

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**G-CSF UYARIMININ DONÖR GRANÜLOSİTLERİNE ETKİLERİNİN HÜCRE
YÜZEY BELİRTEÇLERİ İLE GÖSTERİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Rabiya NAYİR

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2018-8283 kodlu proje ile desteklenmiştir**

OCAK 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.

Rabiya NAYİR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“G-CSF Uyarımının Donör Granüositlerine Etkilerinin Hücre Yüzey Belirteçleri İle Gösterilmesi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

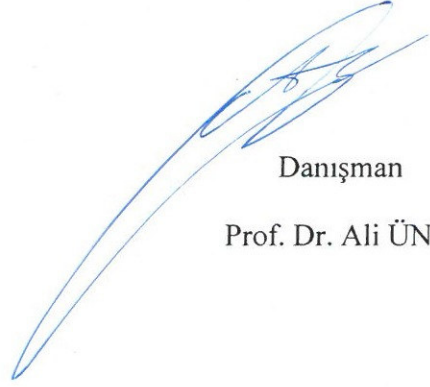
Tezi Hazırlayan

Rabiya NAYİR



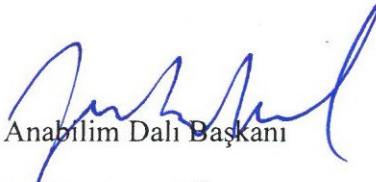
Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNAL



Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Yusuf ÖZKUL



KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Ali ÜNAL danışmanlığında **Rabiya NAYİR** tarafından hazırlanan “ **G-CSF Uyarımının Donör Granülositlerine Etkilerinin Hücre Yüzey Belirteçleri İle Gösterilmesi** ” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre Anabilim Dalında Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

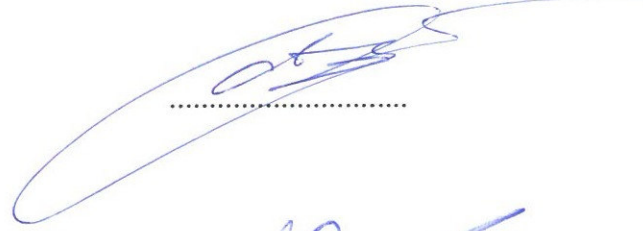
14/01/2020

JÜRİ İMZA

İmza


Danışman: Prof. Dr. Ali ÜNAL

(Erciyes Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı)



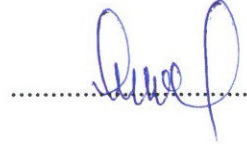
Üye: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

(Erciyes Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı)



Üye: Prof. Dr. Vesile ŞENOL

(Kapadokya Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı)



ONAY

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

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

Enstitü Müdürü

Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresi ve tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinde yararlandığım, aynı zamanda danışmanlığımı yapan, desteklerini esirgemeyen değerli hocam Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ali ÜNAL'a

Tez yazım süreci ve laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e

Tez çalışmalarım süresince, desteğini esirgemeyen flow laboratuvarında beraber çalıştığım Biyolog Sinan KÜTÜK, Biyolog Huriye ÇELİKZENCİR'e, ayrıca Aferez Ünitesi personellerine,

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

G-CSF UYARIMININ DONÖR GRANÜLOSİTLERİNE ETKİLERİNİN HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ İLE GÖSTERİLMESİ

Rabiya NAYİR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, OCAK 2020

Danışman: Prof. Dr. Ali ÜNAL

KISA ÖZET

Kemik iliği baskılanmış, uzun süreli nötropenisi olan hastalar veya nötrofil fonksiyon bozukluğu olan hastaların ciddi bakteri ve mantar enfeksiyonlarına yakalanma riski yüksektir. İyileşebilmeleri için dolaşımda yeterli sayıda nötrofil bulunması gerekir. Bu bağlamda standart tedaviye direnç geliştiren hastalarda granülosit transfüzyonunun kullanımı önemli bir klinik uygulamadır. Aferez cihazlarının gelişmesi ve koloni uyarıcı faktörlerin (CSF) kullanımıyla terapötik olarak etkili ve yeterli miktarda granülosit toplamak mümkün olmaktadır.

G-CSF'ler kemik iliğinde granülosit üretimini uyarırken aynı zamanda olgun olmayan granülositlerin kana geçiş süresini de kısaltan sitokinlerdir. G-CSF ile mobilize edilen vericilerden, transfüzyon için iyi bir terapötik granülosit dozu sağlanır.

Bu çalışmada granülosit vericilerine G-CSF uygulamasının vericide ve elde edilen granülositler üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunu araştırılması amacıyla 11 vericide nötrofil yüzey belirteçlerinde ekspresyon ölçümü yapıldı. Özellikle değişim olma ihtimali olan (CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116) hücre yüzey reseptörleri seçilerek etkileşim donör perifer hücreleri ve toplanan granülosit üründe araştırıldı.

Yaptığımız ölçüm sonucunda G-CSF uygulaması öncesi ve sonrasında yüzey belirteçlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim izlendi. G-CSF uygulaması CD13 ekspresyonu 17 kat (GM SI:17), CD116 yı ise 3,5 kat artırırken, CD15 ekspresyonu 10 kat CD16 yı ise 5 kat azalttığı izlendi. CD13 ve CD116 ekspresyonundaki artış G-CSF'nin bir etkisi olarak granülositlerin kemik iliğinden

periferik kana geçişi ile açıklanmaktadır. Miyeloblast aşamasından olgun nötrofillere kadar olan aşamalarda granüositler değişik düzeylerde CD13 ifade eder. CD116 GM-CSF resptörü olarak artış kaydeder. CD16 ve CD15 ekspresyonundaki azalış uygulama sonrası kemik iliğindeki turn-over artışına bağlı olarak henüz olgunlaşmamış nötrofillerin de hızla dolaşıma çıktığını göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda G-CSF'nin vericide farklı olgunluktaki granüositlerin dolaşıma katılmalarını sağladığını, granüositler üzerindeki reseptörlerin ekspresyon düzeylerinde değişime sebep olduğunu gösterdik. Bu durum farklı olgunluktaki granüositlerin işlevsel olarak da farklı olabileceğini gösterir. Bu nedenle hastalara transfer edilecek olan granüositlerin etkinliği ile matürasyon düzeyi arasındaki ilişkinin klinik araştırmalarla ortak çalışılması G-CSF dozu/düzeyinin bu süreçteki etkisini daha iyi ortaya koyacaktır.

Anahtar Kelimeler: G-CSF, Nötropeni, Granüosit Transfüzyonu, Sitokin, Flow Sitometri

**DEMONSTRATING THE EFFECTS OF STIMULATION WITH G-CSF ON
DONOR GRANULOCYTES USING CELL SURFACE MARKERS**

Rabiya NAYİR

ErciyesUniversity, GraduateSchool of Health Sciences

Department of Stem Cell Sciences

Master of Science Thesis, JANUARY 2020

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ABSTRACT

Patients with bone marrow suppressed, long-term neutropenia or patients with neutrophil dysfunction are at increased risk of developing serious bacterial and fungal infections. There must be sufficient neutrophils in the circulation for recovery. In this context, the use of granulocyte transfusion in patients developing resistance to standard therapy is an important clinical practice. With the development of apheresis devices and the use of colony stimulating factors (CSF), it is possible to collect therapeutically effective and sufficient amounts of granulocytes.

G-CSFs are cytokines that stimulate the production of granulocytes in the bone marrow while also shortening the passage of immature granulocytes into the blood. From donors mobilized with G-CSF, a good dose of therapeutic granulocyte for transfusion is provided.

In this study, neutrophil surface marker expression was measured in 11 donors in order to investigate the effects of G-CSF application on granulocyte donors on donor and obtained granulocytes. In particular, cell surface receptors that were likely to change were selected (CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116) and the interaction was investigated in donor peripheral cells and collected granulocyte product.

As a result of the measurement, a statistically significant change was observed in surface markers before and after G-CSF application. It was observed that G-CSF application increased CD13 expression 17 fold (GM SI: 17), CD116 3.5 fold, while CD15 expression decreased 10 fold CD16 5 fold. Increased expression of CD13 and

CD116 is explained by the passage of granulocytes from bone marrow to peripheral blood as an effect of G-CSF. In the stages from the myeloblast stage to the mature neutrophils, the granulocytes express different levels of CD13. CD116 records increase as GM-CSF receptor. Decrease in expression of CD16 and CD15 shows that immature neutrophils are rapidly circulating due to turn-over increase in bone marrow after application.

In conclusion, we have shown that G-CSF allows different maturation granulocytes to circulate in the donor and causes changes in the expression levels of receptors on granulocytes. This indicates that granulocytes of different maturity may also be functionally different. Therefore, the association between the efficacy of the granulocytes to be transferred to the patients and the level of maturation in clinical studies will better demonstrate the effect of G-CSF dose / level in this process.

Keywords: G-CSF, Neutropenia, Granulocyte Transfusion, Cytokine, Flow Cytometry

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Granülosit Transfüzyonu	3
2.2. Hematopoetik Kök Hücre ve Hematopoez.....	3
2.2.1.Kök Hücre Yuvası ve Hematopoetik Sitokinler	4
2.3. G-CSF.....	7
2.3.1. Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF).....	7
2.3.2. G-CSF'nin Biyolojik Etkileri	7
2.3.3. G-CSF'nin Kullanım Alanları	8
2.3.4. Biyo-eşdeğer G-CSF'ler	9
2.4. Granülositlerin Toplanması Ve Aferez	10
2.4.1. Granülosit Vericilerinin Mobilizasyonu	11
2.4.2.Granülosit Vericisinde Kan Bağışlama Uygunluk Kriterleri.....	11
2.4.3. Granülosit Vericisine Verilen G-CSF Miktarı ve Granülosit Aferezi	12
2.5. Granülopoiez ve Granülositler	13
2.5.1. Granülopoiez (Granüllü Lökosit Oluşumu).....	13

2.5.2. Granülositler	14
2.5.2.1. Eozinofiller.....	14
2.5.2.2. Bazofiller.....	16
2.5.2.3. Nötrofiller.....	17
2.5.2.3.1. Nötrofillerin İmmünofenotiplendirilmesi.....	20
2.5.2.3.2. Nötrofil Heterojenitesi.....	22
2.5.2.3.3. Nötrofiller Patojen Etkileşimleri	24
2.5.2.3.3.1. Degranülasyon	25
2.5.2.3.3.2. Fagositoz.....	26
2.5.2.3.3.3.Nötrofil Ekstraselüler Tuzaklar (NET).....	27
2.6. Granülositlerin İmmünofenotiplendirilmesi.....	28
2.6. 1. Akım sitometri	28
2.6.2.Akım sitometri cihazının temel bileşenleri.....	28
2.6.1.2. Akım Sitometrinin Kullanım Alanları.	30
2.6.1.3. ASM ile immunfenotipleme yapmanın Avantajları ve Dezavantajları... 31	
3.GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Sarf Malzemeler	33
3.1.2. Çalışmada kullanılan antikorlar	35
3.2. Örnek Toplama Ve Hazırlama.....	36
3.3. Örneklerin akım sitometrik analiz uygulamaları.....	36
3.3.1.Örneklerdeki hücrelerin akım sitometri ile tanımlanması	36
3.3.2. Akım Sitometrinin Okuma ve Analiz İçin Hazırlanması.....	37
3.3.3. Akım Sitometride Örnek Hazırlam İşlem Basamakları	37
3.3.4.Akım Sitometride Elde Edilen Sonuçların Analizi	38
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	38
4.BULGULAR	39

4.1.Çalışma Grubunun Özellikleri.....	40
4.2.Çalışma Grubunda Akım Sitometri İle Hücre Yüzey Belirteçleri Analizi için Yapılan İşlemler	43
4.3.Çalışma Gruplarının Akım Sitometri ile Analizleri	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	66

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR

AGM	: Aort/Gonad/Mezonefroz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
APC	: Allofosiyenin
ASM	: Akım Sitometri
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BOS	: Beyin Omur İlik Sıvısı
CBC	: Tam Kan Sayımı
CD	: Cluster Differentiation
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
CEACAM	: Karsinoembriyonik Antijen İle İlişkili Hücre Adezyon Molekülleri
CMV	: Sitomegalovirüs
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktör
CV	: Dağılım
ECP	: Eozinofil Katyonik Protein
EDN	: Eozinofil Kökenli Nörotoksin
EMA	: European Medicines Agency- Avrupa İlaç Ajansı
EMEA	: The European Agency For The Evaluation Of Medicinal Products
Epo	: Eritropoetin
Fc	: Fragment Of Crystallisable
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
FL	: Flt3 Ligand

fMLP	: Formil Metionil Lösil Fenilalanin
FS	: Forward Scatter Hücre Büyüklük Ölçümü
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
G-CSFR	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör Reseptörü
GM	: Geometrik Mean (Geometrik Ortalama)
GM-CSF	: Granülosit-Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
GPCR	: G Protein-Bağlantılı Reseptörler
HbsAg	: Akut Veya Kronik HBV (Hepatit B Virüsü)
HCV	: Hepatit C Virüs
HIV	: Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HKPH	: Hematopoetik Kök / Progenitör Hücre
Ig	: İmmüoglobülin
IgSF	: İmmüoglobulin Süper Ailesinin
IL	: İnterlökin
LAM	: Lökosit Adezyon Molekülü
LYMPH	: Lenfosit
MBP	: Esas Temel Proteinler
M-CSF	: Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
MFI	: Mean Fleurosan İndeks
NET	: Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları
NEUT	: Nötrofil

ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PE	: Fikoeritrin
PerCP	: Peridin Klorofil Proteini
PMN	: Polimorfnükleer
PRR'ler	: Pattern Recognition Receptors
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünlerinin
SCF	: Stemcell Faktör / Kök Hücre Faktörü
SI	: Stimülasyon (Uyarım) İndeksi
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SS	: Side Scatter Hücre Granüler Yapı Ölçümü
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörleri
TH2	: T-Helper 2 (Yardımcı T Hücre 2)
TLR	: Toll-like Reseptörleri / Toll Benzeri Reseptörler
TNF	: Tümör Nekroz Faktörleri
Tpo	: Trombopoetin
VDRL	: Venereal Disease Reseach Laboratory / Venereal Hastalık Araştırma Laboratuvarı
WBC	: Beyaz Kan Hücresi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	32
Tablo 3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	33
Tablo 4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri.....	40
Tablo 4.2. 11 Vericide Tam Kan Sayımı (CBC) Verileri.....	41
Tablo 4.3. G-CSF Öncesi Ve G-CSF Sonrası Vericinin Kan Örneklerinde WBC Değerlerinin Karşılaştırılması.....	42
Tablo 4.4. G-CSF Öncesi Ve G-CSF Sonrası Vericinin Kan Örneklerinde NEUT Değerlerinin Karşılaştırılması.....	42
Tablo 4.5. 1. Vericide Cv ve Geometrik Ortalamain üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri	47
Tablo 4.6. 2. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri.....	48
Tablo 4.7. 3. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri	49
Tablo 4.8. 4. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri	50
Tablo 4.9. 5. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri.....	51
Tablo 4.10. 6. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri.....	52
Tablo 4.11. 7. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri	53
Tablo 4.12. 8. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri	54

Tablo 4.13. 9. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri	55
Tablo 4.14. 10. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri.....	56
Tablo 4.15. 11. Vericide Cv ve Geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri.....	59
Tablo 4.16. G-CSF öncesi ve sonrası 11 vericinin CV, GOrtalama değer ve SI değerlerinin ortalma dağılımı	60
Tablo 4.17. GCSF değerlerinin önce ve sonrası için fark analizi sonuçları (CV)....	60
Tablo 4.18. GCSF değerlerinin önce ve sonrası için fark analizi sonuçları (GM)....	61
Tablo 4.19 Geometrik ortalama değerlerine göre SI fark analizleri.....	62
Tablo 4.20. Korelasyon Analizi.....	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	İlkel Eritropoez Ve Erişkin Eritropoezi.....	4
Şekil 2.2.	Sitokin Reseptörlerinin Yapısı.....	5
Şekil 2.3.	Hematopoezde Rolü Olan Sitokinler Ve İnterlökinler.....	6
Şekil 2.4.	G-CSF'nin Majör Biyolojik Etkileri.....	8
Şekil 2.5.	Granülositlerin Gelişim Aşamaları	13
Şekil 2.6.	Eozinofil Yayma Görüntüsü.....	14
Şekil 2.7.	SS/CD45 Kapısında Eozinofil Akım Sitometri Görüntüsü.....	15
Şekil 2.8.	SS/45 ve SS/CD123 Kapısında Bazofil Akım Sitometri Görüntüsü.....	16
Şekil 2.9.	Nötrofil Yayma Görüntüsü.....	17
Şekil 2.10.	Nötrofillerdeki Granül Çeşitleri Ve İçerikleri.....	18
Şekil 2.11.	Nötrofil Yüzey Reseptörleri.....	20
Şekil 2.12.	Nötrofil Heterojenitesi	23
Şekil 2.13.	Degranülosyon.....	25
Şekil 2.14.	Antikor Aracılı Opsonizasyon ve Patojenlerin Fagositozu	26
Şekil 2.15.	Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları.....	27
Şekil 2.16.	Akım Sitometride Hücrelerin Tek Tek Geçişi ve Sinyal Türlerinin Gösterimi.....	28
Şekil 2.17.	Akım Sitometride SS/FS Görüntüsü	29
Şekil 2.18.	Akım Sitometri İle CD45 Kapısında Hücresel Dağılımın Gösterilmesi	31
Şekil 4.1.	Kontrol ve Ürün Örneklerinde Akım Sitometri İş Akış Şeması... ..	39
Şekil 4.2.	Kontrol Grubunda Örneklerin Nötrofil Kapısında Tanımlanması.....	44
Şekil 4.3.	Ürün Grubunda Örneklerin Nötrofil Kapısında Tanımlanması	46
Şekil 4.4.	1. Verici Flow Görüntüsü.....	47
Şekil 4.5.	2. Verici Flow Görüntüsü.....	48
Şekil 4.6.	3. Verici Flow Görüntüsü.....	49
Şekil 4.7.	4. Verici Flow Görüntüsü.....	50
Şekil 4.8.	5. Verici Flow Görüntüsü.....	51
Şekil 4.9.	6. Verici Flow Görüntüsü.....	52
Şekil 4.10.	7. Verici Flow Görüntüsü.....	53

Şekil 4.11. 8. Verici Flow Görüntüsü	54
Şekil 4.12. 9. Verici Flow Görüntüsü.....	55
Şekil 4.13. 10. Verici Flow Görüntüsü.....	56
Şekil 4.14. 11. Verici Flow Görüntüsü.....	57
Şekil 4.15 . Tüm Vericilerde Cv Ve GM Stimülasyon İndekslerinin Dağılım.....	57
Şekil.4.16. Tüm Vericilerde GM Değerlerinin Stimülasyon İndeksleri	58



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nötropeni, kanser kemoterapisi ve hematopoietik kök hücre naklinin önemli ve ciddi bir komplikasyonu olmaya devam etmektedir. Malignite tedavisinde kemoterapi kullanımı arttıkça, nötropeni insidansı ve ciddi enfeksiyonlar da artmıştır. Nötropenik enfeksiyonlar ciddi morbiditeye neden olur, bazen de ölümcüldür ve bu hastaların tedavi maliyetlerini artırır. Enfeksiyonlardan kurtarmanın en güçlü belirleyicisi, kemik iliği tarafından nötrofil üretiminin iyileştirilmesi ve yeterli sayıdaki kan ve doku nötrofilleridir. Nötrofiller, bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı konak savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, potansiyel yaklaşımlar arasında granülosit transfüzyonlarının kullanımı ve koloni uyarıcı faktörlerin uygulanması vardır.

G-CSF'ler nötrofil üretimini artıran sitokinlerdir. Hematopoetik kök hücrelerden öncül nötrofillerin oluşmasını çoğalmasını ve olgunlaşmasını yönlendirirler. Kemoterapi alan hastalarda nötropeni süresini ve şiddetini azaltan fagositik CSF'lerdir ve fagosit varlığına rağmen fagositlerin fungisidal ve antibakteriyel aktivitelerini artırır. G-CSF, kemik iliği rezerv havuzundan nötrofillerin hızlı bir şekilde ayrılmasının yanı sıra hematopoietik kök hücrelerden nötrofil üretimine neden olur ve yaklaşık 10 gün süren kemik iliği nişinde miyeloid farklılaşması sırasında bu hücrelerin geçiş süresini hızlandırır. Bu çalışmada G-CSF'nin granülositlerdeki hücre yüzey ekspresyonlarındaki değişime etkisi araştırılacaktır. Bu amaçla granülosit transfüzyonu için gönüllü olan sağlıklı vericiden G-CSF uygulaması öncesi kan örneği (2cc) ve G-CSF uygulaması sonrası granülosit ürünü örneği (2cc) çalışmaya dâhil edilecektir. Bu örneklerdeki hücre yüzey belirteçleri CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 ekspresyon düzeyleri akım sitometri yöntemi ile ölçülecektir.

Nötropeni tedavisi için granülosit transfüzyonu tedavi seçeneklerinden birisidir. Ancak G-CSF ve biyo-benzer ilaçların gelişimi ile hematopoietik kök hücrelerin uyarılması granülosit transfüzyonunun nötropeni tedavisi için etkin bir yöntem olarak

kullanılmaktadır. Granülosit transfüzyonunda kemik iliğinin uyarımı amacıyla G-CSF uygulamasının donör üzerindeki etkileri son yıllarda üzerinde durulan konulardan birisidir. Bu çalışma ile G-CSF miktarının donörler üzerindeki etkisi izlenebilecek ve hastaya verilecek granülosit ürününün maturasyon düzeyi (özellikleri) daha iyi anlaşılabilir ve etkinliği izlenebilecektir. Beraberinde G-CSF verilmesinin donör hücre dağılımı üzerine etkisi araştırılarak uygulamanın donör üzerine etkileri öğrenilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Granülosit Transfüzyonu

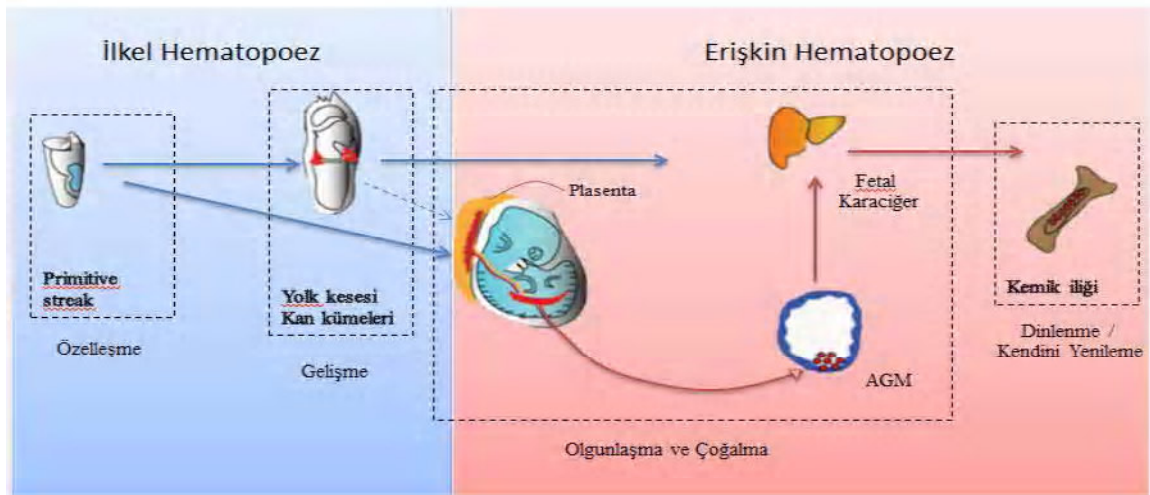
Granülosit transfüzyonu büyük miktarda donör kanının işlenmesi sırasında bir eritrosit sediment ajanı kullanılarak santrifüj lökoferez yoluyla, kortikosteroidli veya kortikosteroidli olmayan G-CSF ile uyarılan donörlerden toplanan bir PMN (polimorfo nükleer lökosit) olarak tanımlanır (Strauss RG, 2015).

Tarihsel olarak, uyarılmamış donörlerden veya sadece kortikosteroidlerle uyarılanlardan alınan transfüzyon için toplanan PMN konsantreleri, aşırı yetersiz sayıda PMN içeriyordu. Günümüzde, sağlıklı bağışçılardan granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) artı kortikosteroid kemik iliği stimülasyonu ve ardından geniş hacimli lökafheraz vasıtasıyla çok daha fazla sayıda PMN toplanabilir. Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit-makrofaj kolon-uyarıcı faktör (GM-CSF), kemoterapi alan hastalarda nötropeni süresini ve şiddetini azaltan hem fagositik CSF'lerdir ve fagosit varlığına rağmen fagositlerin fungisidal ve antibakteriyel aktivitelerini arttırır. G-CSF, kemik iliği rezerv havuzundan nötrofillerin hızlı bir şekilde ayrılmasının yanı sıra hematopoietik kök hücrelerden nötrofil üretimine neden olur ve yaklaşık 10 gün süren kemik iliği nişinde miyeloid farklılaşması sırasında bu hücrelerin geçiş süresini hızlandırır (Busca A, ve ark. 2018) (Strauss RG,2009) (Hiemstra IH, 2017).

2.2. Hematopoetik Kök Hücre ve Hematopoez

Hematopoetik kök hücreler (HKH'ler), immün fonksiyonu, homeostaz dengesini ve mikroorganizmalara ve iltihaplanmaya yanıtı kontrol eden özel kan hücrelerine farklılaşabilen yetişkin kök hücrelerdir ve insan vücudundaki enflamatuar tepkiler için hayati önem taşıyan hematopoetik sistemin oluşumuna yol açar (Tekeli ve ark. 2016). Hematopoetik sistem, HKH popülasyonundan üretilen kan hücrelerinin yaşam boyu

tedarikini sağlamaktadır (Akhilesh ve ark. 2019). Hematopoez, hematopoetik kök / progenitör hücrelerden (HKPH'ler) başlayan ve tüm yetişkin kan hücrelerinin oluşumundan sorumlu olan kan hücresi oluşum sürecidir (Akhilesh ve ark. 2019). Hematopoez embriyonik dönemde ilkel damarlardan gelişen hemojenikendotel / hemanjiyoplast ile başlar. Hematopoetik öncüller sonra yolk kesesi, ardından aort/gonad/mezonefroz (AGM) ve allantois ile plasentaya doğru göç eder. Gebeliğin ortalarında karaciğer en önemli hematopoez organı ve HKH'lerin çoğalma ve farklılaşma merkezidir. Kemik iliği ise 7. aydan itibaren kan hücrelerinin üretiminden sorumludur ve bu görevine ömür boyu devam eder. Yolk kesesinde ilk hematopoez oluşumu ilkel eritrosit üretimi ile başlar. Bu eritrositler büyük ve çekirdeklidir, embriyonik hemoglobini içerir. İlkel eritropoez geçicidir ve kısa sürede yerini fetal ve erişkin eritropoeze (definitif) bırakır. Fetal karaciğerdeki HKH'deki mitoz kemik iliğindeki HKH'ye göre daha aktiftir. Kemik iliğindeki HKH'ler daha çok istirahat (G0) fazındadır. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. İlkel Eritropoez Ve Erişkin Eritropoezi

2.2.Kök Hücre Yuvası ve Hematopoetik Sitokinler

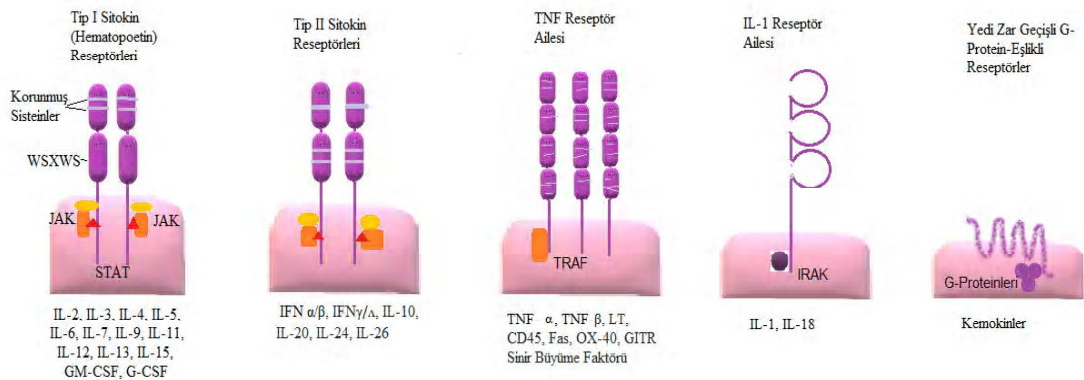
2.2.1.Kök Hücre Yuvası ve Hematopoetik Sitokinler

Kök hücrelerin buldukları ortam onların bölünme ve farklılaşmalarında önemli yeri olan, onların kaderini belirleyen in vivo veya in vitro mikro çevreye “**Stem Cell Niche= Kök Hücre Yuvası**” denilmektedir (Niche: niş; yuva; odak) (Alp Can, 2008). Bu mikro

çevre emriyonik olmayan kök hücrelerin, farklılaşmalarını gerektiren bir uyarı alana kadar dinlenme fazında beklemelerini sağlar. Hematopoietik hücrelerin niş içinde farklılaşmasını, sitokinler, transkripsiyon faktörleri, sinyal dönüştürücüler, epigenetik düzenleyiciler, anti-apoptotik proteinler belirler (Can A, 2008), (Ateş U,2016).

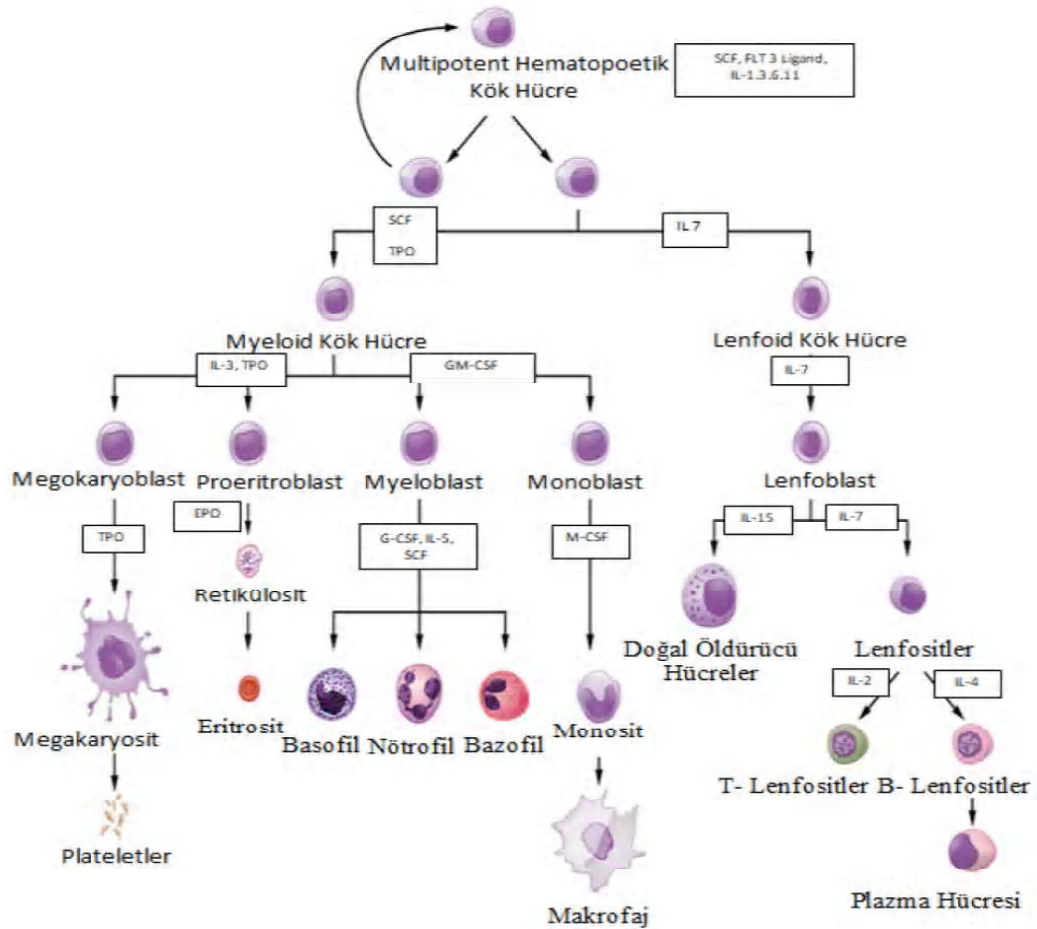
Sitokinler hücreSEL düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrenin davranışlarını etkiler. Belirli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır ancak aynı biyolojik etkiyi gösterir. Büyüme faktörleri, lenfokinler (interlökinler (IL1, IL3 gibi)), koloni sitimüle edici faktörler (G-CSF; granülosit sitimüle edici faktör, GM-CSF; granülosit monosit sitimüle edici faktör gibi), transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α , TCF- β), tümör nekroz faktörleri, interferonlar olmak üzere gruplandırılırlar. Hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücreSEL metabolizmanın değiştirilmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadırlar (Güneş H, 1999).

Sitokinler etkilerini kendilerine ait reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bu reseptörler hücre dışı sitokin-bağlayan bükümlerine göre toplam beş ana ailede toplanmaktadır. Bunlar; immünoglobülin (Ig) süper aile reseptörleri, Tip I sitokin reseptörleri (hematopoietin ailesi), Tip II sitokin reseptörleri (interferon ailesi), TNF reseptör ailesi, kemokin reseptörleri (yedi zar geçişli reseptörler)dir (Erten G, 2013). Şekil 2.2.'de sitokinler için reseptörler gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Sitokin Reseptörlerinin Yapısı. Farklı sitokinler için reseptörler, korunmuş hücre dışı büküm yapılarına ve sinyal mekanizmalarına göre aileler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Şemada her reseptör ailesine bağlanan reseptör ve ligandlar sıralanmıştır. WSXWS, triptofan-serin-Xtriptofan- serin

Hematopoietik hücrelerin yapımı, protein veya glikoprotein yapısındaki hematopoetik sitokin molekülleri ile sağlanır. Bunlar hematopoietik hücreler üzerinde bulunan özel reseptörler ile bağlanıp intrasellüler sinyali başlatarak hücrelerin yaşamı, çoğalması, farklılaşması, olgunlaşması ve fonksiyonel aktivitelerini kontrol eder. İçlerinde sitokinler ve koloni uyarıcı faktörlerin de bulunduğu birçok büyüme faktörü tanımlanmıştır. Bunların çoğu kemik iliğinden salgılanmakta ancak bazıları birçok farklı doku ve hücrelerden yapılarak kan yolu ile iliğe ulaşmaktadır. Örneğin; eritropoetin daha çok böbrek, trombopoetin karaciğerden yapılırken GM-CSF çeşitli doku ve hücrelerden yapılır. Bazı sitokinler belli hücre serisine özeldir. Ancak kök hücre ve megakaryosit öncülleri gibi bazı hücrelerin çoğalmak için birçok sitokinin eşzamanlı etkisine ihtiyacı vardır. Şekil 2.3.'de HKH'nin olgun kan hücrelerine farklılaşma aşamaları ve farklılaşmaya neden olan bazı önemli sitokinler görülmektedir.



Şekil 2.3. Hematopoezde rolü olan sitokinler ve interlökinler

Koloni stimüle edici faktörler, Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), Interlökin-3 (IL-3), Eritropoetin (Epo,) Trombopoetin (Tpo), Interlökin-5 (IL-5), Stem cell faktör (SCF), Flt3 Ligand (FL) Interlökin-6 ailesi (IL-6, IL-11, IL-1, IL-2, IL-4)

2.3. G-CSF

2.3.1. Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF)

G-CSF, hematopoiezin ve doğal immün sistemin temel hücre dışı düzenleyicisidir. CSF3 geni tarafından kodlanan 25 kD büyüklüğünde salgılanan bir glikoproteindir. Kemik iliği stromal hücreleri tarafından üretilir. HKH'den olgun nötrofile kadar, nötrofil soyundaki tüm hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkiler. Etkilerini G-CSF reseptörüne (G-CSFR) bağlanarak gösterirler. G-CSFR metamiyelositler, miyelositler, promiyelositler, miyeloblastlar, miyeloid projenitör hücreler ve ilkel hematopoetik hücreler de dahil olmak üzere tüm nötrofiller ve öncüleri tarafından eksprese edilir (Basu S ve ark. 2002). G-CSFR, Tip I sitokin reseptör ailesinin tipik bir yapısına sahip bir transmembran proteindir. Hücre dışı bileşen, bir N-terminal immünoglobülin alanı, eşleştirilmiş bir fibronektin modülü içindeki bir sitokin tanıma alanı ve diğer üç fibronektin III tekrarı içerir. (Avalos 1996)

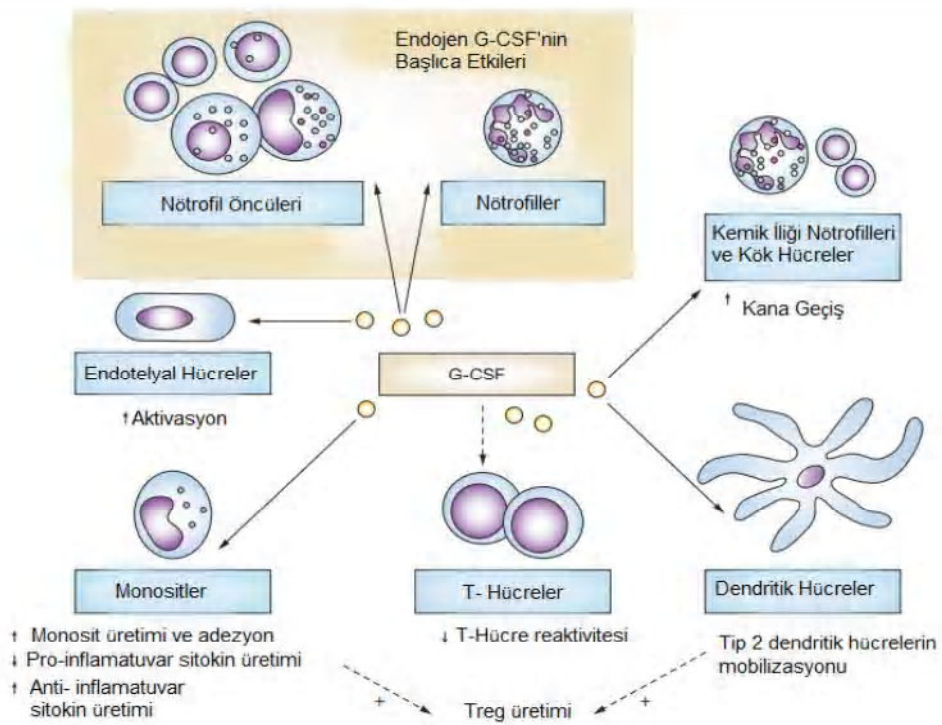
2.3.2. G-CSF'nin Biyolojik Etkileri

G-CSF'ler esas biyolojik etkilerini nötrofiller üzerinde gösterirler. Nötrofillerin kemik iliğinde oluşmasını ve olgunlaşmasını hızlandırırlar. Aynı zamanda olgun olmayan nötrofillerin de kemik iliğinden periferik kana geçişini de hızlandırırlar. İn vitro çalışmalarda G-CSF'nin nötrofil kemotaksisini ve fagositozu artırdığı, reaktif oksijen patlaması mekanizmasını uyardığı, bakterisidal ve fungisidal aktiviteyi, antikora bağlı hücre toksisitesini artırdığı gösterilmiştir. Kompleman reseptörlerinin (CD11b/CD18b, CD35) ekspresyonunu artırır. İn vivo çalışmalarda ise G-CSF'in nötrofillerle IgG'ler için Fc reseptörü olan CD64 ekspresyonunu artırırken, Ig-G kompleksleri için Fc reseptörü olan CD16 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. CD11b kompleman

reseptörü ve LAM-1 ekspresyonunu başlangıçta artırırken, daha sonra bu etkinin azaldığı, bakteriyel lipopolisakkarid reseptörü CD14 ve kompleman reseptörü CD35'in ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (Dale DC ve ark. 1995).

G-CSF uygulaması, IL-10 üretmek için monositleri indükler ve TH2'yi destekleyen dendritik hücreleri harekete geçirir, bu da T hücre reaktivitesinin azalmasına katkıda bulunabilir (Rutella S ve ark. 2005).

G-CSF ayrıca kök hücreler de dahil olmak üzere nötrofillerin ve öncülerinin hayatta kalma süresini uzatır. Şekil 2.4.'de G-CSF'nin majör biyolojik etkileri gösterilmiştir.



Şekil 2.4: G-CSF'nin Majör Biyolojik Etkileri.

2.3.3. G-CSF'nin Kullanım Alanları

G-CSF klinik olarak nötropeni ve enfeksiyon tedavisinde ve in vitro hayvan deneylerinde kullanılır. Klinik olarak kanser kemoterapisine bağlı nötropeni, allojenik ve olog kemik iliği transplantasyonlarından sonra hastalara G-CSF uygulandığında nötrofil sayılarının düzelmesinin hızlandığı ve kemoterapiden sonra ciddi nötropeni süresini azalttığı (Ozer ve ark. 2000), antibiyotik kullanım gereksiniminin veya antibiyotik kullanım süresinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum hastaların hastanede

kalma süresini kısaltmıştır. Ancak olgularda mortalite azalması gösterilememiştir (Karp JE ve ark. 1994), (Birekul A ve ark. 2016).

G-CSF aynı zamanda siklik nötropeni, HIV enfeksiyonları, miyelodisplastik sendrom gibi hastalıklarda enfeksiyon tedavisi için kullanılmıştır (Lieschke GJ ve ark. 1992).

G-CSF hematopoetik kök hücreleri uyaran bir büyüme faktörüdür. Bu nedenle allojenik ve otolog kök hücre nakillerinde kullanılmaktadır. G-CSF ya tek başına ya da miyelosupresif bir kemoterapi dozundan sonra uygulanırsa otolog kök hücre nakli için kök hücre mobilizasyonu daha da artırır. Allojenik hemotopoitik kök hücre nakli yapılacak hastalar içinde sağlıklı donörlerden hücreler alınır. Bunun için gönüllü bağışçılara G-CSF uygulamasının güvenli ve etkili olduğu gösterilmiştir. Günümüzde G-CSF ile mobilize kan kök hücreleri, mobilizasyon prosedürleri, toplama kolaylığı, genel anesteziden kaçınılması ve kan sayımlarının daha hızlı iyileşmesi nedeniyle otolog ve allojenik kök hücrelerin kaynağı olarak kemik iliği toplanmasının yerini almıştır (Grigg ve ark. 1995).

G-CSF in vitro olarak ise nötropenik olmayan enfeksiyon hastalıklarında tek başına veya antibiyotiklerle kombine etkisini araştırmak üzere hayvan modellerinde, nötrofillerin endotel yüzeyine adezyonunu ve süperoksit yapımını artırması sebebiyle doku hasarı ve organ yetmezliği neden olup olmadığı da hayvan çalışmalarında araştırılmıştır (Dale DC, ve ark.1995), (Karp JE. Ve ark.1993),(Daifuku R,ve ark, 1993),(Smith WS ve ark.1995).

2.3.4. Biyo-eşdeğer G-CSF'ler

Kimyasal sentezle üretilen konvansiyonel ilaçlar, original ajan ile aynı aktif maddeyi içerdiğinde ve original ilaca kalite, güvenlik ve etkinlik açısından benzer olduklarında 'jenerik' ismini alır. Biyolojik olarak eşdeğer maddeler üretildiğinde, bunlar 'biyobenzer' olarak adlandırılır. Biyobenzer G-CSF'nin üretimi ve kullanımı, şu anda EMA (European Medicines Agency- Avrupa İlaç Ajansı) olarak adlandırılan, EMEA tarafından üretilen özel bir kılavuz not setine sahiptir. Biyobenzer G-CSF'lerin üretimi ve kullanımı bu kılavuza göre yapılmaktadır (Michael Schmitt ve ark, 2014). Bu ilaçlar deri altı (subkutan) veya damar içi (intravenöz) uygulama için tek kullanımlık

şişelerde veya önceden doldurulmuş şırıngalarda (her biri 300 ve 600 mcg) bir çözelti halinde mevcuttur. Doz rejimleri, endikasyona ve uygulama yoluna (intravenöz veya subkutan) göre değişir.

Doğal G-CSF 174-177 aminoasit içeren başlıca nötrofiller üzerinde etkili olan bir glikoproteindir. Rekombinat teknoloji ile G-CSF üretimi ile kök hücre mobilizasyon protokollerine G-CSF'nin biyobenzerleri eklenmiştir (Aktaş F.1996). Neupogen® (Filgrastim) bu alanda üretilen ve diğer benzer ilaçların karşılaştırıldığı referans ilaç olmuştur. Özgün G-CSF'nin 174 aminoasitli izoformunun non-glikolize benzeridir ancak özgün proteinde olmayan ek bir N-terminal methionin bulunmaktadır. Ticari ürünler referans neupogenden pH, filgrastim konsantrasyonu ve polisorbitat 80 içeriğiyle farklıdır (Özcan M. 2012).

Başlıca biyobenzer G-CSF'ler şunlardır:

- Ratiograstim ®
- Tevagrastim®
- Biograstim ®
- Zarzio®
- Nivestim ®

2.4. Granülositlerin Toplanması Ve Aferez

Aferez hastanın veya bağışçının (donörün) kanının damar dışına alınarak otomatik cihaz yardımıyla bir veya birden fazla bileşenine ayrıldığı tedavi ile veya tedavisiz geriye döndürüldüğü veya istenilen bileşenin değiştirildiği bir işlemdir. Aferez işleminin, donör aferezi (Plazmaferez, Trombositaferez, Eritrositaferez, Granülositaferez), Terapötik aferez (Sitaferaz, Terapötik Plazmaferez, Fotoferaz, Adsorbif sitaferez), Periferik kök hücre aferezi (Allojenik, Otolog) gibi tipleri vardır.

Granülosit aferezi, gönüllü vericinin kanını tıbbi bir cihazdan geçirmek sureti ile granülosit hücrelerini kanın diğer bileşenlerinden ayırması ve geri kalan kısmını tekrar geri verme işlemidir. Kemik iliğinde üretilen granülosit hücrelerinin yapımını uyarmak ve kan dolaşımına çıkışını hızlandırmak için vericiye G-CSF uygulanmaktadır.

2.4.1. Granülosit Vericilerinin Mobilizasyonu

Klinik tarafından nötropenik hasta için granülosit toplama işlemine karar verilir ise hasta yakını bilgilendirilerek bağış yapacak vericiler bulunması gerektiği bildirilir. Klinik doktoru granülosit istem formu ile birlikte vericileri toplama ünitesine yönlendirir. Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanan “Donör Sorgulama Formu”nun ölçütlerine uyan ve İşlem sırasında oluşabilecek komplikasyonlar ve işlem süresi ile ilgili toplama ünitesi doktoru tarafından bilgi verilen kişiler granülosit vericisi olabilirler.

2.4.2. Granülosit Vericisinde Kan Bağışlama Uygunluk Kriterleri

Granülosit aferez donöründe aferez işlemi öncesi çalışılması gereken kan bağışlama kriterleri şunlardır.

1. Vital bulguları:

Kan basıncı: sistolik 90-150 diastolik 60-90 arasında olmalı

Nabız : 60-120 arasında olmalı

Ateş : <38 olmalı

2. Verici 50 kg'nin üzerinde olmalıdır.

3. Hb : hemoglobin değerleri kadınlar için 12.5'in üzerinde, erkek vericiler için 13,5'in üzerinde olmalıdır.

4. HbsAg, HCV, HIV, VDRL gibi viral belirteçler negatif olmalıdır

5. AST, ALT değerleri normal olmalıdır.

6. CMV IgG pozitif olabilir, CMV IgM negatif olmalıdır.

7. Verici kan grubu ile hasta kan grubu aynı olmalıdır.

Granülosit verici adayının kan tetkik sonuçları, vital bulguları ve damar yolları toplama ünitesi doktoru tarafından değerlendirilir. Verici kriterlere uygunsa klinikte donör mobilizasyon programına başlanır.

2.4.3. Granülosit Vericisine Verilen G-CSF Miktarı ve Granülosit Aferezi

Uygun donörlere granülosit aferezi için G-CSF uygulaması yapıldıktan 12 saat sonra granülositlerin toplanması için randevu verilir. Donörlere granülosit aferezi için verilen G-CSF miktarları şu şekildedir.

- 70 kg üstü donörler; 48 mü nepogen + 1 adet 8 mg kordexa (deksametazon)
- 70 kg altı donörler; 30 mü neupogen + 1 adet kordexa (deksametazon)

Mobilizasyon işlemi tamamlanan verici toplama ünitesinde gelir. Vericinin vital bulguları ve kan değerleri kontrol edilir. Sonuçlar normal ise granülosit verme onam formu alınır ve aferez ünitesine yönlendirilir. Aferez ünitesinde işleme bağlı gelişebilecek yan etkiler anlatılarak vericiden onam formu alınır ve granülosit aferezi işlemine başlanır. İşlem esnasında tansiyon düşüklüğü ve hipokalsemiye bağlı parmaklarda ve yüzde karıncalanma, bazen hafif kas çekilmeleri, bulantı-kusma, hissi meydana gelebilir. Bu durumlarda aferez ünitesi görevlileri veriye gerekli müdahaleleri gerçekleştirirler. Verici, her türlü istenmeyen olayın engellenmesi veya acil durumlara müdahale edilmesi için toplama işlemi sırasında ve işlem sonrası en az 20 dakika izlenmelidir.

İşlem tamamlandıktan sonra reinfüzyon işlemine geçilir. Ürün aferez setinden tüp sailer yardımı ile uzaklaştırılır. Ürün bekleme ünitesine alınır. Üründen numune alınarak laboratuvara gönderilir. Örnek numune sonuçları otomasyonda ürün değerleri bölümüne yerleştirilir. Sistem otomatik olarak ne kadar ürün toplandığını ve ne kadar sürede hastaya infüze edilmesi gerektiğini hesaplar. Daha sonra ürüne üzerinde hangi hastaya ait olduğu, toplanan ürün miktarı ve hastaya infüzyon süresini gösteren barkod yapıştırılarak ürün kan merkezine ışınlanmak üzere gönderilir.

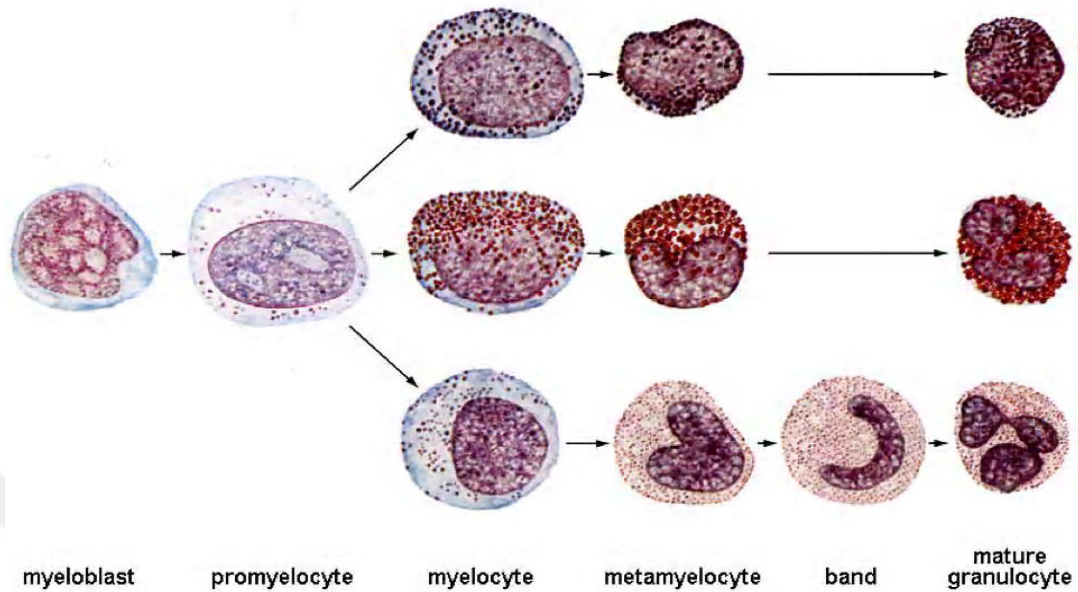
Granülosit konsantreleri en kısa sürede transfüze edilmelidir. Çünkü granülosit içindeki PMN fonksiyonları 6 saatte hızla bozulmaya başlar. Bu nedenle infüzyon ilk 24 saatte gerçekleştirilmelidir.

2.5. Granülopoiez ve Granülositler

Granülositler kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden köken alırlar. 3 tip granülosit oluşur. Bunlar eozinofil, bazofil ve nötrofillerdir.

2.5.1. Granülopoiez (Granüllü Lökosit Oluşumu)

Diğer kan hücrelerinde olduğu gibi, granülositler de multipotent kök hücreden köken alırlar. Bu hücrelerin yüksek derecede kendilerini yenileyip diğer hücre tiplerini oluşturacak birimleri yapabilme özelliği vardır. Multipotent kök hücrenin G-CSF, GM-CSF gibi koloni uyarıcı faktörler ve IL-3, IL-5 gibi sitokinler tarafından uyarılması sonucu nötrofil eozinofil ve bazofil gibi hücreleri oluşturacak miyeloid kök hücre oluşur. Miyeloid kök hücreden miyeloblastlar oluşur. Miyeloblastlar 3 veya daha fazla çekirdekçik içeren büyük çekirdekli, nispeten daha küçük hücredir. Miyeloblast farklılaşmasında çekirdek hemen dikkati çeker. Sitoplazma bazofilik; ancak granülsüzdür. Daha ileri gelişmelerde hücre büyür ve küçük metakromatik azurofil granüller oluşmaya başlar. Bu hücrelere promiyelositler denir. Bu evreden sonra miyelosit evresine geçilir. Miyelositler promiyelositlerden daha küçük olmaları ve kromatinlerinin daha yoğun olmalarıyla ayırt edilirler. Sitoplazmalarında özel granüller denen ikinci bir tip granül oluşmaya başlar. Bir sonraki evrede oluşan metamiyelositler çekirdeklerinin şekli ile ayırt edilebilirler. Çekirdekteki şekil değişikliği devam eder ve bir müddet sonra ince uzun düz veya kıvrımlı bir çekirdek oluşur. Bu özellik yüzünden lökositlere bant form nötrofil lökositler denir. Son olgunlaşma evresinde çekirdek iyice kıvrılarak çok loblu hale gelir. Loplara çok ince kromatin iplikleriyle birbirine tutunur. Şekil 2.5.'te granülositlerin gelişim aşamaları gösterilmiştir. Çoğunlukla olgun lökositler kemik iliğinden dolaşıma salınır, ancak enfeksiyon durumlarında bant-form veya metamiyelositler de dolaşıma katılır.



Şekil 2.5: Granülositlerin Gelişim Aşamaları

2.5.2. Granülositler

Granülositler, lökositlerin bir alt grubu olup, vücudun enfeksiyonlara karşı savunmasında önemli rolleri vardır. 3 tip granülosit vardır.

2.5.2.1. Eozinofiller

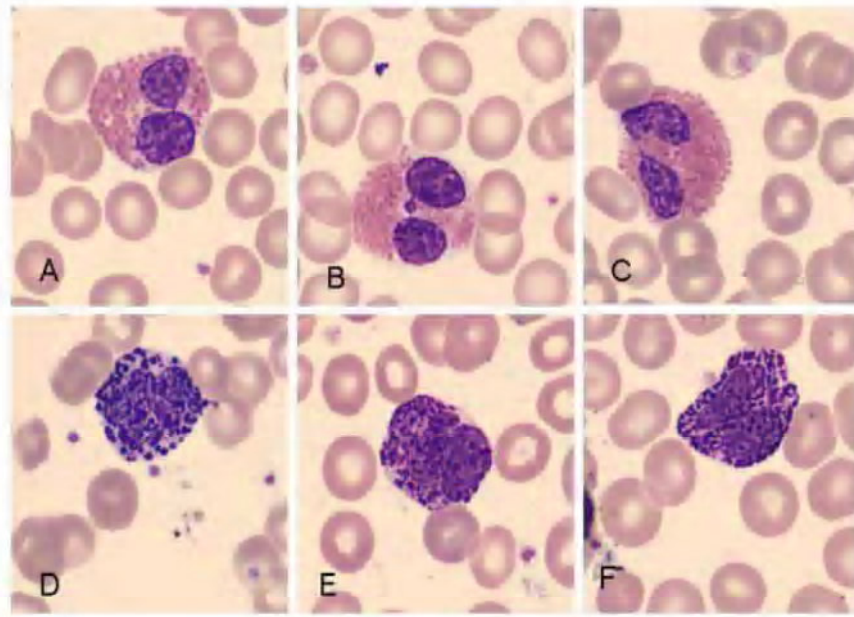
Kemik iliğindeki multipotent kök hücrelerden oluşur. Olgunlaştıktan 3-4 gün sonra dolaşıma geçerler. Dolaşımda 3-4 saat gibi kısa bir süre kaldıktan sonra, bağ dokusuna geçerler ve burada 8 gün gibi kısa bir süre yaşarlar. Plazmada süspansiyon halde bulunan hücrelerin çapı 9 μ , kuru yaymada 12 μ kadardır. Granülleri, kan boyaları ile boyandığında pembe- kırmızı renk tonunda görünürler. Bu özellikleri sebebiyle ışık mikroskopuyla kolayca tanınır, tespit edilebilirler. Çekirdeği, nötrofil çekirdeğinden daha az segmentli olup, genellikle 2 loblu görünür. (Şekil 2.6)

Eozinofiller organel yönünden fakirdir. Bir çift sentriyol, küçük bir golgi, birkaç mitokondri ve pek gelişmemiş bir endoplazmik retikulum bulunur.

Eozinofillerde özel granüller ve azurofil granüller olmak üzere 2 tip granül bulunur. Özel granüller içindeki, esas temel proteinler (MBP) eozinofil katyonik protein (ECP), eozinofil peroksidaz (EPO) ve eozinofil kökenli nörotoksin (EDN) bulunur. MBP, ECP

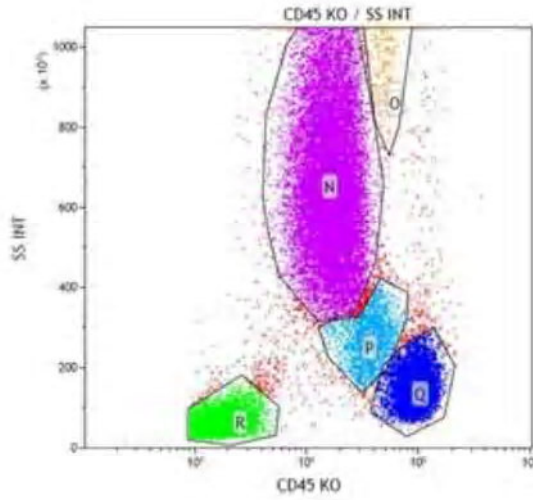
ve EPO protozoa ve parazit helmintler üzerinde güçlü sitotoksik etkiye sahipken, EDN parazitlerin sinir sisteminin bozulmasına neden olur.

Eozinofillerin azurofil granülleri lizozomlardır. Çeşitli asit hidrolazları ve diğer hidrolitik enzimleri içerir. Bunlar antijen-antikor komplekslerinin ortadan kaldırılmasında ve parazitlerin yok edilmesinde işlev görür. Bu yüzden, parazitik hastalıklarda ve çeşitli alerji tepkimelerinde sayılarında artış görülür.



Şekil 2.6. Eozinofil yayma görüntüsü. A, B, C- Normal eozinofillerde, çekirdek genellikle iki lobludur. Koyu portakal sarısı boyanan granüller çekirdeği örtmez. D, E, F- Bazofil parçalılar. Siyaha yakın koyu mavi boyanan bazofil granüller genellikle çekirdeği de örttüğünden çekirdek yapısı iyi seçilemez

SS/FS karakterleri nötrofile benzer ve SS genel olarak daha yüksek bir seviyededir. İmmün fenotiplendirmede CD45 pozitifliği, CD16 negatifliği ve SS değeri nötrofillerden daha fazla olması önemli ayırıcı özellikleridir. (Şekil 2.7.)



Şekil 2.7. SS/CD45 Kapısında Eozinofil Akım Sitometri Görüntüsü O: Eozinofil

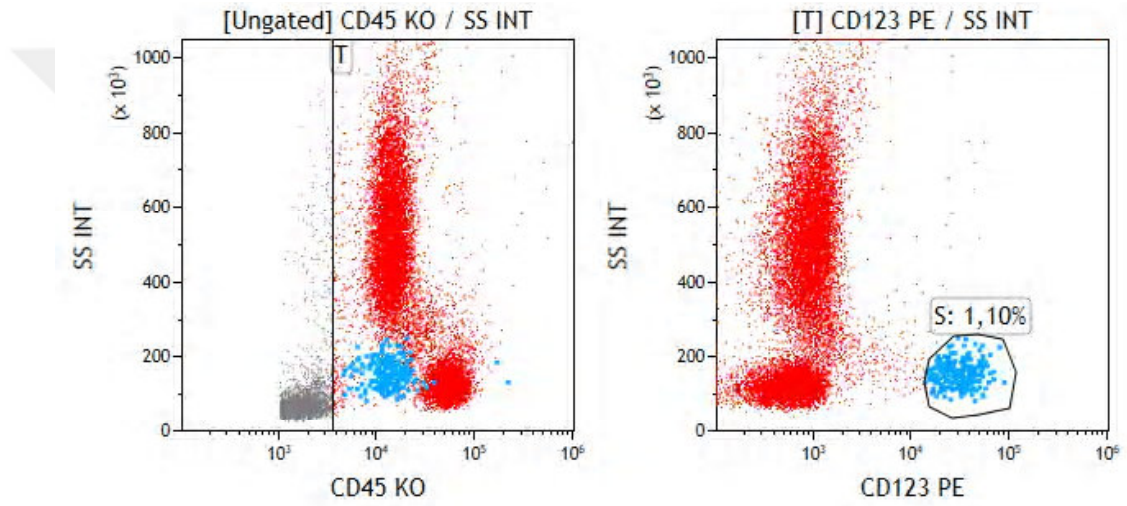
2.5.2.2. Bazofiller

Toplam lökosit sayısının %1'inden azını oluşturan bazofiller, granülositler içinde en az sayıda bulunan hücrelerdir. 10 μ çapındadırlar. Çekirdekleri uzunca ve çoğunlukla U veya J şeklinde olmasına karşın, iki loblu da görülebilir. Fakat çekirdek segmentasyonu diğer granülositlerde görülenden çok daha azdır. Elektron mikroskobu incelemelerinde küçük bir golgi, birkaç mitokondri ve pek gelişmemiş endoplazmik retikulum uzantıları görülür. Hücre sitoplazmasında bol miktarda glikojen bulunur.

Kanın bazofilleri ile bağ dokusunun mast hücreleri genelde birçok özellikleri açısından birbirine benzer. Metakromatik granüllere sahip olan her iki hücre kemik iliğinde aynı kök hücreden oluşur. Ancak mast hücrelerini oluşturacak öncül hücre bağ dokusuna göç ettikten sonra çoğalıp gelişirken; bazofiller oluştuğları kemik iliğinden doğrudan dolaşım kanına geçerler. İki hücrelerinde işlevleri aynıdır. Dokudaki mast hücreleri hareketsizken, bazofiller hareketlidir. Bazofil ve mast hücrelerinin başka bir benzerliği de yüzey zarlarındaki Ig-E için özel Fc reseptörünün yer almasıdır. Ig-E, ateş astım ve alerjik dermatitte normalin 20 katı kadar yükselen bir serum bileşenidir. Dokuya bir alerjen girdiğinde, bazofil ve mast hücrelerinin yüzeyinde Ig-E ile birleşir. Bu olay, bu hücreleri uyararak degranülasyona neden olup, histamin ve diğer aracı moleküllerin salınmasına yol açar. Histamin damar genişliğini artırarak dokuda ödeme neden olur. Bu bölgede şişme görülür.

Bazofillerin yüzey zarında CD40L denen bir protein ifade edilir. Bu protein B lenfosit üzerinde bulunan tamamlayıcı reseptörü (CD40) ile etkileşerek Ig-E sentezinin artmasına neden olur. Temel bazofil belirteci CD123'tür.(Şekil 2.8.)

Bazofillerin sitoplazmalarında özel granüller ve azurofil granüller olmak üzere 2 tip granül bulunur. Özel granüller nötrofil ve eozinofillerin granüllerinden daha büyük; ama daha az sayıdadır. Azurofil granüller, bazofillerin lizozomları olup, diğer lökosit tiplerinde bulunan lizozomal asit hidrolazlarla aynıdır.



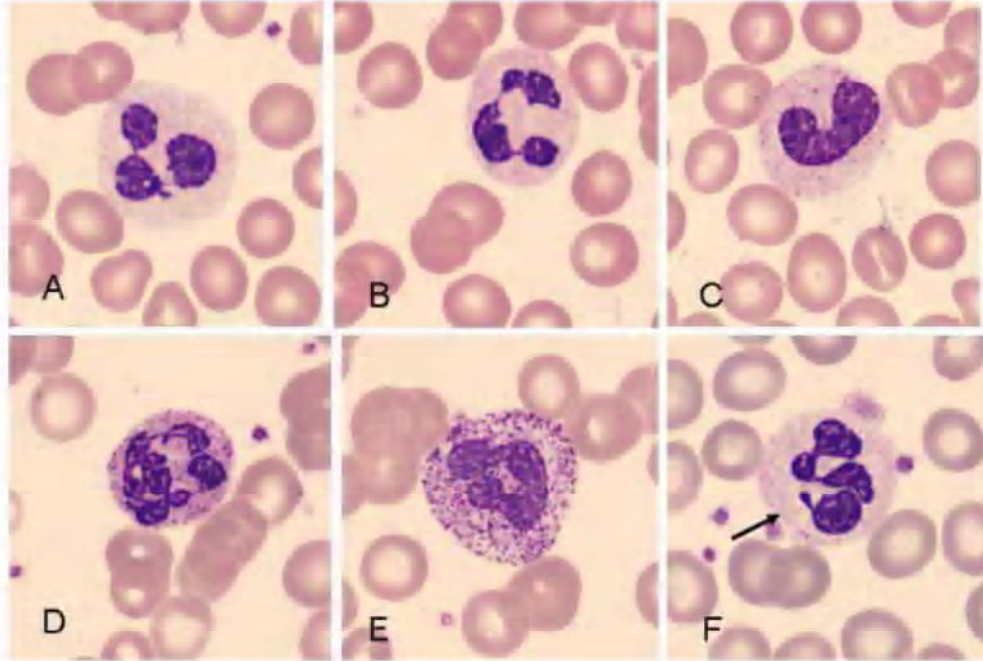
Şekil 2.8. SS/45 ve SS/CD123 Kapısında Bazofil Akım Sitometri Görüntüsü

2.5.2.3. Nötrofiller

Nötrofiller, tüm kan lökositlerinin %55-65'ini kapsayan, dolayısıyla kanda en fazla bulunan lökositlerdir. Bir mm³ kanda 3000-6000 kadar nötrofil bulunur. Dolaşım kanında çapları 7 µ, damar dışında ve kuru yaymalarda 10-12 µ kadar olabilir. İki veya çok loblu karakteristik çekirdeğiyle kolayca tanınabilir. Çekirdekteki lob sayısı hücrenin yaşıyla ilişkilidir. Lobsuz, ince uzun çekirdekler varken; zamanla iki veya çok loblu çekirdekler oluşur. Çekirdek şeklinin değişkenliği yüzünden kısaca **poliler** diye adlandırılan bu hücrelere **polimorf nükleer** (PMN) lökositler de denir.(Şekil 2.9.)

Çekirdek kromatini çok koyu ve yoğun boyandığından çekirdekçiğin belirlenmesi olanaksız olur. Kadınların nötrofillerinde yoğunlaşmış inaktif X kromozomunu belirten

kromatin, çok küçük ayrı bir lobül (**Barr Cisimciği**) oluşturur. Şeklinin davul tokmağına benzemesi sebebiyle davul tokmağı da denmektedir.



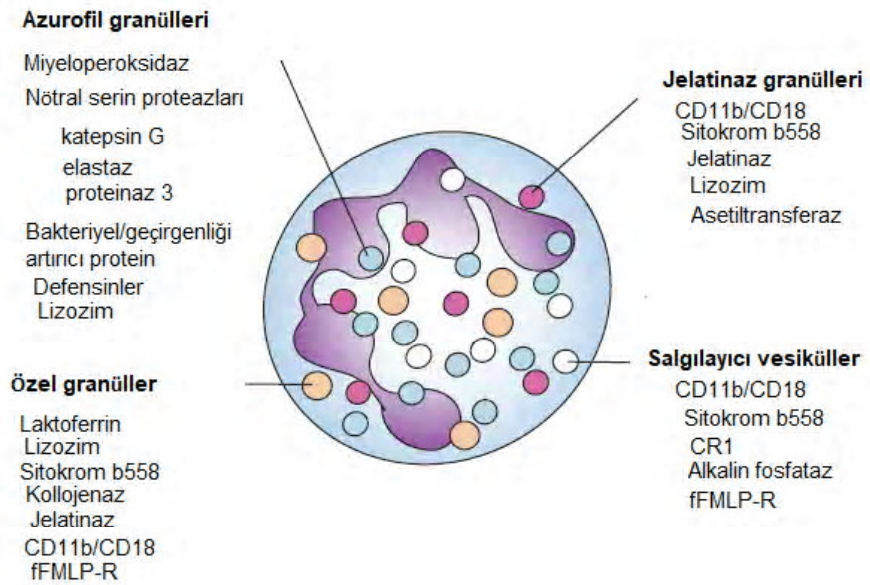
Şekil 2.9. Nötrofil Yayma Görüntüsü. Şekil A ve B çekirdeklerindeki lob sayısı beşten az olan olgun nötrofilleri göstermektedir. Bazı nötrofillerin çekirdekleri loblara ayrılmamıştır. “C” veya “S” şeklinde olabilirler. Bu hücreler nötrofillerin genç şekilleridir. Çomak veya Stab olarak isimlendirilirler. Çomakların oranı normalde %5’i geçmez. (Şekil C). D çekirdeği beşten fazla loblu (hipersegmente) parçalı nötrofil.. E sitoplazmada toksik granülasyon. Şekil F Kadınlarda iki X kromozomuna tekabül eden davul tokmağı şeklindeki çekirdek çıkıntısı (Barr cisimciği).

Organel yönünden oldukça fakir olan nötrofillerde pek gelişmemiş GER ve Golgi kompleksi ile çok az sayıda ribozom bulunur. Nötrofiller uygun boyalarla boyandığında sitoplazmalarında üç tip granül görülür. Koyu ve büyük olan azurofil granüller (birincil granüller), açık renkli ve en küçük boyutta olan özel granüller (ikincil granüller) ve üçüncül granüller. Olgun nötrofiller ayrıca fonksiyonlarıyla ilgili spesifik proteinleri

depolayan granüller ve salgılayıcı veziküller içerir. Bu granüllerin granülopoez sırasında üretimleri ve farklı protein belirteçleri spesifik olarak şöyledir;

- (i) Birincil veya azurofilik granüller miyeloblast ile promyelosit evresinde bulunur (markerler: miyeloperoksidaz, CD63)
- (ii) Sekonder veya spesifik granüller miyeloblast ile promyelosit evresinde bulunur (lipokalin-2, CD66b)
- (iii) Üçüncül, tersiyer veya jelatinaz granülleri bant hücresi aşamasında bulunur (jelatinaz B, CD11b)
- (iv) Son olarak, salgılayıcı veziküller sadece olgun nötrofillerde bulunur (Cassatella M. ve Ark; 2019).

Bu granüllerin içerdikleri enzimler Şekil 2.10.' de gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Nötrofillerdeki Granül Çeşitleri ve İçerikleri

Azurofil granüllerde miyeloperoksidazi asit fosfataz, B-glukuronidaz ve birçok hidrolitik enzim ve çok çeşitli antimikrobiyal efektör moleküllerini içerir. Bu yüzden bunlar primer lizozom olarak kabul edilir. Azurofil granüller özel granüllerden sayıca daha azdır. Özel granüllerde Tip IV kollojenaz, fosfolipaz, komplement aktivatörleri, laktoferrin ile bakteristatik ve bakterisit aktiviteye sahip lizozim yer alır. Nötrofillerde iki tip üçüncül granül bulunur. Birincisi fosfatazları

içerirken, diğer tip nötrofillerin bağ dokusundaki hareketini kolaylaştıran metalloproteinazları (jelatinazları) içerir. Bu paketler, hücre içi translokasyon, nötrofil plazma membran bileşiminin hızlı bir şekilde değiştirilmesi, hücre dışı akıntı, diğer hücrelerle iletişim ve/veya antimikrobiyal efektör fonksiyonlarını etkinleştirmek için "kullanıma hazır" bir lipit iki tabakalı membran ile kaplıdır. (Cassatella M ve ark, 2019) ; (Carlos Rosales, 2018).

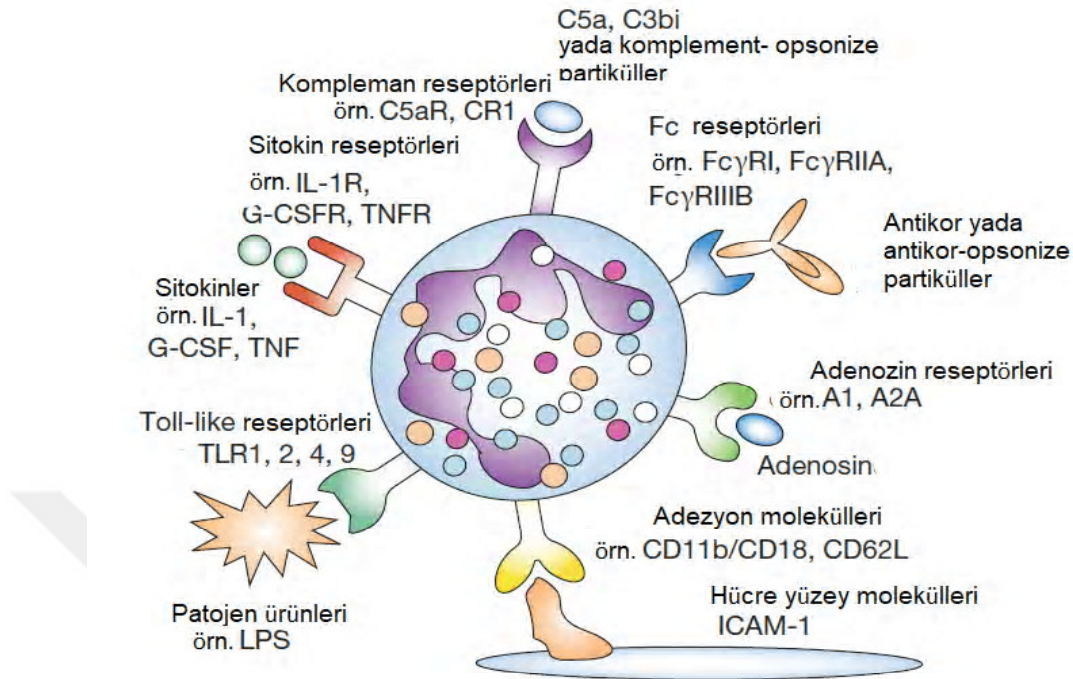
2.5.2.3.1. Nötrofillerin İmmünofenotiplendirilmesi

Nötrofiller, konukçu enfeksiyonlara karşı savunmada kritik bir rol oynar ve bu amaçla çeşitli efektör mekanizmalar gerçekleştirebilirler. Bununla birlikte, otoimmünite ve kanser dahil, nötrofillerin aktivitelerinin konakçı için zararlı olabileceği bir takım patolojik durumlar da vardır. Bu nedenle nötrofillerin aktivitelerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Diğer bağışıklık hücrelerinde olduğu gibi, nötrofil efektör fonksiyonlarının çoğu, plazma zarındaki bir dizi immünoresptör tarafından düzenlenir (Dieke J ve ark. 2016).

- **Nötrofillerde eksprese edilen immünoresptörler.**

Nötrofiller üzerindeki birkaç hücre yüzeyi reseptörü sınıfı, hücrel aktivasyon ve hücre içi sinyal iletimi ile ilgilidir. Bunlar arasında G protein-bağlantılı reseptörler (GPCR'ler), sitokin ve kemokin reseptörleri, yapışma reseptörleri (örneğin integrinler veya selektinler) ve Tolllike reseptörleri (TLR'ler) veya C tipi lektin reseptörleri gibi desen tanıma reseptörleri (PRR'ler) bulunur (CLR'ler). Ek olarak, nötrofiller tarafından immün tepkilerin modülasyonu, hücre içi ITAM veya ITIM motifleri yoluyla sinyalleme aracılığı eden Ig benzeri bağlanma alanları içeren yapılar olarak tanımladığımız aktive edici ve inhibe edici immüno reseptörler vasıtasıyla düzenlenir.

Nötrofiller üzerindeki immünoresptörlerin büyük çoğunluğu, genellikle V- veya C-set tiplerinden olan hücre dışı Ig benzeri alanların varlığı ile karakterize edilen Immunoglobulin süper ailesinin (IgSF) üyeleridir (Dieke J. ve ark. 2016). Şekil 2.11.'da nötrofil yüzey reseptörleri şematize edilmiştir.



Şekil 2.11. Nötrofil Yüzey Reseptörleri

a. Fc reseptörleri

Nötrofiller üzerindeki en iyi karakterize edilmiş immünoresptör ailesi, Fc reseptörleridir. IgG ile opsonize edilmiş bakteri, maya ve mantarların fagositozu, bu mikroplara karşı konakçı savunmada çok önemlidirler. İnsan nötrofilleri üç tip Fc reseptörü ifade eder: sadece aktive edilmiş nötrofiller tarafından ifade edilen yüksek afiniteli FcRI (CD64) ve yapısal olarak eksprese edilen orta afiniteli FcRIIa (CD32a) ve FcRIIb (CD16b). FcRI ve FcRIIa tipik aktive edici reseptörlerdir. FcRI, reseptör ligasyonu üzerine FcR zinciri ile birleşirken, FcRIIa bir iç ITAM motifi içerir (Dieke J. van Rees ve ark. 2016). Kafkas popülasyonunun ~% 20'sinde, FCGR2C'nin 3 ekzonundaki bir SNP bir ORF üretir, bu da ek FcRIIc ekspresyonu ile sonuçlanır. FcRIIc, esasen, FcRIIb inhibitör reseptörünün hücre dışı bölgesini (nötrofillerde eksprese edilmez) ve FcRIIa'nın sitoplazmik kısmını içeren, olay üzerinde eşit olmayan bir geçişten kaynaklanan hibrit bir moleküldür. Hücre içi ITAM motifi nedeniyle, FcRIIc aktive edici bir reseptördür.

c. Siglec reseptörleri

Sialik asit bağlayıcı Ig benzeri lektinler (Siglecs), çoğu miyeloid hücrelerinde eksprese edilen sialik asit tanıyan aktifleştirici ve inhibe edici reseptörler ailesini içerir. Sialik

asitler, konak hücreler tarafından ve ayrıca bir dizi patojen tarafından eksprese edilen ve/veya salgılanan negatif yüklü şekerlerdir. Bu nedenle, işaretler, bir dereceye kadar, özü, öz-özden ayırt edebilir ve bağışıklık hücrelerinin faaliyetlerini buna göre düzenleyebilir. Bu etkileşimler, hematopoez ve kan hücresi proliferasyonundan ve farklılaşmasından apoptoz indüksiyonuna veya hücrel aktivasyonun inhibisyonuna kadar çeşitli işlemlere aracılık eder.

d. CEACAM reseptörleri

Karsinoembriyonik antijen (CEA) ile ilişkili hücre adezyon molekülleri (CEACAM'ler), konakçı molekülleri ve ayrıca patojenleri (özellikle bakteriyel opaklıkla ilişkili (Opa) proteinleri) tanır ve hücre-hücre etkileşimi işlemlerini düzenler. CEACAM'lar, diğer CEACAM ailesi üyeleri ile hem homofilik hem de heterofilik etkileşimlere aracılık eder ve biyolojilerini ayrıntılı olarak anlamak için karmaşık hale getirir.

e. TREM reseptörleri

TREM-1 ve TLT-2 nötrofillerde eksprese edilir. TLT-2, birincil (azurofilik) granüllerde bulunur ve enflamatuar mediatörlerle uyarıldıktan sonra degranülasyon yoluyla yukarı doğru düzenlenir. TLT-2 daha sonra nötrofiller üzerindeki GPCR'lere bağlanan agonistler (fMLP) sonrasında nötrofil aktivasyonuna ve kemotaksiye aracılık edebilir.

Akım sitometri gibi yeni teknolojiler, kemik iliği ve periferik kandan elde edilen örneklerdeki nötrofilleri hem diğer kan hücrelerinden ayırt etmek hem de farklı formlardaki nötrofilleri belirlemek için çeşitli hücre yüzeyi reseptörünün ifadesi kullanılmaktadır. Bu reseptörlerin başlıcaları MPO, CD10, CD11b, CD13, CD15, CD16, CD33, CD38, CD62L'dir. Olgun ve olgunlaşmamış nötrofiller arasındaki ayırımın kolaylaştırılması için CD10, CD13, CD64 ve CD87 gibi ilave markerler kullanılabilir (Hidalgo A ve ark.2019), (Avcılar H. ve ark.,2014). İnsanlarda, olgun nötrofiller CD15 + CD66b + CD16 + CD14- olarak tanımlanır (Silvestre-Roig C ve ark. 2019).

2.5.2.3.2. Nötrofil Heterojenitesi

Nötrofiller, enfeksiyonlara ve doku hasarına birincil cevap verenlerdir. Nötrofillerin, fagositoz, degranülasyon ve nötrofil hücre dışı tuzak (NET) üretimi dahil olmak üzere güçlü antimikrobiyal fonksiyonlar sergileyen homojen bir hücre popülasyonundan oluştuğu düşünülmüştür. Ancak artan kanıtlar, bu hücrelerin farklı alt popülasyonlarının

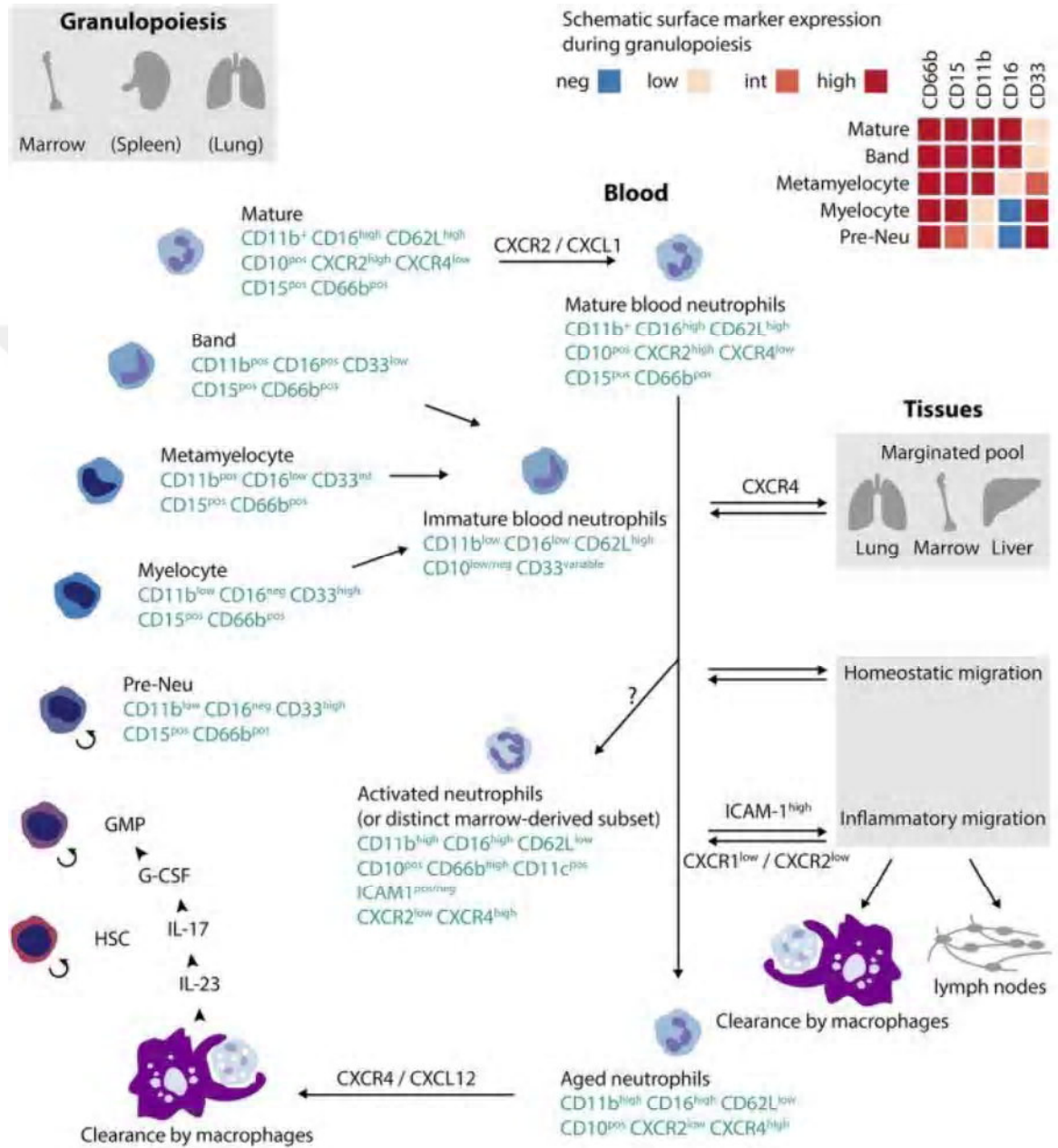
immüno-regülatör olduğunu ve kanser ve diğer enflamatuar hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir (Silvestre-Roig C ve ark. 2019)

İnsan nötrofilleri, T ve B hücreleri gibi uyarlanabilir bağışıklık hücreleri veya ilgili alt popülasyonlar ile dendritik hücreler, monositler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler de dahil olmak üzere doğal immün hücrelerle in vitro ve in vivo çapraz karışma sağlayabilir. Bu iki yönlü etkileşimleri kurarak, bir yandan nötrofiller, hayatta kalma ve efektör fonksiyonlarını modüle eden sinyalleri alabilirken, diğer yandan, diğer sinyaller, doğal veya adaptif immün efektör tepkilerini başlatabilir, çoğaltabilir ve/veya baskılayabilir. Moleküler seviyede, hücreler arası sinyaller çoğunlukla 'alıcı' hücrelerin reseptörlerine etki eden efektör hücreler tarafından üretilen proteinler yoluyla iletilir (Cassatella ve ark, 2019).

Nötrofiller yaşam döngüleri boyunca önemli fenotipik heterojeniteye sahiptirler.(Şekil 2.12.) Olgun Nötrofiller karakteristik bir çok lobüler çekirdek ve yüksek yüzeyde CD16 (FcyRIII), CD62L (L-selektin) ve CD10 (nötr endopeptidaz), nötrofil soy markerleri CD15 ve CD66b ile birlikte ekspres eder . Bant hücrelere göre daha az olgun olan nötrofiller, yüksek CD33 (Siglec-3) ve daha düşük CXCR2 gösterir; bu, kemik iliği nişinden mobilizasyonu sağlayan reseptördür. Olgunlaşmamış nötrofiller olgun nötrofillerden daha fazla CXCR4 ekspres eder ve muhtemelen kemik iliğinde tutulmalarını teşvik eder. Yaşlanma, CD11b ve CD11c integrinlerinin yüksek ekspresyonunu, düşük CD62L'yi ve fagositozun bir inhibitörü olan düşük CD47'yi de içeren diğer değişikliklerle birlikte görülür. Olgunlaşma ile ilgili bu varyasyon efektör fonksiyonundaki değişikliklere karşılık gelir. Yaşlı nötrofiller, immün savunma için iltihaplanma bölgelerine göçte özellikle etkili olabilir, ancak olgunlaşmamış nötrofiller belirli patojenlere karşı üstün bakteri öldürücü işlev gösterirler (Grieshaber-Bouyer R. ve Peter A. Nigrovic 2019).

Olgunlaşma değişikliklerinin ötesinde, nötrofiller fenotipi aktivasyonla değiştirir. Hücre içi granüllerin mobilizasyonu, yalnızca çözünür mediatörleri değil aynı zamanda nötrofil yüzeyine önceden oluşturulmuş membran proteinlerini de getirir. Bunlar arasında CD66b, inte2 integrin CD11b / CD18'in (Mac-1) a ve β zincirleri ve bazı bireylerde ilişkili proteaz proteinaz 3 (PR3). Aktif nötrofillerde hızla CD62L dahil diğer yüzey belirteçleri kaybolur. Aktif nötrofiller, dinlenme nötrofillere kıyasla fonksiyonda çok sayıda değişiklik gösterir. İç-dış sinyal ve kümelenme integrin bağlanmasını artırır

ve aktive edilmiş nötrofiller böylece lipid mediatörlerinin, sitokinlerin, kemokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesinin yanı sıra gelişmiş hareketlilik sergiler (Linden M, Meyaard L, 2016).



Şekil 2.12. Nötrofil Heterojenitesi (Grieshaber-Bouyer R. ve Nigrovic PA, 2019)

2.5.2.3.3. Nötrofiller Patojen Etkileşimleri

Doğal bağışıklık sistemi istilacı mikroorganizmalara karşı ilk ana savunma hattıdır. Polimorfonükleer lökositler (PMN'ler veya nötrofiller) insanlarda en bol bulunan lökositlerdir ve istilacı patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisi için gereklidir. Gelişmesi için zaman gerektiren ve spesifik mikroplarla önceki etkileşime bağlı olan

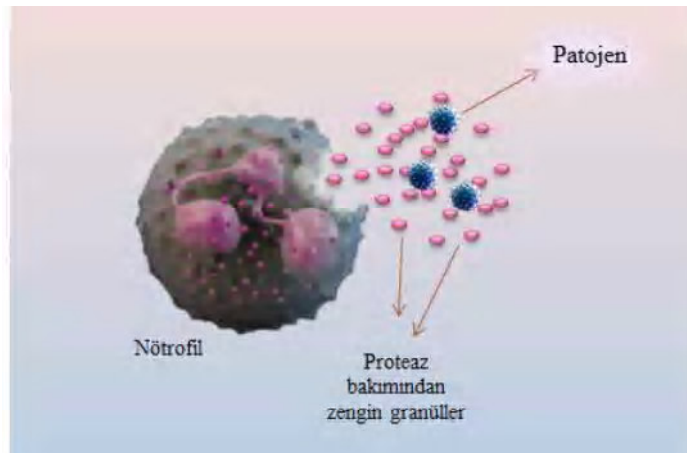
kazanılmış bağışıklık tepkisi ile karşılaştırıldığında, nötrofillerin mikroorganizmaları öldürme kabiliyeti anıdadır, spesifik değildir ve önceki mikroorganizmalara maruz kalmamasına bağlı değildir (Viktoria Rungelrath ve ark. 2019).

Nötrofillerin istilacı mikropları hızla öldürme kabiliyeti konukçu sağlığını korumak için vazgeçilmezdir. Nötrofil mikrobisidal işlemlerde meydana gelen kusurlar veya PMN bolluğundaki genel bir azalma insan sağlığına zararlıdır ve sıklıkla ciddi ve tekrarlayan enfeksiyonlarla sonuçlanır (Viktoria Rungelrath ve ark. 2019).

Kemik iliğinde farklılaşma sırasında, nötrofiller patojen tanıma, kemokin reseptörleri, yapışma-ilişkili moleküller, FcR'ler ve sitokin reseptörleri gibi çeşitli reseptörleri eksprese ederler. Olgun nötrofiller kan damarlarında dolaşır ve istilacı patojenleri tanıyarak ve nötralize ederek immün gözetlemede rol oynarlar. Organizmayı mikrobiyal enfeksiyon belirtileri için sürekli kontrol ederler ve buldukları zaman, bu hücreler istilacı patojenleri tuzağa düşürmek ve öldürmek için hızlı bir şekilde tepki verirler. Nötrofiller için üç ana antimikrobiyal fonksiyon tanınır: fagositoz, proteaz bakımından zenginleştirilmiş granüllerin salınması (degranülasyon) ve reaktif oksijen türlerinin oluşması ve nötrofil-hücre dışı tuzakların oluşumudur (Rosales C, 2018) (Hyun Y ve Hong C, 2017).

2.5.2.3.3.1. Degranülasyon

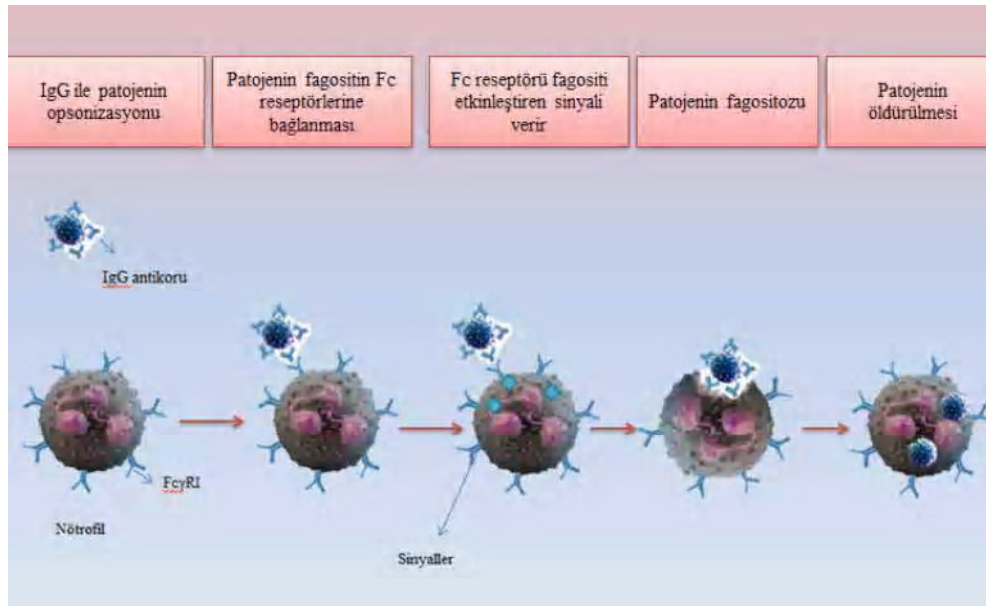
Nötrofile ait diğer bir savunma strateji olan degranulasyonda ise enfeksiyon çevresine patojenlere etkili moleküller salınarak onunla mücadele yapılır. Bu moleküller seçici olmadığı için konak dokusu üzerinde de patojen etkiye sahiptir. (Şekil 2.13.)



Şekil 2.13. Degranülasyon. Nötrofiller patojenle karşılaştıklarında proteaz bakımından zenginleştirilmiş granüllerini hücre dışına salarak mikropları yok ederler.

2.5.2.3.3.2. Fagositoz

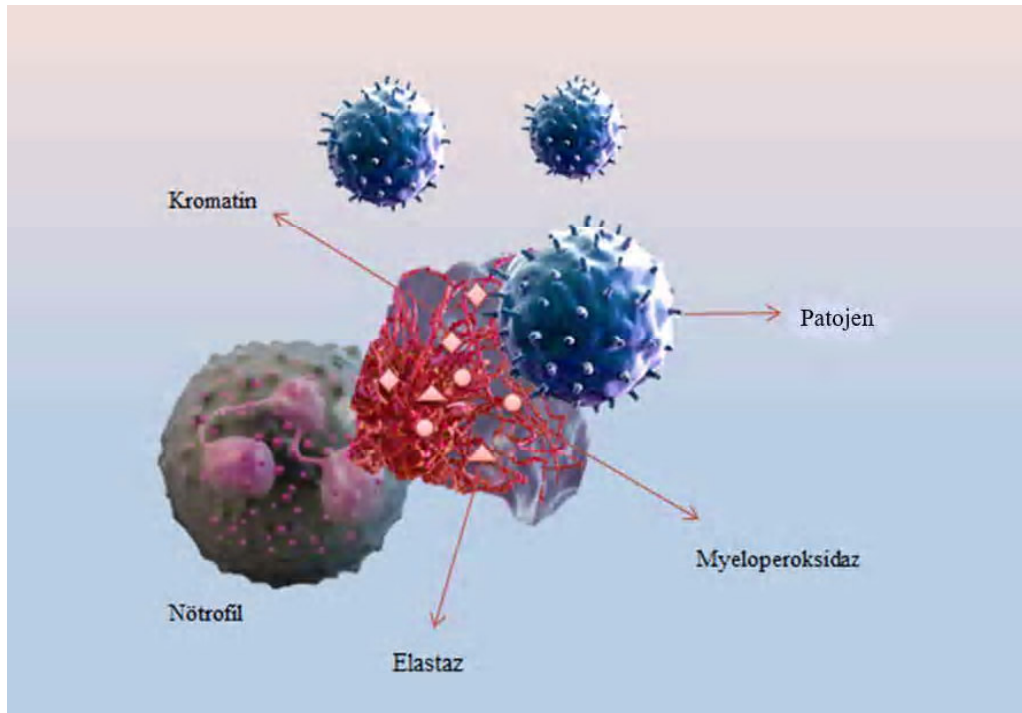
Antikorlar mikropları kaplar ve onların fagositler tarafından yutulmalarını kolaylaştırır. Fagositozdan önce partiküllerin kaplanması işlemine opsonizasyon, mikropları kaplayan ve onların fagositozunu artıran moleküllere ise opsonin denir. Nötrofiller hızlı ve güçlü fagositlerdir. Fc γ reseptörleri, C tipi lektinler veya kompleman reseptörleri gibi opsonik reseptörlerin ligasyonu üzerine, nötrofil membran, bir partikül veya bir mikrop, membran lipidlerinin karmaşık bir etkileşimi, hücre içi sinyal kaskadları ve sitoskeletal yeniden düzenlemelerin aracılık ettiği bir prosesi içine alır. Daha sonra, birincil ve ikincil granüller, fagozom ile kaynaşır ve antimikrobiyal içeriğini deşarj eder. Fagositoz dakikalar içinde ortaya çıkar ve kompleman sistemi, IgG antikorları ve hücre ön aktivasyonu ile güçlendirilir. Fagositozla fagozom içindeki patojen oksidatif ve oksidatif olmayan öldürme mekanizması ile yok edilir. Oksidatif olmayan öldürme mekanizmasında farklı granül parçalarının membranları fagozomal membran ile birleşir ve granül bileşenlerini fagozoma bırakır. Oksidatif öldürme mekanizması (respiratorik yanma) ise reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimi yoluyla olmaktadır (Yıldız K, 2016). NADPH-oksidaz, membran bağlı ve sitozolik bileşenlerden oluşan çok bileşenli bir enzim sistemidir (Björnsdottir H ve ark, 2016). Şekil 2.14.'te fagositoz mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Antikor aracılı opsonizasyon ve patojenlerin fagositozu. Belli IgG alt grubundaki antikorlar mikroplara bağlanır ve sonra fagositlerdeki Fc reseptörleri tarafından tanınır. Fc reseptöründen alınan sinyaller opsonize edilmiş mikropların fagositozuna katkıda bulunur ve fagositleri bu mikropları ortadan kaldırmak için etkin kılar.

2.5.2.3.3.Nötrofil Ekstraselüler Tuzaklar (NET)

Nötrofiller istilacı mikroorganizmaları yakalamak için hücre dışı ortama nükleer bileşenleri (DNA ve histonlar) ve sitoplazmik granüler proteinleri (elastaz, myeloperoksidaz, katepsin G ve metaloproteazlar) salgılayabilirler. Bu patojen öldürme mekanizmasına “NET (Neutrophil Extracellular Traps) – Nötrofil Hücre Dışı Tuzaklar” denir. Peptidylarginin deiminaz (PAD) 4, NET oluşumunda, nükleer DNA'yı nükleozomlara ayırmak ve böylece DNA ipliklerini serbest bırakmak için, kromatin histonları üzerindeki arginin kalıntılarını (pozitif yükten yoksun bırakarak) serbest bırakarak sitriline dönüştürerek kilit bir rol oynar. Bu sırada, elastaz ve MPO granüllerden çekirdeğe taşınır ve histonları parçalayarak kromatin yoğunlaşmasını kolaylaştırır. Daha sonra, granül bileşenleriyle kaynaşmış yoğunlaştırılmış kromatin, hücre dışı boşluğa salınır (Şekil 2.15) (Ma Y. ve ark 2019), (Kader Y. 2016). Bu yapıların organizmadaki görevinin patojeni enfeksiyon bölgesinde fiziksel olarak çevrelemek ve yayılmasını engellemek, ayrıca yapısında bulunan histonlar, granuler enzimler (myeloperoksidaz ve elastaz) ve bazı sitoplazmik proteinler (laktoferrin ve katepsinler) ile patojen üzerine antibakteriyel etki ve virülensini azaltmak olduğu belirlenmiştir. (Süral N ve Yıldız K, 2017).



Şekil 2.15. Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları.

2.6. Granüositlerin İmmünofenotiplendirilmesi

Granüositler üzerindeki çeşitli reseptörlerin hücre yüzeyi ekspresyonu hızlı sonuç almak için akım sitometri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

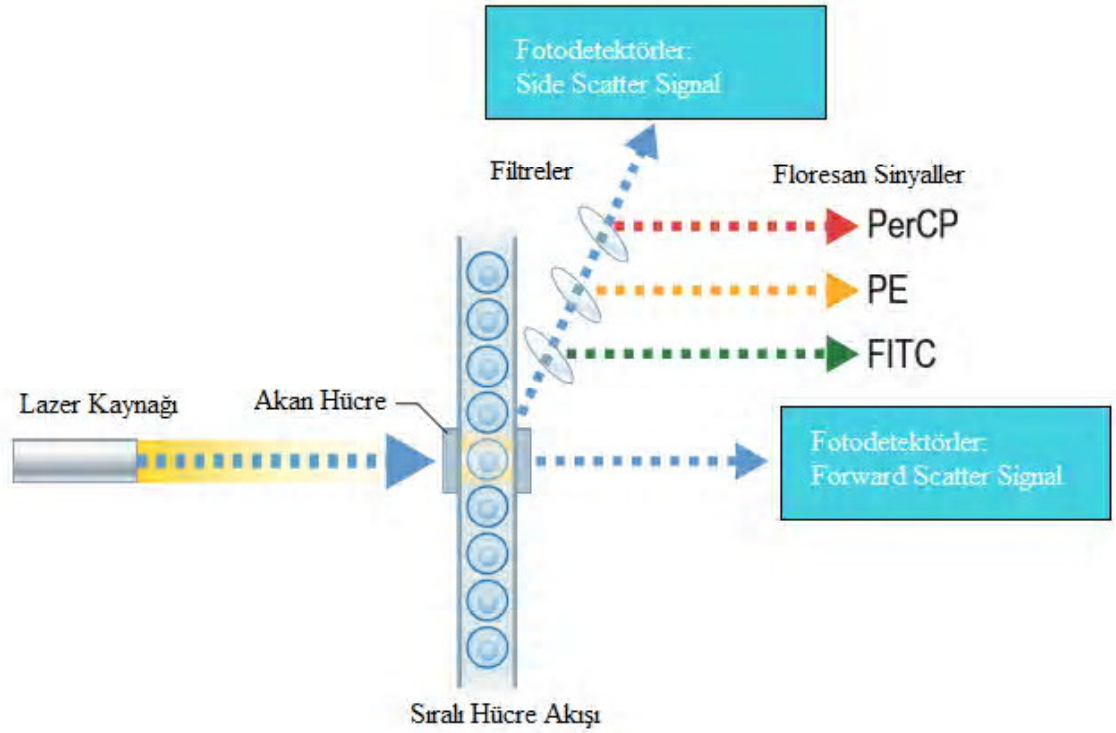
2.6. 1. Akım sitometri

Akım sitometrisi, immünofenotipleme olarak adlandırılan bir yöntem olan lökosit popülasyonlarının ve alt popülasyonların tanımlanması dahil hematopoietik hücrelerin değerlendirilmesinde standart bir laboratuvar aracı haline gelmiştir. Bu teknolojinin klinik uygulaması, tanı laboratuvarlarında rutin kullanıma uygun cihazların ve veri analiz sistemlerinin geliştirilmesiyle kolaylaştırılmıştır. Ek olarak, bir dizi farklı floresan göstergeye (flourokromlar) doğrudan konjuge edilmiş lenfosit (ve diğer hematopoetik hücre) yüzey antijenlerine özgü genişletilmiş monoklonal antikorlar (mAb'ler), çok renkli (polikromatik) çalışmaları kolaylaştıran kapsamlı bir reaktif paneli sağlar.

Akım sitometri ile periferik kan, kemik dahil olmak üzere süspansiyon haldeki beyin omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvıları veya dokuların hücrelerini incelemek mümkündür.

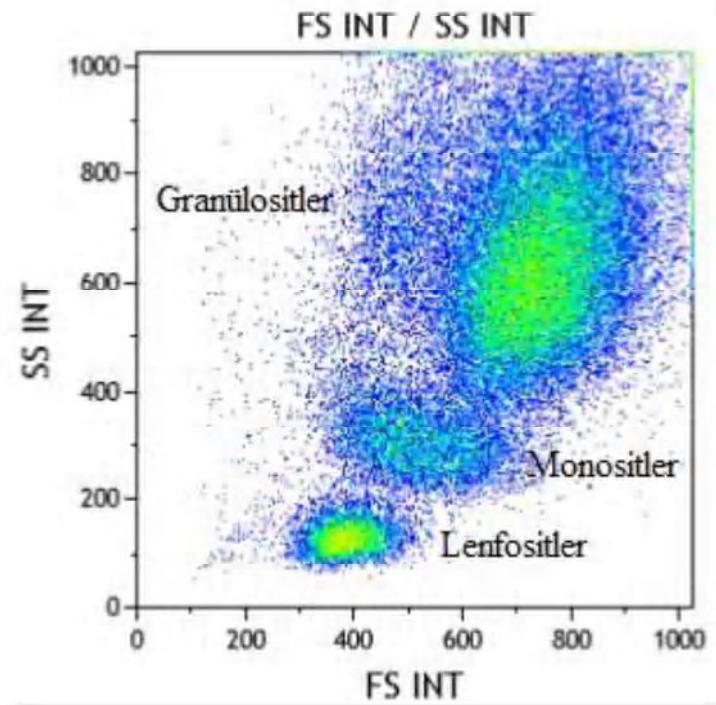
2.6.2. Akım sitometri cihazının temel bileşenleri

- I. Lazer kaynağı
- II. Optik dedektörler ve filtreler
- III. Sıvı akış sistemi
- IV. Bilgisayar ve analiz sistemi



Şekil 2.16. Akım Sitometride Hücrelerin Tek Tek Geçişi Ve Sinyal Türlerinin Gösterimi

Temelde akım sitometri hücrelerin akışkan bir sistem tarafından, bir veya daha fazla lazer kaynağının önünden geçerken optik sistemde bıraktıkları ışık sinyallerinin, analiz için elektronik sinyallere dönüştürülmesi prensibine dayanır. Sinyallerin kaynağı hücrelerin büyüklüğü (FSC), granularitesi (SSC) gibi fiziksel özellikleri veya florokromların oluşturduğu sinyaller de olabilir (Şekil 2.17). Standart klinik cihazlardaki aydınlatma, her biri belirli bir monokromatik ışık kaynağı sağlayan iki veya daha fazla lazer tarafından üretilir. Modern lazerler küçüktür ve ultraviyole (350 nm), menekşe (405 nm), mavi (488 nm), yeşil (532 nm), sarı (560 nm), turuncu (610 nm), kırmızı (560 nm), dahil olmak üzere farklı uyarma gereksinimlerine sahip olan birden fazla florokromun eşzamanlı kullanımına izin verir. Bu şekilde hücreye bağlanan florokromun özelliğine göre hücrenin immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, canlılığı gibi özellikleri hakkında bilgi sahibi olunur.



Şekil 2.17. Akım Sitometride SS/FS Görüntüsü

Klinik immünotiplemelerde yaygın olarak kullanılan florokromlar arasında organik boyalar floresan izotiyosiyanat (FITC), fikoeritrin (PE), peridin klorofil proteini (PerCP) ve allofosiyenin (APC) bulunur. PE ve APC'nin siyanilere (Cy5, Cy5.5 ve Cy7) ve Alexa Fluor boyalarına konjugasyonları, bir florokromdan ikinci florokroma yayılan ışık kaynağı olarak enerji aktarımına dayanan ek emisyon spektrumları ile tandem boyalar üretir.

2.6.1.2. Akım Sitometrinin Kullanım Alanları.

Akım sitometri (ASM) birçok alanda kullanılabilir. Örneğin ;

- İmmünotipleme çalışmaları; hücre alt gruplarını, soy, hücre farklılaşma aşamasını, hücre aktivasyon durumunu ve klonaliteyi tanımlama
- Aktivasyon odaklı çalışmalar: Kalsiyum akışı, hücre içi protein fosforilasyonu, oksidatif patlama: Nötrofil çalışmaları.

- Hücre içi sitokin çalışmaları: Bir bağışıklık tepkisinin T yardımcı-1 (Th1) / Th2 / Th17 durumunu belirleme, in vitro antijene özgü bir cevabın değerlendirilmesi, hücre yüzey çalışmalarının değerlendirilmesi
- Hücre Döngüsü Analizi: S fazının ve anöploidinin tarama yüzdesi için kullanışlıdır. Hücre yüzey çalışmaları ile birleştirilebilir. Apoptozis markerleri ile kombine edilebilir.

2.6.1.3. ASM ile immunfenotipleme yapmanın Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları:

- Kısa zamanda çok fazla sayıda hücrenin özellikleri belirlenebilir
- Hücreler Büyüklük (FSC) ve Granüler (SSC) yapıları, florokrom ile boyanma özellikleri gibi çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir
- Hücreler canlılıkları tespit edilebilir
- Hücrenin fenotipi ve gelişiminin hangi evresinde olduğu tespit edilebilir
- Eş zamanlı bulunan birden çok hematolojik malitenin, bifenotipik hücrelerin belirlenmesi mümkündür.

Dezavantajları:

• Sağlıklı analiz yapılabilmesi için yeterli sayıda hücrenin olması gerekir. Beyin omur ilik sıvısı (BOS), Plevral mayi gibi bazı vücut sıvıları ve hiposelüler kemik iliği gibi bazı numunelerde yeterli sayıda hücre bulunmayabilir. Bu durum analizler için güvenilir veri elde edilmesinin önüne geçer.

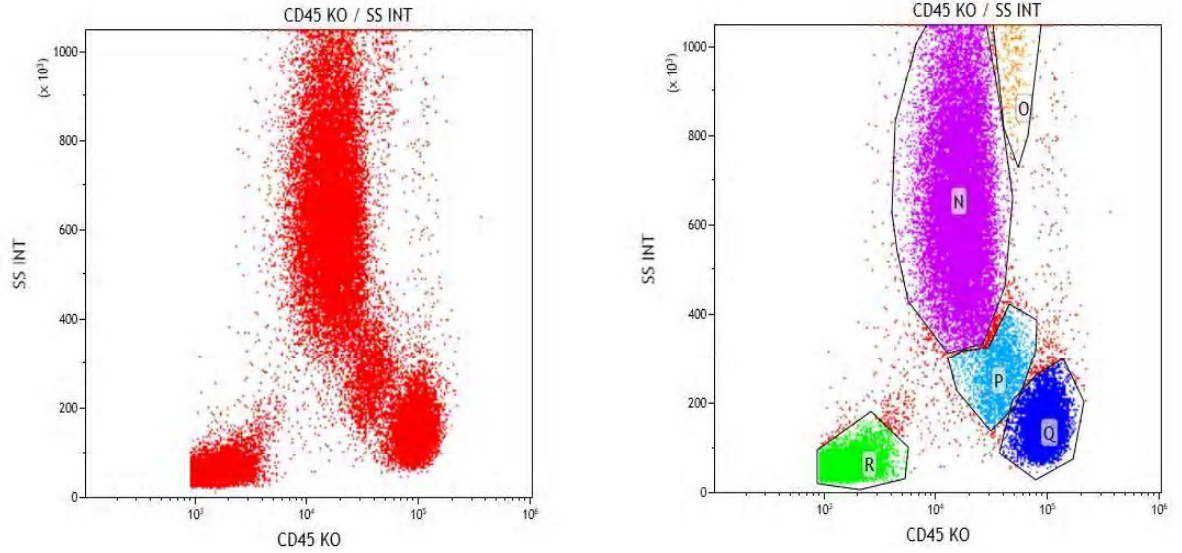
• Hücrelerin çevreleriyle olan ilişkileri gözlenemez.

• Florokrom boyalar ışıktan etkilenir. Gerekli hassasiyette çalışılmazsa bu durum analiz sonuçlarını etkileyebilir.

Ortam sıcaklığı yüksek olması lazer sistemini etkiler. Bu durum analiz sonuçlarının bozulmasına sebep olur. Aynı zamanda soğuk ortamda sürekli çalışılması, çalışan kişinin sağlığını etkileyebilir.

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 değerlendirmelerin yapılabileceği savunulmaktadır.



Şekil 2.18. Akım Sitometri İle CD45 Kapısında Hücresel Dağılımın Gösterilmesi

Erciyes Üniversitesi Aferez Ünitesi Akım Sitometri Laboratuvarında Beckman Coulter Navios ile yapılan çalışmada CD45 Kapısında Hücresel Dağılımın Gösterilmesi. (Şekil 2.18)

Yeşil (R) : Eritrosit, Trombosit vs, Lacivert (Q): Lenfosit, Mavi (P): Monosit, Pembe (N): Nötrofil, Turuncu (O): Eozinofil

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran 11 granülosit vericisinden G-CSF (neupogen) almadan önce ve aynı gönüllünün G-CSF (neupogen) aldıktan 16 saat sonra toplanan ürün numunelerinden alınan 3 cc örnek kullanılarak gerçekleştirildi. Önce ve sonra alınan granülosit numunelerinde CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişimin araştırıldı. Bu çalışma TYL-2018-8283 No'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan Etik Kuruldan Onayı No: 2018/153, Karar Tarihi: 21.03.2018, onay alındı.

3.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan, aferez ünitesi akım sitometri laboratuvarına ait alet ve cihazlara ait bilgiler Tablo 3.1'de, sarf malzemelere ait bilgiler ise Tablo 3.2'de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ekipman Türü, Marka (Araç, Teçhizat)	
Santrifüj (marka)	Santrifüj
Vorteks Cihazı (Dragon Labs .MX-S ve HEIDOLPH)	Örneklerin karıştırılması
Kalibre edilmiş standart pipetler (10-100µl, 100-1000µl) (Gilson,ABD)	Örneklerin ve antikorların eklenmesi
Akım sitometri cihazı (Backman Coulter/ Navios)	Hücrelerin karakterizasyonu
Kaluza analiz	Verilerin işlenmesi

Tablo 3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme	Kullanım amacı
Kalibre edilmiş standart pipet uçları (ISOLAB)(10-100 µl, 100-1000 µl)	Tüm aşamalar
Plastik akım sitometri test tüpleri 12x75 mm	Tüm aşamalar
İsoflow (BC, 41116015)	Hücre yıkama işlemlerinde
Optilyse C Lysing Solution (Beckman Coulter, USA)	Eritrositlerin uzaklaştırılması
CD10 FITC Antikoru (BC)	Hücrelerin karakterizasyonu
CD13 APC Antikoru (BC)	Hücrelerin karakterizasyonu
CD16 ECD Antikoru (BC)	Hücrelerin karakterizasyonu
CD45 KO Antikoru (BC)	Hücrelerin karakterizasyonu
CD116 PE Antikoru (BC)	Hücrelerin karakterizasyonu
CD15 FITC/CD33 PE /CD45ECD mix Antikoru (BC)	Hücrelerin karakterizasyonu

3.1.2. Çalışmada kullanılan antikorlar

Çalışmada Beckman Coulter firmasına ait IVD belgeli antikorları kullanıldı.

- **CD10:** 100 kD nötr endopeptidaz ve metaloproteaz ailesinin bir üyesidir. CD10, B hücresi öncüleri, T hücresi öncüleri ve nötrofiller üzerinde eksprese edilir.
- **CD13:** Aminopeptidaz N, APN ve gp150 olarak da bilinen 150-170 kD tip II bir transmembran glikoproteinidir. Trombositlerde veya eritrositlerde ifade edilmez. Granülositler, monositler, miyeloid progenitörleri, endotel ve epitel hücreleri, granüler lenfosit altkümeleri üzerinde eksprese edilir.
- **CD15:** CD15, ayrıca Lewis X, 3-FAL, X-hapten ve SSEA-1 olarak da bilinen 3-fukosil-N-asetillaktozamindir (3-FAL). CD15, granülositler ve monositler üzerinde eksprese edilir.
- **CD16:** Düşük afiniteli IgG reseptörü III (FcyRIII) olarak bilinir. İki farklı form olarak ifade edilir (CD16a ve CD16b). CD16a (FcyRIIIA), 50-65 kD polipeptit bağlantılı bir transmembran proteindir. İnsanlarda NK hücrelerinin, aktive monositlerin, eksprese edilir. CD16, NK hücre aktivasyonu, fagositoz ve antikora bağlı hücre aracılı sitotoksitede (ADCC) işlev gören toplu IgG veya IgG-antijen kompleksini bağlar. Nötrofiller, NK hücreleri, aktive monositler, makrofajlar üzerinde eksprese edilir.
- **CD45:** Aynı zamanda lökosit ortak antijen (LCA) olarak da bilinen 180 - 240 kD'lik tek zincirli bir tip I membran glikoproteinidir. Eritrositler veya trombositler hariç, tüm hematopoetik hücrelerin plazma zarı üzerinde eksprese edilen bir tirozin fosfatazdır. CD45, hücre büyümesi, farklılaşma, hücre döngüsü ve onkojenik transformasyon dahil olmak üzere çeşitli hücreysel işlemleri düzenleyen bir sinyal molekülüdür.
- **CD116:** GM-CSF reseptörünün 70-85 kDa zinciridir. Yüksek afiniteli GM-CSF reseptörünü oluşturmak için CDw131 zinciriyle birleşir. GM-CSF'yi nispeten düşük bir afinite ile bağlayan çözünen bir CD116 formu tanımlanmıştır. CD116, monositler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, dendritik hücreler ve bunların öncülleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri dahil olmak üzere çeşitli miyeloid hücrelerde eksprese edilir.

YÖNTEM

Çalışmamız, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı akım sitometri laboratuvarında yürütüldü. Erciyes Üniversitesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuran ve 45 mü neupogen alan 18-55 yaş aralığında 11 erkek granülosit vericisinden toplanan üründe ve 11 sağlıklı kontrol periferik kan örneğinde miyeloid hücre yüzey belirteci olan CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile ölçüldü.

3.2. Örnek Toplama Ve Hazırlama

Çalışmada Erciyes Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran gönüllü granülosit vericilerinden G-CSF (neupogen) almadan önce alınan 3 cc periferik kandan ve aynı gönüllünün G-CSF (neupogen) aldıktan 16 saat sonra toplanan ürün numunelerinden alınan 3 cc ürün kullanıldı.

Örnek gereksinimleri

1. Biyolojik örnekler: Yeni alınmış periferik kan ve toplanan üründen alınan örneği içerdi.
2. Numuneler aseptik olarak antikoagülan içeren steril boş bir kan toplama tüpünde (ACD formül A, K₃EDTA) toplandı.
3. Antikoagülanlı örnekler boyama işlemine dek (24 saat içerisinde), oda sıcaklığında (18-25 °C) saklandı.
4. Numuneler canlılıklarını yitirmeleri için temin edilir edilmez boyama işlemleri gerçekleştirildi.

3.3. Örneklerin akım sitometrik analiz uygulamaları

3.3.1. Örneklerdeki hücrelerin akım sitometri ile tanımlanması

Örneklerde Myeloid seri hücrelerdeki yüzey belirteçlerinin G-CSF Öncesi ve G-CSF Sonrası ekspresyon düzeylerindeki değişim izlendi. Çalışmada CD10 FITC , CD13 APC, CD15 PE, CD16 ECD , CD116 PE belirteçleri kullanıldı.

3.3.2. Akım Sitometrinin Okuma ve Analiz İçin Hazırlanması

- Cihaz butondan açılır.
- Cytometer on açılır.
- Navios software açılır.
- Cihaza yıkama tüpleri verilir.
- Lazer ayarlarını kontrol etmek amacıyla, cihaz ayar boncukları cihazdan geçirilir.
- Hazırlanılan test tüplerindeki kontrol veya ürün numuneleri cihazdan geçirilir.
- Analiz; elde edilen hücresel verilerin ilgili program kullanılarak işlenmesi analiz edilmesi sonuçlandırılmasıdır.

3.3.3. Akım Sitometride Örnek Hazırlam İşlem Basamakları

İşlem basamakları donörden alınan kontrol kanı örneği ve aynı donörden elde edilen granülosit ürünleri örneği için aynı şekilde çalışılmıştır.

- 12x75 mm'lik flow tüplerinin her birine 100 µL örnek üzerine
- 1. Tüp: 5'er µL CD10 FITCH, CD45 KO, CD116 PE, ve 3'er µL CD13 APC, CD16 ECD antikorları eklendi.
- 2. Tüp: 10 µL 15 FITCH /33 PE /45 ECD mix antikoru eklendi.
- Elde edilen karışım vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda her bir tüpe lizis solüsyonundan 0,5 mL eklendi vorteks işlemi yapıldı ve oda sıcaklığında, karanlıkta 10 dakika inkübasyon işlemi yapıldı.
- Süre sonunda tüm örneklere 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem iki defa tekrarlandı.
- Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz yapıldı.

- Analiz, Beckman Coulter Navios model akım sitometre cihazı ve Kaluza yazılımı programı kullanılarak yapıldı.
- Örnekler analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı ve FL1' de kompenzasyon sıfır olarak seçildi ve okuma elli bin hücre sayımı ile yapıldı.
- Akım sitometrik analiz sonrasında hem kontrol hem de ürün örneklerinde tüm lökositler içinde Nötrofiller seçilerek X- CV ve X- Geometrik Ortalama (GM) değerleri alındı.

3.3.4. Akım Sitometride Elde Edilen Sonuçların Analizi

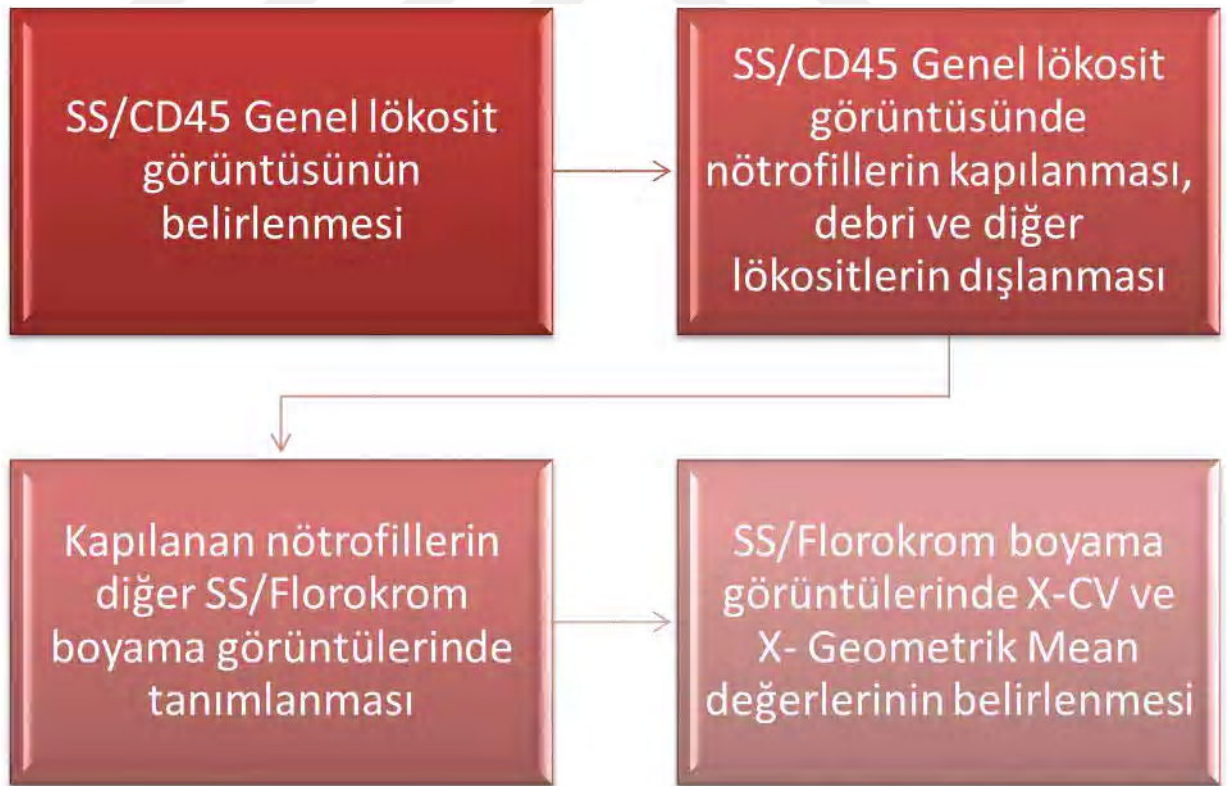
Hem kontrol hem de ürünlerin sonuçlarının analizi için Beckman Coulter firmasının Kaluza 2.1 analiz programı kullanılmıştır. Hücreler florokrom boyanma özelliklerine ve SS sinyal özelliklerine göre gruplandırıldı. SS/CD45 genel lökosit görüntüsünde nötrofiller kapılanarak debri ve diğer lökositler dışlandı. Seçilen nötrofil kapısı SS/CD10, SS/CD13, SS/CD15, SS/CD16, SS/CD116 görüntülerinde tanımlandı. Herbirinde X-CV ve X-Geometrik Ortalama değerleri belirlendi. G-CSF öncesi kontrol kanı ile G-CSF sonrası granülosit ürünlerinin değerleri karşılaştırıldı.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Akım sitometri ölçümlerinden elde edilen verilerde tüm analizler için SPSS 17.0 for Windows programında yapıldı. Ölçüm verileri ortalama ve standart sapma değerleri ile tanımlandı. Verilerin normallik testi için Kolmogorov Smirnov Testi yapıldı. Tüm parametreler standart normal dağılıma uymadığı için, gruplar arası farklarda Mann Whitney U Testi, korelasyon analizinde ise Spearman's rho korelasyon analizi kullanıldı. Tüm analizler %95 güven aralığında gerçekleştirildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada gönüllü granülosit vericilerinde G-CSF uygulaması ile vericinin beyaz kan hücrelerinde meydana gelen yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişimin izlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla granülosit vericisinde, G-CSF uygulaması öncesi alınan kontrol kan örneği ile yine aynı vericinin G-CSF uygulaması sonrası toplanan granülosit ürünlerinden alınan örneklerde yöntem kısmında belirtilen protokole uygun olarak akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin ekspresyonları ölçülmüştür. Bu işlem için SS/45 görüntüsünde lökositler kapılanarak elli bin hücrenin akım sitometri cihazından geçmesi ile gerçekleştirildi (Şekil4.1.).



Şekil 4.1. Kontrol e Ürün Örneklerinde Akım Sitometri İş Akış Şeması

4.1.Çalışma Grubunun Özellikleri

Erciyes Üniversitesi Hematoloji Hastanesi Aferez Ünitesi'ne başvuran 20-46 yaş aralığındaki sağlıklı granülosit vericileri çalışmaya dahil edildi. Granülosit vericilerin yaş, cinsiyet kilo ve uygulanan G-CSF dozu Tablo 4.1'de gösterildi. Ayrıca G-CSF öncesi ve G-CSF sonrası vericinin beyaz küre, nötrofil ve lenfosit değerleri ve G-CSF sonrası toplanan üründe beyaz küre, nötrofil ve lenfosit değerleri Tablo 4.2' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

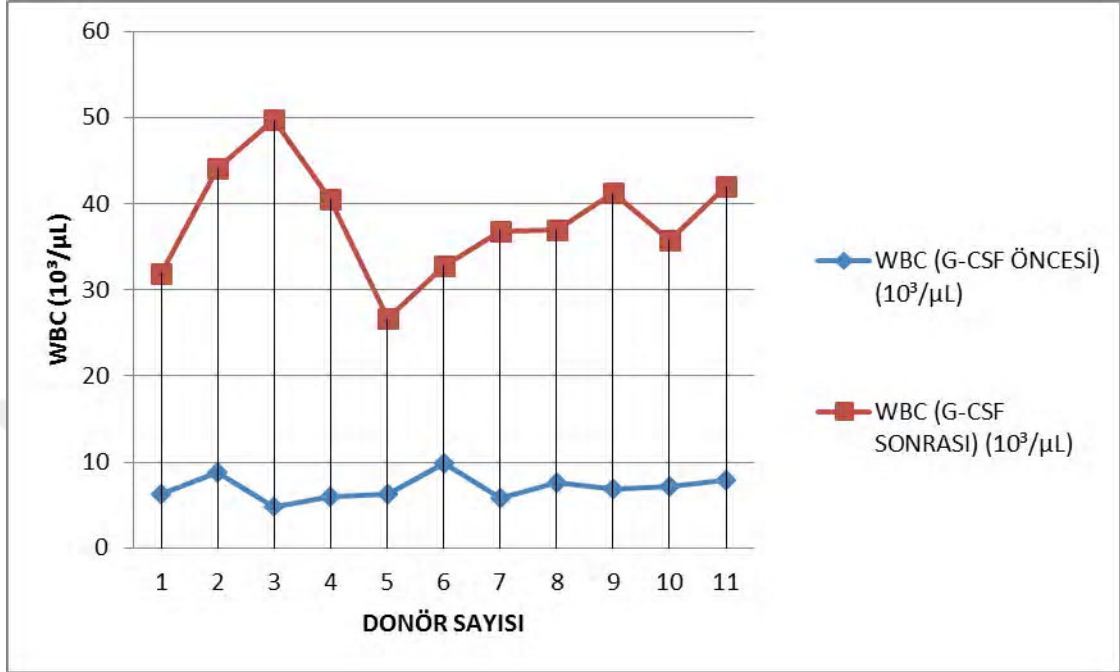
Granülosit vericisi	Cinsiyet	Yaş	Kilo (kg)	Uygulanan G-CSF Dozu (mü)
1.Verici	Erkek	27	93	48
2.Verici	Erkek	28	96	48
3.Verici	Erkek	20	64	30
4.Verici	Erkek	42	65	30
5.Verici	Erkek	29	66	30
6. Verici	Erkek	46	58	30
7.Verici	Erkek	21	60	30
8. Verici	Erkek	32	82	48
9.Verici	Erkek	45	88	48
10.Verici	Erkek	22	81	48
11.Verici	Erkek	27	88	48

Tablo 4.2. 11 vericide tam kan sayımı (CBC) verileri. WBC: Beyaz Kan Hücreleri, Neut: Nötrofil, G-CSF Granulosit koloni uyarıcı faktör

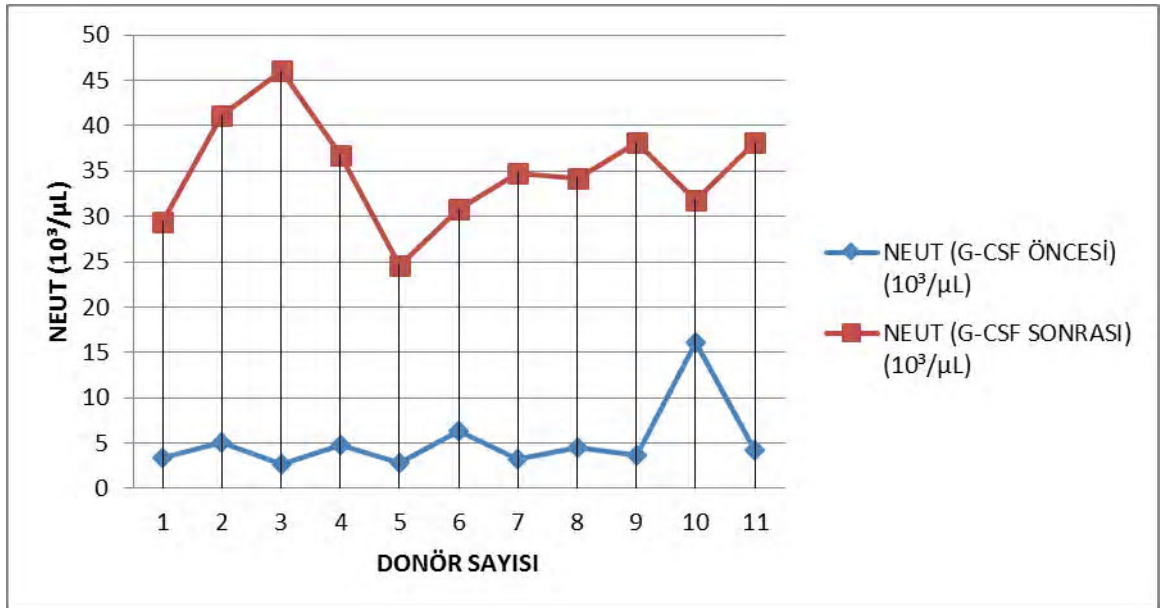
Verici	G-CSF öncesi vericinin kan örneği			G-CSF sonrası vericinin kan örneği			G-CSF sonrası toplanan ürün örneği	
	WBC (10 ³ /μL)	NEUT (10 ³ /μL)	LYMPH (10 ³ /μL)	WBC (10 ³ /μL)	NEUT (10 ³ /μL)	LYMPH (10 ³ /μL)	WBC (10 ³ /μL)	NEUT (10 ³ /μL)
1.Verici	6,25	3,36	2,23	31,91	29,41	0,93	146	116
2.Verici	8,77	5,02	2,8	44,12	41,17	1,09	274	238
3.Verici	4,79	2,7	1,48	49,74	46,02	1,34	145,08	123,11
4.Verici	6,01	4,82	0,62	40,59	36,76	1,5	116,17	84,91
5.Verici	6,25	2,84	2,68	26,67	24,62	1,06	39,88	22,51
6.Verici	9,81	6,37	2,58	32,8	30,75	1,03	139,02	116,84
7.Verici	5,77	3,23	2,08	36,84	34,77	0,7	65,07	49,38
8.Verici	7,65	4,48	2,65	37	34,24	1,7	43,95	34,24
9.Verici	6,91	3,73	2,41	41,25	38,11	1,32	121,95	91,47
10.Verici	7,23	16,1	2,63	35,79	31,86	1,13	255,42	208,53
11.Verici	7,92	4,23	2,88	41,96	38,14	1,34	84,79	57,27

Çalışma grubundaki vericilerin, G-CSF öncesi ve G-CSF sonrası kendi kan örneklerindeki beyaz kan hücresi ve nötrofil değerleri vericiler arasında karşılaştırılmıştır. Tablo 4.3 bu değerlerden beyaz kan hücrelerinin karşılaştırılmasını gösterirken Tablo 4.4 nötrofil değerlerinin karşılaştırılmasını göstermektedir.

Tablo 4.3. G-CSF öncesi ve G-CSF sonrası vericinin kan örneklerinde WBC değerlerinin karşılaştırılması



Tablo 4.4. G-CSF öncesi ve G-CSF sonrası vericinin kan örneklerinde NEUT değerlerinin karşılaştırılması



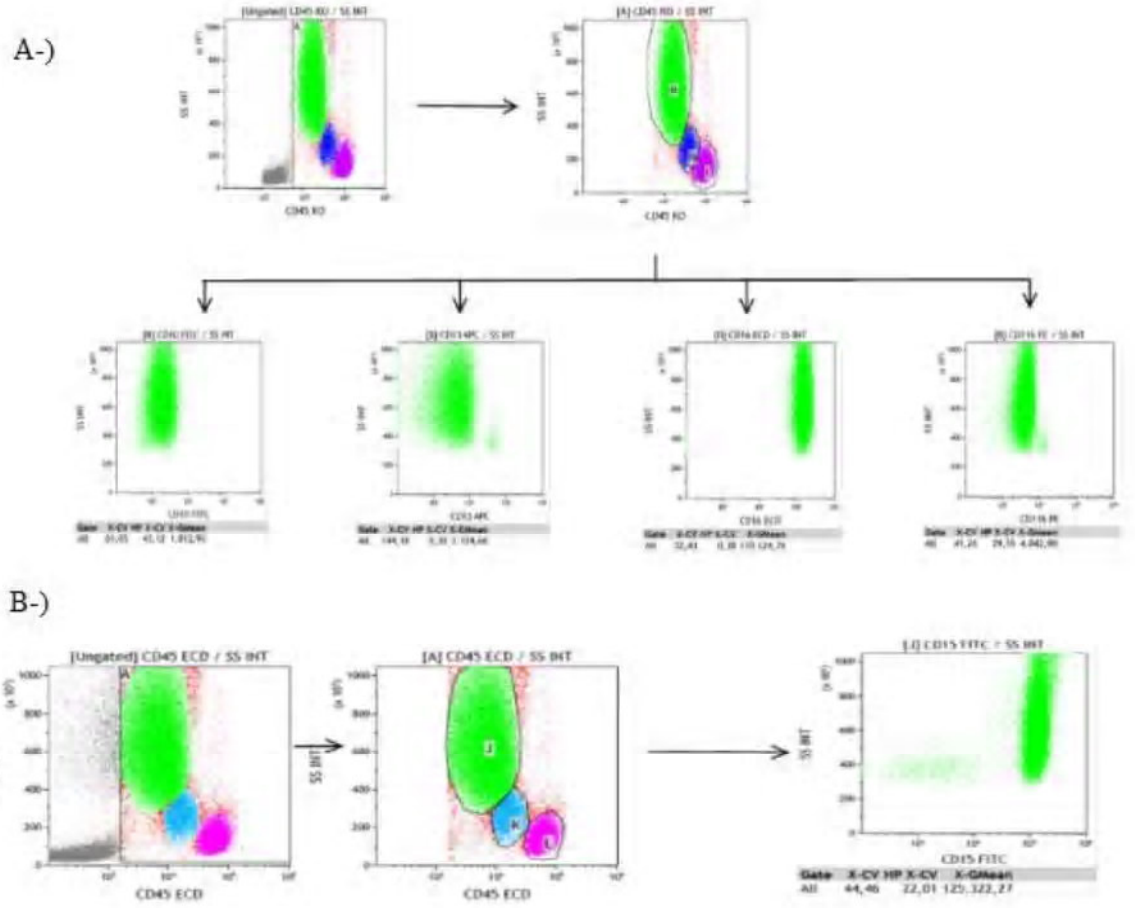
4.2.Çalışma Grubunda Akım Sitometri İle Hücre Yüzey Belirteçleri Analizi için Yapılan İşlemler

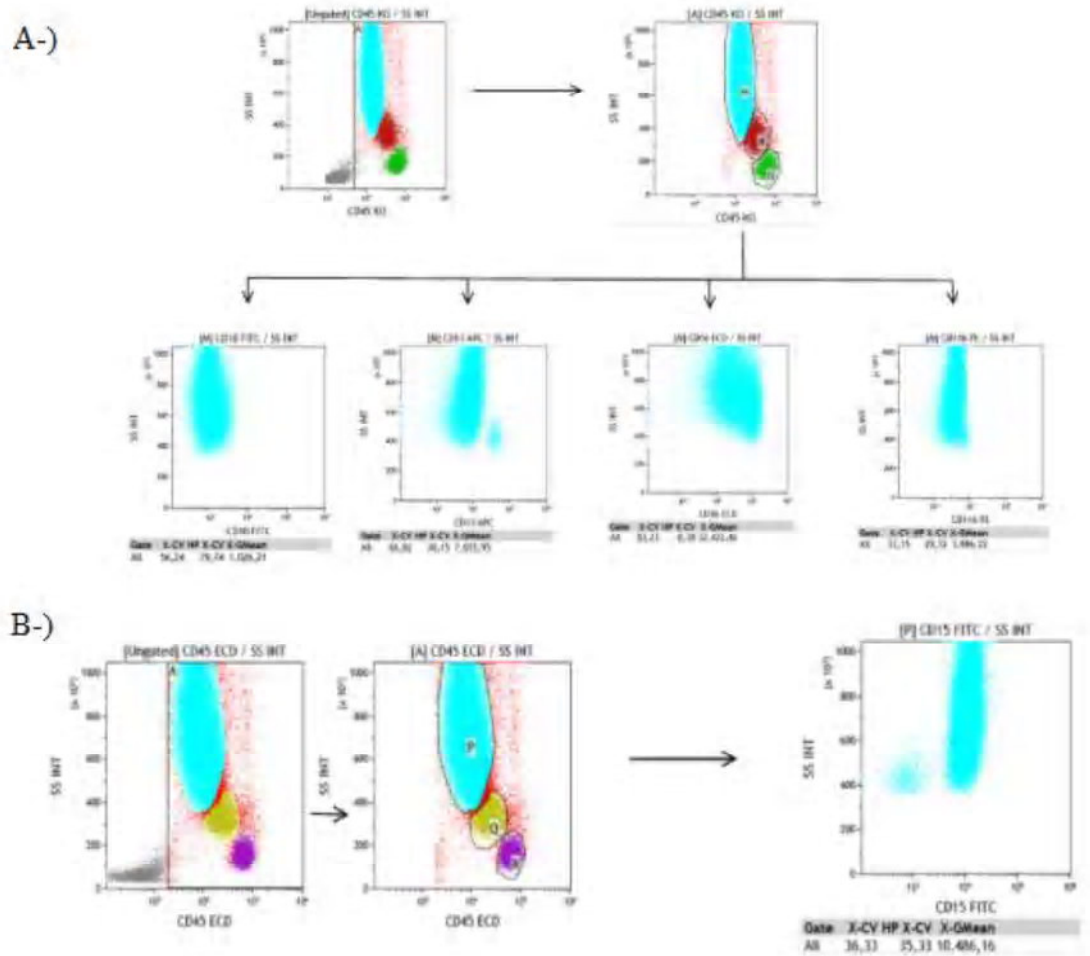
Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuran ve 30 - 48 mü neupogen alan 20-46 yaş aralığında, sağlıklı ve kan bağışlama kriterlerine uyan 11 erkek granülosit vericisinden, neupogen öncesi periferik kan örneğinde ve aynı 11 granülosit vericisinde, neupogen alımından 12 saat sonra toplanan granülosit ürün örneği kullanıldı. Bu örneklerdeki hücreler analiz için akım sitometride çalışıldı.

Bu çalışmada yöntem kısmında belirtilen protokole göre beyaz kan hücrelerinde hücre yüzey belirteçleri olan CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 ekspresyonları ölçüldü. Sayım işleminde SS/45 kapısında tanımlı beyaz kürelerden kapılama yapılarak akım sitometride elli bin hücre geçirildi. SS/45 kapısında tanımlı hücrelerden nötrofiller kapılanarak analiz grupları oluşturuldu. Bu işlem G-CSF öncesi kan örneği ve G-CSF sonrası toplanan ürün örneğinde gerçekleştirildi.

G-CSF öncesi kan örneği (Şekil 4.2) ve G-CSF sonrası toplanan ürün örneğindeki (Şekil 4.3) hücrelerin analiz grupları aşağıdaki gibidir:

- SS/CD45 genel lökosit hücreleri ve SS/CD45 nötrofil kapılı hücreler
- SS/CD10 FITC'de nötrofil kapısı tanımlı hücreler
- SS/ CD13 APC'de nötrofil kapısı tanımlı hücreler
- SS/ CD15 PE nötrofil kapısı tanımlı hücreler
- SS/CD16 ECD nötrofil kapısı tanımlı hücreler
- SS/116 PE nötrofil kapısı tanımlı hücreler





Şekil 4.3. Ürün Grubunda Örneklerin Nötrofil Kapısında Tanımlanması. A-)SS/CD45 KO tanımlı lökositler B-) SS/CD45 ECD tanımlı lökositler

4.3.Çalışma Gruplarının Akım Sitometri ile Analizleri

Çalışmaya dahil edilen granülosit vericilerinin G-CSF öncesi (kontrol) kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Bu belirteçlerin CV (dağılım) ve geometrik ortalama değerleri kaluza analiz sistemi ile belirlendi (şekil). Uyarım indekslerini belirlemek için vericilerin G-CSF sonrası toplanan üründe bulunan CV değeri ile G-CSF öncesi (kontrol) CV değerlerinin oranı hesaplandı. Aynı işlem geometrik ortalama değerleri için

tekrarlandı. Bu oranın 1'in üzerinde çıkması ürünün SI'nin kontrolün SI'ne göre arttığını gösterir.

$$\text{Stimulasyon indeksi (SI)} = \frac{\text{Ürün Geometrik ortalama}}{\text{Kontrol Geometrik ortalama}}$$

SI < 1 (ekspresyon azalışı)

SI > 1 (ekspresyon artışı)

SI = 1 (ekspresyon düzeyinde değişimi yok)

$$\text{Stimulasyon indeksi (SI)} = \frac{\text{Ürün cv}}{\text{Kontrol cv}}$$

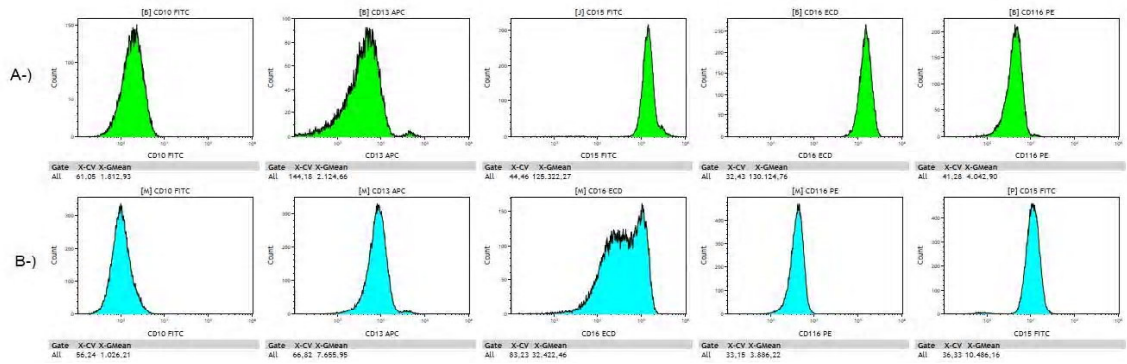
SI < 1 (ekspresyon azalışı)

SI > 1 (ekspresyon artışı)

SI = 1 (ekspresyon düzeyinde değişimi yok)

Verici 1

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 27 yaşında, 93 kg, 48 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.4'deki gibidir.



Şekil 4.4. 1. Verici Flow Görüntüsü. A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

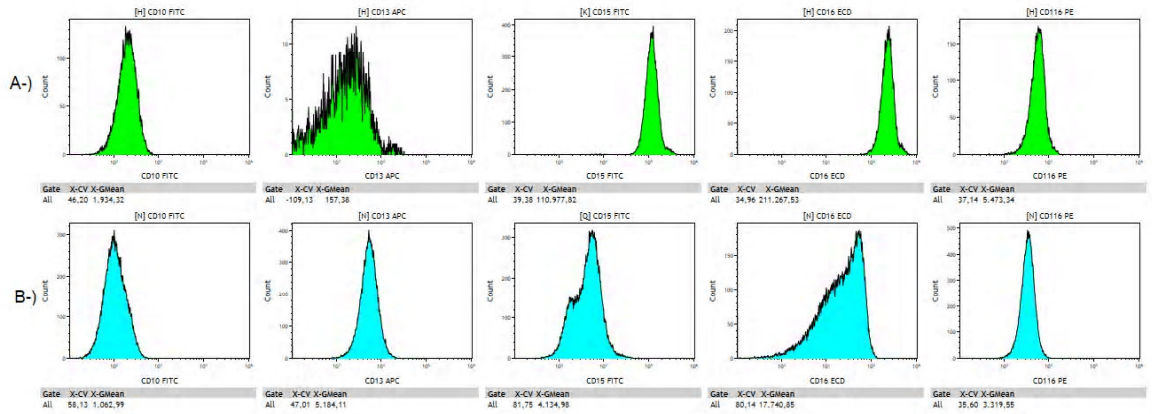
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. 1. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	0,92 ↓	0,56 ↓
CD13	0,46 ↓	3,6 ↑
CD15	0,81 ↓	0,008 ↓
CD16	2,56 ↑	0,249 ↓
CD116	0,8 ↓	0,96 ↓

Verici: 2

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 28 yaşında, 96 kg, 48 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.5.'deki gibidir.



Şekil 4.5. 2. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

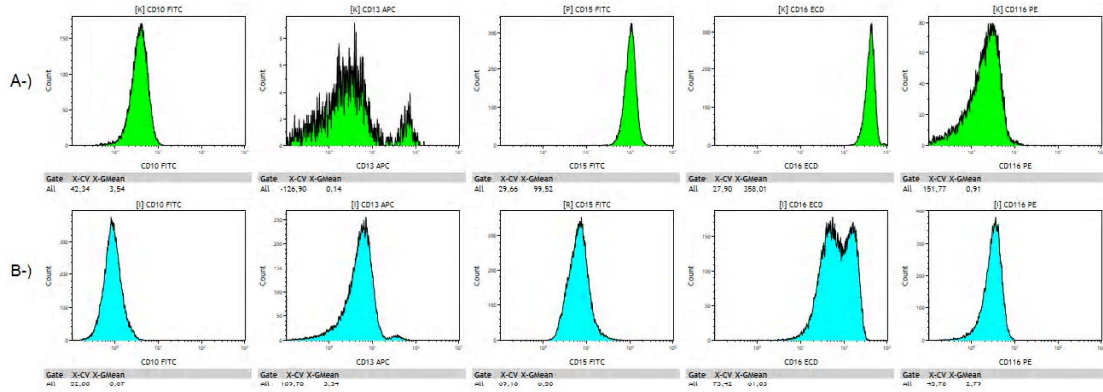
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri 4.6.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. 2. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	1,25 ↑	0,54 ↓
CD13	-0,43 ↑	32,94 ↑
CD15	2,07 ↑	0,037 ↓
CD16	2,29 ↑	0,083 ↓
CD116	0,95 ↓	0,6 ↓

Verici 3

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 20 yaşında, 64 kg, 30 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin cv ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.6.'deki gibidir.



Şekil 4.6. 3. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

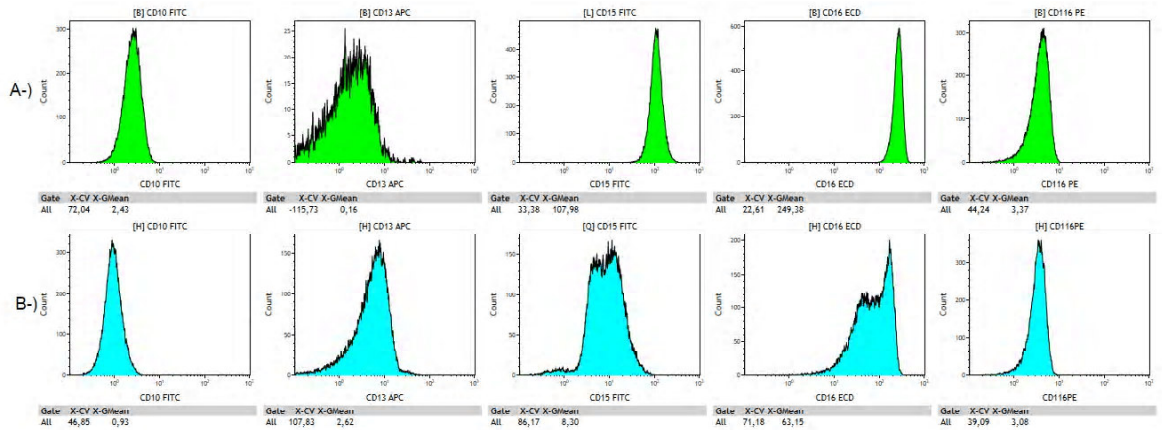
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	1,22 ↓	0,24 ↓
CD13	-0,86 ↑	23,85 ↑
CD15	2,33 ↑	0,065 ↓
CD16	2,63 ↑	0,17 ↓
CD116	0,3 ↓	3,06 ↑

Verici 4:

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 42 yaşında, 65 kg, 30 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.7'deki gibidir.



Şekil 4.7. 4. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

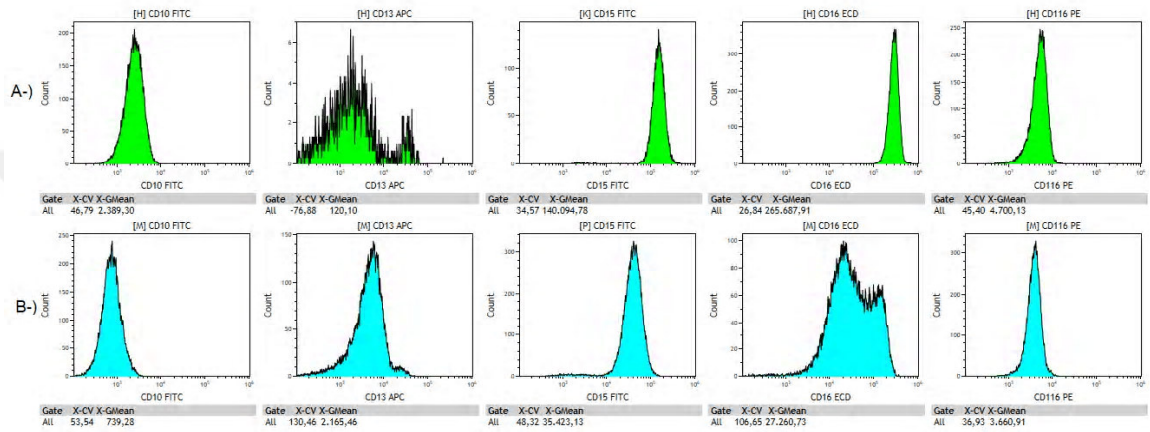
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	0,65 ↓	0,38 ↓
CD13	-0,93 ↑	16,37 ↑
CD15	2,58 ↑	0,076 ↓
CD16	3,14 ↑	0,25 ↓
CD116	0,88 ↓	0,91 ↓

Verici 5

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 29 yaşında, 66 kg, 30 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.8.'deki gibidir.



Şekil 4.8. 5. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

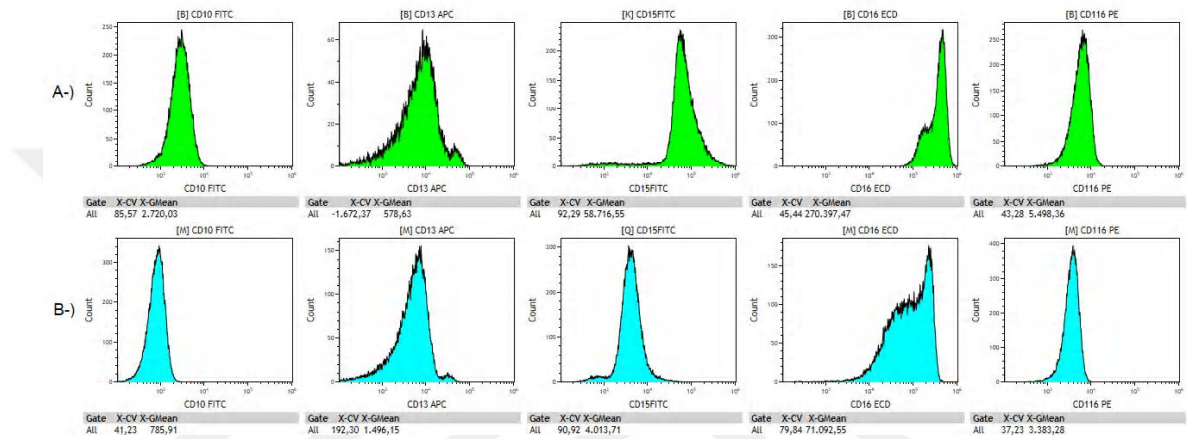
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.9.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. 5. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	X-CV	X-GM
CD10	1,14 ↑	0,30 ↓
CD13	1,69 ↑	18,03 ↑
CD15	1,39 ↑	0,25 ↓
CD16	3,67 ↑	0,102 ↑
CD116	0,81 ↑	0,77 ↓

Verici 6

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 46 yaşında, 58 kg, 30 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.9.'deki gibidir.



Şekil 4.9. 6. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

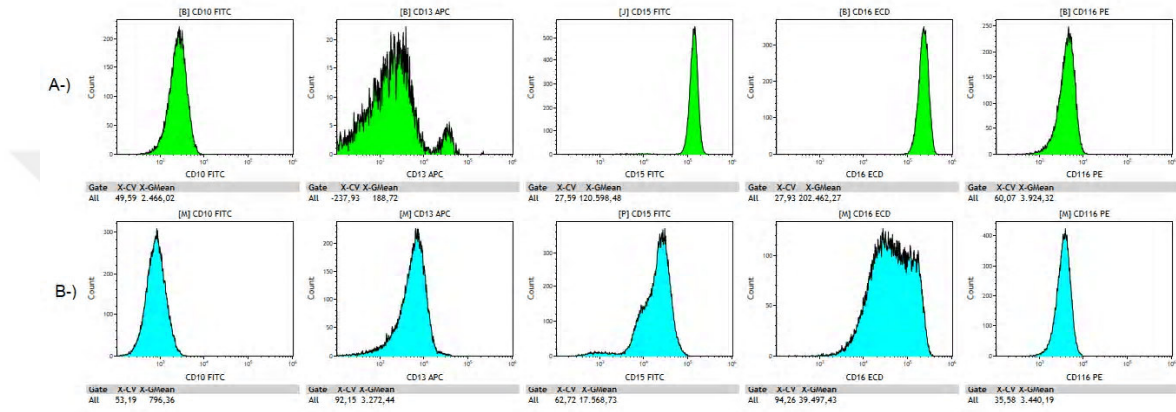
CV ve geometrik Ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.10.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.10. 6.Vericide CV ve Geometrik Ortalamamın üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	0,48 ↓	0,28 ↓
CD13	-0,114 ↑	2,58 ↑
CD15	0,98 ↓	0,068 ↓
CD16	1,64 ↑	0,26 ↓
CD116	0,86 ↓	0,61 ↓

Verici 7

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 21 yaşında, 60 kg, 30 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.10.'deki gibidir.



Şekil 4.10. 7. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

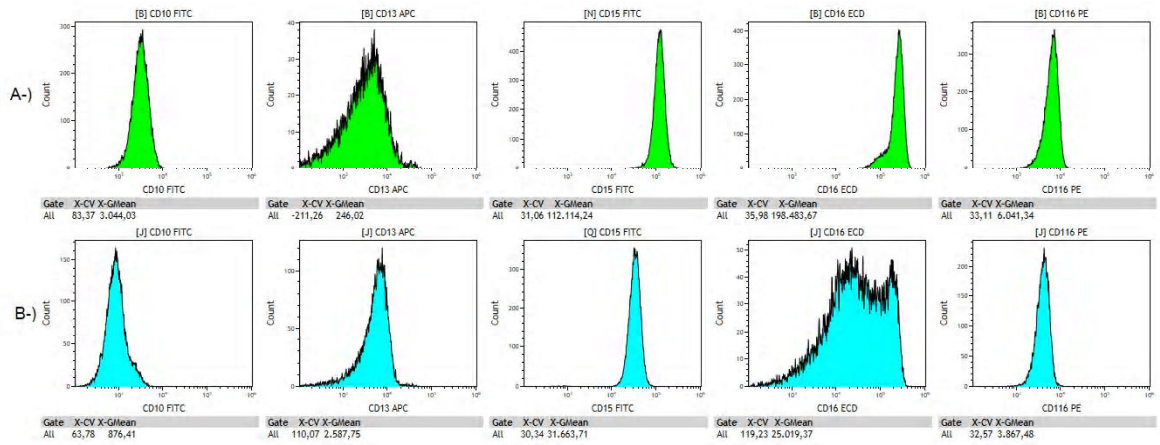
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. 7. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	1,07 ↑	0,32 ↓
CD13	-0,38 ↑	17,34 ↑
CD15	2,027 ↑	0,14 ↓
CD16	3,37 ↑	0,19 ↓
CD116	0,59 ↓	0,87 ↓

Verici 8

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 32 yaşında, 82 kg, 48 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.11.'deki gibidir.



Şekil 4.11. 8. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

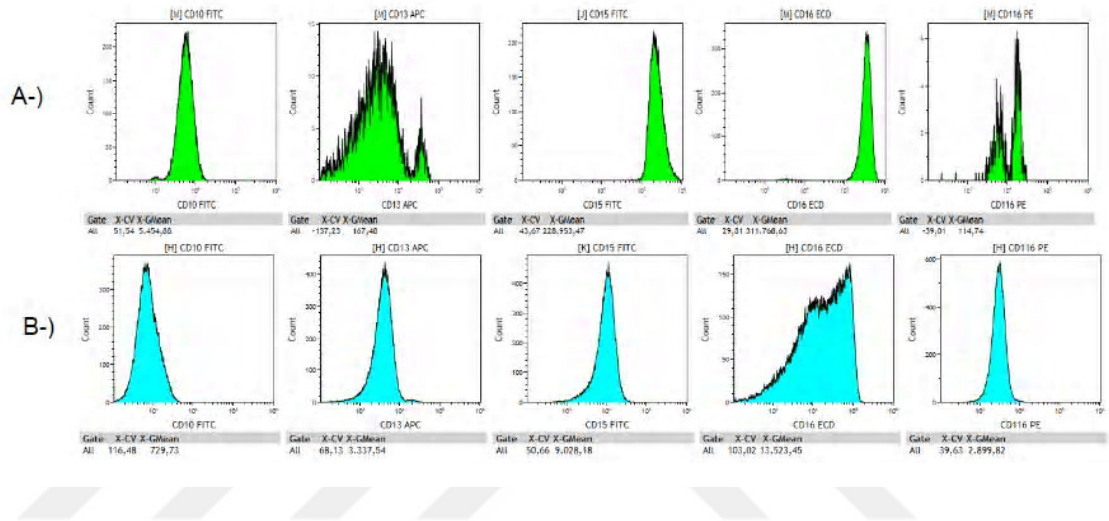
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.12.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. 8. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	0,76 ↓	0,28 ↓
CD13	-0,52 ↑	10,51 ↑
CD15	0,97 ↓	0,28 ↓
CD16	3,05 ↑	0,12 ↓
CD116	0,98 ↓	0,64 ↓

Verici 9

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 45 yaşında, 88 kg, 48 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.12.'deki gibidir.



Şekil 4.12. 9. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

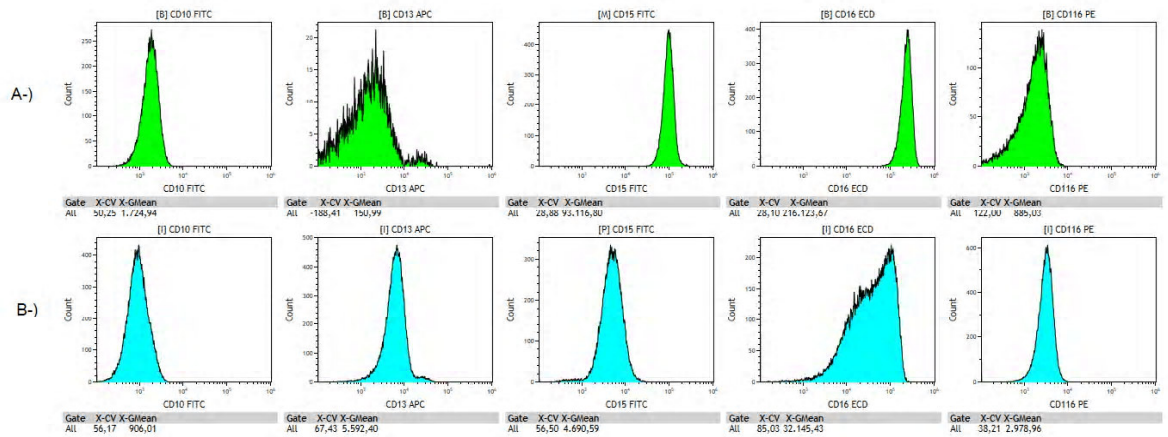
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.13.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.13. 9. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	2,25 ↑	0,13 ↓
CD13	0,49 ↑	19,92 ↑
CD15	1,16 ↑	0,039 ↓
CD16	3,45 ↑	0,043 ↓
CD116	-1,01 ↑	25,27 ↑

Verici 10

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 22 yaşında, 93 kg, 81 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.13.'deki gibidir.



Şekil 4.13. 10. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

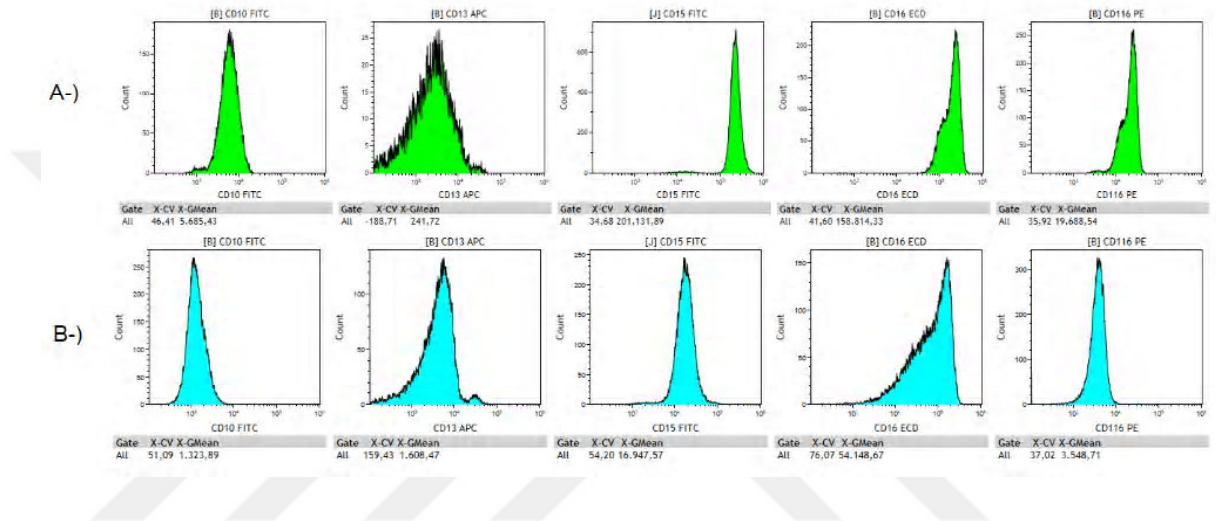
CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.14.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.14. 10. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın üründeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	1,11 ↑	0,52 ↓
CD13	-0,35 ↑	37,03 ↑
CD15	1,95 ↓	0,05 ↓
CD16	3,02 ↑	0,14 ↓
CD116	0,31 ↑	3,36 ↑

Verici 11

Kan bağışlama kriterlerine uygun, 27 yaşında, 88 kg, 48 mü neupogen alan erkek granülosit vericisinin, G-CSF öncesi kontrol kanı ve bu vericilerden G-CSF sonrası toplanan ürünlerde nötrofil kapısında tanımlı hücrelerin, CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin CV ve geometrik ortalama değerleri Şekil 4.14. 'deki gibidir.



Şekil 4.14. 11. Verici Flow Görüntüsü A-) G-CSF öncesi, B-) G-CSF sonrası

CV ve geometrik ortalama değerlerine göre uyarım indeksleri hesaplanan belirteçlerinin ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri Tablo 4.15.'de gösterilmiştir.

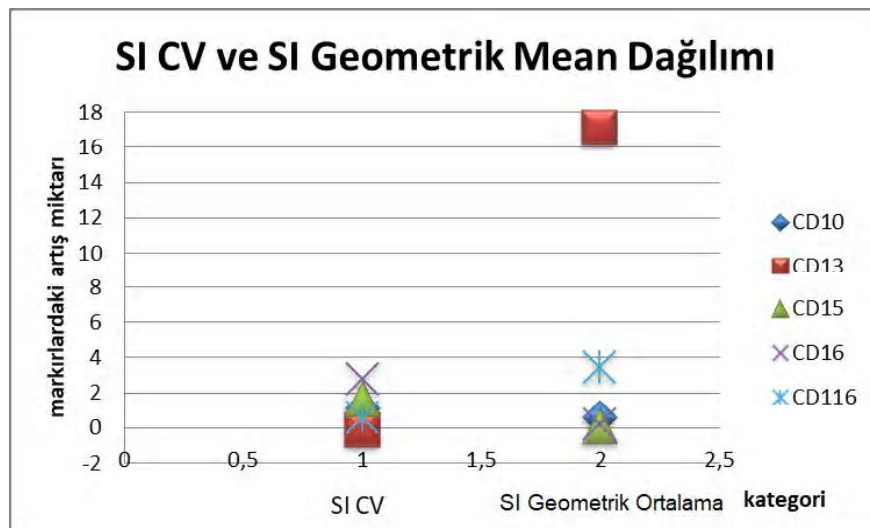
Tablo 4.15. 11. Vericide CV ve Geometrik Ortalamanın ürünlerdeki değerlerinin kontroldeki değerlere göre değişimleri

RESEPTÖRLER	DEĞERLER	
	CV	GM
CD10	1,1 ↑	0,23 ↓
CD13	-0,84 ↑	6,65 ↑
CD15	1,56 ↑	0,084 ↓
CD16	1,82 ↑	0,34 ↓
CD116	1,03 ↑	0,18 ↓

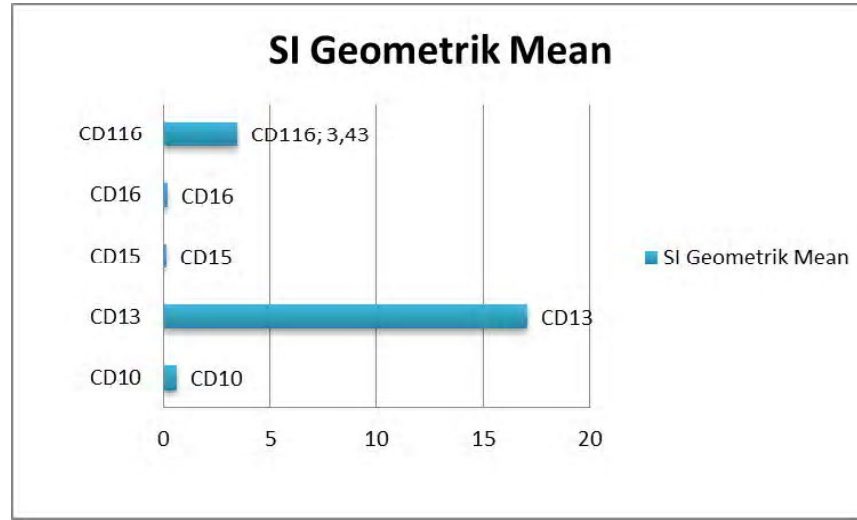
11 granülosit vericisinin G-CSF öncesi ve G-CSF sonrası dağılım, geometrik ortalama ve uyarım indeksleri belirlendi. Değerlerin ortalaması ve standart sapmasını Tablo 4.16. gösterilmiştir. Bu değerlerin fark analizi sonuçları ise Tablo 4.17.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.16. G-CSF öncesi ve sonrası 11 vericinin CV, Geometrik Ortalama değerleri ve SI değerlerinin ortalama dağılımı

Ölçüm		CD10	CD13	CD15	CD16	CD116
G-CSF Öncesi CV	Ortalama	57,74	-265,49	39,97	32,33	52,29
G-CSF Sonrası CV	Ortalama	58,97	104,67	60,64	87,86	37,34
SI CV	Ortalama	1,09	-0,16	1,62	2,78	0,59
G-CSF Öncesi GMean	Ortalama	2476,17	361,45	108294	178703	4579,36
G-CSF Sonrası GMean	Ortalama	749,87	2991,48	12179,2	28452,3	2817,36
SI GMean	Ortalama	0,6	17,08	0,1	0,18	3,43



Şekil 4.15 . Tüm Vericilerde Cv Ve Geometrik Ortalama Stimülasyon İndekslerinin Dağılımı



Şekil 4.16. Tüm Vericilerde Geometrik Ortalama Değerlerinin Stimülasyon İndeksleri

Şekil 4.15. tüm vericilerde CV ve geometrik ortalama stimülasyon idekslerinin dağılımı gösterirken Şekil 4.16 tüm vericilerde geometrik ortalama değerlerinin stimülasyon indeksleri göstermektedir.

Tablo 4.17. G-CSF değerlerinin önce ve sonrası için fark analizi sonuçları (CV)

	Ölçüm	Ortalama Rank	p
CD10	G-CSF Öncesi CV	10,55	
	G-CSF Sonrası CV	12,45	0.519
CD13	G-CSF Öncesi CV	6,82	
	G-CSF Sonrası CV	16,18	0.000
CD15	G-CSF Öncesi CV	7,91	
	G-CSF Sonrası CV	15,09	0.008
CD16	G-CSF Öncesi CV	6,00	
	G-CSF Sonrası CV	17,00	0.000
CD116	G-CSF Öncesi CV	13,64	
	G-CSF Sonrası CV	9,36	0.133

Tabloya göre CD10 ve CD116 değerlerinin önce ve sonrası arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmayıp ($p>0.05$); CD13, CD15 ve CD16 parametrelerinin önce ve sonraki değer farkları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Tablo 4.18. G-CSF değerlerinin önce ve G-CSF sonrası için fark analizi sonuçları (GM)

	Ölçüm	Ortalama	p
		Rank	
CD10	G-CSF Öncesi GM	15,36	0.004
	G-CSF Sonrası GM	7,64	
CD13	G-CSF Öncesi GM	7,82	0.007
	G-CSF Sonrası GM	15,18	
CD15	G-CSF Öncesi GM	15,36	0.004
	G-CSF Sonrası GM	7,64	
CD16	G-CSF Öncesi GM	15,36	0.004
	G-CSF Sonrası GM	7,64	
CD116	G-CSF Öncesi GM	13,55	0.151
	G-CSF Sonrası GM	9,45	

Geometrik ortalama değerlerine göre G-CSF Öncesi ve Sonrası fark analizleri incelendiğinde, sadece CD16 için fark anlamlı olmayıp ($p>0.05$), diğer parametreler için anlamlıdır ($p<0.05$).

Tablo 4.19. Geometrik ortalama değerlerine göre SI fark analizleri

	Ölçüm	Ortalama Rank	p
CD10	SI	15,73	
	SI GM	7,27	0.001
CD13	SI	6,00	
	SI GM	16,50	0.000
CD15	SI	17,00	
	SI GM	6,00	0.000
CD16	SI	17,00	
	SI GM	6,00	0.000
CD116	SI	9,64	
	SI GM	13,36	0.193

Geometrik ortalama değerlerine göre SI fark analizleri incelendiğinde, sadece CD16 için fark anlamlı olmayıp ($p>0.05$), diğer parametreler için anlamlıdır ($p<0.05$).

Tablo 4.20. Korelasyon analizi

		CD10	CD13	CD15	CD16	CD116
CD10	p	1	,181	,946**	,874**	,772**
	r		,149	,000	,000	,000
	N	66	65	66	66	66
CD13	p	,181	1	,037	,065	,318**
	r	,149		,772	,610	,010

	N	65	65	65	65	65
CD15	p	,946**	,037	1	,898**	,666**
	r	,000	,772		,000	,000
	N	66	65	66	66	66
CD16	p	,874**	,065	,898**	1	,550**
	r	,000	,610	,000		,000
	N	66	65	66	66	66
CD116	p	,772**	,318**	,666**	,550**	1
	r	,000	,010	,000	,000	
	N	66	65	66	66	66

Korelasyon analizi sonuçlarına göre CD10 ile CD15, CD16 ve CD 116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur ($p<0.01$). CD13 ile CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde ilişki bulunmuştur ($p<0.05$). CD15 ile CD16 ve CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur ($p<0.01$). CD16 ile CD10, CD15 ve CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur ($p<0.01$). CD116 ile CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur ($p<0.01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik iliği baskılanmış, uzun süreli nütropenisi olan hastalar veya nütrofil fonksiyon bozukluğu olan hastaların ciddi bakteri ve mantar enfeksiyonlarına yakalanma riski yüksektir. İyileşebilmeleri için dolaşımda yeterli sayıda nütrofil bulunması gerekir. Bu bağlamda standart tedaviye direnç geliştiren hastalarda granülosit transfüzyonunun kullanımı önemli bir klinik uygulamadır. Aferez cihazlarının gelişmesi ve koloni uyarıcı faktörlerin (CSF) kullanımıyla terapötik olarak etkili ve yeterli miktarda granülosit toplamak mümkün olmaktadır. (Kaynar L ve ark., 2015)

G-CSF'ler kemik iliğinde granülosit üretimini uyarırken aynı zamanda olgun olmayan granülositlerin kana geçiş süresini de kısaltan sitokinlerdir. G-CSF ile mobilize edilen vericilerden, trasfüzyon için iyi bir terapötik granülosit dozu sağlanır. (Unal A ve ark., 2018)

Çalışmamıza dahil edilen granülost vericilerinde tam kan sayımı verileri incelendiğinde G-CSF uygulamasının ardından beklenildiği gibi vericilerin beyaz kürelerinde büyük miktarda artış meydana gelmiştir. Bu değer içinde nütrofillerin sayısı ortalama 8 kat artarken lenfositlerin sayısı normal sınırlarda kalmıştır.

11 sağlıklı granülosit vericisine tek doz verilen granülosit koloni uyarıcı faktörün (G-CSF) vericinin nütrofillerinin yüzey belirteçleri üzerine etkisini akım sitometri yöntemi ile inceledik. G-CSF'ye yanıt olarak yeni oluşturulan nütrofiller üzerindeki CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 yüzey belirteçlerinin dağılım, geometrik ortalama ve uyarım indeksleri ölçüldü. Bu belirteçlerin CV değerlerindeki fark analiz sonuçlarına göre CD13, CD15 ve CD16 ifadelerinin farkları istatistiksel

olarak anlamlı bulundu. ($p<0.05$) geometrik ortalama ve uyarım indeksi değerlerinin sonuçlarına göre sadece CD16 değeri anlamlı değildir. ($p<0.05$)

Korelasyon analizi sonuçlarına göre CD10 ile CD15, CD16 ve CD 116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulundu ($p<0.01$). CD16 ile CD10, CD15 ve CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulundu ($p<0.01$). CD116 ile CD10, CD13, CD15, CD16 ve CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki bulundu ($p<0.01$).

Zarco MA ve arkadaşları yaptığı çalışmada G-CSF alan 16 sağlıklı granülosit vericisinde G-CSF sonrası nötrofillerde meydana gelen immünofenotipik değişiklikleri ve bunların zaman içindeki değişimini incelemişler ve CD10 ifadesinde azalma, CD15, CD16 belirteçlerinin MFI değerlerinde azalma gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda yaptığımız ölçümler sonucunda G-CSF uygulaması öncesi ve sonrasında yüzey belirteçlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim izlendi. G-CSF uygulaması CD13 ekspresyonunu 17 kat (GM SI: 17), CD116'yı ise 3,5 kat artırırken, CD15 ekspresyonu 10 kat CD16 ise 5 kat azalttığı izlendi.

CD13 ve CD116 ekspresyonundaki artış G-CSF'nin bir etkisi olarak olgun olmayan granülositlerin kemik iliğinden periferik kana geçişi ile açıklanmaktadır. Miyeloblast aşamasından olgun nötrofillere kadar olan aşamalarda granülositler değişik düzeylerde CD13 ifade ederler. CD116 GM-CSF reseptörü olarak artış kaydeder. CD16 ve CD15 ekspresyonundaki azalış uygulama sonrası kemik iliğindeki turn-over artışına bağlı olarak henüz olgunlaşmamış nötrofillerin de hızla dolaşıma çıktığını göstermektedir. Aynı zamanda CD10 ile CD15, CD16 ve CD116 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir korelasyonun bulunması ($p<0.01$) bizim bu bulgularımızı desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda G-CSF'nin vericide farklı olgunluktaki granülositlerin dolaşıma katılmalarını sağladığını, granülositler üzerindeki reseptörlerin ekspresyon düzeylerinde değişime sebep olduğunu gösterdik. Bu durum farklı olgunluktaki granülositlerin işlevsel olarak da farklı olabileceğini gösterir. Bu nedenle hastalara transfer edilecek olan granülositlerin etkinliği ile matürasyon düzeyi arasındaki

ilişkinin klinik araştırmalarla ortak çalışması G-CSF dozu/düzeyinin bu süreçteki etkisini daha iyi ortaya koyacaktır.



6. KAYNAKLAR

- Aktaş F. Hematopoetik Büyüme Faktörleri ve İnfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı, Flora Dergisi 1996
- Avalos BR. 1996. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor.
- Avcılar H, Köker MY, Eser B. Sağlıklı kemik iliği ve kan örneklerinde akım sitometri uygulamaları. Cumhuriyet Tıp Derg 2014; 36: 415 -421
- Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR, Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. BLOOD 2002; 100 (3): 854-861
- Birekul A, Ünal A., Kaynar L, Keni N, Turak Ermiş E, Şıvgın S, Eser B, Köker Y, Çetin M. Allojenik Kök Hücre Naklinde; Engrafman Öncesi Nötropenik Ateş Ataklarının Granülosit Transfüzyonu İle Başarılı Tedavisi; (Granülosit Transfüzyonu, Engraftmanı Hızlandırıyor mu?) 11. Aferez Kongresi, Bildiri Kitabı, İstanbul, 2016.
- Björnsdottir H, Welin A, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J. Quantification of heterotypic granule fusion in human neutrophils by imaging flow cytometry. Data in Brief 2016; 6:386-393
- Blood 88:761–777.
- Busca A, Cesaro S, Teofili L, Delia M and all. SEIFEM 2017: from real life to an agreement on the use of granulocyte transfusions and colony-stimulating factors for prophylaxis and treatment of infectious complications in patients with hematologic malignant disorders. Expert Rev Hematol. 2018; 3:1-14
- Can A, Haematopoietic stem cells niches: Interrelations between structure and function, Transfusion and Apheresis Science 38 (2008) 261–268.
- Cassatella MA, Östberg NK, Tamassia N, Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. TREIMM 2019; 1582 : 17

- Daifuku R, Andresen J, Morstyn G. Recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor for the prevention and treatment of non neutropenic infectious diseases. *J Antimicrob Chemother* 1993;32 (Suppl A):91-7.
- Dale DC, Liles WC, Summer WR, Nelson S. Review: Granulocyte colony-stimulating factor -Role and Relationships in infectious diseases. *J Infect Dis* 1995; 172:1061-75.
- Erten G. istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Bağışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri Sempozyum Dizisi No: 80 • 6-7 Mayıs 2013; 55 - 62
- Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Front. Immunol.* 2019 10: 346.
- Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Maher D. 1995. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86: 4437–4445.
- Güneş H. Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri, *Tr. J. of Biology* 1999;23: 283–292
- Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle Trends in *Immunology* 2019: 40(7):584-597
- Hiemstra IH, van Hamme JL, Janssen MH, van den Berg TK, Kuijpers TW. Dexamethasone promotes granulocyte mobilization by prolonging the half-life of granulocyte-colony stimulating factor in healthy donors for granulocyte transfusions. *Transfusion.* 2017; 57(3):674-684
- Hyun Y, Hong C . Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *JLB* 2017; 102
- Karp JE, Merz WG, Disck JD. Management of infections in neutropenic patients: new opportunities and emerging challenges. *Curr Opin Infect Dis* 1994; 7:430-5.
- Kaynar L, Solmaz M, Oztekin M, Baysal S, Sivgin S, Eser B, Unal A, Cetin M. Collection of Granulocytes for Transfusion to Neutropenic Patients:

- Performance Comparison of Two Apheresis Systems. EBMT 2015 Topic: 07. Apheresis stem cell collection and processing EBMT15-ABS-1790
- Kumar A, S.D'Souza S, and S.Thakur A, Understanding the Journey of Human Hematopoietic Stem Cell Development, Hindawi Stem Cells International 2019; 1-13.
- Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocytemacrophage colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 1992; 327:28-35, 99 -106
- Ma Y, Yang X, Chatterjee V, Meegan JE, Beard RS, Yuan SY. Role of Neutrophil Extracellular Traps and Vesicles in Regulating Vascular Endothelial Permeability. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1037.
- Ozer H, Armitage JO, Bennett CL, Crawford J, Demetri GD, Pizzo PA, Schiffer CA, Smith TJ, Somlo G, Wade JC, Wade, JL 3rd, Winn RJ, Wozniak AJ, Somerfield MR. 2000. 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: Evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. *J Clin Oncol* 18:3558–3585.
- Özcan M, Hematolojide Biyobenzer İlaçları - KFCG E-bülten; Sayı 59, Mayıs 2012
- Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol.* 2018; 9: 113.
- Rungelrath V, Kobayashi SD, DeLeo FR. Neutrophils in innate immunity and systemsbiology-level approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2020;12(1):e1458
- Rutella S et al. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol* 175: 7085–7091
- Sağsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler Dicle Üniv Vet Fak Derg 2008: 1 (2): 29 – 33
- Schmitt M, Publicover A, Orchard KH, Görlach M, Wang L, Schmitt A, Mani J, Tsigotis P, Kuriakose R, Nagler A. Biosimilar G-CSF Based Mobilization of Peripheral Blood Hematopoietic Stem Cells for Autologous and Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Theranostics.* 2014; 4(3): 280–289.

- Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends in Immunology* 2019; 40(7):565-583,
- Sivgin S, Karakus E, Kaynar L, Kurnaz F, Pala C, Keklik M, Zararsiz G, Solmaz M, Eser B, Cetin M, Unal A. The comparison of Filgrastim (Neupogen), biosimilar filgrastim (Leucostim) and Lenograstim (Granocyte) as a first line peripheral blood stem cell mobilization strategy in autologous hematopoietic stem cell transplantation: A single center experience from Turkey. *Transfusion and Apheresis Science* 2013; 48,315-320
- Smith WS, Sumnicht GE, Sharpe RW, Samuelson D, Millard FE. Granulocyte colony stimulating factor versus placebo in addition to penicillin G in a randomised blinded study of gramnegative pneumonia sepsis: Analysis of survival and multisystem organ failure. *Blood* 1995; 86:1301-9.
- Strauss RG. Neutrophil Collection and Transfusion. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine* 2009; 219-227
- Strauss RG. Neutrophil/granulocyte transfusion collected from G-CSF+dexamethasone stimulated donors. *Curr Opin Hematol.* 2015; 22(6): 565-567
- Süral N, Yıldız K. Farklı Yönleriyle Netosis. *Türk Hij Den Biyol Derg,* 2017; 74(4): 351-360
- Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi* 2005;15 (1): 48-56.
- Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y, Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(2):72-83
- Unal A, Birekul A. Kaynar L. Eser B. Cetin M. Successful Treatment With Granulocyte Transfusion and Early Neutrophil Engraftment İn Allogeneic Transplant Patients With Febrile Neutropenia: Does Granulocyte Transfusion Effect on Neutrophil Engraftment ? *Journal Of Global Onkology* 2018; 4: 2
- Utku Ateş, Kök hücreyi tanıyalım, *FNG& Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(1):19 -28

Linden M, Meyaard L. Fine-tuning neutrophil activation: Strategies and consequences. *Immunology Letters* 2016; 178:3-9

Van Rees DJ, Szilagyi K, Kuijpers TW, Matlunga HL, van den Berga TK. Immunoreceptors on neutrophils. *Seminars in Immunology* Volume 2016; 28 (2): 94-108

Yıldız K. Netosis: Alternative Defense Method Used by Neutrophils to Fight Pathogen. *Turkiye Parazitol Derg.* 2016 40(3):158-162

Zarco MA, Ribera JM, Urbano-Ispizua A, Filella X, Arriols R, Martínez C, Feliu E, Montserrat E. Phenotypic changes in neutrophil granulocytes from healthy donors after G-CSF administration. *Haematologica* 1999; 84:874-878



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 96681246/
Konu :

13.03.2018

Sayın Prof.Dr. Ali Ünal
Hematoloji

Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 21.03.2018 tarihinde yapılan toplantıda çalışmanız ile ilgili alınan Etik Kurul Kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Sami Aydoğan
Etik Kurul Başkanı

Eki: adet

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Granülosit transfüzyonu yapılan hasta ve donörlerden elde edilen nötrofillerde ve serumda sitokin (G-CSF, GM-CSF, IL-3) ölçülmesi ve engrafman üzerine etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLEN DIRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarhi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2018/153	Tarih : 21.03.2018	Funca HANCI ZAMECI Etik Kurul Sekreteri				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						

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 İlişki		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"/>	
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 type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
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"/>	
Prof. Dr. Aydın ÜNAL	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 type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Güven KAHRIMAN	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 type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
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"/>	
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"/>	
Doç. Dr. Cihangir 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"/>	
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 type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
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"/>	
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"/>	
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"/>	
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"/>	
Ecz. Şökran 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"/>	
Sevtap 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"/>	

* Toplantıda Bulunma

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

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011-1) (KAEK-30)

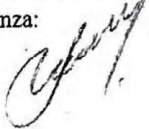
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Granülosit transfüzyonu yapılan hasta ve donörlerden elde edilen nötrofillerde ve serumda sitokin (G-CSF, GM-CSF, IL-3) ölçülmesi ve engraftman üzerine etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL 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	suknye@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof Dr Ali Ünal			
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji			
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Melikgazi, Kayseri			
	VARSA İDARI SORUMLU ÜNVANI/ ADI SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz	Uzmanlık Tezi				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

ASLI GİBİDİR

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



Fund. HANCI MEÇİ
Etik Kurul Sekreteri

G-CSF UYARIMININ DONÖR GRANÜLOSİTLERİNE ETKİLERİNİN HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ İLE GÖSTERİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

% **10**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR



tphd.org.tr
İnternet Kaynağı

% **1**



CEMAL ÖZTÜRK. "İÇ GÜVENLİK HİZMETLERİNDE ÇALIŞANLARIN LİDERLİK ALGISI İLE SALDIRGANLIK TUTUM DÜZEYLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ", Journal of International Social Research, 2016
Yayın

% **1**



studylibtr.com
İnternet Kaynağı

% **1**



www.aferez.org
İnternet Kaynağı

% **1**



library.cu.edu.tr
İnternet Kaynağı

% **1**



www.floradergisi.org
İnternet Kaynağı

% **1**

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Rabiya NAYİR

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 15 Temmuz 1994, Kayseri

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +90 553 844 76 07

Email: nagargo_rabiya45@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kayseri	2016
Lise	Talas Lisesi, Kayseri	2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2016	İdeal Eğitim Kurumu	Biyoloji Öğretmeni
2018-2020	Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Onkoloji Hastanesi Akım Sitometri Laboratuvarı	Biyolog (Part Time)

YABANCI DİL

İngilizce