

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı**

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ
HASTALARIN GAMMA DELTA T HÜCRE DÜZEYLERİ
VE KLİNİK ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Yeter Tuğçe TOKBAY**

**Danışman
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2020
KAYSERİ**

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

**ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ
HASTALARIN GAMMA DELTA T HÜCRE DÜZEYLERİ
VE KLİNİK ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Yeter Tuğçe TOKBAY**

**Danışman
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ**

**Ocak 2020
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Yeter Tuğçe TOKBAY

YÖNERGEYE UYGULUK SAYFASI

“Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların Gamma Delta T Hücre Düzeyleri ve Klinik Özellikler Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Yeter Tuğçe TOKBAY

Danışman

Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ

Kök Hücre Bilimleri ABD Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ danışmanlığında **Yeter Tuğçe TOKBAY** tarafından hazırlanan “**Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastaların Gamma Delta T Hücre Düzeyleri ve Klinik Özellikler Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre Bilimleri** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../ 2020

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ

Üye : Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şerife AYZAZ GÜNER

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle faydalı olabilmek için elinden geleni sunan sayın danışman hocam Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ 'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca beni her zaman destekleyen tüm imkanlardan faydalanmamı sağlayan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN' a ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yanımda olan desteğini hiç esirgemeyen ve bilgi birikimleri ile yardımcı olan Yüksek Biyolog Mustafa Burak ACAR'a teşekkür ederim.

Tezin yapılmasında ilk günden beri büyük katkıları olan, çalışmalarım süresince her türlü desteği veren laboratuvar arkadaşlarım Moleküler Biyolog Ahmet ŞİMŞEK, Biyolog Sura Hilal AHMED AL- SAMMARRAIE, Biyolog Zeynep GÜNAYDIN, Moleküler Biyolog Habibe BOZALAN, Moleküler Biyolog Miray BOLAT'a desteklerini hiçbir zaman esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunarım. Genom ve Kök Hücre Merkezi yöneticileri, akademisyenleri ve çalışanlarına yardımları için teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve hayallerimi gerçekleştirmemi sağlayan aileme ve ilk günden beri bana inanan, her zaman destek olan eşim Erdi TOKBAY'a varlığı ve sabrı için teşekkür ederim.

Yeter Tuğçe TOKBAY

Ocak 2020 KAYSERİ

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARIN GAMMA DELTA T HÜCRE DÜZEYLERİ VE KLİNİK ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yeter Tuğçe TOKBAY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2020
Danışman: Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ

ÖZET

Akut lenfoblastik lösemi özellikle gençler ve çocuklarda yaygın olarak görülen bir lösemi türüdür. Kan hücresi olan lenfoblastların olgunlaşma sürecinde meydana gelen anormal hücrelerin kontrol dışı büyüme ve çoğalması ile gerçekleşmektedir. Bu anormal hücreler çabuk yayılarak hastalık belirtileri göstermektedir. Bu tez çalışmasıyla DLI (sağlıklı bireyler), Tanı anı (1.gün) ve kemoterapi tedavisinin 33.günü hastalardan elde edilmiş Gamma Delta T ($\gamma\delta$ T) hücrelerinin B-ALL (CCRF-SB) kanser hücre hattına etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Biyolojik mekanizmaları değerlendirmek için deney gruplarından alınmış $\gamma\delta$ T hücreleri CCRF-SB hücre hattıyla birlikte kültüre edilmiştir. Kültür sonrasında her grup için apoptoz, senesens, proliferasyon testleri yapılmıştır. Kültür işlemi sonrasında apoptoz sonuçları DLI (Döner lenfosit infüzyonu) ve 33.gün $\gamma\delta$ T hücrelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. 33.gün ve 1.gün arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmiştir. Proliferasyon testi sonucunda; CCRF-SB kontrol grubu $\gamma\delta$ T uygulanmış deney gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Deney grupları arasında 1.gün grubuna göre DLI ve 33.gün grubunda daha az proliferasyon hücre olduğu gözlemlenmiştir. Senesens testi için deney gruplarına dahil edilen CCRF-SB kontrol grubu diğer deney gruplarına göre yüksek floresan aktivite göstermiştir. Beta galaktozidaz ifadesinin floresan aktivite için DLI ve 33.gün grupları 1.güne göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: B Hücreli akut lenfoblastik lösemi, Gamma Delta ($\gamma\delta$) T, Apoptoz, Proliferasyon, Senesens.

**EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN GAMMA DELTA T
CELL LEVELS AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH
ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDHOOD**

Yeter Tuğçe TOKBAY

**Erciyes University, Health Sciences Institute,
Department of Stem Cell Sciences
Master Thesis, January 2020
Supervisor: Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ**

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukaemia is a common type of blood cancer, especially in young people and children. It occurs due to uncontrolled growth and proliferation of abnormal cells caused by a disruption in the maturation process of lymphoblastic cells. These abnormal cells are dysfunctioned and their rapid spreading is considered as signs of disease. The aim of this study was to investigate the effects on B-ALL (CCRF-SB) cancer cell line of Gamma Delta T ($\gamma\delta$ T) cells obtained from healthy individuals, 1st day and 33rd day patients. To evaluate the biological mechanisms, the experimental groups $\gamma\delta$ T cells were cultured together with the CCRF-SB cell line. Apoptosis, senescence and proliferation tests were performed for each group after culture. Apoptosis results did not show a significant difference in DLI (donor lymphocyte infusion) and 33rd day $\gamma\delta$ T cells. Statistical significance was observed between 33rd day and 1st day. As a result of the proliferation assay, DLI and 33rd day $\gamma\delta$ T cells groups showed statistical significance compared to the 1st day group. Moreover, we did not apply to CCRF-SB for control groups. This group has shown a significant difference from treatment groups. The CCRF-SB group without $\gamma\delta$ T cells included in the experimental groups for senescence testing showed higher fluorescence activity than the other experimental groups. Fluorescence activity of Beta-galactosidase expression found DLI and 33rd day groups statistically significant than 1st day group.

Key Words: B Cell acute lymphoblastic leukemia, Gamma Delta ($\gamma\delta$) T, Apoptosis, Proliferation, Senescence.

İÇİNDEKİLER

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARIN GAMMA DELTA T HÜCRE DÜZEYLERİ VE KLİNİK ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hematopoez.....	3
2.2. Çocukluk Çağı Lösemileri	4
2.2.1. Çocukluk Çağı Lösemilerinde Sınıflama	5
2.2.1.1. Morfolojik Sınıflandırma	5
2.2.1.2. İmmunolojik Sınıflandırma	6
2.2.1.3. Genetik Sınıflandırma.....	6
2.2.2. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Epidemiyolojisi	7
2.2.3. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Etiyolojisi	7
2.2.4. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Klinik Belirti ve Bulgular.....	7
2.2.5. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Prognoza Etki Eden Faktörler	8
2.2.6. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Risk Sınıflandırma Sistemi.....	9
2.2.7. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Tedavi, Relaps ve Remisyon	10

2.3. İmmün Sistem	10
2.4. Gamma Delta ($\gamma\delta$) T Hücrelerinin Temel Özellikleri	12
2.5. İmmünoterapi	13
2.5.1. Kanser ve İmmün Sistem İlişkisi.....	14
2.6. Kanser İmmünoterapisinde $\gamma\delta$ T Hücre Bazlı Yeni Yaklaşımlar.....	16
2.7. Hücre Kültürü.....	17
2.7.1. Hücre Kültürü İçin Gerekli Ekipmanlar	17
2.7.2. Hücre Kültürü Kimyasalları	18
2.7.2.1. Mediumlar.....	18
2.7.2.1.1. Medium İçeriğindeki Maddeler	18
2.7.2.1.1.1. Tuzlar	18
2.7.2.1.1.2. Vitaminler	19
2.7.2.1.1.3. Karbonhidratlar	19
2.7.2.2. Medium İçeriğine Dahil Edilen Diğer Maddeler.....	19
2.7.2.2.1. Serum.....	19
2.7.2.2.2. Aminoasitler.....	19
2.7.2.2.3. Antibiyotikler.....	19
2.7.2.2.4. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri.....	20
2.7.2.2.5. PBS (Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi)	20
2.7.2.2.6. Tripsin.....	20
2.8. Testler.....	20
2.8.1. Apoptoz Testi	20
2.8.2. Senesens Testi	21
2.8.3. Proliferasyon Testi	21
3. YÖNTEM VE MATERYAL.....	27
3.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	27
3.1.1. Numunelerin Toplanması	28
3.2. Mononükleer Hücre İzolasyonu	28
3.2.1. Hücrelerin Dondurulması, Çözülmesi	28

3.3. B-ALL Hücre Kültürü ve Çoğaltılması.....	28
3.4. <i>In vitro</i> Hücre Kültüründe DLI(Donör Lenfosit İnfüzyonu) Çoğaltılması	29
3.5. Gamma/Delta T Hücre İzolasyonu.....	29
3.6. Gamma/Delta T Hücreler ile B-ALL Hücre Hattının Kokültürü	30
3.7. CCRF-SB Hücre Hattının Seçilmesi	30
3.8. Apoptoz Testi	31
3.9. Hücre Proliferasyon Testi.....	31
3.10. Senesens Testi	32
3.11. İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. B-ALL Tanısı Almış Bireylerin ve Kemoterapi Almış Bireylerin Bulguları;	34
4.2. Gamma Delta T ($\gamma\delta$ T) Hücrelerin Elde Edilmesi;.....	36
4.3. Gamma Delta T ($\gamma\delta$ T) Hücrelerinin CCRF-SB Kanseri Hücre Hattı ile Kültüre Edilmesi;.....	37
4.4. Senesens testi bulguları;	37
4.5 Apoptoz testi bulguları;	39
4.6. Hücre Proliferasyon Testi Bulguları;	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	44
KAYNAKÇA	48
ÖZGEÇMİŞ.....	55

KISALTMALAR ve SİMGELER

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>
$\alpha\beta$	Alfa Beta
AGM	Aorta-Gonad-Mezonefroz
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
β -Gal	Beta-galaktozidaz
CALLA	Common leukemia-associated antigen
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CD	Clusters of Differentiation
cIg	Sitoplazmik İmmünglobulin
CLP	Common Lymphoid Progenitör
CMP	Common Myeloid Progenitör
DLI	Donör Lenfosit İnfüzyonu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FAB	French, American, British
FBS	Fetal Bovine Serum
$\gamma\delta$	Gamma Delta
GMP	Granülosit/Monosit Progenitör
Hb	Hemoglobin
HLA	Human Leucocyte Antigen
HRG	High Risk Group
HSC	Hematopoietic Stem Cell
Htc	Hematokrit
IFN	İnterferon

Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
LDH	Laktat dehidrogenaz
LSM	Lymphocyte Separation Medium
MEP	Megakaryosit/Eritrosit Projenitör
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICM	Morfolojik-İmmünolojik-Sitogenetik-Moleküler genetik
MPP	Multipotent Projenitör
MRD	Minimal Residual Disease
MRG	Medium Risk Group
MTX	Methotrexate
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NK Cell	Natural Killer Cell
NKG2D	The Natural Killer Group 2D
PBS	Fosfatla Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	Polimerase Chain Reaction
Plt	Platelet
RBC	Red Blood Cell
SRG	Standart Risk Group
SSS	Santral Sinir Sistemi
TCR	T cell receptor
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TIL	Tümör İnfiltratif Lenfositler
TLR	Tool-like reseptör
TNF	Tümör nekrozis faktör
WBC	White Blood Cell

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Hematopoetik hiyerarşi modeli	4
Şekil 2.	Doğal- Edinsel Bağışıklık Sistemi.....	14
Şekil 3.	Deney dizayn figürü.	27
Şekil 4.	DLI (%15,5), 1.gün (%12,5) ve 33.gün (%15) gruplarından elde edilen gamma delta T hücre yüzde gösterimine ait grafikdir.	36
Şekil 5.	Periferik kandan izolasyonu yapılmış $\gamma\delta$ T hücrelerinin kültür ortamı.	37
Şekil 6.	Bu görsel $\gamma\delta$ T uygulaması sonrası CCRF-SB	37
Şekil 7.	Grafik, floresan aktivite (4-MUG Floresan beta-galaktozidaz) sonucu DLI, 1.gün ve 33.gün grupları ile CCRF-SB gruplarının sensensini göstermektedir.	38
Şekil 8.	DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarının floresan aktivite (4-MUG Floresan beta-galaktozidaz) sonucunun karşılaştırılmalı olarak sensensini göstermektedir.	39
Şekil 9.	Bu görsel $\gamma\delta$ T uygulaması sonrası CCRF-SB	40
Şekil 10.	MUSE Cell Analyzer cihazından alınmış Annexin-v boyama sonrası.....	41
Şekil 11.	Total apoptotik ve ölü hücreler çıkarıldıktan sonra elde edilmiş ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün hücrelerine ait canlı hücrelerin yüzdelerini gösteren grafikdir.....	41
Şekil 12.	Hücre proliferasyonu için KI67 antikoru ile boyanmış ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarına ait pozitif proliferasyon gösteren hücrelerin yüzdesini göstermektedir.	42
Şekil 13.	Muse cell analiz cihazından hücre proliferasyonu testi ile elde edilmiş ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarına ait yüzde olarak gösterilmiş Volcano Plot grafiğidir.	43

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Çocukluk çağı lösemilerinde sınıflama	5
Tablo 2.	ALL klinik ve laboratuvar bulguları	8
Tablo 3.	$\alpha\beta$ T ve $\gamma\delta$ T hücrelerinin genel özellikleri	12
Tablo 4.	Tanı anı B-ALL teşhisi konulmuş bireylere ait tıbbi laboratuvar tetkik sonuç raporundan alınan Laktat Dehidrogenaz (LDH), B-lenfosit antijeni CD19, Beyaz Küre (WBC), Eritrosit (RBC) ve Trombosit (PLATELET/PLT) değerleri.....	35
Tablo 5.	B-ALL teşhisi sonrası uygulanan kemoterapinin 33.günü hasta bireylerden alınmış örneklerin tıbbi laboratuvar tetkik sonuç raporundan alınan laktat dehidrogenaz (LDH), Beyaz Küre (WBC), Eritrosit (RBC) ve Trombosit (PLT) değerleri.....	35
Tablo 6.	$\gamma\delta$ T hücre uygulanmış grupların ve uygulanmamış CCRF-SB (Kontrol) hücre hattında 4-MUG floresan beta-galaktozidaz deneyi ile ölçülen senesens değerleri.....	38
Tablo 7.	Apoptoz testi ile boyanan $\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış CCRF-SB hücrelerinin Annexin-V boyama sonrası.....	40
Tablo 8.	Annexin V ile boyanan ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB hücrelerinin, Late/Early apoptotic ve Dead hücreler dışında kalan canlı hücrelerin yüzde değerleri	40
Tablo 9.	Kİ-67 boyama ile hücre proliferasyonu değerlerini gösteren DLI, 1. gün ve 33. gün uygulaması yapılmış CCRF-SB ve Kontrol grubunun değerleri.....	42

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akut Lenfoblastik Lösemi, kemik iliği öncü hücrelerinin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile meydana gelmektedir. Çocukluk çağının 1-5 yaş aralığında sıkça görülen ve özellikle erkek çocuklarında daha çok rastlanan malign (kötü huylu) bir kanser türüdür. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Amerika Birleşik Devletlerin de 18 yaş altı çocuklarda sıklıkla görülmekte ve ölümlere sebep olmaktadır. Ülkemizde ise görülme sıklığının 1.4/100000 olduğu düşünülmektedir. Kimyasal maddeler, beslenme, ilaç, enfeksiyonlar ve genetik yatkınlıklar gibi etkenler çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi nedenlerindedir (Uzunhan ve Karakaş, 2012).

İmmün sistem, vücut sıvıları ve yüzeyini kontrol etmektedir. Mikroorganizmalar ve zararlı maddelerin girişini düzenler ve engeller. İmmün sistem; doğuştan ve adaptif olmak üzere ikiye ayrılır. Doğuştan gelen immün sistem genel, adaptif immün sistem ise belli patojenlere özgüdür. Vücudumuz gün içerisinde çok fazla etken faktör nedeni ile hücreler kanserleşmekte ve immün sistem hücreleri bu kanserleşen hücreleri tanımakta ve inhibe etmektedir (Songu ve Katılmış, 2012). Adaptif immün sistem hücre elemanı T hücreler kanser hücrelerine karşı immünoterapi de kullanılmaktadır. T hücrelerinin bir alt grubu olan $\gamma\delta$ (Gamma Delta) T hücreleri çeşitli kanser türleri üzerinde etkili olabilmektedir (Wu ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında; çocukluk çağının en sık rastlanan kanser türü olan ALL'de $\gamma\delta$ T hücrelerini incelenmesi, tedavi öncesi ve sonrasında hastaların $\gamma\delta$ T hücrelerinin sayılarak, immünoterapi ve hücresel tedaviler sonrası bu hücrelerin hastalığın prognozuna etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Tez çalışmasının önemi; yukarıda bahsedildiği gibi çocukluk çağında en sık rastlanan ölüm nedenlerinden biridir. Son yıllarda kanser ile ilgili çalışmalar; immün sistem faktörleriyle beraber araştırılmaya başlanmıştır. Bizim çalışmamız yeni tanı almış

çocukluk çağı ALL hastaları üzerinde yapılacak bir çalışma olup, $\gamma\delta$ T hücrelerinin hasta prognozuyla olan ilişkisinin gözlemlenmesi açısından literatür de önemli bir yere sahip olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

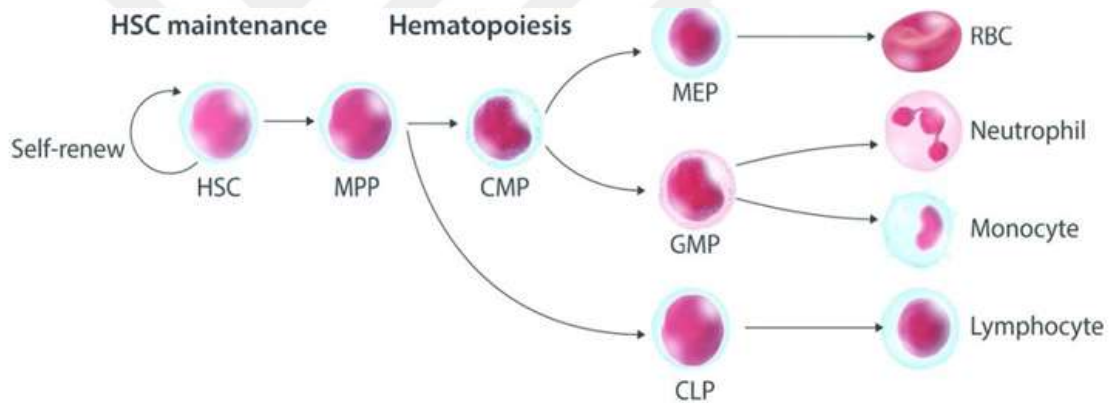
2.1. Hematopoez

Hematopoez, embriyonik veya yetişkin türde kök hücreden farklı kan hücrelerinin oluşması sürecini tanımlamaktadır. Hematopoetik kök hücreler kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Hematopoez sürecinin temel elemanlarını hematopoetik kök hücre, kemik iliği mikroçevresi ve hematopoetik büyüme faktörleri oluşturur (Ateş, 2016).

Hematopoez, embriyonik gelişimin 3.haftasında, vitellüs kesesinin duvarındaki mezoderm hücrelerinin hemanjiyoplast hücrelerine farklılaşmasıyla başlar. Hemanjiyoplast hücreler kan hücrelerinin ve endotel hücrelerinin öncülleridir. Embriyonik gelişimin 4.haftasından itibaren embriyonik mezodermin AGM (Aorta-Gonad-Mezonefroz) olarak anılan bölgesinde küçük hücre grupları meydana gelir. Bu bölgeden köken aldıktan sonra kan yoluyla geçerek bir süre sonra karaciğer ve dalak geçici süreliğine hematopoetik doku olarak görev yapmaya başlarlar (Cao ve ark., 2013). Gebeliğin 6.haftasında hematopoetik kök hücreler kordon ve plasentada ortaya çıkarak doğuma kadar burada kalırlar. Lenfoid öncül hücreleri gebeliğin 7.haftasından itibaren timusa göç ederek T lenfosit gelişimini başlatırlar (Patıroğlu ve Özcan, 2016). Kemik iliği gebeliğin 5. ayında devreye girmeye başlar ve son 3 ayda hematopoezin ana merkezi olarak görev alır. Tüm erişkin hayatı boyunca da bu görevi üstlenir (Orkın ve Zon, 2008; Özdemir, 2015).

Hematopoezin gelişim hiyerarşisinde hematopoetik kök hücreden sonra MPP (Multipotent progenitor) hücreler yer alır. MPP hücreleri tüm serilere farklılaşabilirler ancak kendilerini yenileme yetenekleri sınırlıdır. Hematopoetik kök hücreler (Common Myeloid Progenitors; Ortak Miyeloid Progenitor), CLP (Common Lymphoid Progenitors; Ortak Lenfoid Progenitor) gibi farklılaşma yeteneği sınırlı olan oligopotent

progenitörlere kaynak oluştururlar. CMP ve CLP hücreleri hematopoez gelişim hiyerarşisinde dallanma noktasında bulunurlar. Bu oligopotent hücreler bütün kan hücrelerini oluşturacak öncül hücrelerin oluşumunu sağlarlar. Lenfoid öncülü olan ortak lenfoid progenitörler; T cell, B cell, NK cell içeren olgun lenfoid efektör hücreleri oluştururlar. Ancak bu hücrelerin miyeloeritroid hücre oluşturma yeteneği gelişmemiştir. Miyeloid öncülü olan ortak miyeloid progenitörler ise miyeloid ve eritroid seri ile dendritik hücre yapma yeteneği geliştirmişlerdir (Durand ve Dzierzak, 2005; Kaushansky, 2006). CMP hücreleri hematopoez gelişim hiyerarşisinin devamında GMP (Granülosit Monosit Öncülleri) ve MEP (Megakaryosit Eritrosit Öncülleri) olmak üzere iki farklı hücre grubuna farklılaşırlar. GMP hücreleri nötrofil, eozinofil, bazofil gibi kan hücrelerine ve makrofajlara, MEP hücreleri ise platelet ve eritrositlere farklılaşırlar (Kaushansky, 2006).



Şekil 1. Hematopoetik hiyerarşi modeli. RBC: kırmızı kan hücresi; MPP: çok değişkenli progenitör; CMP: ortak miyeloid progenitör; MEP: megakaryosit-eritrosit progenitör; GMP: granülosit-monosit progenitör; CLP: Ortak lenfoid progenitör (Zhang ve ark., 2018).

2.2. Çocukluk Çağı Lösemileri

Lösemi, hematopoetik kök hücrede meydana gelen genetik ya da epigenetik olgunlaşma ve farklılaşma hatası göstermesi ile belirli bir basamakta durması ve bu immatür hücrelerde anormal klonal proliferasyon gelişmesi sonucu oluşan kemik iliğinin malign bir grup hastalığıdır (Couto ve ark., 2005).

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), çocukluk çağında en çok görülen ve lenfoidlerden köken alan bir lösemi türüdür. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %25' ini, çocukluk çağı

lösemilerinin ise %97'sini akut lenfoblastik lösemiler oluşturmaktadır (Howell ve ark., 2015; Lanzkowsky, 2005).

2.2.1. Çocukluk Çağı Lösemilerinde Sınıflama

Lösemi sınıflandırması immünofenotipik, morfolojik, moleküler, sitogenetik ve biyokimyasal olarak yapılmaktadır. Çocukluk çağında görülen lösemiler akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır (Mutlu, 2005).

Tablo 1.Çocukluk çağı lösemilerinde sınıflama (Mutlu, 2005).

<p>A) AKUT LÖSEMİLER (%97)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) 2. Akut Myeloid Lösemi (AML) 3. Akut Undiferansiye Lösemi (<%0,5) 4. Akut karışık lösemi <p>B) KRONİK LÖSEMİLER (%3)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Philedelphia kromozomu pozitif KML 2. Juvenil kronik myeloid lösemi (JKML)
--

2.2.1.1. Morfolojik Sınıflandırma

Fransız, Amerikan ve İngiliz (FAB) hematologları tarafından 1976 yılında periferik yayma ve kemik iliğinden aspire edilen preparatların morfoloji açısından incelenmesiyle, çekirdek şekli, hücrelerin büyüklüğü, sitoplazmanın bazofili derecesi, çekirdekçik sayısı belirlenerek lenfoblastlar üç gruba ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre ALL 3 (FAB L1, FAB L2, FAB L3) gruba ayrılır (Menteşe ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2015).

FAB L1: Bu grupta blastlar küçük olur ve birbirlerine benzerler aynı zamanda sitoplazmaları dar olarak gözlenir. Genellikle çocukluk çağında görülen ALL'lerin %85'ini oluşturmaktadırlar. Çoğunun hücresinde nükleus ya bulunmaz ya da çok az sayıda bulunur. Vakuelleri bulunmaz (Bassan ve ark., 2004). Bu grup lenfoblastlarda remisyon-indüksiyon oranının yüksek olduğu, uzamış remisyon ve sağkalım gösterdikleri izlenmiştir (Menteşe ve ark., 2017)

FAB L2: Genellikle yetişkinlerde görülmesinin yanı sıra çocukluk çağında görülen ALL'lerin de %14'ünü oluştururlar. Blastları daha geniş ve büyük sitoplazmalıdır. Nukleolusları daha belirgindir ve birden fazla sayıdadır. Vakuelleri vardır (Bassan ve ark., 2004). Bu morfolojiye sahip hastalar genellikle kötü prognoz gösterirler ve relaps oranları da yüksektir (Menteşe ve ark., 2017).

FAB L3: Çocukluk çağı ALL'lerinin %1'i FAB L3 grubundandır. Bu grupta bulunan blastlar homojen özellik gösterirler ve büyük olarak bulunurlar. Vakuelleri ve nukleusları bol miktarda bulunur. Sık sık mitoz geçirirler. L3 alt tipi, Burkitt lenfoma lösemi olarak kabul edilir (Menteşe ve ark., 2017).

2.2.1.2. İmmunolojik Sınıflandırma

Lösemi hücrelerinin yüzey antijenlerinin incelenmesi sonucu yapılan sınıflandırma çeşididir. Gelişim aşamasında lenfosit yüzeylerinde farklı antijenler belirir ve kaybolur. Bu yüzey antijenlerine CD (Cluster of Differentiation) denir (Jaffe, 2001). Bu antijenler etiket görevi görerek hücrenin hangi gelişim aşamasında olduğunu gösterir.

ALL hastalığında immunofenotipleme, yüzeyde ve sitoplazmada bulunan antijenlere göre olgun T hücreli, B hücreli ve B-prekürsör ALL olarak 3 gruba ayrılır. Bunlara ek olarak ALL altgrupları; Pro-B ALL, Erken pre-B ALL, Pre-B ALL, Transizyonel (geç) pre-B ALL, Olgun B hücreli ALL ve T hücreli ALL'dir (Gutiérrez ve Silverman, 2015).

2.2.1.3. Genetik Sınıflandırma

Lösemi gruplarını belirlemede FAB kriterlerini desteklemek için bazı sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır. Bu sebeple akut lenfoblastik lösemi hastalarında MICM (Morfoloji, İmmünoloji, Sitogenetik, Moleküler genetik) sınıflaması da uygulanmaktadır. MICM sınıflandırmasında hiperdiploidi görülen hastalarda prognozun daha iyi olduğu gözlenirken; psododiploidi, hipodiploidi ve tetraploidide kötü, haploidde ise daha kötü prognoz göstermektedir (Wetzler ve ark., 1999).

2.2.2. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Epidemiyolojisi

Kanser birçok ülkede çocuklarda görülen en çok ikinci ölüm nedeni olarak yer alır. Uluslararası sınıflandırmalara göre (ICCC,1996) ise en çok gözlenen çocukluk çağı malignitesi lösemilerden oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 15 yaş altı lösemi görülme oranı 100.000'de 4 olarak bilinir ancak lösemi görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre farklılık gösterebilir (Boyle ve ark., 2008).

Türk Pediatrik Hematoloji Derneği (TPHD) ve Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'nun 2009- 2012 yılları arasındaki kayıtlar incelendiğinde %29,34 ile Türkiye'de de lösemi çocukluk çağı kanserleri arasında ilk sırada yer almaktadır (Yeşilipek, 2012).

Lösemi hastalığının %75-80'ini ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi) oluşturmaktadır. Sağlık Bakanlığından elde edilen verilere göre yıllık lösemi görülme sıklığı 1.5/100.000 olarak belirtilmiştir. En çok 1-4 yaş arasında görüldüğü saptanmıştır. Kız/ erkek oranı ise 1/1.2-1.3'tür (Arceci ve ark., 2006).

2.2.3. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi Etiyolojisi

Akut lenfoblastik lösemi, hematopoetik kök hücrelerin herhangi bir olgunlaşma göstermeden mutasyon sonucu devamlı çoğalması ile oluşur (Arceci ve ark.,2006). Hastalığın gelişmesinde genetik faktörlerin etkili olmasının yanında radyasyon, hava kirliliği, enfeksiyon, ilaçlar ve yiyecekler gibi dış etkenlerin de hastalığın görülmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Wiemels, 2012).

2.2.4. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Klinik Belirti ve Bulgular

Akut lenfoblastik lösemide başlangıcın genellikle sinsi olduğu gözlenmiştir. Bu hastalıkta en çok görülen bulgular; bitkinlik (%50), ateş (%60) ve solukluktur (%40) (Lanzkowsky ve ark., 2016). Bu bulguların yanı sıra trombositopeni, kemik ve eklem ağrısı da en çok gözlenen semptomlardandır.

ALL'li hastalarda karaciğer, dalak, lenf nodları ve meninks gibi bölgeler en çok gözlenen ekstrameduller tutulum bölgeleri olarak bilinmektedir. ALL'li hastalarda aynı zamanda testis, tonsil, orbital doku gibi bölgelerde infiltre gözlenebilmektedir.

Lökositöz yüksekliği de hastaların yaklaşık olarak %10- 15'inde görülmektedir (Conter ve ark., 2004).

Tablo 2.ALL klinik ve laboratuvar bulguları (Conter ve ark., 2004).

Klinik bulgular	Laboratuvar bulguları
Ateş,	Lökosit sayısı (mm ³)
Halsizlik	• < 10,000
Kanama,	• 10,000-50,000
Solukluk	• > 50,000
Kemik ağrısı	Hemoglobin (g/dl)
Lenfadenomegali	• < 7.0
Dalak büyüklüğü (1-4 cm,>5 cm)	• 7.0-11.0
Karaciğer büyüklüğü (1-4 cm,>5 cm)	• > 11.0
Mediastinal kitle	Trombosit sayısı (mm ³)
SSS tutulumu	• <20,000
Testis tutulumu	• 20,000-100,000
	• >100,00

2.2.5. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Prognoza Etki Eden Faktörler

ALL hastalarında risk grupları birlikte prognostik ölçütlerin de belirlenmesi hastaya uygun nitelikte ve yoğunluktaki tedaviyi başlamak açısından önem taşımaktadır.

Tanı anında hastanın yaşı, lökosit seviyesi, remisyona girip girmemesi ve sağ kalım süresi evrensel prognostik faktörlerdendir (Margolin, 1997).

Çalışmalarda çocukluk çağı B-ALL hastalarında kötü prognoz görülmesi ile lökosit yüksekliği arasında bir ilişki olduğu saptanmışken, aynı şekilde bir ilişki olduğu T-ALL'li hastalarda saptanamamıştır (Hastings ve ark., 2015). Hastalarda en kötü prognoz ise 1 yaş altındaki çocuklarda olduğu gözlenmektedir. 1 yaş altındaki çocuklarda genellikle SSS tutulumu, yüksek blast oranı ve tedaviye geç yanıt gibi bazı özellikler görülmektedir (Margolin, 1997). 1 yaş altındaki hastalarda kendi arasında değerlendirildiğinde en kötü prognoza sahip hastalar 3 ay altında görülürken, en iyi prognoza sahip olanlar 6-12 ay aralığında görülmektedir. Tüm yaş grupları

incelendiğinde ise en iyi prognoza sahip olanlar 2-6 yaş arasındaki hastalarda görülmektedir (Pieters ve ark., 2007).

Cinsiyet bakımından incelendiğinde, kızlarda erkeklere oranla daha iyi prognoz olduğu gözlenmiştir. Bu durumun kız ve erkek hastalardaki endokrin, biyolojik ve metabolik farklılıklardan dolayı olduğu düşünülmektedir.

Ancak güncel tedavi yöntemleri ile erkeklerdeki kötü prognozunda ortadan kalkması sağlanmıştır. Önemli prognostik faktörlerden biri tedaviye hızlı yanıtıdır. Verilen indüksiyon tedavisi sonucu remisyona giremeyen hastalarda indüksiyonun başarısız olduğu şekilde değerlendirme yapılır ve bu hastalarda kısa yaşam ve nüks görülme sıklığının da arttığı belirlenmiştir (Margolin, 1997). Yapılan çalışmalar indüksiyon tedavisi sırasında yetersiz nutrisyonel desteğin de sonucunda kötü prognoz görülmesine sebep olduğunu göstermektedir (Co-reyes ve ark., 2012).

2.2.6. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Risk Sınıflandırma Sistemi

ALL'de bazı test sonuçları (lökosit sayısı, yaş, löseminin immünofenotip ve sitogenetik özellikleri, merkezi sinir sistemi tutulumu veya ekstramedüler tutulumun olup olmaması, tedaviye yanıt süresi) hastanın risk sınıflandırmasında önemlidir. Yapılan risk sınıflandırmasına göre tedavi protokolleri oluşturulmuştur. Türkiye'de ALL IC 2009 protokolü kullanım için seçilmiştir (ALL IC-BFM, 2009)

ALL' de risk gruplandırma kriterleri; 8. gün periferik kandaki blast sayısı, 33. gün kemik iliği yanıtı, tanı anındaki yaş, tanı anındaki lökosit sayısı, t(4;11) t(9;22) kromozom varlığıdır.

Standart risk grubu (SR): 7 günlük prednizolon tedavisinden sonra 8.günde bakılan periferik kanda blastik hücre sayısının <1000/ mm³ olması (Prednizolona iyi yanıt), tanı anındaki lökosit sayısının <20000/mm³, 1 yaş ya da üzerinde olması, 6 yaş altında olması, hastanın 33.günde tam remisyona girememiş olması, T hücre immünolojisinde olmaması, t(4;11) t(9;22) olmaması gibi kriterlerin bulunması durumunda hasta SR grubu olarak belirlenir.

Orta risk grubu (MR): Hastanın MR grubu olarak belirlenebilmesi için lökosit sayısı \geq 20.000 /mm³ olması, 1 yaş altında olması ya da 6 yaş üzerinde olması, T hücre immünolojisinde olması gibi kriterlerden en az birinin olması ayrıca 7 günlük

prednizolon tedavisinden sonra 8.günde bakılan periferik kanda blastik hücre sayısının 1000 /mm³ den az olması (prednizolona iyi yanıt), 33. günde tam remisyon, t(4;11) t(9;22) olmaması kriterlerinin hepsini karşılaması gerekmektedir.

Yüksek risk grubu (HR): HR grubu diyebilmek için hastanın 7 günlük prednizolon tedavisinden sonra 8.günde bakılan periferik kanda blastik hücre sayısının 1000/mm³ fazla olması, 33. günde tam remisyon elde edilememiş olması, t(4;11) t(9;22) varlığı yaş ve lökositten bağımsız olarak tek bir kriter varlığı yeterlidir.

2.2.7. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemide Tedavi, Relaps ve Remisyon

ALL tedavisi, yaklaşık olarak 2-2,5 yılı bulan ve remisyon-indüksiyon, konsolidasyon (pekiştirme) ve idame fazı olarak 3 fazdan oluşan bir tedavidir (Pui ve ark., 2008). Remisyon-indüksiyon fazında kullanılan tedavi, kortikosteroid (Prednisone veya Deksametazon), Asparaginaz ve Vinkristine gibi kemoterapötiklerden oluşur. Antrasiklinler ise 4. seçenek kemoterapötik ajan olarak kullanılır. Bu protokol standart risk grubundaki hastalarda konsolidasyon tedavisiyle birlikte verildiğinde genellikle yeterli olur. Yüksek riskli hastalarda ise remisyon-indüksiyon fazında 4 veya daha fazla kemoterapötik ajan vermek gerekebilir (Inaba ve ark., 2013). Konsolidasyon tedavisinde hastanın öncelikle remisyon-indüksiyon tedavisini tamamlaması istenir. Bu fazda çoğunlukla yüksek doz Methotrexate ve Merkaptopürin uygulanır. Vinkristin-kortikosteroid tedavileri, 20-30. haftalarda uygulanan asparaginaz tedavisi ve remisyon-indüksiyon fazında kullanılan 4-6 haftalık tedavinin tekrarı (reindüksiyon) konsolidasyon tedavisinde uygulanan diğer uygulamalardır (Pui ve ark., 2008). Hastalığın idame tedavisi ile toplam tedavi süresi 2 yıl veya daha fazla devam etmektedir. İdame tedavisi olarak günlük Merkaptopürin ve haftalık Methotrexate tedavisi verilir (Inaba ve ark., 2013).

2.3. İmmün Sistem

İmmün sistem, enfeksiyonlara yol açan virüs, mantar, bakteri, parazit gibi organizmalara karşı gelişen bir savunma sistemidir. İmmün sistem hücreler, organlar ve dokulardan oluşur. Bu hücreler monosit, nötrofil, lenfosit, dendritik hücrelerdir. Organ ve dokuları ise timus bezi, kemik iliği, lenf sistemi, dalak, barsak, solunum sistemi ve derideki lenfoid yapılar oluşturur. İmmün sistemin çalışması, doğal immün yanıt (doğal

direnç) ve edinsel immün yanıt (kazanılmış direnç) olmak üzere iki ana kolda incelenmektedir (Santori, 2015).

Doğal immün yanıt, başlıca doğal öldürücü hücreler, eozinofiller, nötrofiller, bazofiller, makrofajlar, mast hücreleri ve dentritik hücreler tarafından gerçekleştirilir. Belli bir antijenden bağımsız ortaya çıkan ancak immünolojik hafıza oluşturmayan sadece vücuda karşı olanı tanımaya yönelik immün yanıttır. Edinsel immün yanıtın temel yapıtaşlarını B ve T lenfositler oluşturur. Edinsel immün yanıt kendinden olmayan patojenlere özgü immün yanıt oluşturur ve daha sonraki karşılaşmalarda hızlı yanıt vermek adına etkene özgü immünolojik hafıza oluşturur (Salımı ve ark., 2010).

B lenfositlerinin olgunlaşmaları erken evrede kemik iliğinde gerçekleşmektedir ve antikor üretiminden sorumludurlar. Lenfoid dokudaki organizasyonlarına göre foliküler B hücreleri, marjinal zon B hücreleri ve B1 hücreleri gibi alt grupları bulunmaktadır. T lenfositleri ise kemik iliğinden köken alarak timüste olgunlaşır, dolaşıma girer, sekonder organ ve dokulara giderler (Patıroğlu ve Özcan, 2016).

Hücre yüzey reseptörlerine göre iki alt gruba ayrılırlar. Bunlar, alfa-beta TCR (T cell receptor) heterodimeri eksprese eden $\alpha\beta$ (Alfa Beta) T hücreler ve gamma-delta TCR heterodimeri eksprese eden $\gamma\delta$ T hücrelerdir. $\alpha\beta$ T hücreler major histocompatibility complex (MHC) sınıf I veya II moleküller tarafından sunulan antijenik peptidleri tanır (Davis ve ark., 1998). Kanser immünoterapisi çoğunlukla, bu MHC sınırlı (MHC restricted) $\alpha\beta$ T'lerin aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Son zamanlara kadar sayıca küçük T hücre alt grubu olan $\gamma\delta$ T hücreler çok az dikkat çekmiştir. Bu hücreler sitokin üretimi, güçlü sitotoksik etki gibi $\alpha\beta$ T'lerin bilinen belirli fonksiyonlarını paylaşmakla birlikte; değişik antijenleri MHC sınırlı olmayan (nonMHC restricted) bir şekilde tanır (Altınççek ve ark., 2001). $\gamma\delta$ T hücrelerinin bazı alt grupları ise stresle indüklenebilen MHC sınıf I ilişkili büyük çoğunluğu epitelyal tümör hücrelerinden eksprese edilen molekülleri veya tümör hücresi tarafından üretilebilen fosforile metabolitleri tanır ve bu tanımda NKG2D gibi hücre yüzey reseptörleri önemli rol oynar (Cerwenka ve ark., 2000; Cosman ve ark., 2001). Bundan dolayı birçok tümör hücresi $\gamma\delta$ T hücre aracılı lizise oldukça dayanıksızdır (Kabelitz ve ark., 2004). Artmış apoptozun gözlemlendiği bazı durumlarda ise $\gamma\delta$ T hücre fonksiyonlarında yetersizlikler ortaya çıkmaktadır (Hedges ve ark., 2003).

2.4. Gamma Delta ($\gamma\delta$) T Hücrelerinin Temel Özellikleri

Gamma delta ($\gamma\delta$) T hücreleri, 'geleneksel olmayan' T hücrelerinin protitidir ve periferik kandaki nispeten küçük T hücrelerinin alt kümesini temsil eder. γ ve δ zincirlerinden oluşan heterodimerik T hücre reseptörlerinin (TCR'ler) ekspresyonu ile tanımlanırlar. Bu onları $\alpha\beta$ TCR'leri eksprese eden klasik ve çok daha iyi bilinen $CD4^+$ yardımcı T hücreleri ve $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerinden ayırır. $\gamma\delta$ T hücreleri, sitokinlerin (IL-17, TNF- α , IFN- γ) ve kemokinlerin (IP-10, lenfotaktin, RANTES) enfekte olmuş veya dönüştürülmüş hedef hücrelerinin sitolizi sonrasında, transfer edilmiş hücrelerin tanınmasında geniş fonksiyonel plastisite gösterirler. Yapılan çalışmalar $\gamma\delta$ T hücrelerin, potansiyel antitümör etkili efektör hücrelerin immün sistemde etkili olduğunu göstermiştir. $\gamma\delta$ T hücreler $CD3^+$ periferik kan T hücrelerinin %1-10'u gibi küçük bir bölümünü oluştururken, deri ve intestinal epitel gibi vücudun dış bölgelerindeki T hücrelerinin ise büyük bölümünü oluşturur. $\gamma\delta$ T hücreler, $\alpha\beta$ T hücrelerde gözlenen bazı görevleri (ör: sitotoksisite, sitokin üretimi) yapması dışında bazı yönleriyle $\alpha\beta$ T hücrelerinden farklıdır. İlk olarak bazı $\gamma\delta$ T hücreler $CD8^+$ antijeni ifade ederken çoğu $CD4^+$ veya $CD8^+$ antijene sahip değildir. Periferik kandaki $\gamma\delta$ T hücrelerinin büyük kısmında gözlenen bu durum, antijen tanınmasındaki MHC sınırlandırması ile sonuçlanır (Hayday, 2000). İkinci olarak, $\gamma\delta$ T hücrelerin germ-line kodlanan TCR dağarcığı, $\alpha\beta$ T'lerin geniş TCR dağarcığı ile karşılaştırıldığında daha küçüktür (Kabelitz ve ark., 2004).

Tablo 3. $\alpha\beta$ T ve $\gamma\delta$ T hücrelerinin genel özellikleri (Kabelitz ve ark., 2004).

Özellik	$\alpha\beta$ T	$\gamma\delta$ T
CD3⁺ hücrelerdeki oranı (%)	90-99	1-10
TCR V gen germ-line dağarcığı	Büyük	Küçük
CD4/CD8 Fenotip		
CD4⁺	~ %60	<%1
CD8⁺	~ %30	~ %30
CD4⁺ CD8⁺	<%1	<%1
CD4⁻ CD8⁻	<%1	<%1
MHC sınırlaması	CD4 ⁺ : MHC sınıf II	Yok
Ligand	CD8 ⁺ : MHC sınıf I Peptid + MHC	Fosfolipid antijen

$\gamma\delta$ T hücreler sahip olduğu TCR molekülündeki V geni kullanılarak insanlarda 2 alt tipe ayrılmıştır (Pietschmann ve ark., 2009).

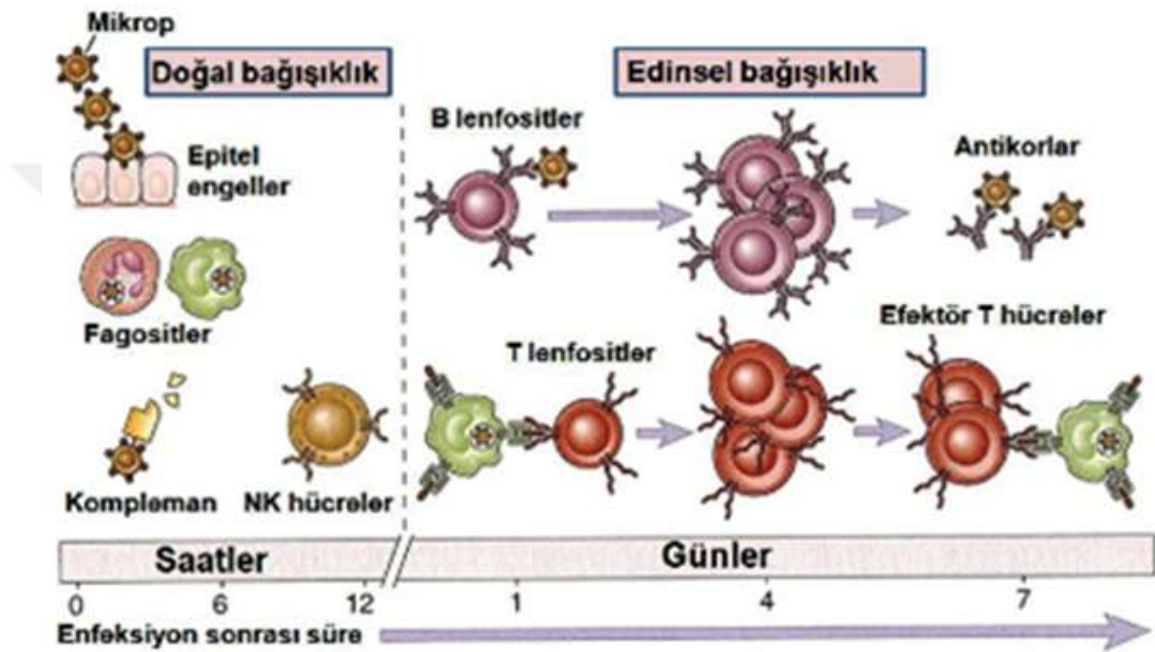
1.V γ 9V δ 2 T hücreler: V γ 9V δ 2 hücreler, insanlarda perifer kandaki $\gamma\delta$ T hücrelerinin %80-90'ını oluşturur. Mikroorganizma veya tümör kaynaklı fosfo antijenleri tanımakla görevli hücrelerdir. Doğumda çok nadir görülmesine rağmen, erken çocukluk süresince sayıları artmaktadır (Casetti ve Martino, 2008).

2.V δ 1 T hücreler: Bu hücreler mukozalardaki $\gamma\delta$ T hücrelerinin %10-40'ını oluştururlar. Stresle indüklenen MHC ile ilişkili molekülleri tanırlar. Çevresel mikroorganizmalar ile temasa bağlı olarak $\gamma\delta$ T hücre topluluğu genişlemektedir. $\gamma\delta$ T lenfositlerin antijeni tanınması $\alpha\beta$ T lenfositlerden farklı olarak, MHC moleküllerine bağımlı değildirler. Enfeksiyonun belirleyicileri olarak korunan küçük organik molekülleri (monoetilfosfat, izopentenilpirofosfat) ve stres varlığını işaret eden molekülleri (MICA, MICB) tanırlar (Özbek, 2014).

2.5. İmmünoterapi

İmmünoterapi spesifik tedaviler arasında yer almaktadır. Kelime anlamı olarak bireyin immün sisteminin belirli kısımlarını kullanarak, kanser gibi çeşitli hastalıklarla mücadele etmemizi sağlayan terapidir. Biyolojik terapi ve biyoterapi olarak da adlandırıldığı durumlar mevcuttur (Barbaros ve Dikmen, 2015). Kanser gelişimi yapısal farklılıklar gösteren birtakım hücrelerin anormal bir şekilde artışı ve bunların vücuda yayılması ile meydana gelmektedir. Kanser hücrelerinin oluşumu genellikle intrinsik veya eksojen faktörlerden kaynaklanan gen mutasyonlarının bir sonucudur. Giderek dünya çapında ciddi bir sorun haline gelen kanserin gelecekte de artarak bu konumunu sürdürmesi beklenmektedir (Zhou, 2014). Bu durum kanserin tedavisi için etkili yöntemler kullanımını zorunlu hale getiren bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Cerrahi yöntemler ve radyoterapi ile her ne kadar tümörlerin yok edilmesinde başarı sağlansa da, bazı kanserli hücre kalıntıları ve metastaza bağlı hastalık tekrarları önemli bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bu yüzden bu yöntemlerle kombine olarak kemoterapi de tedavi sürecinde kendine yer bulmaktadır. Fakat kemoterapinin kanserli hücrelerin yanında vücudun sağlıklı hücrelerine verdiği zarar da göz önüne alınarak bireysel özelliğe sahip, tümöre özgü tedavilere olan ilgi artmaktadır (Wayteck ve ark., 2014). İmmünoterapi ile dışarıdan verilen maddelerle tümörlere karşı immün cevap

geliştirilebileceği gibi, vücudun kendi hücreleri ile de bu yanıt oluşturulabilir. Örneğin makrofajlar, NK (natural killer) hücreler, dendritik hücreler, T lenfositler ve B lenfositler çeşitli yollar aracılığıyla tümörlerin yok edilmesine yardımcı olabilir ya da doğrudan ortadan kaldırılabirler. Tümörlere karşı efektör mekanizmalar olarak kullanılan bu hücreler kemoterapötiklerin aksine doğrudan kanserli hücrelere yönlendirilebilirler (Aslan, 2010).



Şekil 2.Doğal- Edinsel Bağışıklık Sistemi (Abbas ve ark., 1999).

2.5.1. Kanser ve İmmün Sistem İlişkisi

İmmün sistemin değişikliğe uğramış hücrelerin büyümesini engelleyerek çoğalıp zararlı hal almadan da yok etmesi olayına kanser immün gözetimi denir. Kanser immün gözetimi düzenli hücre homeostazının sürdürülmesi ve karsinogenezisin inhibisyonu ile olur (Kim ve ark., 2007). Tümör hücreleri ile immün hücreler karşı karşıya geldiğinde immün hücrelerin ölümü gerçekleşir. Fakat tümör hücrelerinin konak immün hücrelerinden kaçarak immün sistem elemanlarını etkisiz kılma yetenekleri vardır (Barbaros ve Dikmen, 2015). Kanser immün düzenlemesi; equilibrium (denge), elimination (bertaraf etme) ve escape (kaçış) olarak 3 fazdan oluşur. Eliminasyon fazı, immün gözetim kavramının özelliklerini gösterir. Denge fazı eliminasyon fazında immün sistemin ortadan kaldıramadığı tümörlerin latent periyot evresi olarak

adlandırılır. Kaçış fazı ise tümör hücrelerinin denge fazını geçirmiş olmasına rağmen yinede tümörlerin büyüme ve çoğalma gösterdiği evredir (Dunn ve ark., 2004).

Kanser ve immün sistemle ilgili kullanılan tedavi yöntemlerinden biri monoklonal antikorlar kullanarak gerçekleştirilen ve en fazla klinik alanda çalışılan yöntemdir. Bu yöntemde sınırsız çoğalma özelliği olan tümör hücreleri ve antikor üreten memeli hücreleri birleştirilerek antikor üretimi yapabilen hibridoma hücreleri oluşturulur. Bu hücrelere bir tek tipte hibrid hücreden oluşmasından dolayı monoklonal hücre adı verilir. Monoklonal antikorlar genellikle biyolojik materyallerin saflaştırmasında, teşhisinde ve analizlerinde kullanılmaktadır. Bunlara ek kanser ve bazı otoimmün hastalıkların teşhis ve tedavisinde, organ nakillerinde doku reddinin önlenmesi amacıyla da kullanılır (Waldmann, 2003).

Diğer immünoterapi yöntemleri, immünolojik açıdan aktif olan hücrelerin hastalığın oluşumunun önlenmesi ve tedavisi amacıyla hastaya verilmesidir. Bu yaklaşımda immün sistem elemanı olan T hücreleri kullanılır. Bunlar; kanser spesifik TCR (T hücresi reseptörü) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücreleri, TIL (tümör infiltratif lenfositler) ve antikorun ekstraselüler kısmı ile T hücresi reseptörünün sinyal mekanizmasını bir araya getiren kimerik antijen reseptörü (CAR) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücrelerdir (Özet ve ark., 1996).

Bu yaklaşımlardan en kolay hazırlananı TIL'lerdir ancak transfer sonrası TIL'lerin desteklenmesi için yüksek dozda IL-2 (interlökin-2) vermek gerekir. Bu da yüksek oranda toksisiteye sebep olabilir. Bu yöntemle lenfosit depleksyonu olan hastalarda ve metastatik melanomalı hastalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. TCR yerine CAR ekspresyonu yapan T hücrelerine yönelik çalışmalar da mevcuttur. Bunlar T hücrelerine MHC (Majör histokompatibilite kompleksi) ile sınırlı antijenin aksine, tüm antijeni tanıma fırsatı sağlar. Bu yöntemde sonuçların başarılı olduğu gözlenmiştir ancak olabilecek toksisite sebebiyle henüz kullanım alanı kısıtlıdır. Başka bir yöntemde endojen tümör spesifik T hücrelerinin kullanımı ile ilgilidir. Bu yöntem en fazla işlem gerektiren yöntem olarak bilinmektedir (Harris ve Drake, 2013).

2.6. Kanser İmmünoterapisinde $\gamma\delta$ T Hücre Bazlı Yeni Yaklaşımlar

$\gamma\delta$ T hücrelerin potansiyel antitümör aktivitesinin kliniğe uyarlanması 2 strateji vardır: Bunlardan biri $\gamma\delta$ T-stimüle edici ligandların (fosfoantijenler) *in vivo* olarak uygulanması ve $\gamma\delta$ T hücrelerinin aktivasyonunu indüklemek, diğeri ise $\gamma\delta$ T hücrelerin *ex vivo* izolasyonu sonrası *in vitro* olarak genişletilmesi ve hastaya $\gamma\delta$ T hücrelerin adoptiv transferidir. Önceden $\gamma\delta$ T hücreler ile ilgili 2 strateji olduğu düşünülüyordu. Bunlar halihazırdaki endikasyonların klinik kullanımda lisanslı ilaçların uygulanması ve önceden belirlenmiş oldukça potent fosfoantijenlerin uygulanması işlemleriydi. Sentetik fosfoantijenler (bromohidrin pirofosfat) pico-nano-molar konsantrasyonlarda, *in vitro* olarak V γ 9V δ 2 T hücreleri stimüle ederek dizayn edildiler ve böylece *in vivo* potansiyel uygulamalar için başlıca aday oldular (Çiçek, 2015). Bazı fosfoantijenler sadece $\gamma\delta$ T hücrelerini aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda tümör hücrelerine karşı onların sitotoksik etkilerini artırır (Sicard ve ark., 2001; Sireci ve ark., 2001). Bununla beraber bu gözlemden çıkan, ilginç bir sonuç da “osteoporoz tedavisinde kullanılan aminobifosfonatlarında, *in vitro* ve *in vivo* olarak insan V γ 9V δ 2 T hücreleri üzerinde potent stimülatör etki sağladığı”dır (Kunzmann ve ark., 2000). İnsan V γ 9V δ 2 T hücreleri tarafından aminobifosfonatların tanınması, mikrobiyal ve sentetik fosfoantijenler gibi, TCR-bağımlıdır. Bununla birlikte değişik aminobifosfonatların değişik $\gamma\delta$ -stimüle edici etkileri bulunduğu gibi; fosfoantijenler ve aminofosfonatlar arasında antijen prezentasyonu gereksinimleri arasında fark vardır (Das ve ark., 2001). Fosfoantijenlerin sunumu ligandın devamlı varlığını gerektirir, bundan dolayı fosfoantijenler ile antijen sunan hücreleri (Antigen-Presenting Cell, APC) uyarmak yetersiz kalır. Bu aminobifosfonatların tersi bir durumdur. Aminobifosfonatlarla APC’lerin preinkübasyonu $\gamma\delta$ T hücre aktivasyonunu tetiklemek için yeterlidir (Miyagawa ve ark., 2001).

APC yüzeyinde bulunan aminobifosfonatların $\gamma\delta$ T hücreler tarafından direkt tanınma imkanına ilaveten, bu maddeler $\gamma\delta$ T hücrelerin dolaylı aktivasyonunda da sorumlu olabilir. Aminobifosfonatlar, olan farnesil difosfat sentazın (IPP adlı ara ürünü oluşturan, mevalonat metabolizması yolağının, ilerletici (promoting) bir enzimi) potent inhibitörüdür (Dunford ve ark., 2001). Farnesil difosfat sentazın aminobifosfonat aracılı inhibisyonu nedeniyle, V γ 9V δ 2 T hücrelerinin potent aktivatörü olan IPP’nin hücre içi

birikimi, $\gamma\delta$ T hücrelerin selektif aktivasyonuna katkıda bulunabilmektedir (Schnurr ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar sonucunda IL-2 ler ile aminobifosfonatların kombine edilmesi kanser immünoterapisi için gelecek vaad etmektedir. Bazı çalışmalarda IL-2 ile fosfoantijenler veya aminobifosfonatların birlikte kullanılmasının, klinik cevap olarak, tümör reaktif $\gamma\delta$ T hücrelerinin yeteri kadar mobil ve aktive olup olamayacağı ile elgilenmiştir. Aminofosfanat veya fosfoantijenlerle IL-2 tarafından *in vivo* olarak $\gamma\delta$ T hücre aktivasyonu, $\gamma\delta$ T hücrelerinin *ex vivo* izolasyonu ile *in vitro* ortamda büyük ölçülerde genişlemesini sağlayan adoptiv immün terapilere bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Wilhelm ve ark., 2003).

2.7. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, *in vitro* koşullarda bir organizmadan alınan dokunun fiziksel ve kimyasal yöntemlerle parçalanarak bağımsız hücrelerinin canlılığının devam ettirilmesi işlemidir (Rando, 2006).

In vitro koşullarda kültüre edilen hücreler, *in vivo* koşullar sağlandığı takdirde aynı özelliklerini göstermeye devam ederler. Bu durum bizlere bir canlıya ait hücrelerin farklı koşullar, farklı kimyasallar veya ilaçlara karşı nasıl tepki vereceğini canlı dışında yapılan deney ve gözlemlerle araştırmak için olanak sağlar. Aynı zamanda kültüre edilmiş hücreler kontrol edilebilir ve homojen olduklarından tam organizmalara kıyasla üzerinde çalışmak birçok avantaj içerir (Pittenger, 2008).

2.7.1. Hücre Kültürü İçin Gerekli Ekipmanlar

Hücre kültürü, diğer biyolojik deneylerin yapıldığı ortamlarla aynı yerde gerçekleştirilemez. Hücre kültürü yapılabilmesi için ortamın steril ve hazırlık alanının bulunması gerekir.

Hücre kültürü laboratuvarlarının temel ekipmanları steril kabin, hücrelerin yaşaması için gerekli %5 CO₂ ve 37 °C'lik ortamı sağlayan karbondioksit inkübatörü, kültüre edilen hücreleri gözlemleyebilmek için invert mikroskop, hücre yıkama için kullanılan satrifüj cihazı, uzun vadede hücre saklamaya yarayan azot tankı, kültür malzemelerinin

bozulmadan saklanmasında kullanılan +4 °C soğutucu, -20 °C ve -80 °C derece dondurucu temel olarak hücre kültürü laboratuvar ekipmanlarını oluşturur.

2.7.2. Hücre Kültürü Kimyasalları

2.7.2.1. Mediumlar

Mediumlar, hücrelerin yaşayabilmesi için gerekli olan besiyerleridir. Hücreler bu besiyerleri sayesinde yüzerek, askıda kalarak ya da kültür kabının tabanında beslenmelerini sağlamış olurlar. Hücre kültürü besiyerinin optimum koşul olan pH değerini taşıması gerekir. Hücreler çoğunlukla pH:7.4 olan ortamda yaşarlar. pH indikatörü olarak fenol kırmızısı kullanılır. Medium pH'nın arttırılıp azaltılmasına bağlı olarak fenol kırmızısının rengi değişir. Ortam asidik oldukça medium rengi sarıya yaklaşırken, bazik ortamda medium koyu kırmızı, pembe renk alır.

Mediumlardaki diğer önemli birleşenler ise CO₂, NaHCO₃ ve HEPES'tir. Karbondioksit medium içerisinde gaz halde iken çözünür. Medium içerisinde laktik asit birikmesi sonucu ortam pH'ı düşer. Ortamın pH dengesini korumak adına medium içerisine bu birleşenler eklenir. HEPES ise bu birleşenler arasında en çok kullanılan tampon birleşenlerden biridir. Hücre kültürü mediumlarının sıcaklıkları, hücreleri etkileyen önemli bir unsurdur. Memeli hücreleri genellikle -196°C'de donmuş olarak saklanabilirler. +4°C'de birkaç gün canlılıklarını koruyabilirler. Memeli hücreleri için en uygun kültür sıcaklığı 37°C'dir. Hücre kültüründe kullanılan mediumlar soğutuculara saklandığından, hücrelerin üzerine koyulmadan önce sıcaklıklarının bu sıcaklığa yaklaştırılması kültürdeki hücrelerin canlılığı açısından çok önemlidir (Freshney, 2010).

2.7.2.1.1. Medium İçeriğindeki Maddeler

2.7.2.1.1.1. Tuzlar

Tuzlar, medium osmolaratisine katkıda bulunan bileşenlerdir. Medium içinde bulunan tuzlardan bazıları; Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, SO₄⁻², PO₄⁻³ şeklindedir. Özellikle Ca²⁺ hücre tutunması ve hücre-hücre etkileşimi açısından önemli bir role sahiptir (Freshney, 2010).

2.7.2.1.1.2. Vitaminler

Vitaminler, hücre metabolizması için besiyeri içindeki konsantrasyonları oldukça önemlidir. A, D, E, K vitaminleri, B grubu vitaminler, biotin, inositol, folik asit, nikotinamit vitaminleri hücre kültür ve çoğalması için hücre kültür mediumlarında bulunması gerekli vitaminlerdir (Freshney, 2010).

2.7.2.1.1.3. Karbonhidratlar

Besiyerlerinde karbonhidratlar şeker formunda bulunurlar ve hücreler için temel enerji kaynağı görevi görürler. Mediumlar içerisinde farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Kullanılacak medium hücre tipine göre seçilir (Freshney, 2010).

2.7.2.2. Medium İçeriğine Dahil Edilen Diğer Maddeler

2.7.2.2.1. Serum

Serumlar, büyüme faktörü barındırdığından hücrelerin büyüme ve gelişmesinde önemli role sahiptir. Hücre tipi ve fizyolojik duruma göre farklı oranlarda mediuma eklenebilirler. Besiyeri içine genelde %10 oranında eklenen serumlar, büyükbaş hayvanlardan, atlardan veya insanlardan elde edilebilirler (Freshney, 2010).

2.7.2.2.2. Aminoasitler

Aminoasitler hücrelerin yaşaması ve büyümesinde önemli role sahiptirler. Bazal mediumların içinde bulunabileceği gibi sonradan da eklenebilirler. En çok kullanılan aminoasit ise glutamindir. Glutamin yarı ömrü kısa olan bir aminoasit olduğundan uzun süre kullanılmayan mediumlara eklemek gerekebilir (Freshney, 2010).

2.7.2.2.3. Antibiyotikler

Hücre kültürünün çalışıldığı *in vitro* ortamda hücreler doğal ortamından uzakta ve doğal immün sistemleri olmadığı için bakteri ve fungus kontaminasyonundan korumak amacıyla medium içerisine genelde %1 oranında antibiyotik eklenir. Bu antibiyotiklerden bazıları; penisilin, gentamisin, amfoterisin ve streptomisin'dir (Freshney, 2010).

2.7.2.2.4. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Hormonlar ve büyüme faktörleri genelde hücre kültüründe kullanılmazlar. Ancak bazı hücrelerin daha iyi gelişebilmesi ve büyümesi için ortama eklenebilirler. Besiyeri içeriğine genellikle insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II), epidermal büyüme faktörleri (EGF) ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ilave olarak eklenmektedir (Freshney, 2010).

2.7.2.2.5. PBS (Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi)

PBS, hücre kültürü işlemlerinde genellikle hücre kabına tutunan hücreleri tripsin ile kaldırdıktan sonra hücre yüzeyinin yıkanması işlemi için kullanılmaktadır. Hücre kültüründe kullanılan iki çeşidi vardır. Kalsiyum ve magnezyum içeren PBS, hücre izolasyonu sırasında kollajenaz enzimi ile birlikte kullanılır. Kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ise genellikle yıkama işlemleri sırasında kullanılır. Tripsin enzimi kalsiyum ve magnezyum varlığında çalışmadığından dolayı yıkama işlemlerinde +2 değerlikli iyon içeren kalsiyum ve magnezyum içeren PBS kullanılmaz (Freshney, 2010).

2.7.2.2.6. Tripsin

Tripsin, plastik yüzeye tutunan hücreleri kaldırmak için kullanılan bir enzimdir. Ancak hücrelerin tripsin ile temas ettiği süre çok önemlidir. Uzun süre temas ederse hücre membran yüzeyinde bulunan protein yapılar parçalanmaya başlar. Dolayısıyla hücrenin plastik yüzeye tutunmasını ve canlılığını etkiler. Tripsin enzimini durdurmak için de tripsin inhibitörü ya da bol miktarda protein içeren bir serum (FBS vb.) kullanılır (Freshney, 2010).

2.8. Testler

2.8.1. Apoptoz Testi

Bu çalışmada apoptoz oranının ne ölçüde değiştiğini bulmak için Muse Cell Analyzer cihazına ait Annexin V/Dead Cell kiti kullanılmıştır. Annexin V, hücre yüzeyinde bulunan ve apoptoz veya hücre ölümü gibi durumlarda kanıt olarak gösterilen fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) moleküllerini belirlemeye yarayan bir

işaretçidir (Koopman ve ark., 1994). Ayrıca bu kitin içinde ölü hücreleri boyamaya yarayan 7-AAD boyası vardır. 7-AAD, hasarlı fosfolipid zardan geçip DNA'ya bağlanan bir moleküldür. Mikro santrifüj tüpünde bulunan hücrelere Annexin V ile muamele edilip sonrasında akım sitometri temelli bir cihaz olan Muse Cell Analyzer'da incelenerek apoptoz yüzdesi belirlenebilmektedir.

2.8.2. Senesens Testi

Senesens, hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu ancak bölünmelerinin kalıcı olarak durduğu bir süreçtir. Senesens sürecinin çeşitli belirteçleri vardır. Bu belirteçlerden biri lizozom artışına bağlı olarak lizozomal enzimlerin artmasıdır. Senesens hücrelerdeki lizozomal artışın sonucu olan lizozomal enzim seviyesindeki artış hücrelerde pH:6'da β -galaktosidaz aktivitesinin tespit edilmesinde olanak sağlar (Kurz ve ark., 2000). pH:6.0'da saptanabilen senesense bağlı beta-galaktosidaz (SA- β gal) aktivitesi, kültürdeki senesent hücrelerin tespitini sağlar. Lizozomal B-galaktosidaz aktivitesi, birçok memeli hücresinde, pH:4'te normalde X-Gal kullanılarak gerçekleştirilen sitokimyasal boyama ile yerinde tespit edilir. Fakat spesifik olarak senesent insan fibroblast kültürlerinde bulunan ancak farklılaşmış hücrelerde bulunmayan bir pH:6-galaktosidaz aktivitesi senesent hücrelerin ayırımına olanak verir (Debacq-chamiaux ve ark., 2009; Dımır ve ark., 1995). Bu tez çalışmasında senesens belirlemek amacıyla 4-Mug testi uygulanmıştır.

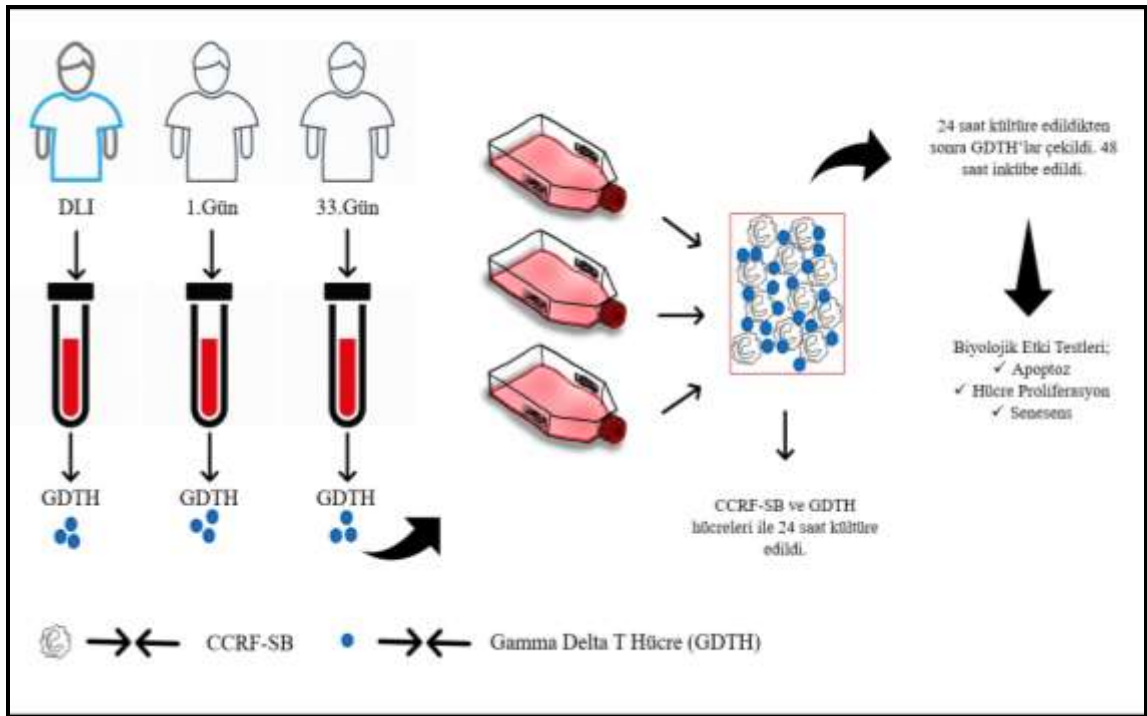
2.8.3. Proliferasyon Testi

Bu çalışmada hücrelerin proliferasyonunu ölçmek amacıyla Ki-67 immün boyama işlemi uygulanmıştır. Bu proliferasyon belirteci olan protein, kendisine özel bir antibadi ile boyanabilir ayrıca metabolik olarak aktif ve özellikle hızlı bir şekilde bölünen hücrelerde bolca ifade edilir. Temel olarak öncelikle test yapılacak olan hücre fikse edilir. Fiksasyondan sonra internal bir boyama yapılacağından hücre membranı deterjanlar ile geçirgen hale getirilir. Bu işlemlerden sonra Ki-67'yi tanıyan bir primer antibadi ve ona bağlı florokrom içeren bir sekonder antibadi ile hücreler muamele edilir. Floresan mikroskop veya uygun lazer ve filtre içeren akım sitometri cihazı ile proliferasyon hücreleri belirlenebilmektedir.

3. YÖNTEM VE MATERYAL

3.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmamız Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin 26.01.2018 tarih ve 2018/46 nolu kararı ile etik kurul onayı alındıktan sonra başladı. Çalışmamız için hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki ayrı grup oluşturuldu. Hasta grubu için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematoloji-Onkoloji Servisinde yatan yeni ALL tanısı almış, yaşları 2 ile 18 arasında değişen, cinsiyet ayrımı olmayan ve gönüllü olan toplam 10 kişiden oluşan hasta birey çalışma kapsamına alındı. Kontrol grubu olarak herhangi bir nedenle steroid veya kemoterapi almayan sağlıklı donörden DLI (Donör Lenfosit İnfüzyonu) elde edilmiştir.



Şekil 3.Deney dizayn figürü.

3.1.1. Numunelerin Toplanması

Çocuk Hematoloji-Onkoloji Servisine Akut Lenfoblastik Lösemi tanısıyla yatan hastalardan herhangi bir tedavi uygulanmadan, tanı anında periferik kan örnekleri ön kol venöz damarlarından EDTA'lı kan tüplerine 2 mL olacak şekilde alınmıştır. Erciyes Üniversitesi BETÜL-ZİYA EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) Laboratuvarına gönderilmiştir. Numune toplama işlemi hasta grubundan tanı anında (1.gün) ve hastanın tedavisinin 33. gününde olmak üzere periferik kanları toplanmıştır.

3.2. Mononükleer Hücre İzolasyonu

ERÜ Genkök Merkezine gelen kan örnekleri zaman kaybetmeden 1:1 oranında seyreltilmiştir. Sepmate' e 20-25 mL LSM (Lymphocyte Separation Medium) besiyeri eklenerek seyreltilen kan sepmate'e aktarılmıştır. 800 xg de 25 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısmı atılmıştır. Kalan kısmın üzeri tamamlanarak 400 xg de tekrar 10 dakika santrifüj edilerek mononükleer hücre izolasyonu elde edilmiştir. İzolasyon işlemi hastanın tanı anı, tedavi aldıktan sonra 33.günde olmak üzere 2 gruba uygulanmıştır.

3.2.1. Hücrelerin Dondurulması, Çözülmesi

DLI ve Hasta grubundan elde edilen hücreler üzerine dondurma işlemi için, %70 FBS (Fetal Bovine Serum), %10 DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve %20 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) dondurma (freezing) solüsyonu eklendi. Krayoviallerde +4° de 1 saat, 20° de 4 saat, – 80° de 24 saat ve daha sonra -196° sıvı azot tanklarına alınmıştır. Hücrelere işlem uygulanacağı zaman krayovialler azot tankından alındıktan sonra oda ısısında hızlıca çözündürülmüştür.

3.3. B-ALL Hücre Kültürü ve Çoğaltılması

Ticari olarak temin edilen B-ALL hücre hattı (CCRF-SB) kültürü için, %10 FBS, %1 Penicilin, %1 Glutamin ve RPMI 1640 ile besiyeri hazırlanmıştır. CCRF-SB hazırlanan besiyerinde 300 xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldıktan sonra DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile yıkanarak tekrar 300 xg de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti üzerine kültür solüsyonu eklenerek kültür kabına büyüme besiyeri ile aktarılıp, 37 °C,

%5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Aynı işlem istenilen hücre sayısına ulaşıncaya kadar tekrarlanmıştır.

3.4. *In vitro* Hücre Kültüründe DLI(Donör Lenfosit İnfüzyonu) Çoğaltılması

Sağlıklı donörden elde edilen DLI için TexMACS besiyeri hazırlanmıştır. Ek olarak besi yerine %10 FBS, %1 Glutamin ve %1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Mononükleer hücreleri alınan DLI grubu için kültür kaplarına ekimi yapılmadan önce bekletildikleri azot tankından alındı ve hücreler çözdürüldü. Ardından 350 xg de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Elde edilen hücre pelleti üzerine DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) eklenerek tekrar 350 xg de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atıldıktan sonra T-75 flasklara hücreler ekildi ve 37 °C, %5 CO₂ 'lik inkübasyona bırakıldı.

3.5. Gamma/Delta T Hücre İzolasyonu

Hasta bireylerden alınan 1.gün ve 33.gün periferik kan örnekleri farklı zaman dilimlerinde olduğu için periferik kandan elde edilen mononükleer hücreler azot tankında saklanmıştır. Deney aşamaları için azot tankından alınarak her gruba ait hastalardan elde edilmiş mononükleer hücreler havuz oluşturularak toplanmış ve çalışılmıştır. Bu durum bireysel farklılığı önlemek amacıyla yapılmıştır. Gamma Delta T hücre izolasyonu için TCR γ/δ + T cell isolation kit basamaklarına göre yapılmış ve manyetik hücre ayırma yöntemi kullanılmıştır. Kit basamaklarını takiben; hücreler çözdürüldükten sonra 300 xg de 10 dakika santrifüj edildi. İzolasyon işlemi için öncelikle mononükleer hücreler sayılmıştır. Hücreler sayıldıktan sonra 300 xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde ettiğimiz hücre pelletine 10⁷ hücre başına 80 μ l buffer eklenmiştir.

Sonrasında 10⁷ hücre başına 20 μ l Biotin-Antibody kokteyli eklenip iyice karıştırılarak +4 °C de 15-20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra 10⁷ hücre başına 1-2 mL buffer eklenerek 300 xg de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti üzerine 10⁷ hücre başına 80 μ l buffer eklenmiştir. Sonrasında 10⁷ hücre başına 20 μ l Anti-Biotin MicroBeads eklenip iyice karıştırılarak +4 °C de 15-20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 10⁷ hücre başına 1-2 mL buffer ilave edilerek hücreler tekrar yıkanmış ve 10 dakika 300 xg'de santrifüj

edilmiştir. Süpernatantı tamamen aspire edilmiştir. Elde edilen hücre pelletine 10^8 hücre başına 500 μ l buffer ile çözdürülerek manyetik ayırma işlemine devam edilmiştir. Toplam hücre sayısına ve γ/δ T hücrelerinin sayısına göre uygun bir MACS Kolonu (MS Kolon) ve MACS Ayırıcı seçilerek manyetik ayırma işlemi yapılmıştır. Hücreler uygulandıktan sonra tutunmayanlar (negatif seçilim) alınarak γ/δ T hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.6. Gamma/Delta T Hücreler ile B-ALL Hücre Hattının Kokültürü

İzole edilen γ/δ T hücreleri ile çoğaltılan CCRF-SB hücre hattı, TexMACS (FBS, glutamin ve antibiyotik (penisilin-streptomisin)) besiyerinde 24 saat birlikte kültüre edilmiştir. Bu işlem tanı anı (1.gün), 33.gün ve kontrol grubu olmak üzere uygulanmıştır.

3.7. CCRF-SB Hücre Hattının Seçilmesi

γ/δ T hücreleri ile inkübatörde 24 saat kültüre edilen CCRF-SB hücre hattını ayırmak için CD19 MicroBeadslerden yararlanılmıştır. Bu işlem manyetik hücre ayırımı ile gerçekleştirilmiştir. İşlem için öncelikle deney grupları (tanı anı, 33.gün, kontrol grubu) buldukları flasklardan 15mL'lik falconlara alınmıştır. DPBS ile flasklar bir kez yıkanıp falcon tüpe her bir grup aktarılmıştır. 350 xg de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılmıştır. Elde edilen hücre pelleti üzerine 1.5 mL DPBS eklenerek çözdürüldü ve tekrar 350 xg de santrifüj edilerek süpernatant kısım atılmıştır. Pellet üzerine 1mL MACS buffer eklenerek hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı sonrası 300 xg de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılmıştır. Hücre pelleti üzerine 10^7 hücre başına 80 μ l buffer eklendikten sonra 10^7 hücre başına 20 μ L CD19 MicroBeads eklenmiştir. İyi karıştırıldıktan sonra 4 °C de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

10^7 hücre başına 1-2 mL buffer eklenerek yıkandıktan sonra 300 xg de 10 dakika santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra 10^8 hücre başına 500 μ L buffer eklenerek uygun bir MACS Kolonu (MS Kolonu) ve MACS Ayırıcı seçilerek manyetik ayırma işlemi yapılmıştır. Hücrelere uygulandıktan sonra manyetik kolona tutunanlar (Pozitif seçilim) alınarak CCRF-SB hücre izolasyonu

gerçekleştirilmiş ve CCRF-SB hücrelerine etkilerini gözlemleyebilmek için 48 saat inkübasyonda bekletilmiştir.

3.8. Apoptoz Testi

Bu çalışmada hücreleri apoptoz açısından gözlemek amacıyla Annexin V/Dead Cell kiti kullanılarak MUSE Cell Analyzer™ cihazında apoptoz testi gerçekleştirildi. Çalışma iki biyolojik tekrarlı olacak şekilde planlanmıştır. Bu testte hücre yüzeyinde bulunan ve apoptoz veya hücre ölümü gibi durumlarda hücre zarının dış yüzeyine çıkan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) molekülleri Annexin V ile işaretlenir. Ayrıca kit hasarlı fosfolipid zardan geçip DNA'ya bağlanarak ölü hücreleri boyayan 7-AAD boyası da içerir. Hücreler kit protokolü doğrultusunda Annexin V ile muamele edilip akım sitometri temelli bir cihaz olan MUSE Cell Analyzer™'da incelenerek apoptotik hücre yüzdesi belirlenir.

İnkübasyon sonrası hücre grupları 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 350 xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı ve kit basamakları doğrultusunda unstainable grup seçilerek deney gruplarında bulunan hücreler besiyerini uzaklaştırmak için DPBS ile yıkandı ve biyomateryallerin tamamen uzaklaştığı gözlemlenince tripsin ile kaldırıldı. Deney gruplarından elde edilen hücrelere 100µL DPBS ve 100 µL Annexin V/Dead Cell Reagent eklendi. Vortekslendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. MUSE Cell Analyzer™ cihazında Annexin V/Dead Cell programı ile 3 tekrarlı okuma yapılarak apoptoz testi tamamlandı.

3.9. Hücre Proliferasyon Testi

Proliferasyon, hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşmekte ve hücrelerin iki yavru hücreyi oluşturması işlemidir. Proliferasyon ölçüm testleri; DNA sentez hızının ölçülmesine, metabolik aktivitenin ölçümüne, proliferasyon belirteçlerinin ölçümüne ve hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayalı testler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu tez çalışmasında hücrelerin proliferasyon oranlarını saptamak amacıyla MUSE Cell Ki67 Proliferasyon (MUSE Cell) kitinden faydalanılmıştır. Bu kit Ki67 ekspresyonuna dayalı olarak çoğalan ve çoğalmayan hücrelerin yüzdelerinin nicelendirilmesine izin verir. İki biyolojik tekrarlı olacak şekilde hücre grupları belirlenmiştir. Bu tahlilde Ki67 hücreleri (çoğalmayan hücreler ve izotip kontrolü) ve Ki67+ hücreleri (çoğalan

hücreler) olmak üzere iki hücre popülasyonu ayırt edilebilir. Hücrelere kit protokolleri doğrultusunda muamele edilerek MUSE Cell AnalyzerTM'da okunan yazılım, hem Ki67 + hem de Ki67 hücrelerinin yüzdesini sağlar.

İnkübasyon sonrası hücre grupları 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 350 xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı ve kit basamakları doğrultusunda unstainable grup seçilerek deney gruplarında bulunan hücrelere besiyerini uzaklaştırmak için DPBS ile yıkama yapıldı. 300 xg de 10 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar süpernatant kısım atıldı. Her bir örnek üzerine 50 µL fix solüsyonu eklendi (solüsyon fix: 80 µL 5fix +320 µL DPBS). 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra fiksasyon solüsyonu ve hücrelerin üzerine 150 µL assay buffer eklendi (buffer assay: 800 µL 5x assay+3200 µL DPBS). 300 xg de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım atıldıktan sonra hazır permeabilizasyon solüsyonundan her tüp için 100 µL eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra üzerine her bir örnek için 100 µL assay buffer eklendi. 300 xg de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantı atıldı. Ardından her tüpe 50 µL assay buffer eklenerek tekrar 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin ardından tüplere 10 µL Ki67 antibody eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Tüplerin üzerine 150 µL assay buffer eklendi ve MUSE Cell AnalyzerTM'da 3 tekrarlı okuma yapılarak proliferasyon testi tamamlandı.

3.10. Senesens Testi

İnkübasyon sonrası hücre grupları 15 mL falkon tüplere alınarak 350 xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı. Hücre pelleti alındı ve 10 mL DPBS'de çözülerek hücrelerin sayımı yapıldı. Her bir örneğin lizis işlemi için 200 µL RIPA Buffer eklendi ve insülin şırıngası ile pipetaj yapıldı. 5 dakika ultrasonikasyon ve 5 dakika buz uygulama işlemi 3 tekrarlı şekilde yapıldıktan sonra 20000 xg de 15 dakika +4 °C de soğutmalı santrifüjde santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım dört ayrı tüpe 50µL olarak aktarıldı. Aktarıldıktan sonra her tüpe 150µL Reaksiyon buffer (40 mM sitrik asit, 40 mM sodyum fosfat, 300 mM, 10 mM Beta-merkaptoetanol, 4 mM MgCL₂ ve 1,7 mM MUG (-Methylumbelliferyl-β-galactopyranoside)) ve RIPA Buffer dan 50µL eklenerek 2-3 saat 37 °C %5 CO₂ de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her tüpten 50µL alınıp başka bir tüpe

aktarıldı. Ependorf tüpler içeribde 50µL bulunan lizatların üzerine 40 mM Sodyum fosfattan 500µL eklendi. Floresan aktivite ölçmek için kullanılan 96 kuyucuklu siyah plateelerin herbir kuyucuguna total 550µL den 100µL eklenerek 360nm/465nm dalga boyunda GloMax Platereader (Waisman Center-Madison) cihazında ölçümleri yapıldı.

3.11. İstatiksel Analiz

Bu tez çalışmasında tıbbi laboratuvar sonuçları ve *in vitro* deneylerden elde edilen veri analizler, grafikler ve anlamlılık değerleri için GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA) yazılımı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. B-ALL Tanısı Almış Bireylerin ve Kemoterapi Almış Bireylerin Bulguları;

Lösemi için hastalarda rastlanan belirtiler diğer kanser çeşitleri ile ortak özellik gösterebilmektedir. Lökosit hücrelerinin aşırı büyüme ve çoğalması ile normal lökosit hücrelerinin azlığı enfeksiyon ve ateş belirtileri gösterebilir. Buna ek olarak güçsüzlük anemi ve nefes darlığı şikayetleri eritrosit eksikliğine bağlı olarak gelişebilmektedir. Akut lösemi hastası çocuklarda gözlemlenen morluklar ve kanama kan testlerinde trombosit eksikliği ile anlaşılabilir. Bu şikayetler doğrultusunda istenilen tam kan sayımı, kemik iliği aspirasyonu ve flow sitometri sonuçları ile lösemi tanısı konulur. Lösemi tanısı almış bireylere kemoterapi, kök hücre nakli ve d6n6r lenfosit infüzyonu tedavileri verilmektedir. Bu bağlamda belirlenen deney düzeneğimizde sağlıklı bireyler, tanı anı ilk gün ve kemoterapi almış hasta bireylerin B hücreli kanser hücre hattıyla beraber kültüre edildi. Kültür işlemlerinden önce hastalardan alınan kan örneklerinden elde edilen test sonuçları tablo 4 ve 5 de gösterilmiştir. Tablodan elde edilen değerler hasta yaş ve değerlendirilen labaratuvarlarda farklılık gösterebilmektedir. LDH (Laktat Dehidrogenaz) 120-300/birimi μL , WBC (Beyaz Küre) 4,8-10,7/ birimi $10^3 \mu\text{L}$, RBC (Eritrosit) 4,2-5,4 $10^6 \mu\text{L}$ ve PLT (Trombosit) 130-400/ birimi $10^3 \mu\text{L}$ olarak kabul edilmektedir

Tablo 4. Tanı anı B-ALL teşhisi konulmuş bireylere ait tıbbi laboratuvar tetkik sonuç raporundan alınan Laktat Dehidrogenaz (LDH), B-lenfosit antijeni CD19, Beyaz Küre (WBC), Eritrosit (RBC) ve Trombosit (PLATELET/PLT) değerleri tabloda verilmiştir.

Tanı Anı (1.gün)	Cinsiyet	Yaş	CD19	LDH	WBC	RBC	PLT
1.Hasta Birey	E	2	98,8	2130	24,81	2,84	45
2.Hasta Birey	E	15	94,4	1284	178,67	3,49	43
3.Hasta Birey	K	0	99,9	690	82,06	2,31	33
4.Hasta Birey	K	2	82,4	1592	940,94	2,05	18
5.Hasta Birey	K	2	85,9	459	8,28	3,62	67
6.Hasta Birey	E	13	99,9	4466	388,26	3,77	29
7.Hasta Birey	K	1	99	620	25,8	4,02	47
8.Hasta Birey	E	6	92	698	3,04	3,58	66
9.Hasta Birey	K	6	99,6	1946	378,48	1,53	15
10.Hasta Birey	E	8	99,5	1006	4,77	3,3	10

Tablo 5. B-ALL teşhisi sonrası uygulanan kemoterapinin 33.günü hasta bireylerden alınmış örneklerin tıbbi laboratuvar tetkik sonuç raporundan alınan laktat dehidrogenaz (LDH), Beyaz Küre (WBC), Eritrosit (RBC) ve Trombosit (PLT) değerleri tabloda verilmiştir.

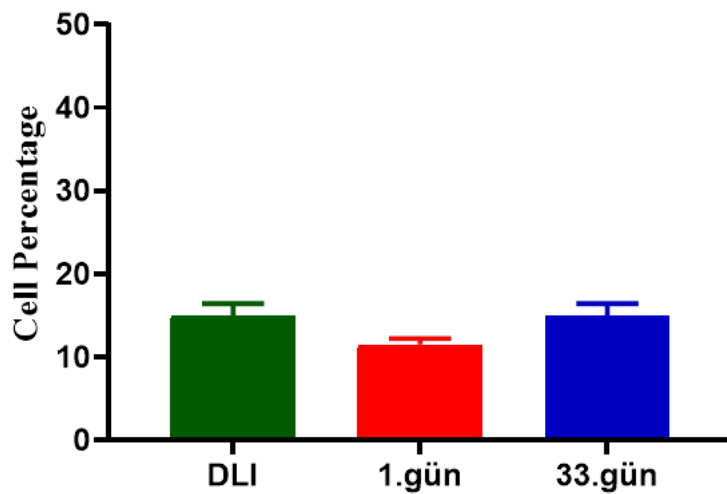
Kemoterapi Sonrası(33.gün)	Cinsiyet	Yaş	LDH	WBC	RBC	PLT
1.Hasta Birey	E	2	318	1,38	2,66	331
2.Hasta Birey	E	15	193	0,52	2,82	41
3.Hasta Birey	K	0	501	9,86	3,25	276
4.Hasta Birey	K	2	572	129,13	2,54	225
5.Hasta Birey	K	2	406	11,36	3,35	370
6.Hasta Birey	E	13	339	14,11	2,92	368
7.Hasta Birey	K	1	315	10,19	3,72	99
8.Hasta Birey	E	6	321	1,11	3,39	200
9.Hasta Birey	K	6	288	1,23	3,38	162
10.Hasta Birey	E	8	264	2,98	3,23	76

Kemoterapi sonrası düşüş gösteren değerlerden biri LDH (laktat dehidrogenaz) enzimidir. Vücudun doku, hücre ve organlarında bulunan LDH enzimi kandaki şekeri enerjiye dönüşmesi için hücreler tarafından kullanılmaktadır. Hasta bireylerin kemoterapiye karşı verdiği tepkiyi anlamak için LDH seviyelerine bakılmaktadır. Kemoterapi sonrası beyaz küre hücrelerinde azalma, eritrositlerde artış görülmektedir. Trombositlerin yüksekliği ise enfeksiyona karşı savunmada tanı anına göre daha dirençli olduklarını göstermektedir (Tablo 4 ve Tablo 5).

Tanı anı ve kemoterapi sonrası periferik kan örneği ile yapılan testler sonucunda trombosit seviyeleri her hasta için karşılaştırılmış 15.yaş (2.HB) hasta bireyde tanı anı ve kemoterapi sonrası trombosit değerleri birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Tanı anı ve kemoterapi sonrası hastaların periferik kanlarında enfeksiyonla savaşmada etkili olan PLT değerleri kemoterapi sonrası yükseldiği gözlemlenmektedir.

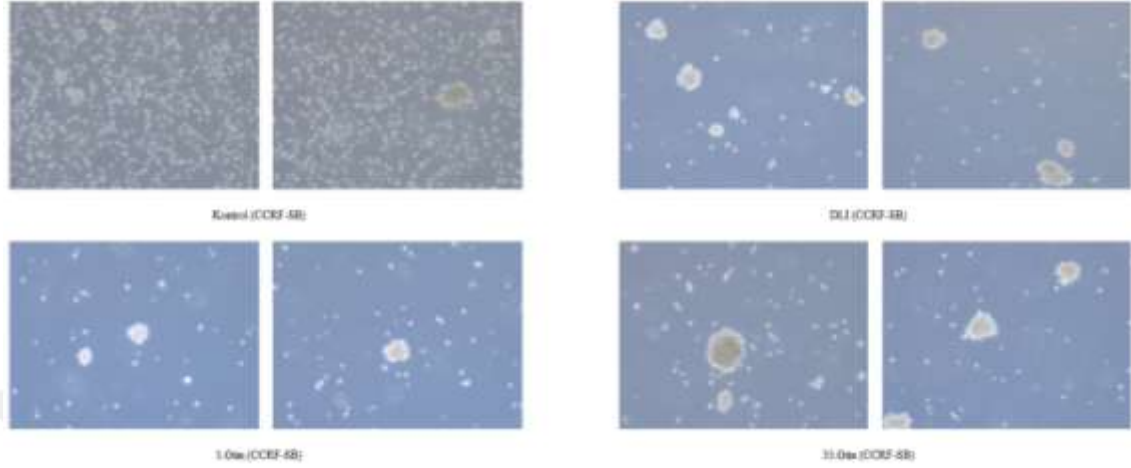
4.2. Gamma Delta T ($\gamma\delta$ T) Hücrelerin Elde Edilmesi;

Deney gruplarını oluşturacak $\gamma\delta$ T hücreleri; DLI, B-ALL tanısının konulduğu ilk gün ve kemoterapi tedavisinin 33. günü olarak belirlenmiştir. Muayene sonrasında B hücre yüzdesi yüksek olan hasta bireylerin periferik kanlar kullanılmıştır. Periferik kandan izole edilen mononükleer hücreler yeterli hasta birey sayısına ulaşana kadar azot tankında bekletildi. DLI ve yeterli hasta birey sayısı oluştuğunda periferik kandan elde edilen mononükleer hücreler deneylerde kullanmak için bir havuzda toplandı. Oluşturulan mononükleer hücrelerin bulunduğu havuzdan $\gamma\delta$ T hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirildi. DLI (Donor lenfosit İnfüzyonu) mononükleer hücrelerinin izolasyonundan 6×10^5 $\gamma\delta$ T hücresi elde edilmiştir. B-ALL tanısı almış kanser hastası çocuklardan alınan ve izole edilen 1. gün mononükleer hücrelerin izolasyonundan $1,5 \times 10^5$ $\gamma\delta$ T hücresi izole edilmiştir. Kemoterapi tedavisine başlanmış tanı günü örnekleri alınan hastalardan 33. gün periferik kanlarından elde edilen mononükleer hücrelerinden 1×10^6 Gamma Delta T hücresi izole edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. DLI (%15,5), 1.gün (%12,5) ve 33.gün (%15) gruplarından elde edilen gamma delta T hücre yüzde gösterimine ait grafik.

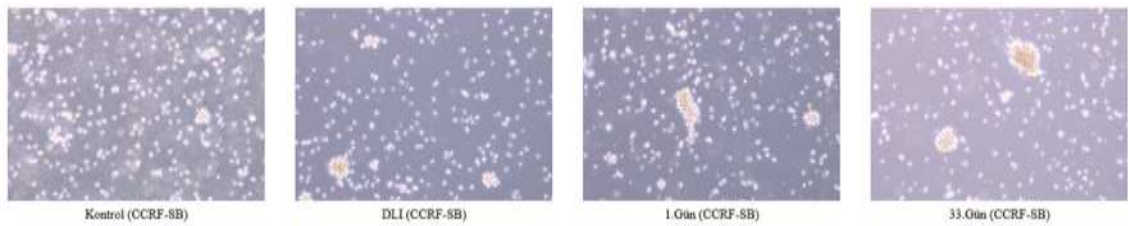
Bu deney grupları için elde edilen hücreler CCRF-SB kanser hücre hattı ile kültürlenmeden önce kültür ortamında bekletilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Periferik kandan izolasyonu yapılmış $\gamma\delta$ T hücrelerinin kültür ortamı görselleridir.

4.3. Gamma Delta T ($\gamma\delta$ T) Hücrelerinin CCRF-SB Kanser Hücre Hattı ile Kültüre Edilmesi;

DLI, 1. gün ve 33. gün $\gamma\delta$ T hücreleri kültür işleminin ardından %70 konfluansiye ulaştığında CCRF-SB kanser hücre hattı üç gruba ayrılarak 1:2 oranında (5×10^5 CCRF-SB hücresi için 1×10^6 $\gamma\delta$ T hücresi) her grup için $\gamma\delta$ T hücre uygulaması yapılmıştır. Uygulama 24 saat olarak belirlenip 37°C de %5 CO_2 inkübe edilmiştir.



Şekil 6. Bu görsel $\gamma\delta$ T uygulaması sonrası CCRF-SB ($\gamma\delta$ T uygulanmamış/kontrol), DLI, 1.gün ve 33.gün) kültür ortamı görselidir.

4.4. Senesens testi bulguları;

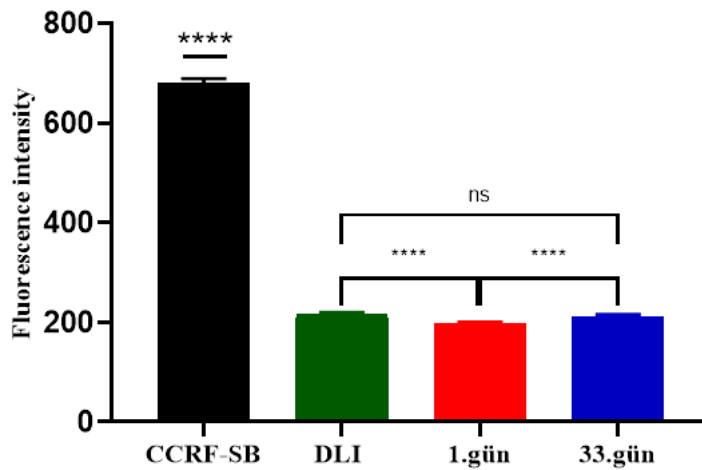
CCRF-SB hücrelerine DLI, 1. Gün ve 33. Gün $\gamma\delta$ T hücreleri 24 saat uygulanmıştır. Uygulama sonrası CCRF-SB kanser hücre hattının davranışını net görebilmek için 48 saat sonra hücrelere senesens testi yapılmıştır. CCRF-SB kanser hattı süspansiyon kültür ortamında çoğalan ve büyüyen bir hücre grubu olduğu için kalsik beta-

galaktozidaz boyama yapmak mümkün değildir. Floresan Beta-Galaktozidaz deneyi yapıldı. Deney gruplarının hücre lizatlarından beta- galaktozidaz aktivitesi floresan bu deneyle ölçüldü.

ALL hastalığı nedeniyle immün sistemi baskılanmış hastalardan elde edilen $\gamma\delta$ T hücre uygulanmış CCRF-SB kanser hücre hattı ve immün sistem $\gamma\delta$ T hücre uygulanmamış CCRF-SB kanser hücre hattına ait floresan aktivite (4-MUG floresan beta-galaktozidaz) değerleri karşılaştırıldığında önemli ölçüde istatistiksel olarak anlamlılık görülmüştür (Şekil 7). Fakat normal (Kanser olmayan hücre hattı) bir hücre hattı için bu değerler oldukça düşüktür ve normal bir hücre hattı daha yüksek floresan aktivite gösterebilmektedir. Tablo 6 da deney gruplarının ve kontrol gruplarının üç kez okutularak elde edilen değerler gösterilmektedir.

Tablo 6. $\gamma\delta$ T hücre uygulanmış grupların ve uygulanmamış CCRF-SB (Kontrol) hücre hattında 4-MUG floresan beta-galaktozidaz deneyi ile ölçülen senesens değerlerine ait tablodur.

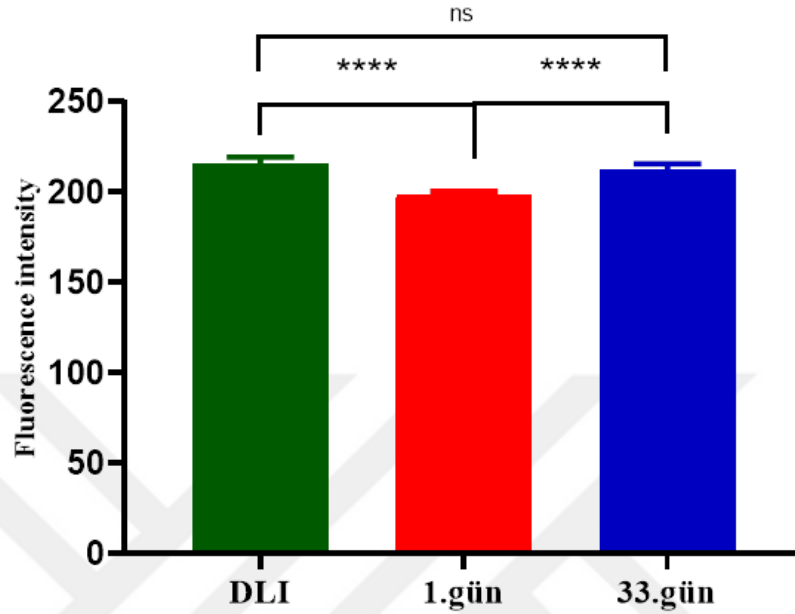
Kontrol	DLI	1.Gün	33.Gün
672,16	211,75	196,5	209,11
688,34	219,24	200,18	215,48
680,25	215,49	198,34	212,30



Şekil 7. Grafik, floresan aktivite (4-MUG Floresan beta-galaktozidaz) sonucu DLI, 1.gün ve 33.gün grupları ile CCRF-SB gruplarının senesensini göstermektedir.

(0.01<=P<0.05: İstatistiksel anlamlılık (*). 0.001<=p<0.01: Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**). P<0.001: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (***, ****). P>0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

1.gün gamma delta T hücreleri uygulanmış gruba göre, DLI ve 33.gün gamma delta T hücreleri uygulanan gruplar istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 8).



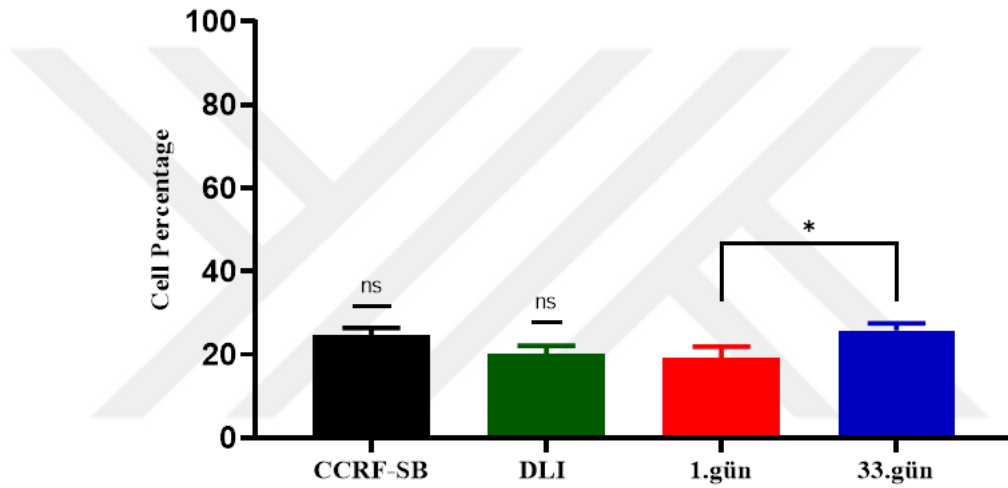
Şekil 8. DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarının floresan aktivite (4-MUG Floresan beta-galaktozidaz) sonucunun karşılaştırılması olarak senesensini göstermektedir.

4.5 Apoptoz testi bulguları;

Apoptoz testi için kültüre edilen $\gamma\delta$ T hücre gruplarından CD19+ CCRF-SB ler seçilip 48 saatlik inkübasyon sonrası Apoptoz testi uygulamaları için hazırlanmıştır. Annexin V ile boyanan hücreler MUSE Cell Analyzer™ cihazında ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Total apoptotik oranını Geç ve Erken apoptozda bulunan hücreler oluşturmaktadır. Kemoterapi sonrası 33. günde elde edilen $\gamma\delta$ T hücreleri kontrol ve DLI gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. 33. gün grubu, tanı anında alınan periferik kandan izole edilen $\gamma\delta$ T hücre grubu CCRF-SB hücrelerinin apoptoza yönelimi istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 9 ve Şekil 10). Tablo 7 ve Tablo 8 de gösterilen yüzde değerleri deney grupları ve kontrol grubunun MUSE Cell Analyzer™ cihazında üç kez okutularak elde edilmiştir.

Tablo 7. Apoptoz testi ile boyanan $\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış CCRF-SB hücrelerinin Annexin-V boyama sonrası (Üç tekrarlı olarak okutulmuş) Total apoptoz yüzde değerlerini göstermektedir.

Kontrol	DLI	1.Gün	33.Gün
%22,69	%17,79	%16,55	%24,01
%26,39	%22,14	%21,87	%27,44
%24,54	%19,97	%19,21	%25,73

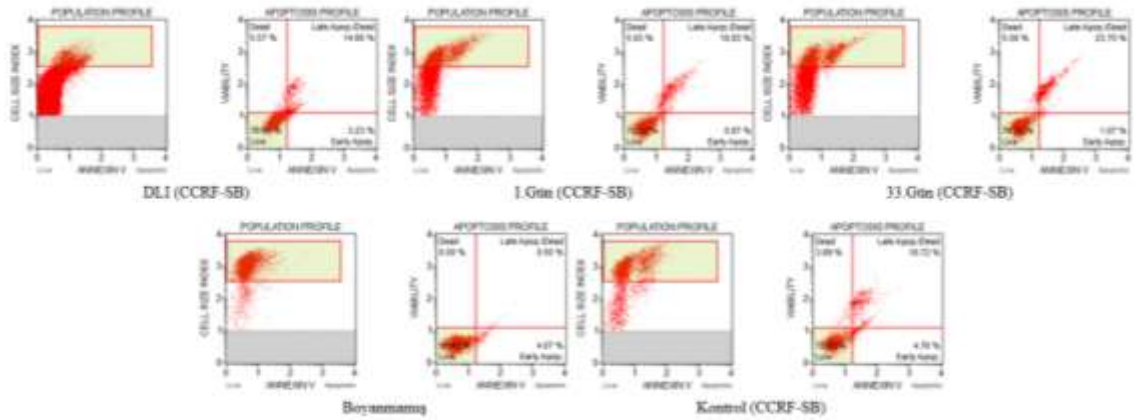


Şekil 9. Bu görsel $\gamma\delta$ T uygulaması sonrası CCRF-SB ($\gamma\delta$ T uygulanmamış/kontrol), DLI, 1.gün ve 33.gün total apoptotik hücre yüzdelere göstermektedir.

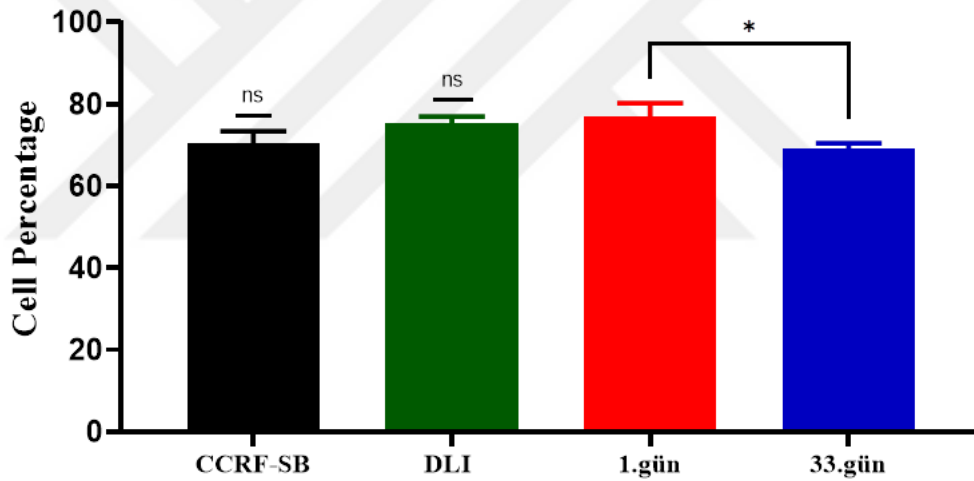
(0.01<=P<0.05: İstatistiksel anlamlılık (*). 0.001<=p<0.01: Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**). P<0.001: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (***, ****). P>0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır).

Tablo 8. Annexin V ile boyanan ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB hücrelerinin, Late/Early apoptotic ve Dead hücreler dışında kalan canlı hücrelerin yüzde değerlerini göstermektedir.

Kontrol	DLI	1.Gün	33.Gün
%67,66	%73,44	%73,47	%67,58
%73,38	%76,94	%80,25	%70,44
%70,52	%75,19	%76,86	%69,01



Şekil 10. MUSE Cell Analyzer cihazından alınmış Annexin-v boyama sonrası ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün total apoptotic ve canlı hücre yüzdeleri gösteren Dot Plot/Scatter Plot görselleridir.



Şekil 11. Total apoptotic ve ölü hücreler çıkarıldıktan sonra elde edilmiş ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün hücrelerine ait canlı hücrelerin yüzdeleri gösteren grafikdir.

(0.01<=P<0.05: İstatistiksel anlamlılık (*). 0.001<=p<0.01: Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**). P<0.001: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (***, ****). P>0.10: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)

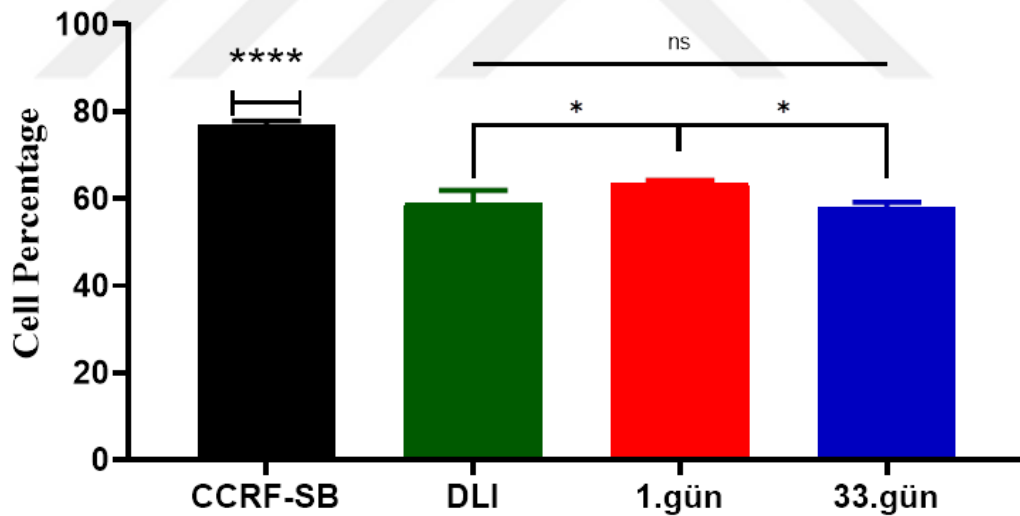
4.6. Hücre Proliferasyon Testi Bulguları;

Deney grubu ve kontrol grubunu apoptoz testi canlılığı dışında KI-67 antikoru ile G1, S ve G2 fazlarında boyanan tümör hücrelerinin popülasyon içerisinde genel proliferasyonu test edilmiştir. DLI, 1. gün ve 33. gün Gamma Delta T hücreleri uygulanmış CCRF-SB kanser hücre hattında istatistiksel anlamlı olarak proliferasyonu etkilediği

görülmüştür. DLI ve 33.gün gruplarında 1.gün grubuna göre daha az proliferasyon olmuş ve istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 12 ve Şekil 13). Tablo 9 deney grupları ve kontrol gruplarına ait MUSE Cell Analyzer™ cihazında üç kez okutularak elde edilen değerleri göstermektedir.

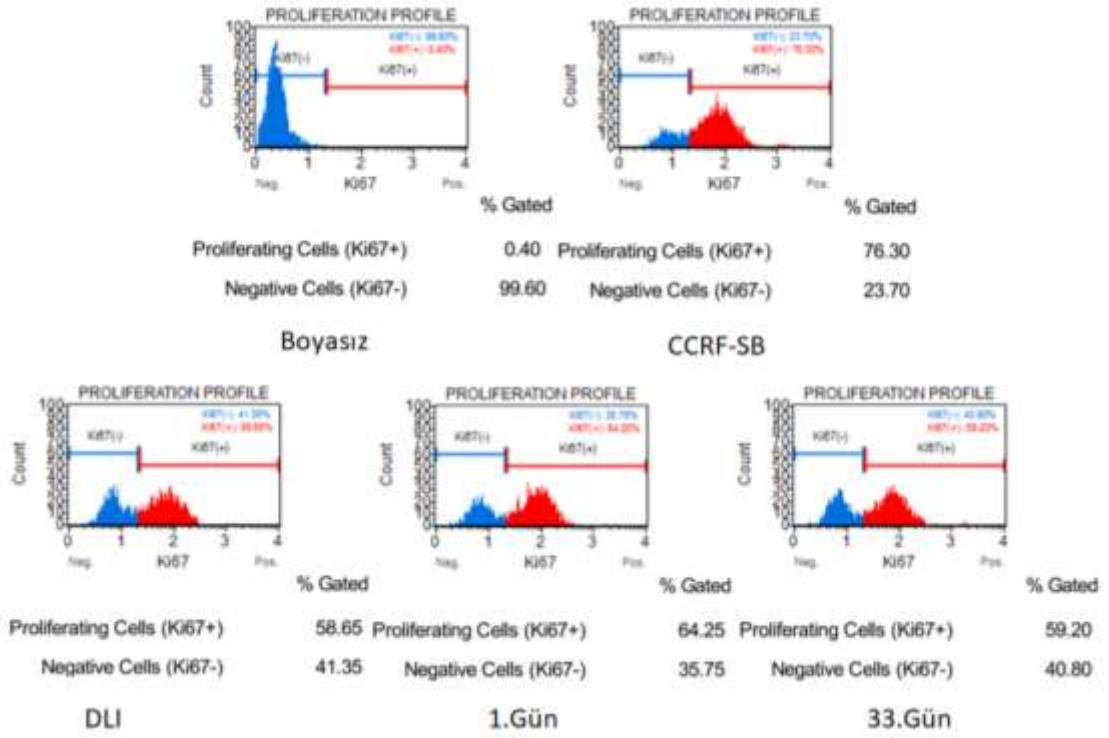
Tablo 9. Kİ-67 boyama ile hücre proliferasyonu değerlerini gösteren DLI, 1. gün ve 33. gün uygulaması yapılmış CCRF-SB ve Kontrol grubunun değerlerine ait tablodur.

Kontrol	DLI	1.Gün	33.Gün
%95,4	%87,86	%88,31	%87,37
%96,7	%89,25	%89,47	%88,52
%96,05	%88,55	%88,89	%87,95



Şekil 12. Hücre proliferasyonu için Kİ67 antikoruna boyanmış ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarına ait pozitif proliferasyon gösteren hücrelerin yüzdesini göstermektedir.

($0.01 \leq P < 0.05$: İstatistiksel anlamlılık (*). $0.001 \leq p < 0.01$: Yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (**). $P < 0.001$: Çok yüksek düzey istatistiksel anlamlılık (***, ****). $P > 0.10$: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.)



Şekil 13. Muse cell analiz cihazından hücre proliferasyonu testi ile elde edilmiş ($\gamma\delta$ T uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) CCRF-SB, DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarına ait yüzde olarak gösterilmiş Volcano Plot grafiğidir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, hücrelerin anormal olarak büyümesi ve çoğalması ile oluşur. Kanserleşme sürecinde normal hücrelerin hücre döngüsünde bulunan kontrol noktalarının ortadan kalkması ile hücre kusurlu ve devamlı olarak çoğalmayı sürdürmektedir. Organizma içerisinde her dakika vücut hücreleri kanserleşme ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu durum bölünme sırasında hücrenin genetik materyali olan DNA'nın kendini eşlemesinde oluşabilecek hataları, DNA tamir mekanizmaları ile hücre döngüsü esnasında denetlenmektedir. Hasarlı hücrenin bölünmeye devam etmesini engelleyen kontrol noktalarında oluşabilecek bir mutasyon neoplastik bir süreci meydana getirmektedir (Konyalıoğlu ve Karamenderes, 2005). Birden fazla sebebin etkilediği neoplastik süreç kan hücrelerini etkilediğinde kanserin başka bir türü olan lösemi ortaya çıkabilmektedir. Bilim insanları geçmişten bugüne kadar kanser hücrelerinin yayılımını ve başka bir doku hücresinde kanserleşmeye devam ettiğini göstermiştir. Vücut içerisinde sürekli dolaşımında bulunan kan ve kan hücreleri bu yayılımı kolayca özetlemektedir.

Çocukluk çağında karşılaşılan akut lenfoblastik lösemi (ALL) kanser çeşitleri arasında sık rastlanılan ve vücudun immün sistemi ile ilişkili bir kanserdir. ALL 0-5 yaş aralığındaki çocukları adaptif immün sistem elemanı B lenfositler üzerinden etkilemektedir. Kanser hücreleri genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak gelişebilmekte ve insan vücudu gün içerisinde çok fazla kanserleşmiş hücreye sahip olmaktadır. Kanserleşmiş hücrelerin karşılaştığı immün sistemde ilk olarak doğal immün ve ardından adaptif immün sistem elemanları kanserleşmiş hücrelere müdahale etmektedir (Uzunhan ve Karakaş, 2012; Gaynon ve ark., 1997).

Çocukluk döneminde immün sistem daha zayıf olmasından kaynaklı olarak çocukların immün sistemi baskılanabilmekte ve daha kolay hasta olabilmektedirler (Wei ve ark., 2017). Bu durum lösemiler için rahat bir zemin hazırlayabilir. Lösemiler, farklı kan

hücrelerine dönüşebilen öncü hücrelerde iken kontrolden çıkmaktadır. Kemik iliğinde iken başlayan lösemi kanı hızlı bir şekilde istila eder ve diğer dokulara (karaciğer, dalak, beyin, omurilik ve testis) yayılır. Bu durum tedavi edilmez ise ölümcül sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Tedavi seçeneklerinden bir kısmı kemoterapi ve immünoterapiyi içermektedir. Sonuçlarımızda 33.gün grubundan elde ettiğimiz Gamma Delta T hücreleri 1.gün grubuna göre total apoptotik hücreler açısından anlamlı görülmüştür. Çalışmamızdaki apoptoz sonucu göz önüne alındığında gamma delta T hücre tedavilerinin hasta için kemoterapi tedavisine ek olarak yardımcı olabileceğini gösteren bir çalışmada gamma delta T hücre alt grubu Vg9Vd2 T hücreleri spesifik olarak akciğerlere, dalağa ve karaciğere bazı hastalarda farklı metastatik tümör alanlarına yönlendirilmiştir. Yönlendirme sonucunda doz sınırlayıcı toksisite gözlenmemiş, ancak çoğu hasta bu çalışmanın uygulandığı terapilerde prognozda iyi yönde ilerleme kaydetmiştir. Buna ek olarak, yan etkisi görülmeyen tedavide farklı olarak Vg9Vd2 T hücrelerini uygulamasında üç hastada, farklı ve ilave yan etki olduğu gözlemlenmiştir (Nicol ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında deney tasarımında bulunan gruplar arasında sağlıklı (DLI) bireyler ve lösemi hastası bireyler bulunmaktadır. B hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre hattı CCRF-SB ile birlikte kültüre edilmesi için immün sistemin doğal ve adaptif sistem hücrelerinden gamma delta T hücreleri seçilmiştir. Gamma delta T hücreleri Dönor lenfosit infüzyonu içeriğinde bulunan hücre gruplarından. DLI, kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda kullanılır ve farklarından biri lenfositlerin kullanılmasıdır. DLI, kemik iliği vericilerinden alınan kan örneklerinden elde edilmektedir. Buna ek olarak DLI verilen hasta bireylerde immün sistemin reaksiyonunun indüklenmesi söz konusudur (Gökmen, 2018).

Hasta ilk bulgularla hastaneye başvuru yaptıktan sonra kan sayımı, flow sitometri ve kemik iliği örneğinden periferik yayma bakılarak lösemi tanısı ve çeşidi belirlenmektedir. Belirleme işleminin ardından hastaya kemoterapi ilaçları ile tedavi uygulanarak günlük gözlemleri yapılmaktadır. Kemoterapiye yanıt vermeyen hastalar ve aynı zaman immün sistemi kemoterapi ile baskılanan hastalar için genetik olarak uyan kişilerden kök hücre ve kemik iliği nakli gerçekleştirilmektedir (Gale ve Champlin, 1984). Kemoterapi tedavisi bitiminden itibaren yaklaşık 6 ay sonra immün sistem hücreleri hastanın immün sisteminde tekrardan fonksiyonel olarak görev

yaparlar. Fonksiyonel olarak görevleri başladıktan sonra hastalar için aşı uygulaması başlayabilir (Alanko ve ark., 1995).

Tanı anı alınan periferik kan örnekleri tıbbi sonuç raporları doğrultusunda CD19 antijeni yüksekliği, beyaz kan hücreleri yüksek, eritrositleri anlamlı görülmemiş ve trombosit değerleri ise tanı anında düşük olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak kanser hücrelerinde değerleri önemli olan laktat dehidrogenaz seviyeleri ise hasta grubu göz önüne alındığında yüksek olduğu görülmüştür. Kemoterapide uygulanan protokole ait ilaçların bazıları vincristin, daunorubicin, prednol ve methotrax gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Kemoterapi sonrası hasta bireylerin düşük olan değerlerinde yükselme ve referans aralığına yakın seviyeler görülmektedir. Buna ek olarak düşük değerlerin ise referans aralığına yakın seviyelere geldiği görülmüştür. Bu durumlar göz önüne alındığında da 2.hasta bireyde gözlemlenen trombosit seviyesi kemoterapi sonrası değerleri ile yakın olarak görülmüştür. Genel olarak üç ana neden bulunmaktadır; kemik iliğinde trombosit yeterince üretilmemesi, kan dolaşımı sırasında trombositlerin seviyesinin düşmesi, karaciğer ve dalakta trombositlerin yok ediliyor olması olarak gösterilebilir.

In vitro deneylerin sonuçları; apoptoz testi, birlikte kültüre edilen Gamma delta T hücreleri ve CCRF-SB hücreleri ayrılıp CCRF-SB hücrelerine Annexin-V boyama yapılmıştır. Annexin-V ile hücrelerin membranında olan değişiklikler apoptotik cisimciklerin oluşumu MUSE Cell analiz cihazında boya yardımıyla ölçülmüştür. 33. gün periferik kanı alınmış hasta bireylerden elde edilen gamma delta T hücreleri CCRF-SB ve DLI gruplarına göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. 1.gün tanı anında periferik kanı alınmış hastalardan alınan gamma delta T hücrelerine göre (33. güne kadar kemoterapi ilaçlarını kullanmıştır) 33.gün grubu total apoptoz açısından %5 farklılık gözlemlendi ve 33. Gün grubu apoptoza yakınlık gösterdiğini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada genel popülasyon gamma delta T hücrelerinin Zoledronik Asit ile uyarılmasının güçlü anti-tümör aktivitesini göstermektedir. Osteosarkom hücre hattına gamma delta T hücrelerine karşı artan immüno duyarlılığını göstermektedir (Muraro ve ark., 2007). Bu çalışmadan farklı olarak bizim sonuçlarımızda kemoterapi öncesi ve sonrası gamma delta T hücre popülasyonu özellikle kemoterapi almış bireylerden alınan hücrelerin anti-tümör aktivitesinin diğer gruplara göre biraz daha fazla olduğu görülmüştür.

Gamma delta T hücresi uygulanmamış kontrol grubunun hücre proliferasyonu DLI, 1.gün ve 33.gün gruplarına göre daha yüksektir. Bu durum gamma delta T hücrelerinin kanser hücresi üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir. Gamma delta T hücre uygulanmış gruplar içerisinde DLI ve 33.gün grupları 1.gün grubuna göre daha fazla sitotoksiktir. Gamma delta T hücreleri kanser hücrelerine karşı güçlü sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Kolon kanserinde yapılan bir çalışmada periferik kandan izole edilmiş Vd1 gamma delta T (Vd1 T) hücrelerinin Vg9Vd2 gamma delta T (Vd2 T) hücrelerine göre daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2015). Proliferasyon testi sonuçları bu çalışmada ki sitotoksik etkiye benzer sitotoksik bir etki göstermektedir.

Senesens testi sonuçlarında tanı anı grubuna göre DLI ve 33.gün gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Yaşlanma stabil bir hücre döngüsü durdurma mekanizması olarak düşünülebilir (Prieto ve Baker, 2019). Bu kanser hücre hattının immün sistem hücrelerinden gamma delta T hücre uygulamasından sonra normal bir hücre (Kanser olmayan hücre hattı) için daha düşük floresan beta-galaktosidaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Buna bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı görülen DLI ve 33.gün grubunun senesense hücreleri yönlendirdiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; kemoterapi almış bireylerden alınan gamma delta T hücreleri DLI gibi kullanılarak kemoterapi tedavisi ile birlikte ek uygulanabilirliği *in vitro* olarak biyolojik mekanizmaları içeren testlerle gösterilmiştir. Buna ek olarak $\gamma\delta$ T hücre immünoterapisi birlikte Zoledronik asit tedavisinin, HCC (hepatocellular carcinoma cell (HepG2, HLE, HLF, HuH-1, JHH5, JHH7, and Li-7)) tedavisi için uygulanabilir ve etkili bir yaklaşım sağlayabileceği önerisini desteklemektedir. Bizim sonuçlarımızı destekleyen bu çalışma kemoterapi sonrası hastanın gamma delta T hücrelerinin alınıp tedaviye ek olarak hastaya tekrar verilerek hastanın prognozunu destekleyebileceği ve yardımcı olabileceği düşünülmektedir. (Sugai ve ark., 2016).

KAYNAKÇA

- Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, and Jordan S. Pober. *Cellular and Molecular Immunology: Slide Set*. WB Saunders, 1999.
- Alanko, Soile, Toivo T. Salmi, and Tarja-Terttu Pelliniemi. "Recovery of natural killer cells after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia and solid tumors." *Medical and pediatric oncology* 24.6 (1995): 373-378.
- ALL IC-BFM 2009 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia Final Version of Therapy Protocol from August-14-2009 page 15
- Altincicek B, et al. "Cutting edge: human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis." *The Journal of Immunology* 166.6 (2001): 3655-3658.
- Arceci RJ, Hann IM, Smith OP. *Pediatric Hematology* 3th ed Malden, Massachusetts Blackwell, 2006;450:81.
- Aslan G. Tümör İmmünolojisi Tumour Immunology. *Turk J Immunol*, 2010;15: 1
- Ateş U. Kök hücreyi tanıyalım. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*, 2016;1.1: 19-28.
- Barbaros MB, Dikmen M. Kanser immünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 2015, 31.4: 177-182.
- Bassan, Renato, et al. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2004, 50.3: 223-261.
- Boyle, Peter, et al. *World cancer report 2008*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2008.
- Cao, Huimin; Oteiza, Ana; Nilsson, Susan K. Understanding the role of the microenvironment during definitive hemopoietic development. *Experimental hematology*, 2013, 41.9: 761-768.
- Casetti, Rita; Martino, Angelo. The plasticity of $\gamma\delta$ T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cellular & molecular immunology*, 2008, 5.3: 161.

- Cerwenka, Adelheid, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity*, 2000, 12.6: 721-727.
- Conter, V., et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Orphanet encyclopedia*, 2004, 14: 1-13.
- Cosman, David, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2001, 14.2: 123-133.
- Couto, E.; Chen, B.; Hemminki, Kari. Association of childhood acute lymphoblastic leukaemia with cancers in family members. *British journal of cancer*, 2005, 93.11: 1307-1309.
- Co-Reyes, Erica, et al. Malnutrition and obesity in pediatric oncology patients: causes, consequences, and interventions. *Pediatric blood & cancer*, 2012, 59.7: 1160-1167.
- Çiçek, Cem. Antrasiklin Kemoterapisi Alan Çocuklarda Kardiyotoksisite Değerlendirilmesi, Karnitin ve Oksidan Sistemin Rolünün Araştırılması. 2015. PhD Thesis. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Das, Hiranmoy, et al. V γ 2V δ 2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood*, 2001, 98.5: 1616-1618.
- Davis, Mark M., et al. Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptors. *Annual review of immunology*, 1998, 16.1: 523-544.
- Debacq-Chainiaux, Florence, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 2009, 4.12: 1798.
- Dimri, Goberdhan P., et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92.20: 9363-9367.
- Dunford, James E., et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 296.2: 235-242.

- Dunn, Gavin P.; Old, Lloyd J.; Schreiber, Robert D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004, 21.2: 137-148.
- Durand, Charles; Dzierzak, Elaine. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 2005, 90.1: 100-108.
- Freshney, R.I., 2010. Culture of Animal Cells Sixth Edition. Wiley-Blackwell, New Jersey, 796 pp.
- Fundamental Techniques In Cell Culture Labrotory Handbook 3rd edition. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-edition.pdf> (24.05.2018),2016.
- Gale, RobertPeter; Champlin, Richard E. How does bone-marrow transplantation cure Leukaemia?. *The Lancet*, 1984, 324.8393: 28-30.
- Gaynon, Paul S., et al. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 1997, 80.9: 1717-1726.
- Gökmen, Ayla. Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu Sonrası Tam Düzelmeyen veya Nüks Eden Hastalıkların Tedavisi. *Turkiye Klinikleri Hematology-Special Topics*, 2018, 11.1: 48-59.
- Gutierrez A, Silverman LM. Acute lymphoblastic leukemia. Fisher DE, Ginsburg D, Look TA, Lux SE, Nathan DG, Orkin SH. ed. Hematology and oncology of infancy and childhood. Philadelphia: WB Saunders. 2015.
- Harris, Timothy J.; Drake, Charles G. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2013, 1.1: 12.
- Hastings, Caroline ve ark. Artan indüksiyon sonrası şiddetlenme, T hücresi akut lenfoblastik lösemisi olan fakat B hücresi hastalığından değil, belirgin bir şekilde artmış beyaz kan hücresi sayısına ($\geq 200 \times 10^9 / l$) sahip çocuklarda ve ergenlerde sonucu iyileştirir: C hücrelerinin O nkoloji G roup'undan bir rapor. *İngiliz hematoloji dergisi* , 2015, 168.4: 533-546.
- Hayday, Adrian C. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology*, 2000, 18.1: 975-1026.

- Hedges, Jodi F., et al. Differential mRNA expression in circulating $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets defines unique tissue- specific functions. *Journal of leukocyte biology*, 2003, 73.2: 306-314.
- Howell, Debra A., et al. Risk factors and time to symptomatic presentation in leukaemia, lymphoma and myeloma. *British journal of cancer*, 2015, 113.7: 1114
- Inaba, Hiroto; Greaves, Mel; Mullighan, Charles G. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 2013, 381.9881: 1943-1955.
- Jaffe, Elaine S. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, 2001.
- Kabelitz, Dieter, et al. Potential of human $\gamma\delta$ T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *International journal of cancer*, 2004, 112.5: 727-732.
- Kaushansky, Kenneth. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *New England Journal of Medicine*, 2006, 354.19: 2034-2045.
- Kim, Ryungsa; Emi, Manabu; Tanabe, Kazuaki. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007, 121.1: 1-14.
- Konyalioglu, Sibel; Karamenderes, Canan. The protective effects of Achillea L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 102.2: 221-227.
- Koopman, G., et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994, 84.5: 1415-1420.
- Kunzmann, Volker, et al. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood*, 2000, 96.2: 384-392.
- Kurz, David J., et al. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 2000, 113.20: 3613-3622.
- Lanzkowsky, Philip. Manual of pediatric hematology and oncology. Elsevier, 2005.

- Lanzkowsky, Philip; Lipton, Jeffrey M.; Fish, Jonathan D. (ed.). *Lanzkowsky's manual of pediatric hematology and oncology*. Academic Press, 2016.
- Margolin, Judith F. Acute lymphoblastic leukemia. *Principle and Practice of Pediatric Oncology*, 1997, 409-462.
- Menteşe, Ahmet, vd. Akut miyeloid lösemili hastalarda karbonik anhidraz I ve II'ye karşı otoantikolar. *Türk Hematoloji Dergisi*, 2017, 34.4: 307.
- Miyagawa, Fumi, et al. Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonate antigen. *The Journal of Immunology*, 2001, 166.9: 5508-5514.
- Muraro, M., et al. Osteosarcoma cell line growth inhibition by zoledronate-stimulated effector cells. *Cellular immunology*, 2007, 249.2: 63-72.
- Mutlu, Neval. BFM-2000 protokolü almış akut lenfoblastik lösemili çocuklarda miyeloid işaretli pozitifliğinin prognostik değeri ve diğer prognostik faktörler ile ilişkisi, 2005, Uzmanlık Tezi.
- Nicol, A. J., et al. Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *British journal of cancer*, 2011, 105.6: 778.
- Orkin, Stuart H.; Zon, Leonard I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008, 132.4: 631-644.
- Özbek, Mehmet. T Lenfositlerin Gelişimi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2014, 2.2: 104-113.
- Özdemir, Tuba. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili hastaların ve sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin lösemik blastlar üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. 2015. PhD Thesis. Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Özet, G., et al. *Klin. Tıp Bilimleri*, 1996, 16.5: 329-332.
- Patiroğlu, Türkan; Özcan, Alper. Yenidoğan Döneminde Hematopoez Ve Yenidoğanda Tam Kan Sayımı. *Türk Pediatri Hematoloji Dergisi*, 2016, 1: 483.

- Pieters, Rob, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *The Lancet*, 2007, 370.9583: 240-250.
- Pietschmann, K., et al. Toll-like receptor expression and function in subsets of human $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*, 2009, 70.3: 245-255.
- Pittenger, Mark F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. In: *Mesenchymal Stem Cells*. Humana Press, 2008. p. 27-44.
- Prieto, Luis I.; Baker, Darren J. Cellular Senescence and the Immune System in Cancer. *Gerontology*, 2019, 1-8.
- Pui, Ching-Hon; Robison, Leslie L.; Look, A. Thomas. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 2008, 371.9617: 1030-1043.
- Rando, Thomas A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, 2006, 441.7097: 1080.
- Salimi, Nima, et al. Design and utilization of epitope-based databases and predictive tools. *Immunogenetics*, 2010, 62.4: 185-196.
- Santori, Fabio R. The immune system as a self-centered network of lymphocytes. *Immunology letters*, 2015, 166.2: 109-116.
- Schnurr, Max, et al. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and $\gamma\delta$ T cells. *Cancer research*, 2002, 62.8: 2347-2352.
- Sicard, H el ene, et al. Synthetic Phosphoantigens Enhance Human V γ 9V δ 2 T Lymphocytes Killing of Non-Hodgkin's B Lymphoma. *Molecular Medicine*, 2001, 7.10: 711.
- Sireci, Guido, et al. Differential activation of human γ δ cells by nonpeptide phosphoantigens. *European journal of immunology*, 2001, 31.5: 1628-1635.
- Songu, Murat; Katılmış, H useyin. Enfeksiyondan korunma ve imm un sistem. *Journal of Medical Updates*, 2012, 2.1: 31-42.
- Sugai, Shiori, et al. Hepatocellular carcinoma cell sensitivity to V γ 9V δ 2 T lymphocyte-mediated killing is increased by zoledronate. *International journal of oncology*, 2016, 48.5: 1794-1804.

- Uzunhan, Tuğçe Aksu; Karakaş, Zeynep. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Çocuk Dergisi*, 2012, 12.1: 6-15.
- Waldmann T., Immunotherapy: Past, Present and Future, *Nature Medicine*, 9(3), 269-277, 2003.
- Wayteck, Laura, et al. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer letters*, 2014, 352.1: 113-125.
- Wei, Guoqing, et al. Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 2017, 10.1: 150.
- Wetzler, Meir, et al. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience. *Blood*, 1999, 93.11: 3983-3993.
- Wiemels, Joseph. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-biological interactions*, 2012, 196.3: 59-67.
- Wilhelm, Martin, et al. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*, 2003, 102.1: 200-206.
- Wu, Dang, et al. Ex vivo expanded human circulating V δ 1 $\gamma\delta$ T cells exhibit favorable therapeutic potential for colon cancer. *Oncoimmunology*, 2015, 4.3: e992749.
- Yeşilipek, M. Akif. Türk Pediatrik Onkoloji (TPOG) Türk Pediatrik Hematoloji Derneği (TPHD) Pediatrik Tümör Kayıtları Lösemi verileri 2002-2012. URL:http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Ftphd.org.tr%2Ffiles%2F11_07_2013%2FLosemi_Verileri_2002_2012%2523Mehmet_Akif_YESI_LIPEK.pdf&date=2017-0525. Son Erişim Tarihi:25.05.2017.
- Zhang, L., et al. Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood reviews*, 2015, 29.2: 101-125.
- Zhang, Zengdi, et al. Bone marrow adipose tissue-derived stem cell factor mediates metabolic regulation of hematopoiesis. *Haematologica*, 2019, haematol. 2018.205856.
- Zhou, Juhua. Advances and prospects in cancer immunotherapy. *New Journal of Science*, 2014, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yeter Tuğçe TOKBAY

Doğum Tarihi ve Yeri: 21.10.1991 - HATAY

Uyruğu: T.C.

Telefon: 05301301849

e-posta: tugcetkby@gmail.com

Yazışma Adresi: Bahçelievler mah. Ceyhan sok. Neva Konak 5/10 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Bölüm/Program	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen Bilimleri	Fatih Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Hemşirelik	Ege Üniversitesi	2015
Y. Lisans	ERÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Bölümü	Erciyes Üniversitesi	Tez Aşamasında

İŞ DENEYİMİ:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Hemşire	Özel İskenderun Gelişim Hastanesi (Pediatri Yoğun Bakım)	2015-2016
Hemşire	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi (Pediatri Hematoloji-Onkoloji Servisi)	2016-Halen

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili hastaların Gamma Delta T hücre düzeyleri ve klinik özellikler arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı MELİKGAZI KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 85		
	E-POSTA	sukriye@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Musa KARAKÜÇÜ		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji-Onkoloji		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Çocuk Hastanesi Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalı , Kayseri		
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ 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 biyoloji tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>		
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans 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 Başkanı
 Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
 İmza:



Funda HANCI

Etiler

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

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARIN GAMMA DELTA T HÜCRE DÜZEYLERİ VE KLİNİK ÖZELLİKLER ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%3	%3	%1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	%1
2	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	www.orpha.net İnternet Kaynağı	<%1
4	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1
5	www.celikors.com İnternet Kaynağı	<%1
6	www.ctf.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	tessera.spandidos-publications.com İnternet Kaynağı	<%1
8	TEKGÜNDÜZ, Emre, DEMİR, Muzaffer and	