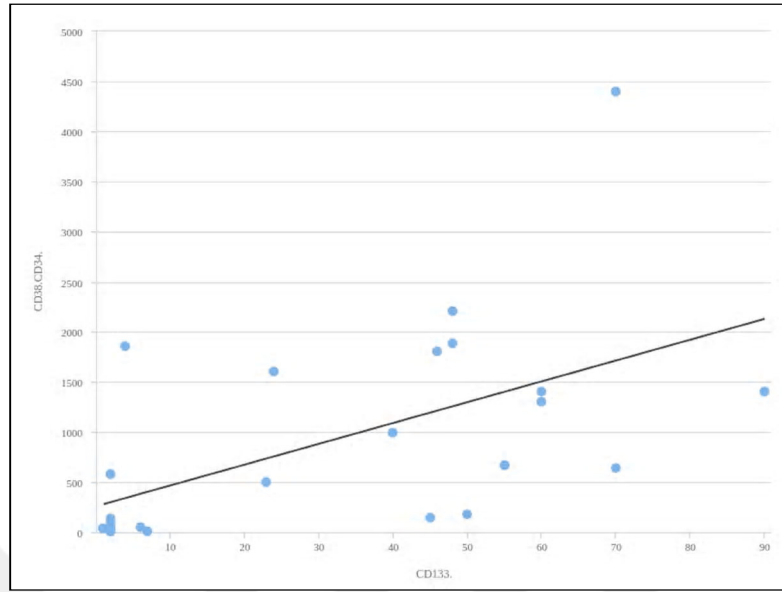
Hasta grubunda, ölçülen CD34+,CD133+, hücrelerin oransal karşılaştırılması ve CD34+ , CD133+ oranları arasında pozitif yönlü bağlantı olduğu gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Blastik hücrelerde elde edilen CD34+ ve CD133+ hücre yüzdeleri korelasyon analizi

AML Blastlarda Lösemik Kök Hücre (CD38-,CD34+) ve CD133+ Ekspresyon Durumu

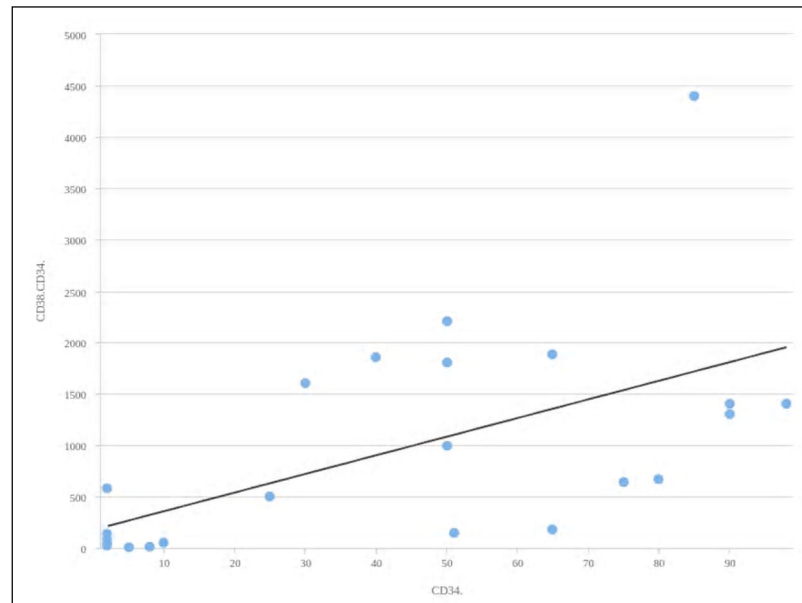
Blastik hücreleri analiz edilen 24 hastada blast içerisinde yer alan erken dönem kök hücre karakterizasyonu yapıldı. (CD38-,CD34+) sayılarının, CD133+ yüzdeleri arasında güçlü, pozitif yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon vardır.(Şekil 4.6) ($p<0.001$).



Şekil 4.6. Blastik hücrelerde (CD38-, CD34+), CD133+ ekspresyon durumu

AML Blastlarda Lösemik Kök Hücre (CD38-,CD34+) ve CD34+ Ekspresyon Durumu Arasındaki İlişkinin Gösterilmesi

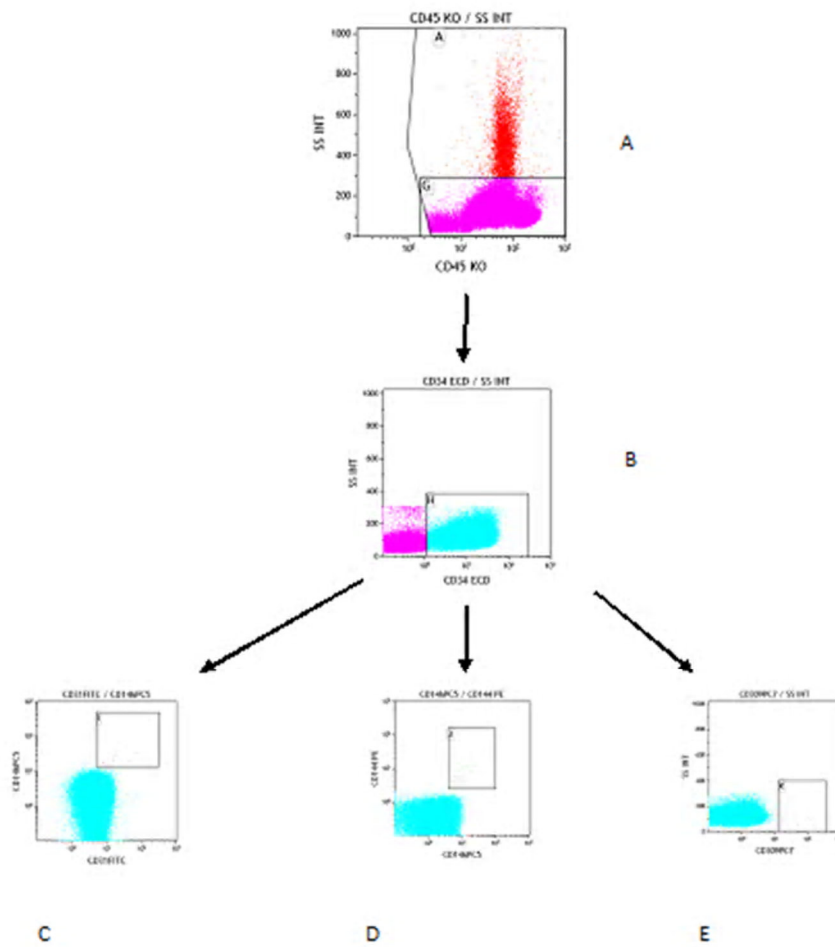
Blastik hücreleri analiz edilen 24 hastada blast içerisinde yer alan erken dönem kök hücre karakterizasyonu yapıldı. (CD38-, CD34+) sayılarının, CD34+ yüzdeleri arasında güçlü, pozitif yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon vardır (Şekil 4.7) ($p < 0.001$).



4.5. AML Blastlarda Endotel Kök Hücre Sayısının Hesaplanması

Hasta grubunda, CD34+ kaplımalar yapılarak ölçülen CD133+, CD309+, CD31+/CD146+, CD146+/CD144+, hücrelerin sayısal değerleri Tablo 4.6'de gösterildi. Şekil 4.8'de ise 2 nolu hastanın akım sitometrik analiz sonuçları örnek olarak gösterilmiştir.

Toplam 24 hastada blastlardan bir milyon hücre saydırılarak Şekil 4.8 gösterildiği gibi analiz yapılarak elde edilen sayılar tablo 4.6 da listelendi.



Şekil 4.8. Endotel kök hücrelerin akım sitometri ile analizi ve kapılama stratejisi.

Şekil A: CD45(Dim) deki blast bölgesi **Şekil B:** CD34+ Hücre Bölgesi **Şekil C:** Blastlardaki CD309+ hücre sayısı, **Şekil D:** Blastlardaki CD144+,CD146+, **Şekil E:** Blastlardaki CD146 +,CD31+ hücre sayısı,

Kapılama stratejisinde kullanılan işlem basamakları;

A: Hücreler önce CD45 Dim blasta kapısı alınır.

B: Seçilen blastik hücrelerde CD34+ hücrelerin kapısı alındı.

C: Seçilen blastik hücrelerde CD309+ kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.

D: Seçilen balastik hücrelerde CD144+,CD146+ ortak pozitif kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.

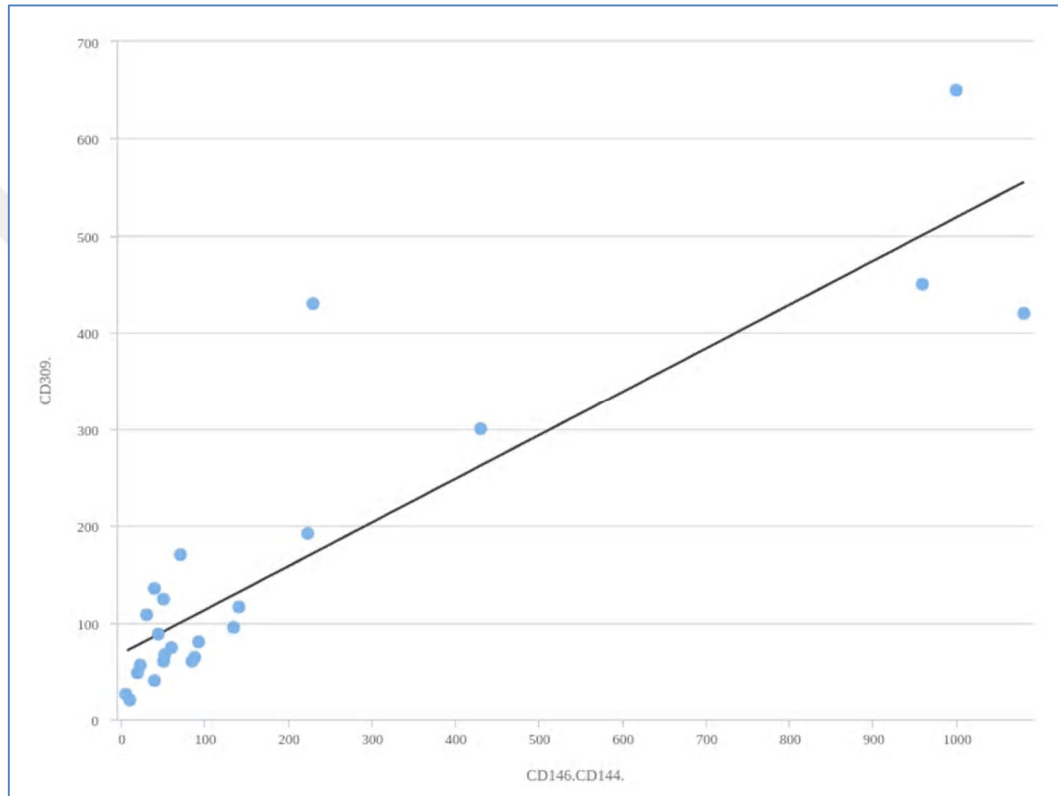
E. Seçilen balastik hücrelerde CD31+,CD146+ ortak pozitif kapısında bulunan hücrelerin sayımı yapıldı.

Tablo 4.7 Blastik hücrelerde endotel kök hücre sayım sonuçları

Hasta	Blastalarda endotel kök hücre sayısı 1×10^6 hücre		
	CD146+CD144+	CD309+	CD31+CD146+
Hasta 1	40	135	45
Hasta 2	20	48	62
Hasta 3	52	67	63
Hasta 4	135	95	110
Hasta 5	92	80	98
Hasta 6	50	60	40
Hasta 7	430	300	420
Hasta 8	230	430	240
Hasta 9	50	124	47
Hasta 10	60	74	46
Hasta 11	224	192	64
Hasta 12	140	116	132
Hasta 13	6	26	8
Hasta 14	1080	420	1630
Hasta 15	1000	650	650
Hasta 16	40	40	65
Hasta 17	10	20	34
Hasta 18	960	450	900
Hasta 19	30	108	99
Hasta 20	44	88	126
Hasta 21	22	56	20
Hasta 22	84	60	62
Hasta 23	70	170	160
Hasta 24	88	64	80

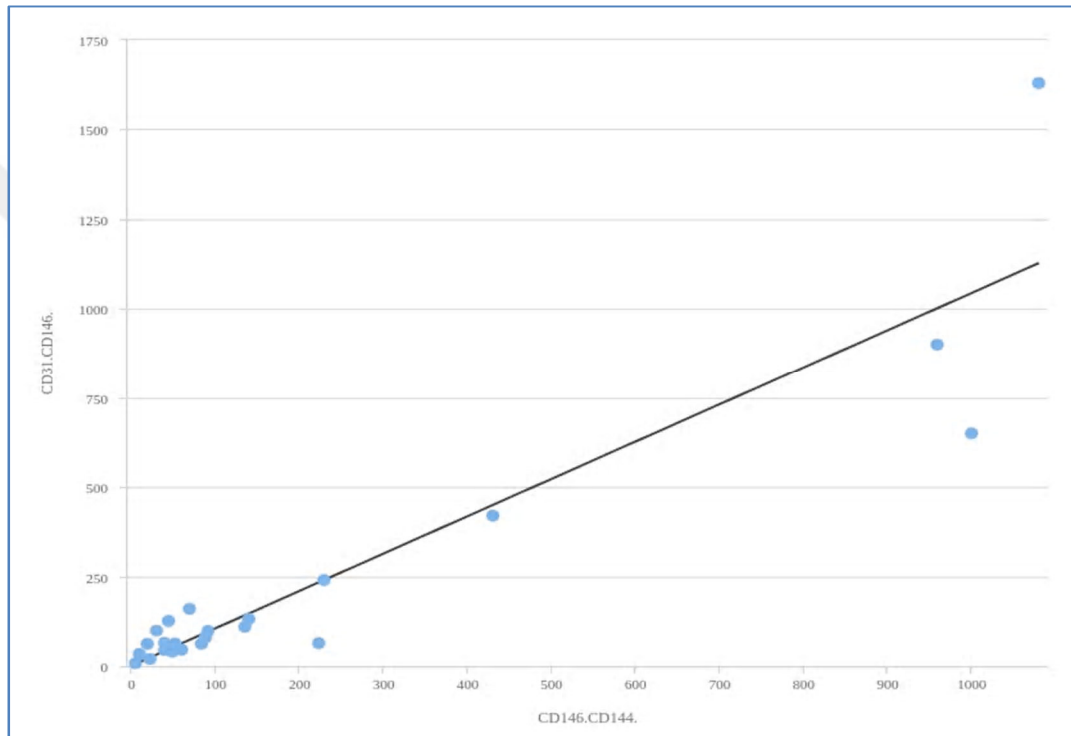
- **Endotel Kök Hücrelerde (CD309+) ve (CD146+ CD144+) Hücre Sayılarını Karşılaştırılması**

Blastik hücreleri analiz edilen 24 hastada blast içerisinde yer alan endotel kök hücre karakterizasyonu yapıldı. Endotel kök hücre grubunda yer alan hücrelerde CD309+ ile C144+,CD146+ hücre sayıları arasında güçlü, pozitif yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon vardır (Şekil 4.9) ($p<0.001$).



- **Endotel Kök Hücrelerde (CD31+CD146+) ve (CD146+CD144+) Hücre Sayılarını Karşılaştırılması**

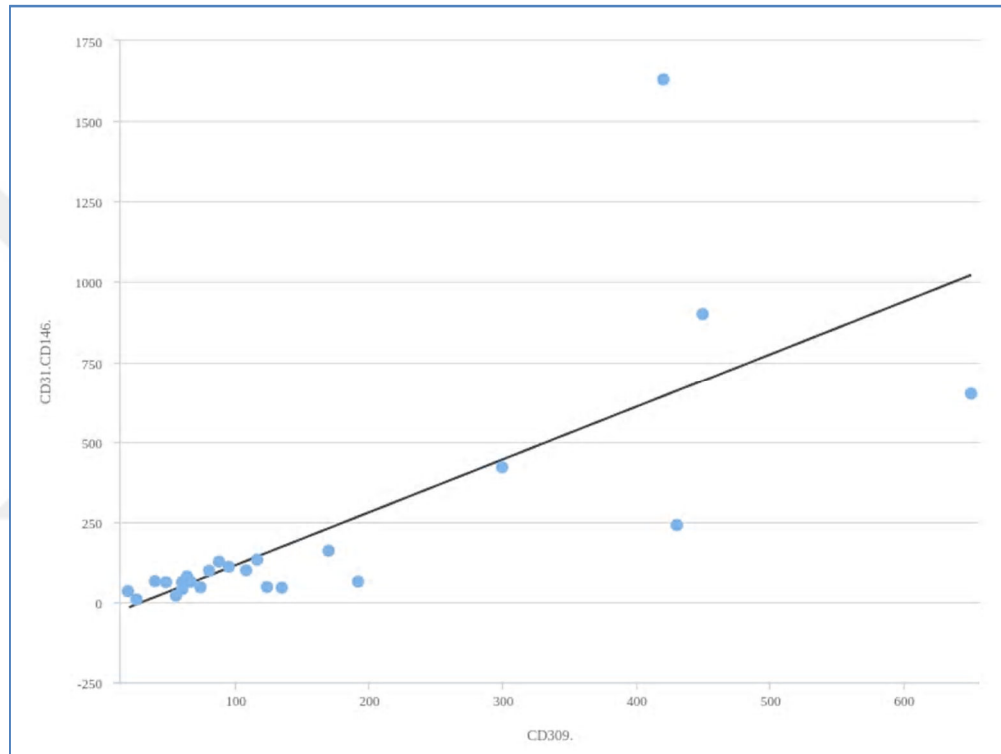
Blastik hücreleri analiz edilen 24 hastada blast içerisinde yer alan endotel kök hücre karakterizyonu yapıldı. (CD31+CD146+), (C144+,CD146+) sayıları arasında lineer bir bağlantının olduğu gösterildi (Şekil 4.10) ($p<0.001$).



Şekil 4.10. Blast içerisindeki endotel kök hücrelerde (CD31+CD146+) ve (CD146+CD144+) hücre sayılarını karşılaştırılması

- **Endotel Kök Hücrelerde (CD31+CD146+) ve CD309+ Hücre Sayılarını Karşılaştırılması**

Blastik hücreleri analiz edilen 24 hastada blast içerisinde yer alan endotel kök hücre karakterizyonu yapıldı. (CD31+CD146+), ile CD309+ sayıları arasında lineer bir bağlantının olduğu gösterildi (Şekil 4.11) ($p<0.001$).



Şekil 4.11. Blast içerisindeki endotel kök hücrelerde (CD31+CD146+), CD309+ hücre sayılarını karşılaştırılması

4.6. Hasta ve Kontrol Örneklerindeki Endotel Kök Hücre Sayısının Karşılaştırılması

- **CD146+CD144+ Endotel Kök Hücre Sayısının Hasta ve Kontrollerde Karşılaştırılması**

24 hasta örneğinde CD146+CD144+ endotel kök hücre sayısı ölçüldü. Medyan değer 40-203 hücre aralığındamedyan değer 65 olarak bulundu.

24 kontrol örneğinde CD146+CD144+ endotel kök hücre sayısı hesaplandı 6,3-29 hücre aralığında medyan değer 10,5 olarak bulundu (Şekil 4.12) ($p<0.001$).

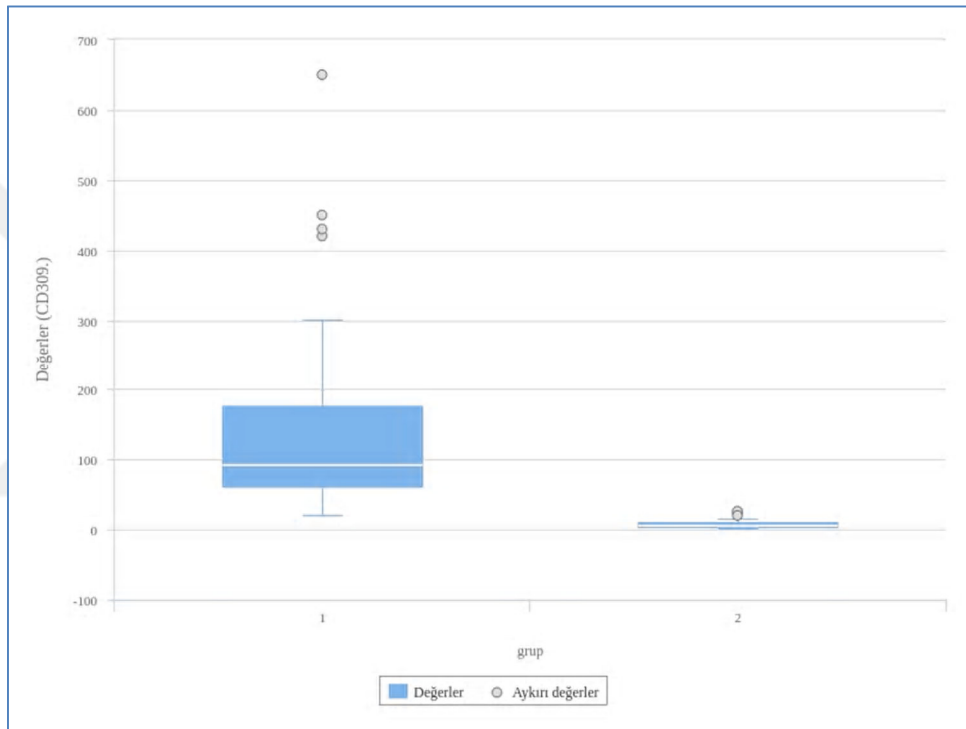


Şekil 4.12. Hasta ve kontrol örneklerindeki endotel kök hücre (CD146+CD144+ hücre) sayısının karşılaştırılması

- **(CD309+ hücre) Endotel Kök Hücre Sayısının Hasta ve Kontrollerde Karşılaştırılması**

24 hasta örneğinde CD309+ endotel kök hücre sayısı ölçüldü. Medyan değer 60-186 hücre aralığında medyan değer 91,5 olarak bulundu.

24 kontrol örneğinde CD309+ endotel kök hücre sayısı hesaplandı 3-9,8 hücre aralığında medyan değer 5,6 olarak bulundu (Şekil 4.13) ($p<0.001$).

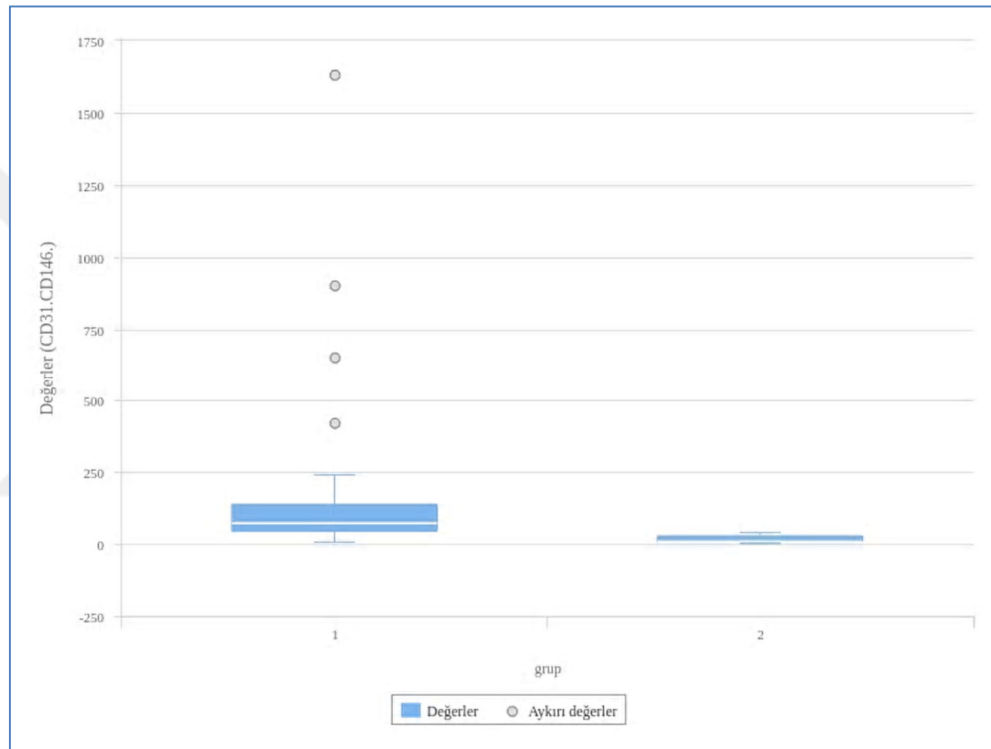


Şekil 4.13. Hasta ve kontrol örneklerindeki endotel kök hücre (CD309+ hücre) sayısının karşılaştırılması

- **(CD31+CD146+ hücre) Endotel Kök Hücre Sayısının Hasta ve Kontrollerde Karşılaştırılması**

24 hasta örneğinde (CD31+CD146+ hücre) endotel kök hücre sayısı ölçüldü. Medyan değer 46,3-153 hücre aralığında medyan değer 73,0 olarak bulundu.

24 kontrol örneğinde (CD31+CD146+ hücre) endotel kök hücre sayısı hesaplandı 6,25-29,5 hücre aralığında medyan değer 10,5 olarak bulundu (Şekil 4.14) ($p<0.001$).



Şekil 4.14. Hasta ve kontrol örneklerindeki endotel kök hücre (CD31+CD146+ hücre) sayısının karşılaştırılması

4.7. Endotel Kök Hücre Sayılarının Blastlarda ve Kontrollerde Karşılaştırılması,

Çalışmamızda endotelial kök hücre ve endotel hücre belirteçleri olarak tanımlanan (CD146+,CD144+), (CD31+CD146+) ortak pozitifliği hücre sayıları hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu. Bunun yanında yine CD 309+ karakterli öncül hücrelerin sayısı anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4.9).

Tablo 4.8 Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması

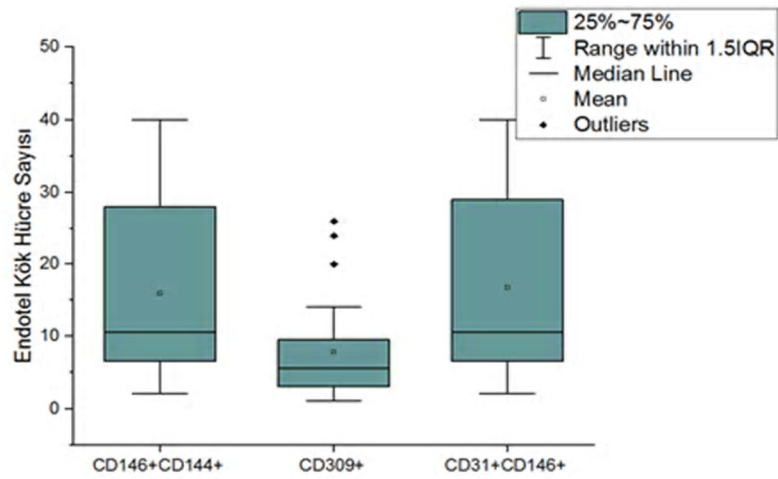
Endotel Kök Hücre Belirteçleri	GRUP		P
	HASTA(N)	KONTROL(N)	
CD146+,CD144+	65.0(40.0-203.0)	10.5(6.3-29.0)	<0.001
CD309+	92.0(60.0-187.0)	6.0(3.0-10.0)	<0.001
CD146+CD31+,	73.0(47.0-153.0)	11.0(6.3-30.0)	<0.001

4.8. Kontrol Grubundaki Endotel Kök Hücrelerin Aralarındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kontrol grubunda yer alan 24 kişinin endotel kök hücre ve endotel hücre belirteçleri olarak tanımlanan (CD146+,CD144+), (CD31+CD146+) ortak pozitifliği olan CD 309+ hücre sayıları sayıları arasında pozitif yönlü liner bir bağlantı istatistiksel olarak gösterildi (Tablo 4.10) (Şekil 4.16) .

Tablo 4.9. Kontrol Grubundaki Endotel Kök Hücrelerin Aralarındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi

Endotel kök hücre Belirteçleri	CD146+, CD144+	CD31+, CD144+	CD309+
CD146+, CD144+	1	0,998**	0,672**
CD31+, CD144+	0,998**	1	0,659**
CD309+,	0,672**	0,659**	1



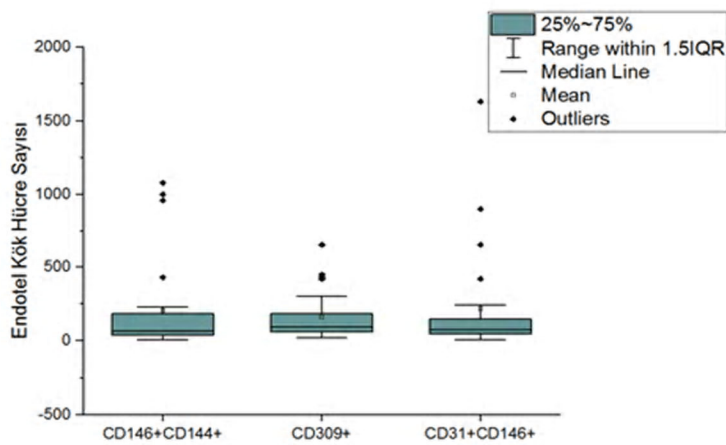
Şekil 4.15. Kontrol grubu EKH'in karşılaştırılması

4.9. Hasta Grubunda Endotel Kök Hücrelerin Aralarındaki Korelasyonun Araştırılması

Çalışmamızda hasta grubunda yer alan 24 kişinin endotel kök hücre ve endotel hücre belirteçleri olarak tanımlanan (CD146+,CD144+), (CD31+CD146+) ortak pozitifliği olan CD 309+ hücre sayıları sayıları arasında pozitif yönlü liner bir bağlantı istatistiksel olarak gösterildi (Tablo 4.11) (Şekil 4.17).

Tablo 4.10. Hasta grubundaki endotel kök hücre grupları aralarındaki korelasyonun değerlendirilmesi

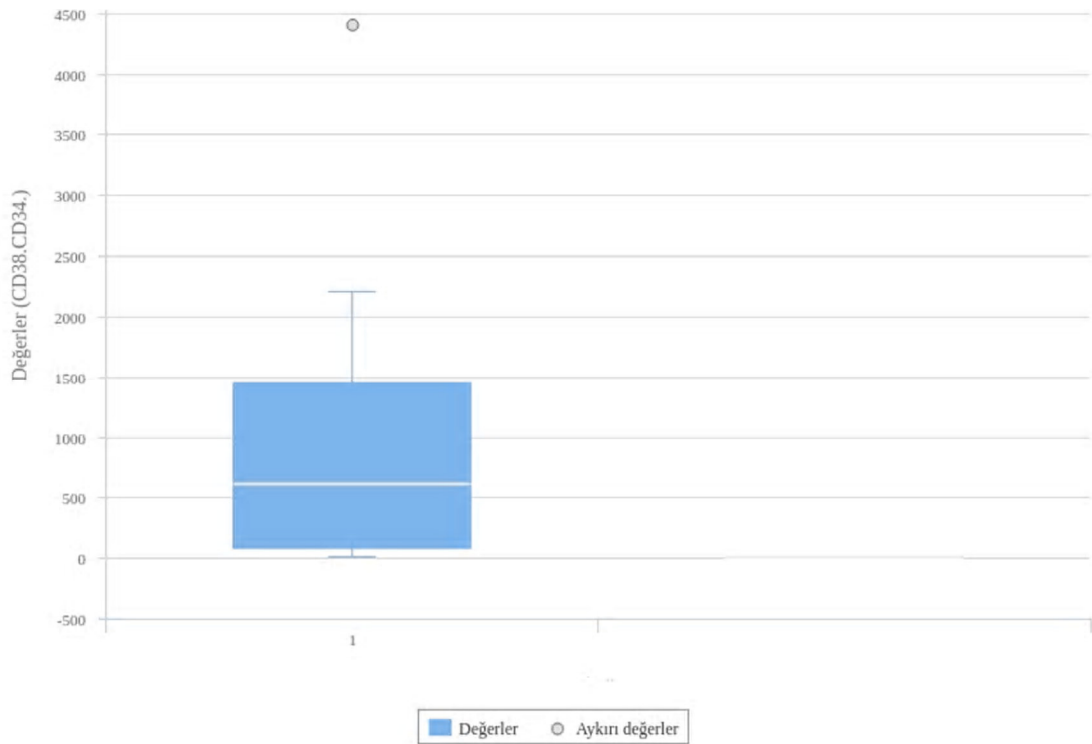
Endotel kök hücre Belirteçleri	CD146+, CD144+	CD31+, CD144+	CD309+
CD146+, CD144+	1	0.798**	0.792**
CD31+, CD144+	0.798**	1	0.770**
CD309+,	0.792**	0.770**	1



Şekil 4.16. Hasta grubu EKH'in karşılaştırılması

4.10. Hasta Örneklerinde Lösemik Kök Hücre Sayısının Değerlendirilmesi (CD38-,CD34+ hücre)

24 hasta örneğinde (CD38-,CD34+ hücre) lösemik kök hücre sayısı ölçüldü. Medyan değer 61,5-1550 hücre aralığında medyan değer 610 olarak bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.17. Hasta örneklerinde lösemik kök hücre (CD38-,CD34+ hücre) sayısının görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akım sitometre ile immün fenotiplendirme AML tanısında, subtiplendirmesinde ve blast yüzdesinin belirlenmesinde altın standart bir yöntemdir. Dolaşımdaki endotel kök hücrelerin tanımlanması için akım sitometri ile endotel kök hücreye yönelik panel hazırlanarak analiz yapılır. Bu amaçla AML panel antikoları dışında CD309 (VEGFR2), (anti-KDR), CD146, CD144, CD31 gibi endotel kök hücre yüzey markırlarına özgün antikoların kullanımı ile EKH sayısı % olarak hesaplanabilmektedir. EKH damarlanmada görevi olan, mezoderm kökenli kök hücreler olarak kabul edilir (Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al., 2010). EKH'ler kemik iliğinde olgunlaşır, dolaşıma çıkarak vasküler hasarın olduğu bölgelerde yoğunlaşır ve hasarın tamir edilmesinde ve damarlanmasının gelişiminde ön planda rol alırlar (Ferrara N. 2000). EKH'ler matürasyonunu tamamlayınca kemik iliğinden ayrılarak periferik dolaşımda endotel hücrelere dönüşebilirler (Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, et al., 2000). Ayrıca, endotel kök hücrelerin kanser doku metastazlarında rol aldığı bilinmektedir (Konukoğlu D, Turhan S. M. 2005).

AML hematoporetik bir kök veya progenitör hücrede mutasyonlar ile karakterize hem proporatif, difonksiyonel ve olgunlaşmamış miyoloid hücrelerin birikiminde gelişen bir kemik iliği kanseridir. AML sonucu oluşan anormal blastik hücreler nihayetinde kemik iliği gibi hematopoetik nişlere hükmeder ve anormal düzeyde periferik kan sayımına neden olurlar (Sargın D. 2003).

Bu çalışmada AML hastalarındaki metastaz eğiliminde etkin olduğu düşünülen endotel kök hücrelerin AML blastik hücresi içerisinde yüzdesi araştırıldı.

Araştırmamızda elde edilen bulguların hastalığa özgü olduğunun gösterilmesi için hasta grubundan elde edilen verilerin sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılması yapıldı. Literatürde sağlıklı kontrol hastalarındaki EKH sayılarına ilişkin çalışmada; Sibal ve arkadaşları ise CD34+ hücre sayısını $418 (242-853)/10^3$ hücre ve CD34+VEGF-R2+ hücre sayısını $14 (6-48) /10^6$ hücre olarak tespit etmişlerdir (Sibal L, Aldibbiat A,

Agarwal S, et al. 2009). Bizim çalışmamızda kontrol grubunun her 10^6 hücre sayımında, CD144+CD146+ ortak pozitif hücre sayısı 10.5 (6.3-29.0) iken, CD309 + hücre sayısı 6.0 (3.0-10.0), CD31+/CD146+ hücre sayısı ise 6.0 (3.0-10.0) olarak bulundu.

10 ⁶ hücre içerisindeki EKH sayısı	Bizim kontrol grubu	Sibal ve arkadaşlarının kontrol grubu (
CD34+CD309+ (VEGF-R2)	6.0 ± (3.0-10.0),	14± (6-48)

Literatürdeki kontrol gruplarında EKH sayılarındaki bu farklı veriler EKH sayılarının birçok faktörden etkilendiğini farklı özelliklerdeki popülasyonlarda farklı değerlerle karşılaşılabileceğini göstermektedir. Biz çalışmamızda periferik kandan 24 kontrol kişisi ve kemik iliği örneği olarak 5 kişi (blast oranı %<1) olan kontrol olarak dâhil edildi.

Tümör hücreleri gibi lösemi hücrelerinin kemik iliğindeki EKH bağı olduğunu gösterilmektedir. Klinik olarak AML’li hastaların kemik iliğinde anjiogenez ve EKH artış olduğu bildirilmiştir. Hussong ve diğ. 20 kontrol ile karşılaştırdığında tedavi edilmemiş AML’li 20 hastada vasküler yapıya yönelik markır kullanarak yaptıkları kemik iliği biyopsileri markır yoğunluğunu ölçtüler. AML olan hastaların vasküler markır ekspresyonunda anlamlı şekilde artış olduğunu gösterdiler (JW Hussong, 2000).

Çalışmamızda hasta ve kontrollerden elde edilen örneklerde EKH sayısal ölçümü (CD144, anti-Vascular Endothelial Cadherin), CD133, CD31, CD34, CD309, CD146, CD45 gibi markır taraması yapıldı. Hasta grubunda CD146+, CD144+ EKH sayısı 65.0 (40.0-203.0) kontrol grubunda 10.5 (6.3-29.0) olarak bulundu. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında CD146+/CD144+ hücre sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu anlaşıldı ($p<0.001$). Hasta grubu CD309+ EKH sayısı 92.0 (60.0-187.0) kontrol grubunda ise 6.0 (3.0-10.0) olarak bulundu. Hasta ve kontrol grubunda CD309+ EKH sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu anlaşıldı ($p<0.001$). Yeni tanı almış, tedavi edilmemiş AML hastalarında kontrol hastalarına kıyasla belirgin bir şekilde EKH sayısında artış olduğu gösterildi (Tablo 4.7).

Hasta grubu CD34+, CD31+, CD146+ hücre sayısı 73.0 (47.0-153.0) iken kontrol grubunda 11.0 (6.3-30.0) olarak bulundu. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda

CD34+, CD31+, CD146+ hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu anlaşıldı ($p < 0.001$).

EKH tanımlamasında üç yaklaşım öne çıkmaktadır (Yoder MC. 2009). **İlk yaklaşım** *in vitro* kültür yöntemidir ve dolaşımdaki mononukleer hücrelerin izole edilerek, çeşitli endotelial büyüme faktörü içeren fibronektin ile kaplı plaklara ekilmesi elde edilen hücreler analiz edilir. **İkinci yaklaşım** *in vitro* kültür ortamında koloni oluşturan hücrelerin sayılması esasına dayanır. **Üçüncü yöntem** ise monoklonal antikörlerin kullanımı ile akım sitometride EKH sayısının akım sitometri ile sayılmasıdır. Bu yöntemlerden üçüncüsü olan akım sitometri yöntemi ile kısa sürede dolaşımdaki EKH miktarı ve % si ölçülebilir. Peichev ve arkadaşları CD34+, CD133+, VEGFR-2+ markırları ile EKH hücrelerini göstermiştir (Peğchew M, et al., 2000). Sonraki çalışmalar da aynı markırları taşıyan hücrelerin dolaşımdaki EKH tanımladığını göstermiştir (Padro T, 2000). Bizim çalışmamızda bu antikörlere ek olarak (CD31+ CD146+), (CD144+ CD146+) paneli kullanıldı ve ortak pozitiflikleri arasında anlamlı lineer bir bağlantı olduğunu gösterdik (Tablo 4.9). Böylece değişik kapılama ve antikörlarla EKH hücrelere ulaşabileceğimizi gösterdik ve optimum analiz paneli oluşturmak için yeni kapılama yöntemleri geliştirdik (Tablo 4.8).

Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer bir veri blastlardaki CD133 düzeyi ile ilgilidir. Akut lösemili olan çocuklarda CD34+ blastlardaki CD133 ekspresyonunun, tedaviye yanıt ve hastalık prognozu üzerindeki etkisi 30 AML ve 30 ALL hastasında Mısırdı yapılmıştır. Sonuçlarda CD133 düzeyi sırasıyla AML de %66.7 ve ALL hastalarında %40 olarak gösterildi. AML'de nüks veya ölüm olan hastaların %80'inde CD133 ekspresyonu ortalama düzeyin üzerinde olduğu bildirilmiştir (Elgendi, Hoda Mohammed, et al., 2010). Bizde yaptığımız çalışmada CD34+ hücrelerin %70'i CD133+ hücrelerin oluşturduğu gözlemledik. Ancak çalışmamızın alanı klinik izlemi kapsamadığı için tedavi ve takip datalarına erişemedik. Klinik çalışmalara ön aşama olabilecek çalışmamız blastlarda CD34 ve CD133 oranları arasında pozitif yönlü bağlantı korelasyon olduğu gözlemlendi.

Bonnet ve Dick adlı araştırmacılar ise LKH'nin CD34+ CD38- yüzey markerlarına sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. LKH nadirdir, fakat bu hücreler lösemi oluştururlar. HKH ile LKH arasında hücre yüzey belirteçleri, apoptotik mekanizma ve kendisini yenileme yönünden farklılıklara sahiptirler. Yapılan son çalışmalar, kemoterapi tedavisinin ve

ardından nüksün bir fonksiyonu olarak LKH frekansında çarpıcı bir artış göstermiştir. Tanı konulan ve konvansiyonel kemoterapiden sonra nüksetmeyi takiben hastalardan eşleştirilmiş örnekler kullanarak, bu çalışmalar nüksetme sırasında LKH frekansında 10-100 kat artış göstermişlerdir (Padro T, 2000 Bonnet D, Dick JE 1997). EKH ile LKH arasında anlamlı bir bağlantı elde edemedik.

Hasta örneğinde CD38-CD34+ lösemik kök hücre sayısı 610 (61,5-1550) bulundu. Bu değer AML blastların %0.06 sını lösemik kök hücrenin oluşturduğunu gösterdi.

Sonuç olarak çalışmamız ile AML kemik iliği blast örneklerinde %0.06 oranında lösemik kök hücre olduğu ve %0.009 EKH olduğunu anlaşıldı. Bu veriler ışığında AML örneklerinde prognoz izlemi mümkün olabilir.

Sonuç olarak;

- CD133+ hücre oranı ile CD34+ hücre oran arasında pozitif yönlü ilişkinin olduğunu gözlemledik
- Endotel kök hücre sayısına erişimde değişik kapılama yöntemleri ile sonuca ulaşılacağı gösterdik,
- Blastlardaki endotel kök hücre sayısı, kontrol grubuna oranla sayısından daha fazla olduğunu gözlemledik,
- Ayrıca lösemi oluşumunda önemli bir etken olan lösemik kök hücrenin hasta grubunda sayısının çok yüksek olduğunu gözlemledik.

Endotel kök hücreler vasküler oluşumda rol alan kök hücre grubudur. Sonuç olarak, çalışmamızda AML kemik iliği blast örneklerinde endotel kök hücre artış olduğunu gözlemledik (Şekil 3). Bu bulgular AML'nin patogeneğinde endotel kök hücrelerinde rol alabileceği hipotezini destekler niteliktedir. EKH AML hücrelerini kemoterapiden koruma ve AML'nin tedavi planlamasında özellikle uzak metastaz olan durumlarda antianjiyogenik ajanların da aktif olarak tedavide rol alabileceği düşünülmektedir. Bu görüşü desteklemek için fazla sayıda klinik izlem içeren çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9: 1370–1376
- Arslan Ö. Lökoferez. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı, Çeşme 2004; ss 54-59.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221–228.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967.
- Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., Robbins, R.C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004; 428 (6983), 668-673.
- Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, et al. Highdose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood* 1987; 70: 869-872.
- Beksaç M. Akut miyeloid lösemi. *Türkiye Klinikleri Hematoloji* 2004;2:1-9.
- Beksaç, M. Kök Hücre. *Bilim ve Teknik*, 2010: 36-41.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763–776.
- Berfoot J., Mauelshagen C., Bruce D., Henderson C., Bownes M., Stem Cells. Science and Ethics 2nd edition. The Scottish Institute for Biotechnology Education, The University of Edinburgh 2005.
- Blau, H.M., Brazelton, T., Weimann, J. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001: 105 (7), 829-841.

- Bongso, A., Lee, E.H. Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. *Stem Cells: From Bench to Bedside*, 2005: 1.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-7.
- Burness, M.L, Sipkins, D.A. The stem cell niche in health and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 107-115.
- Clough L, Dugan N, Hulitt C, Et Al. Improved Method To Estimate Total Blood Volume For Erythrocytapheresis Using The Cobe Spectra In Pediatric Sickle Cell Patients (Abstrac). *J Clin Apher* 1998; 13: 81
- Davila, J.C., Cezar, G.G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T., Trosko, J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicological Sciences*, 2004: 79 (2), 214-223.
- Dorothy E. Lewis, Sarah E. Blatt Clinical Immunology (Fifth Edition) chapter 2 organization of immune system p 21.*
- Edelberg JM et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 2002; 90: 89-93.
- Elgendi, H. M., Mekawy, M. A., Wahab, S. E. A. A., et al. AC133 expression in Egyptian children with acute leukemia: impact on treatment response and disease outcome. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 2010: 32(4), 286-293
- Erden, S. Kök Hücreler ve Klinikte Kullanımları. *Journal of New Results in Engineering and Natural Science* 2014: (3), 1-8.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Rec Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35.
- Fisher VL, Abramovitz LZ. A brief overview of hematopoietic stem-cell transplantation. In: Kline RM, editor. *Pediatric hematopoietic stem cell transplantation*. Informa Healthcare, New York 2006; 2: 601-602.
- Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174.

- Gurman, G, Çelebi H, Üstün C, Arat M, İlhan O, Özcan M et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation as a second transplant for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 485–486.
- Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004; pp:2063-76.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109: 625–637.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Eng J Med* 2003; 348: 593–600.
- Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al. 2010 2010;55(14):e27-e129.
- Horn PA, Tesch H, Staib P, et al. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 1999;93(4):1435-7.
- Iwakura A et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003; 108: 3115–3121.
- İnan, S.,Özbilgin, K. Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 2009: 1, 11-23.
- JW Hussong, GM Rodgers ve PJ Shami, “Kanit akut miyeloid hastalarında anjiyogenez artışılösemi,” *Kan* , vol. 95, hayır. 1, s. 309-313, 2000.
- Kansu, E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2005: 36, 191-197.
- Karaşahin, T. (). Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012; 9 (1): 16-25.
- kaufman ds, hanson et, lewds rl, auerbach r, thomson ja., Hematopoietic colony-forming cells derived from human embriyonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci. USA*; 2001: 98: 10716-21.

- Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., Morrison, S.J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *cell*, 2005; 121 (7), 1109-1121.
- Konukoğlu D, Turhan S. M. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 42-48.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L. ve diğerleri. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine*, 2000; 6 (11), 1229-1234.
- Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006;31:589-95.
- Li, Z., Li, L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in biochemical sciences*, 2006; 31 (10), 589-595.
- Llavadot J et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bonemarrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399–405.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194–1201.
- Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., Gerson, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 1998; 176 (1), 57-66.
- Matsuo Y, Drexler HG. Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines. *Leuk Res* 1998;22:567-79.
- Matthew Smith, Michael Barnett, Renato Bassan et al: Adult Acute Myeloid Leukemia *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004; 49: 197-222
- Maynard, S., Swistowska, A.M., Lee, J.W., Liu, Y., Liu, S.T., Da Cruz, A.B. ve diğerleri. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*, 2008; 26 (9): 2266-2274.
- Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium,

Septembert 15-17, 1986. Second MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;30:1-15.

Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J. ve diğeri. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 2006; 107 (5): 1878-1887.

Ozcelik T, Topcuoglu P, Beksac M, Ozcan M, Arat M, Biyikli Z, et al. Mobilization of PBSCs with chemotherapy and recombinant human G-CSF: a randomized evaluation of early vs late administration of recombinant human G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44 (12): 779-783.

Özkalemkaş F. Akut lösemiler, İç Hastalıkları Kitabı, Ed. Dolar E, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul, 2005, s: 576-80.

Padro T, Ruiz S, Bieker R, Bürger H, Steins M, Kienast J, Büchner T, Berdel W E, Mesters RM. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:2637-44.

Patiroğlu T, Karakukcu M. Lymphocyte Trafficking in Transplantation. *Turkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 2009;2:20-25.

Pedchew M, Nadyer AJ, Peredra D, ZHU Z, Lane WJ; Wlldams M., etal. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating humanCD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.*; 2000; 95 (3): 952-8.

Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+)- cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952–958.

Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997;150:815-21.

Renato Bassan, Gemma Gatta, Carlo Tondini Roel Willemze: Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Jun 2004

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11

- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109:337-46.
- Rogelio Paredes-Aguilera, Lina Romero-Guzman, Norma Lopez-Santiago et al: Flow Cytometric Analysis of Cell-Surface and Intracellular Antigens in the Diagnosis of Acute Leukemia *American Journal of Hematology* 2001; 68:69–74.
- Rohwedel, J., Guan, K., Hegert, C., Wobus, A. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicology in vitro*, 2001; 15 (6): 741-753.
- Salter, A.B., Meadows, S.K., Muramoto, G.G., Himburg, H., Doan, P., Daher, P. ve diğeri. Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo. *Blood*, 2009; 113 (9): 2104-2107.
- Samir A. Kheiri, Thomas MacKerrell, Vincent R. Bonagura et al: Flow Cytometry With or Without Cytochemistry of Acute Leukemias?, *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1998; 34:82–86.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(8):811-22.
- Sargın D. Kök hücre ve kök hücre tedavisi. Türkiye XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, VII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. İstanbul, 12 Ekim 2003: 49-61.
- Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34+ cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol* 1999; 17:1227.
- Schumm, Michael, Peter Lang, and Rupert Handgretinger. *The EBMT Handbook*. Springer, Cham, 2019. Capt 15, p119
- Schwartz SM, Benditt EP. Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 1976; 73(2): 651–653.
- sciences BCL. *Flow Cytometry Catalog - Outside US Version* Life Sciences Division Headquarters. Available from: <https://www.beckman.com.tr/resources/reading-material/catalogs/flow-cytometry-catalog>. 2017 Erişim Tarihi 16.10.2019.

- Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal S, et al. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia*. 2009;52(8):1464-73.
- Smith, A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 2006; 441 (7097): 1060-1060.
- Smith, J.N., Calvi, L.M. Concise review: current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 2013; 31 (6): 1044-1050.
- Strauss Rg, Ciaverella D, Gilcher Ro, Et Al. An Overview Of Current Managment. *J Clin Apher* 1993;8:189-94
- Suda, T., Arai, F., Hirao, A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends in immunology*, 2005; 26 (8): 426-433.
- Teper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002;106: 2781-2786.
- Tepper OM, Sealove BA, Murayama T, Asahara T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. *J Med Invest* 2003; 51: 353-359.
- Travlos, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicologic pathology*, 2006; 34 (5): 548-565.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: 17.
- Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M. Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences: Academic Press, 2014.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., Aguila, H.L. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*, 2004; 103 (9): 3258-3264.
- Watt, F.M., Hogan, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000; 287: (5457), 1427.

- Wu, Y., Wang, J., Scott, P.G., Tredget, E.E. (). Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair and Regeneration*, 2007; 15: 18-S26.
- Yair Reisner, Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood*, 1 December 2011: 118, Number 23.
- Yılmaz, O., Uçar, M. Kök Hücre Çalışmaları ve Terapötik Klonlama. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 2006; 16 (1): 26-31.
- Yoder MC., (). Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost*; 2009; 7: 49-52.
- Zelenin, A.V., Poletaev, A.I., Stepanova, N.G., Barsky, V.E., Kolesnikov, V.A., Nikitin, S.M., Zhuze, A.L., Gnutchnev, N.V. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. 1984; 5: 348-354.
- Zur Nieden, N., Ruf, L., Kempka, G., Hildebrand, H., Ahr, H. (). Molecular markers in embryonic stem cells. *Toxicology in vitro*, 2001; 15 (4): 455-461.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KA EK 80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Akut lösemilerde blastik hücrelerin akım sitometre ile karakterizasyonu, ilişkili molekül ve enzimlerin tanımlanması		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 85		
	E-POSTA	sukriye@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Yavuz Köker		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İmmünooloji		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoji Anabilim Dalı Kayseri		
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
Gozlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz	Bireysel Araştırma Projesi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
İmza:

(Handwritten signature)



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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAFK-90)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Akut lösemilerde blastik hücrelerin akım sitometre ile karakterizasyonu, ilişkili molekül ve enzimlerin tanımlanması					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GONULLU OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SİGORTA						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ						
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU						
	ILAN						
	YILLIK BİLDİRİM						
	SONUÇ RAPORU						
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ						
DİĞER							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No :	2018/53	Tarih :	28.01.2018			
	<p>Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/bölünme gerektiren, ırsac, yetkilere ve yöneticileri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/bölünmenin başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına sözlüyle katılan etik kurul üye tamamının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.</p>						



KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI						
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI Prof. Dr. Sami Aydoğan						
Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile ilişkisi	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Aydın ONAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Changir BIÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Sevrap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
İmza: *[Signature]*

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

AKUT MİYELOİD LÖSEMİLERİN AKIM SİTOMETRİ İLE KARAKTERİZASYONU VE BLASTLARDA ENDOTEL KÖK HÜCRE ORANININ ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 19	% 18	% 9	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	marmamedicaljournal.org İnternet Kaynağı	% 4
2	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
4	tphd.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	thd.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
8	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1

9	www.marmaramedicaljournal.org İnternet Kaynağı	%1
10	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
11	Hava Usküdar Teke, Nur Oguz Davutoglu, Eren Gunduz, Neslihan Andic, Cengiz Bal, Beyhan Durak Aras. "Is Flow Cytometric Immunophenotyping Useful for Predicting Acute Myeloid Leukemia Prognosis?", Istanbul Medical Journal, 2017 Yayın	<%1
12	www.selcukpediatri.org İnternet Kaynağı	<%1
13	www.bloodjournal.org İnternet Kaynağı	<%1
14	biyolojidersim.com İnternet Kaynağı	<%1
15	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
16	www.ilmdergi.org İnternet Kaynağı	<%1
17	TEKELİ, S.Özgür and ERMERK, Kaya. "Endotel progenitör hücreler", Marmara Üniversitesi, 2007.	<%1

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Sinan KÜTÜK

Uyruğu: Türkiye (T.C.)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Temmuz 1986, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel : 05447427632

Email : sinankütük@erciyes.edu.tr kutuksi.sk@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	kocasinan lisesi, Kayseri	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2009-2016 çalışmaktayım	Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı	Biyolog
2016-2019	Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı	Biyolog

YABANCI DİL: İngilizce