

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**MİNİMAL RESİDÜEL HASTALIĞIN ERKEN TANISINA
YÖNELİK GELİŞTİRİLECEK BİYOÇİP İÇİN YÜZEY
KİMYASI VE HÜCRESEL ÇALIŞMALAR**

**Hazırlayan
Ahmet ÇİFÇİ**

**Danışman
Doç. Dr. Aysun ÇETİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2016
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**MİNİMAL RESİDÜEL HASTALIĞIN ERKEN TANISINA
YÖNELİK GELİŞTİRİLECEK BİYOÇİP İÇİN YÜZEY
KİMYASI VE HÜCRESEL ÇALIŞMALAR**

**Hazırlayan
Ahmet ÇİFÇİ**

**Danışman
Doç. Dr. Aysun ÇETİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından TYL-2016-6622 ve TÜBİTAK 115E020 kodlu projeler ile
desteklenmiştir.**

**Aralık 2016
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.

Adı-Soyadı: Ahmet ÇİFÇİ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Minimal Residüel Hastalığın Erken Tanısına Yönelik Geliştirilecek Biyoçip İçin Yüzey Kimyası ve Hücrel Çalışmalar” Adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Ahmet ÇİFÇİ

Danışman

Doç. Dr. Aysun ÇETİN

Tıbbi Biyokimya AD. Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Doç. Dr. Aysun ÇETİN danışmanlığında **Ahmet ÇİFÇİ** tarafından hazırlanan **“Minimal Residüel Hastalığın Erken Tanısına Yönelik Geliştirilecek Biyoçip İçin Yüzey Kimyası ve Hücrel Çalışmalar”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... /..... /2016

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Aysun ÇETİN

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

ONAY:

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

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

Prof. Dr. Aykut ÖZDARANDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca gerek akademik gerek sosyal alanda her konuda bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Aysun ÇETİN' e;

Tezimin ve proje çalışmalarımın her basamağında hem hoca hem abi olarak maddi ve manevi desteklerini gördüğüm, toplantılarımızdaki eleştirileri ve yönlendirmeleriyle beni devamlı olarak araştırmaya ve öğrenmeye teşvik eden, sadece teorik olarak değil pratik anlamda da akademinin işleyişini daha net görmemi sağlayan, tanıştığım en zeki ve en açık fikirli akademisyenlerden birisi olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Kutay İÇÖZ' e;

Tez çalışmam süresince yaptıkları katkılar ve birçok konuda sağladıkları imkanlar için Prof. Dr. Mustafa ÇETİN, Prof. Dr. Sebahattin MUHTAROĞLU, Doç. Dr. Ekrem ÜNAL ve Doç. Dr. Semih YILMAZ' a

Son olarak hayatımın her döneminde hep yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen, en kıymetlim, sevgili aileme teşekkür ederim.

Ahmet ÇİFÇİ

Kayseri, Aralık 2016

MINİMAL RESİDÜEL HASTALIĞIN ERKEN TANISINA YÖNELİK GELİŞTİRİLECEK BİYOÇİP İÇİN YÜZEY KİMYASI VE HÜCRESEL ÇALIŞMALAR

Ahmet ÇİFÇİ

**Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2016
Danışman: Doç. Dr. Aysun ÇETİN**

KISA ÖZET

Lösemi çocukluk çağının en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocukluk çağı lösemilerinin en sık ve en ölümcül olan tiplerindendir. ALL tedavisi öncesinde, sırasında ve sonrasında dolaşımdaki ya da doku içerisindeki kanser hücrelerinin belirlenmesi tanı koyma, tedavinin izlenmesi ve tiplendirme başta olmak üzere tüm aşamalar için büyük önem taşımaktadır. Minimal Residüel Hastalık (MRD) tedaviden kaçan ve relapslara neden olabilen lösemik hücrelerin toplam çekirdekli hücre sayısına oranı olarak tanımlanabilir ve lösemi tedavisinin planlanması ve takibinde önemlidir. MRD ölçümü günümüzde yaygın olarak akım sitometri ve polimeraz zincir reaksiyonlarıyla yapılmaktadır. Bu çalışmada bir ALL hücre hattı olan CCRF-SB hücreleri kullanılarak CD19 ve CD34 gibi çeşitli yüzey biyobelirteçlerine bağlanma potansiyeline sahip antikor bağlı mikrobuncuklar (microbeads) ile bu lösemi hücrelerinin yakalanması ve biyoçip geliştirmede kullanılmak üzere bir altın yüzeyin fonksiyonelleştirilmesi hedeflenmiştir. CD19 beadleri kullanılarak hücrelerin yaklaşık %75'i, CD34 beadleri kullanılarak ise %10'dan daha azı yakalanabilmektedir. Hücre yakalama deneylerini takiben akım sitometri analizleri yapılmış ve CD19 ekspresyon seviyesi %99.1, CD34 ekspresyon seviyesi %17 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: ALL, MRD, hücre hattı, biyoçip, biyobelirteç

SURFACE CHEMISTRY AND CELLULAR STUDIES FOR THE BIOCHIP TO BE DEVELOPED FOR EARLY DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Ahmet ÇİFÇİ

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biochemistry
M. Sc. Thesis, December 2016
Supervisor: Doç. Dr. Aysun ÇETİN**

ABSTRACT

Leukemia is one of the most important health problems of childhood. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common and most lethal type of childhood leukemia. The identification of cancer cells in circulation or in the tissues before, during and after ALL treatment is of great importance for all stages, especially for diagnosis, monitoring and typing. Minimal Residual Disease (MRD) can be defined as the ratio of total nucleated cells to leukemic cells that can lead to relapse and escape from treatment, and is important in planning and follow up of leukemia treatment. MRD measurement is now commonly performed by flow cytometry and polymerase chain reactions. In this study, it was aimed to utilize CCRF-SB cells, which are an ALL cell line, to functionalize a gold surface for use in capturing these leukemia cells and developing biochips, with antibody-bound microbeads (microbeads) having the potential to bind to various surface biomarkers such as CD19 and CD34. Approximately 75% of cells can be captured using CD19 beads and less than 10% using CD34 beads. Following cell capture experiments, flow cytometry analyzes were performed and the CD19 expression level was found to be 99.1% and the CD34 expression level to be 17%.

Key Words: ALL, MRD, cell line, biochip, biomarker

İÇİNDEKİLER

MINİMAL RESİDÜEL HASTALIĞIN ERKEN TANISINA YÖNELİK GELİŞTİRİLECEK BİYOÇİP İÇİN YÜZEY KİMYASI VE HÜCRESEL ÇALIŞMALAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmün Sistem.....	3
2.1.1. Hematopoez	3
2.1.2. B Lenfositler	5
2.2. Lösemi	6
2.2.1. Tanım.....	6
2.2.2. Lösemilerin Sınıflandırılması	7
2.3. Akut Lenfoblastik Lösemi	7
2.3.1 Akut Lenfoblastik Lösemi Tanımı Ve Tarihçesi	7
2.3.2. Akut Lenfoblastik Lösemi Etiyolojisi	8
2.3.3. Akut Lenfoblastik Lösemi Epidemiyolojisi	8
2.3.4. Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisi.....	8
2.3.5. Akut Lenfoblastik Löseminin Sınıflandırması	9
2.3.5.1. Sitogenetik Sınıflandırma	9
2.3.5.2. Morfolojik Sınıflandırma	9

2.3.5.3. İmmünolojik Sınıflandırma	10
2.4. B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi	10
2.5. Minimal Residüel Hastalık.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Kullanılan Demirbaş Malzemeler, Cihazlar Ve Aletler.....	14
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler Ve Kimyasal Maddeler	15
3.3. Hücre Kültürü.....	16
3.3.1. Hücre Kültür Sarfları.....	16
3.3.2. Hücre Kültürü İçin Tam Besiyeri Hazırlığı.....	16
3.3.3. Hücre Dondurma Besiyeri Hazırlığı	17
3.3.4. Hücrelerin Çözülmesi.....	17
3.3.5. Hücre Sayımı	18
3.4. Hücre Yakalama Çalışmaları	19
3.4.1. Tampon 1'in Hazırlanması	20
3.5. Wright Boyama	21
3.6. Akım Sitometri Çalışmaları	22
3.7. Altın Çip Yüzeyin Fonksiyonelleştirilmesi Ve Antikor İmmobilizasyon Çalışmaları.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Hücre Yakalama Deneylerinin Bulguları	24
4.2. Wright Boyama Bulguları.....	28
4.3. Akım Sitometri Bulguları	29
4.4. Altın Yüzey İşlemlerine Ait Bulgular.....	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. REFERANSLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	40

KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ATCC	: American Type Culture Collection
B-ALL	: B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
BFM	: Berlin-Frankfurt-Münster
BSA	: Bovin Serum Albumin
CD	: Cluster of Differentiation
COG	: Children' s Oncology Group
DCC	: N,N-Dicyclohexylcarbodiimide
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	: N, N-Dimethylformamide
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dPBS	: Fosfat Buffer Salin
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FAB	: Fransız-Amerika-Britanya
FBS	: Fetal Bovin Serum
FC	: Flow Cytometry
L-Glu	: L-Glutamin
MCG	: May Grünwald-Giemsa
MPO	: Myeloperoksidaz
MRD	: Minimal Residual Disease
NSE	: Spesifik Olmayan Esteraz
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PS	: Penisilin Streptomisin
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Lösemi tipleri ve görülme oranları	7
Tablo 2.	B-ALL morfolojik sınıflandırmada yüzey biyobelirteçleri.....	10
Tablo 3.	ALL tipleri	11
Tablo 4.	MRD tayininde kullanılan temel yöntemler.....	12
Tablo 5.	Tam besiyeri hazırlanması.	17
Tablo 6.	Hücre dondurma çözeltisi hazırlanması.....	17
Tablo 7.	CD34 beadleri ile hücre yakalama oranları.....	27
Tablo 8.	CD19 beadleri ile hücre yakalama oranları.....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Hematopoez ve kanın şekilli elemanları.....	4
Şekil 2.	B hücre gelişimi.....	5
Şekil 3.	Sadece yüzey belirteçleri kullanılarak CD34 ⁺ lin ⁻ ve prekürsör B hücrelerinin izolasyonu.....	6
Şekil 4.	B-ALL’de kullanılabilecek hücre yüzey biyobelirteçleri	13
Şekil 5.	Thoma Laminin teorik gösterimi.....	18
Şekil 6.	Hücre yakalama çalışmalarında kullanılan CD19 ve CD34 antikorları.	20
Şekil 7.	Tampon 1’ in hazırlanması ve pH ayarlaması.....	21
Şekil 8.	Periferik yayma ve Wright Boyama preparatlarının hazırlanması.	21
Şekil 9.	Akım sitometri örnek hazırlığı.	22
Şekil 10.	CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, invert mikroskop, 10x.....	24
Şekil 11.	CD34 ile hücre yakalama deney sonuçları, invert mikroskop, 10x.....	25
Şekil 12.	CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, upright mikroskop, 100x.....	26
Şekil 13.	CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, invert mikroskop, 40x.....	28
Şekil 14.	CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, Wright Boyama, invert mikroskop, 40x.....	28
Şekil 15.	CCRF-SB hücrelerinde CD10 PE Akım Sitometri sonuçları.	29
Şekil 16.	CCRF-SB hücrelerinde CD19 APC Alexa Fluor Akım Sitometri sonuçları.	29
Şekil 17.	CCRF-SB hücrelerinde CD34 PC5 Akım Sitometri sonuçları.	30
Şekil 18.	Altın yüzeyler üzerinde bead-bağlı hücrelerin tutulması.....	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistem farklı yapılara dönüşme yeteneği olan ve kemik iliğinde oluşan hücrelerden oluşur ve dış etkenleri tanıma yeteneği olan ve bunlara karşı gelişen savunma mekanizmasıdır (1, 2).

Hematopoez; hematopoetik öncül hücrelerinin olgun kan hücrelerine gelişimidir. Fetal dönemin başlangıcında vitellüs kesesinde 4-6 haftalarda, karaciğer ve dalakta 8. haftada meydana gelir. Kemik iliğinde üretim ise 4-5 aydan itibaren başlamaktadır. Doğumdan sonra, bütün hematopoez işlevler sadece kemik iliğinde gerçekleşmektedir, karaciğer ve dalakta hematopoez işlevi sona erer. Bağışıklık sistemi hücreleri de dahil olmak üzere kanın bütün şekilli elemanları, kemik iliğinde bulunan pluripotent hematopoetik hücrelerden köken alırlar (3, 4). Hematopoetik gelişimin ilk aşaması çok sayıda hücreye farklılaşabilme yeteneğine sahip kök hücrelerin, myeloid veya lenfoid öncül hücrelere farklılaşmasıyla olmaktadır. Farklılaşan lenfoid öncül hücrelerden B ve T lenfositleri ile doğal öldürücü hücreler meydana gelmektedir (5).

B lenfosit hücreleri yaklaşık elli yıl önce kuşlarda Bursa fabricius'ta keşfedilmiş, antikorların oluşumunu sağlayan hücreler şeklinde adlandırılmıştır. B lenfosit olarak isimlendirilmelerinin nedeni, bu hücrelerin kuşlarda Bursa fabricius, memelilerde kemik iliğinde (bone marrow) olgunlaşmasıdır (6-8).

Lösemi; hematopoetik hücrelerin genetik anormalliklerden kaynaklanarak hematopoezin belirli adımlarının durması ve bunların klonal proliferasyon olmalarının yol açtığı malign hastalıktır. Terminolojik olarak ise lösemi, kanın beyazlaşmasına verilen isimdir. Akademik literatürde ilk lösemi olgusu 1827 yılında Velpeau tarafından yayınlanmıştır. 1845 yılında is Virchow ve Benett farklı olgularla yapılan çalışmalarda kanın renginin beyaz olduğunu belirtmişler ve hastalığı isimlendirmişlerdir. Lösemiler çocukluk çağında görülen tüm kanser olgularının yaklaşık %30'unu kapsar ve bunun

yaklaşık %80'ini ise ALL meydana getirir. Akut lenfoblastik lösemi yakın tarihe kadar çok ölümcül ve korkutucu bir hastalık olarak görülmekteyken son dönemlerdeki bilimsel yaklaşım ve tedavi stratejilerindeki gelişmeler ile bu hastalar için yaklaşık %80 tedavi kür seviyelerine ulaşılmıştır (9-12).

Lösemiler meydana geliş ve ilerleyiş özelliklerine göre akut lösemi ve kronik lösemi şeklinde sınıflandırılır. Blastlardan, yani olgunlaşmamış hücrelerden köken alanlar akut lösemi olarak isimlendirilir ve burada hastalığın ilerleme hızı göreceli olarak yüksektir. Çoğu olgun hücrelerden meydana gelmiş olmasına rağmen olgunlaşmamış hücreler de bulunan tip ise kronik lösemi olarak isimlendirilirler ve hastalığın ilerleme hızı göreceli olarak düşüktür. Lösemiler temel aldıkları hücreye göre de lenfoid lösemiler ve myeloid lösemiler olarak sınıflandırılmaktadır (13-15).

Minimal Residüel Hastalık (Minimal Residual Disease, MRD), morfolojik olarak saptanamayacak seviyede az oranda relapslara yol açan lösemik hücre varlığını ifade etmektedir. MRD tayini için lösemi hücrelerinin ölçümü kilit noktadır. Bu çalışmada temel olarak 2 hedef belirlenmiştir. Birincisi; bead-konjuge antikorlar kullanılarak bir solüsyon içerisindeki lösemi hücrelerinin (CCRF-SB, ATCC) yakalanmasıdır. İkinci hedef ise; altın kaplama bir yüzeyin fonksiyonel hale getirilmesi yani antikor konjuge edilebilmesi ve bu yüzeyde beadler ile yakalanan hücrelerin tutulmasıdır. Bu amaçla, CCRF-SB hücrelerinin yüzeylerinde eksprese edildiği literatürce belirtilen CD19 ve CD34 antijenlerine spesifik olarak bağlanabilen antikorlar ile kaplı haldeki süperparamanyetik beadler kullanılarak hücreler yakalanmaya çalışılmıştır. Altın yüzeyler ise çeşitli temizleme ve fonksiyonelleştirme basamaklarından geçirilerek üzerlerinde beadlerce yakalanan hücreler tutulmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

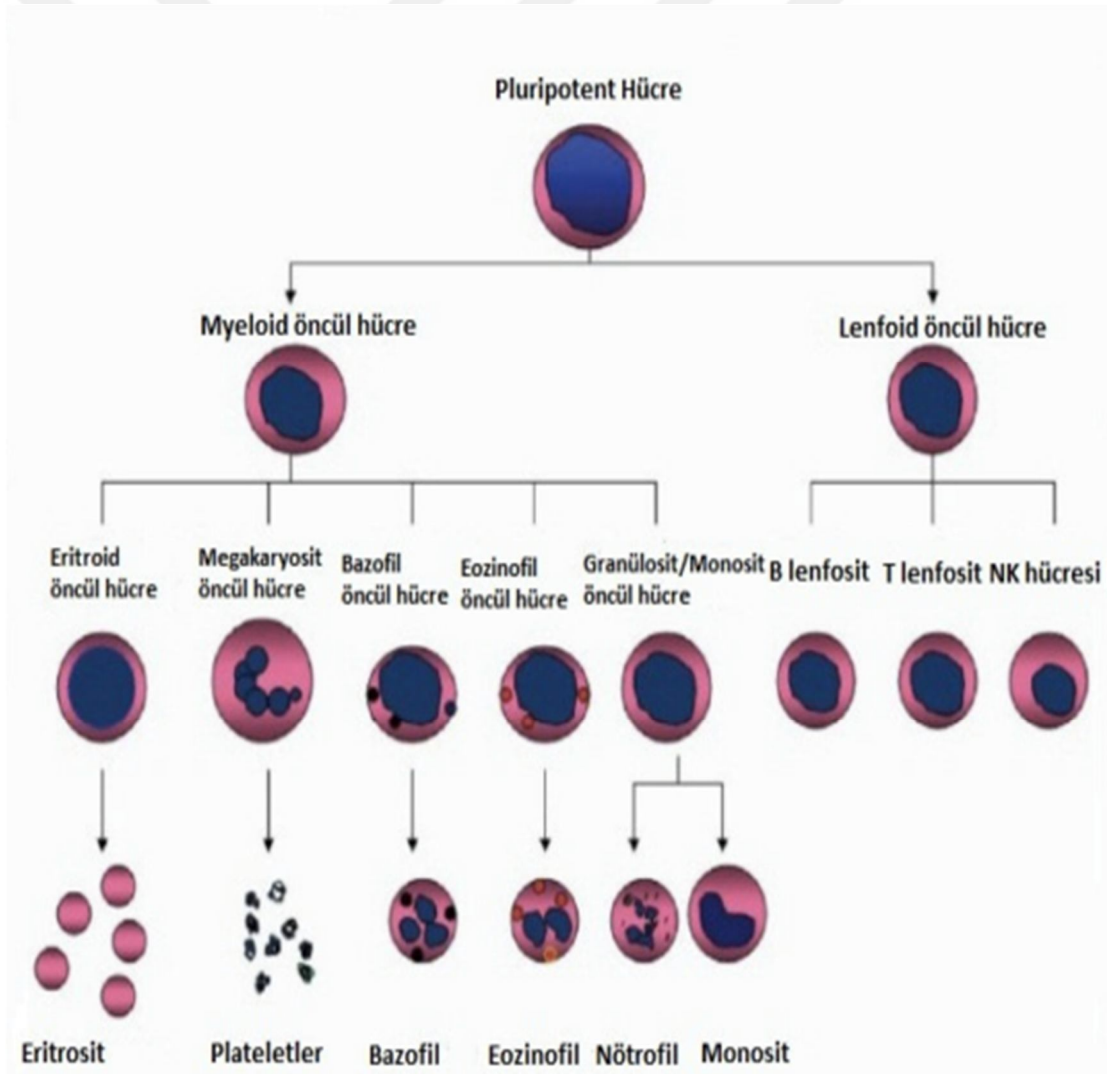
2.1. İmmün Sistem

İmmün sistem farklı yapılara dönüşme yeteneği olan ve kemik iliğinde oluşan hücrelerden oluşur ve dış etkenleri tanıma yeteneği olan ve bunlara karşı gelişen savunma mekanizmasıdır. İmmün cevap edinilmiş immün cevap ve doğal immün cevap olmak üzere iki başlık şeklinde incelenmektedir. Savunma hafızası oluşturan, karşılaştığı yabancı etkenlerin belirli bölgelerini tanıyarak yineleyen durumlarda hızlı cevap vermeyi sağlayan, lenfositlerce sağlanan edinilmiş immün cevaptır. Eozinofil, bazofil, nötrofil, doğal öldürücü hücre, makrofaj, dentritik hücre ve mast hücrelerince meydana gelen ve organizmaya yabancı etkenleri tanımaya yönelik olan sistem doğal immün cevap olarak tanımlanmaktadır. İnsanda immün sistemde görevli olan lenfosit hücreleri doğum öncesi kemik iliği ve karaciğerde, doğum sonrasında ise kemik ve timusta gelişirler (1, 2). B ve T lenfosit hücreleri yüzeylerindeki reseptörlere ve antijenlere karşı geliştirilen çeşitli antikorlar ile tanınabilirler ve PCR veya FC gibi cihazlar kullanılarak incelenebilirler. Monoklonal antikor kullanılarak belirlenen ve hücresel tanımda görev alan moleküller CD (Clusters of Differentiation- farklılaşan antijen grupları) şeklinde isimlendirilirler (2).

2.1.1. Hematopoez

Hematopoez; hematopoetik öncül hücrelerinin olgun kan hücrelerine gelişimidir. Fetal dönemin başlangıcında vitellüs kesesinde 4-6 haftalarda, karaciğer ve dalakta 8. haftada meydana gelir. Kemik iliğinde üretim ise 4-5 aydan itibaren başlamaktadır. Doğumdan sonra, bütün hematopoez işlevler sadece kemik iliğinde gerçekleşmektedir, karaciğer ve dalakta hematopoez işlevi sona erer (3). Bağışıklık sistemi hücreleri de dahil olmak üzere kanın bütün şekilli elemanları, kemik iliğinde bulunan pluripotent hematopoetik hücrelerden köken alırlar (4). Hematopoetik gelişimin ilk aşaması çok sayıda hücreye

farklılaşabilme yeteneğine sahip kök hücrelerin, myeloid veya lenfoid öncül hücrelere farklılaşmasıyla olmaktadır. Kanın bütün şekilli elemanların kökeni, farklılaşma yeteneği olan pluripotent hücrelere dayanır (3). Pluripotent hematopoetik kök hücreler, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme potansiyeline sahip uzun dönem hematopoetik kök hücrelerdir. Erken farklılaşma döneminde bu hücreler kendi kendini yenileyebilme özelliklerini kaybederek öncelikle kısa-dönem hematopoetik kök hücrelere, sonra da multipotent öncül hücrelere dönüşürler. Multipotent öncül hücreler, kendi kendini yenileme potansiyeli çok sınırlı olan ya da hiç olmayan, yalnızca lenfoid veya myeloid hücrelerine dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Farklılaşan bu lenfoid öncül hücrelerden B ve T lenfositleri ile doğal öldürücü hücreler meydana gelmektedir (5).

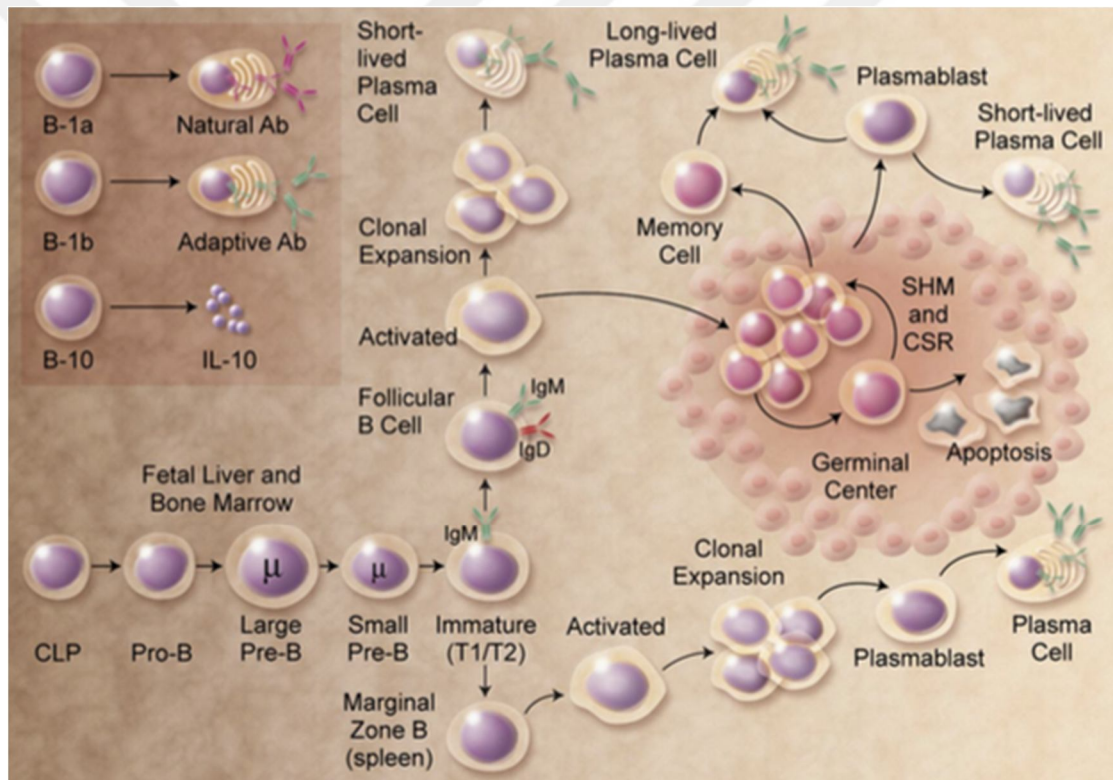


Şekil 1. Hematopoez ve kanın şekilli elemanları (6, 7).

2.1.2. B Lenfositler

B lenfosit hücreleri yaklaşık elli yıl önce kuşlarda Bursa fabricius'ta keşfedilmiş, antikorların oluşumunu sağlayan hücreler şeklinde adlandırılmıştır. B lenfosit olarak isimlendirilmelerinin nedeni, bu hücrelerin kuşlarda Bursa fabricius, memelilerde kemik iliğinde (bone marrow) olgunlaşmasıdır (8).

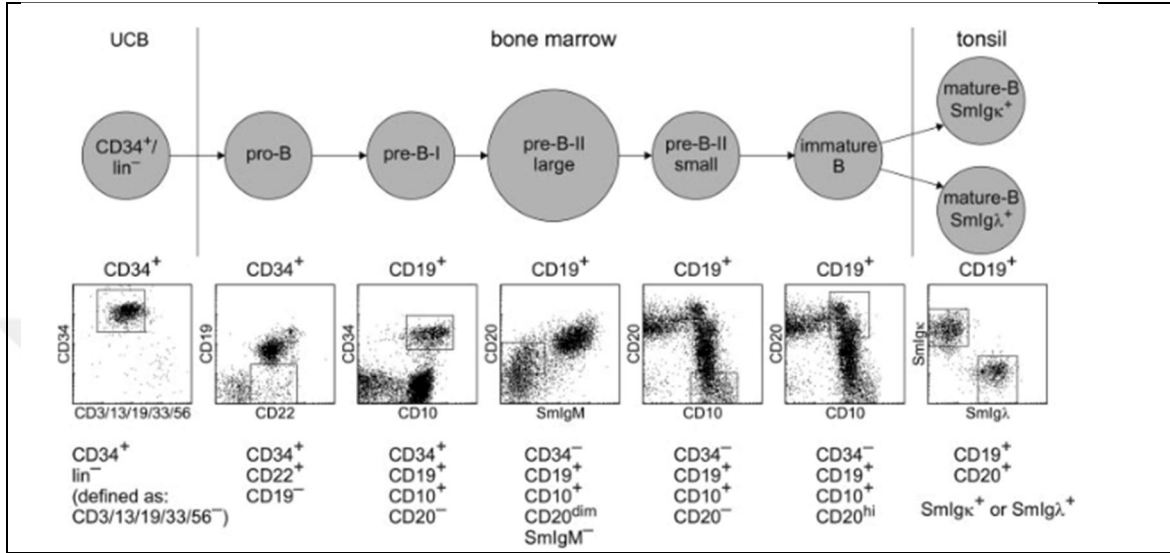
1970 yılların başlarında, hücre yüzey antijenlerinin karakterizasyonu ile deney hayvanı modellerinde keşfedilmiş olan B lenfositler daha sonra birçok çalışmada gösterilmiştir. Şekil 2'de insan ve farede B lenfosit gelişim basamakları gösterilmiştir. B-1a, B-1b ve B10 popülasyonları insanlarda daha az karakterize edilebilmiştir.



Şekil 2. B hücre gelişimi (8).

B hücre öncülleri hematopoetik kök hücrelerden farklılaşmış olan lenfoid hücre serilerinden meydana gelmektedir. Bu seriden farklılaşan ilk hücreler pre-pro B hücresi (fraksiyon A) olarak isimlendirilirler ve bu hücrelerin yüzeylerinde B220 proteini eksprese edilmektedir. Bu hücreler daha sonra pro B hücrelerine farklılaşırlar ve artık yüzeylerinde CD19-, CD22+, CD34+ antijenleri ile karakterizedirler. Daha sonraki farklılaşma evresi olan pre B1'de ise hücreler CD19 antijenini de eksprese etmeye

başlamışlardır. Bu basamaktan sonra sırasıyla pre B2 büyük ve pre B2 küçük hücreler meydana gelmektedir (9).



Şekil 3. Sadece yüzey belirteçleri kullanılarak CD34⁺lin⁻ ve prekürsör B hücrelerinin izolasyonu (9).

2.2. Lösemi

2.2.1. Tanım

Lösemi; hematopoetik hücrelerin genetik anormalliklerden kaynaklanarak hematopoezin belirli adımlarının durması ve bunların klonal proliferasyonlarının yol açtığı malign hastalıktır. Terminolojik olarak ise lösemi, kanın beyazlaşmasına verilen isimdir. Akademik literatürde ilk lösemi olgusu 1827 yılında Velpeau tarafından yayınlanmıştır. 1845 yılında is Virchow ve Benett farklı olgularla yapılan çalışmalarda kanın renginin beyaz olduğunu belirtmişler ve hastalığı isimlendirmişlerdir. Daha sonra yüksek lökosit seviyesine bir gönderme olarak beyaz kan teriminin Yunanca kökenli olan karşılığı leukos ve kan terimine karşılık haima kelimelerinden leukemia kelimesi türetilmiştir (10, 11). Lösemi hücreleri eğer kemik iliğinden başka bölgelerde toplanırsa meydana gelen kitleler lenfoblastom ya da myeloblastom şeklinde isimlendirilir. Bu toplanmalar sıklıkla kemik, merkezi sinir sistemi, dalak, testis, lenf ve meme dokularıdır (12).

2.2.2. Lösemilerin Sınıflandırılması

Lösemiler meydana geliş ve ilerleyiş özelliklerine göre akut lösemi ve kronik lösemi şeklinde sınıflandırılır. Blastlardan, yani olgunlaşmamış hücrelerden köken alanlar akut lösemi olarak isimlendirilir ve burada hastalığın ilerleme hızı göreceli olarak yüksektir. Çoğu olgun hücrelerden meydana gelmiş olmasına rağmen olgunlaşmamış hücreler de bulunan tip ise kronik lösemi olarak isimlendirilirler ve hastalığın ilerleme hızı göreceli olarak düşüktür. Lösemiler temel aldıkları hücreye göre de lenfoid lösemiler ve myeloid lösemiler olarak sınıflandırılmaktadır (13, 14). Çocukluk çağında ortaya çıkan lösemilerinin %3'ünü kronik lösemiler oluştururken %97'sini akut lösemiler oluşturmaktadır. Tablo 1'de de lösemilerin sınıflandırılması gösterilmektedir (15).

Tablo 1. Lösemi tipleri ve görülme oranları (15).

Akut Lösemiler	97%
Akut Lenfoblastik Lösemi	%75-80
Akut Myeloblastik Lösemi	%15-20
Akut İndifferansiye Lösemi	%0.05
Akut Karışık Lösemi	ALL %6 AML %17
Kronik Lösemiler	3%

2.3. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

2.3.1 Akut Lenfoblastik Lösemi Tanımı Ve Tarihçesi

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinde bulunan lenfoid öncü hücre olgunlaşma aşamaların sekteye uğraması ve denetimsiz şekilde artışı ile tanımlanan neoplastik bir anormalliktir (16). Çocukluk çağında görülen akut löseminin en yaygın olarak 1 ile 5 yaşları aralığında daha yaygın ortaya çıktığı 1917 yılında belirtilmiştir. Çocukluk döneminde görülen lösemiler 1970'li yılların başlarına kadar tek sınıf olarak düşünülmüş ancak bazı kemoterapi ilaçlarına karşı yanıtın farklı olduğunun belirlenmesiyle, farklı türlerin olduğu ve bunların geliştirilecek yeni yöntemler ile belirlenmesinin gerekliliği belirlenmiştir (17). Lösemiler çocukluk çağında görülen tüm

kanser olgularının yaklaşık %30'unu kapsar ve bunun yaklaşık %80'ini ise ALL meydana getirir (18). Akut lenfoblastik lösemi yakın tarihe kadar çok ölümcül ve korkutucu bir hastalık olarak görülmekteyken son dönemlerdeki bilimsel yaklaşım ve tedavi stratejilerindeki gelişmeler ile bu hastalar için yaklaşık %80 tedavi kür seviyelerine ulaşılmıştır (12).

2.3.2. Akut Lenfoblastik Lösemi Etyolojisi

Lösemilere nelerin yol açtığı ve hangi yollar üzerinden meydana gelebildiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Akut lenfoblastik lösemi olgularının meydana gelmesinde etkili olduğu belirtilen çeşitli çevresel etmenler ve genetik faktörler belirtilmekte ve araştırılmaktadır. Genel olarak bu durumun meydana gelmesinde birden fazla basamakta meydana gelen metabolik bozuklukların, hücre anormalliklerinin ve kontrol basamaklarından etkilenmeden sonsuz sayıda çoğalabilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşmasının etkili olduğu belirtilmektedir. Bu anlamda planlanan deneysel planlamalar neticesinde B hücrelerinin yüzey biyobelirteçlerinin T lenfosit hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörler ile çalışmalar yapılarak bütün blastların benzer malignitelere sahip olduğu bulunmuş ve blastların klonal karaktere sahip olduğu, yani tek tipteki hücreden köken aldığı gösterilmiştir (19, 20). Çeşitli kimyasalların, virüslerin, radyasyona ve bazı ilaçlara maruz kalmanın ve çeşitli genetik etkenlerin lösemilerin meydana çıkmasında rolü olduğu belirtilmektedir (21).

2.3.3. Akut Lenfoblastik Lösemi Epidemiyolojisi

Kanser olgularının %1 den daha az bir oranı on beş yaşından daha küçük çocuklarda ortaya çıkmakta ve bu dönemde görülen kanser vakalarında beklenen yaşam seviyesinin ve tam olarak iyileşebilme düzeyinin olgun kanser vakalarından önemli ölçüde daha yukarıda olması nedeniyle çocukluk dönemi kanser çalışmaları çok daha iyi sonuç verebilen ve yüksek başarı yakalanabilen çalışmalar olarak önem arz etmektedir (22).

2.3.4. Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisi

ALL'de çeşitli tedavi protokolleri uygulanmakta, kimi zaman bu tedaviler bir kombinasyon şeklinde uygulanabilmektedir.

Destek tedavisinde; hematolojik replasman tedavisi, nötropeni tedavisi, enfeksiyon tedavisi, ağrı ve bulantı tedavisi, tedavinin yan etkilerini azaltıcı tedavi, hasta ve hasta yakınlarının psikososyal olarak desteklenmesi söz konusudur.

Çoklu kemoterapi protokollerinde; referans olarak görülen iki grubun ortaya koymuş olduğu protokoller uygulanır. Bunlardan birincisi Children's Oncology Group (COG), ikincisi Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) çalışma grubudur. ALL'de uygulanmakta olan çoklu ajan kemoterapi protokolleri temel olarak dört basamaktan meydana gelmektedir ve bunlar (28);

- İndüksiyon tedavisi
- Konsolidasyon
- Reindüksiyon tedavisi
- İdame tedavisi

2.3.5. Akut Lenfoblastik Löseminin Sınıflandırması

Akut lenfoblastik lösemilerde farklı parametreler ve yöntemler kullanılarak birden fazla sınıflandırma metodu geliştirilmiştir. Bunların sınıflandırma anlamında tek başına bir değeri olmakla birlikte birden fazla metodun birlikte kullanılabilmesi de söz konusu olabilmektedir.

2.3.5.1. Sitogenetik Sınıflandırma

Sitokimyasal olarak sınıflandırma metodunda, Myeloperoksidaz (MPO), spesifik olmayan esterase (NSE), periyodik asit schiff (PAS), beta-glukoronidaz gibi boyalar kullanılarak gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarla sitoplazmik elementler belirlenebilmekte, bu yolla da sınıflandırma işlemi yapılabilmektedir. MPO aktivitesi monosit ve granülositlerde bulunmaktayken, lenfositlerde bulunmadığı için lenfoid ve myeloid lösemi ayırımında kullanılabilir. Hem lenfoblastlar hem de myeloblastlar NSE bulundurmaktadır. PAS aktivitelerine bakıldığında ise, lenfoblast sitoplazmalarında pozitif, myeloblastlarda ise yaygın olarak negatif sonuç vermektedir. (23, 24).

2.3.5.2. Morfolojik Sınıflandırma

Morfolojik sınıflandırmada May Grünwald-Giemsa (MCG) gibi boyalar kullanılarak kan ve kemik iliği yayma preparatlarının morfolojik olarak araştırılması söz konusudur (25).

Morfolojik sınıflandırma işleminde; çekirdek şekli, hücre boyutu, çekirdekçik sayısı, çekirdek-plazma oranı, boyamalara verilen tepki, sitoplazmada granül yer alıp almaması

ve bunların özellikleri gibi çeşitli parametreler kullanılarak sınıflandırma yapılabilmektedir. Fransız-Amerika-Britanya (FAB) isimli grup tarafından, lenfoblastların üç gruba ayrılmasını ve bu şekilde sınıflandırma yapılmasını öngören sistem yaygın olarak kullanılmaktadır (26).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre akut lenfoblastik lösemi pre-T lenfoblastik lösemi ve pre-B lenfoblastik lösemi olmak üzere iki başlık olarak sınıflandırma yapılmaktadır (23, 27).

2.3.5.3. İmmünolojik Sınıflandırma

Akut lenfoblastik lösemi olgularında yüzey biyobelirteçleri ile ilk kez T- akut lenfoblastik lösemiler ayırt edilmiştir. Lenfoid ve myeloid hücre yüzeylerinde, lösemi tanısı ve sınıflandırması için kullanılabilecek antijenleri belirlenmiş ve Cluster of differentiation (CD) olarak isimlendirilmiştir (27).

Tablo 2. B-ALL morfolojik sınıflandırmada yüzey biyobelirteçleri (27).

B-ALL	İmmünolojik Yüzey Biyobelirteçleri		
	CD10	CD19	CD34
Pro B	pozitif	pozitif	pozitif
Pre B	pozitif	pozitif	pozitif
Geç Pre B	pozitif	pozitif	pozitif
Olgun B	pozitif	pozitif	negatif

2.4. B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), B hücrelerinin gelişim evrelerinin ilk basamaklarında ortaya çıkan genetik değişimler neticesinde, B hücrelerin normalden fazla seyretmesi ile meydana gelen ve görece çocukluk çağında daha çok görülen bir lösemidir. Çocukluk çağı lösemilerinin yaklaşık %75'i B hücreli akut lenfoblastik lösemidir (29).

Tablo 3. ALL tipleri (29, 30).

B Hücreli ALL	Çocukluk çağı lösemilerinin yaklaşık %75'ini oluşturur.
1. Pro B ALL	HLA-DR, TdT, CD19 pozitif, sitoplazmik ve yüzeyel Ig bulunmaz.
2. Yaygın ALL	Tüm ALL olguları içerisinde en sık görülen tip, CD10, CD19, HLA-DR, TdT pozitif.
3. Pre B ALL	Sitoplazmik Ig mevcuttur, CD22 seviyesi yüksektir.
4. Olgun B ALL	Lenfoblast hücre yüzeyinde Ig mevcuttur, çocukluk çağı ve yetişkinlerde %5'ten azdır.
T Hücreli ALL	ALL'lerin yaklaşık %25'ini oluşturur.
1. Pro T ALL	Sitoplazmada CD3, CD7, TdT pozitif, diğer biyobelirteçler negatif.
2. Pre T ALL	Sitoplazmada CD2, CD3, CD5, CD7, TdT pozitif.
3. Kortikal T ALL	Sitoplazmada CD1a, CD3, TdT pozitif.
4. Olgun T ALL	Membranda CD3 mevcuttur.

2.5. Minimal Residüel Hastalık

Minimal Residüel Hastalık (Minimal Residual Disease, MRD), morfolojik olarak saptanamayacak seviyede az oranda relaplara yol açan lösemik hücre varlığını ifade etmektedir (31).

Akut lenfoblastik lösemili hastalarda tedaviye verilen cevabın araştırılmasında minimal residüel hastalık tayininin az veya fazla riskli grupları belirleme noktasındaki güvenilirliğinin yüksek olduğu belirtilmekte, bu sebeple MRD'nin ALL'li olguların tanısında önemli bir tanısal parametre olduğu düşünülmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MRD' nin rutin olarak uygulanan tedavi basamaklarında risk faktörü olarak dahil edilmesi mümkündür (32-34).

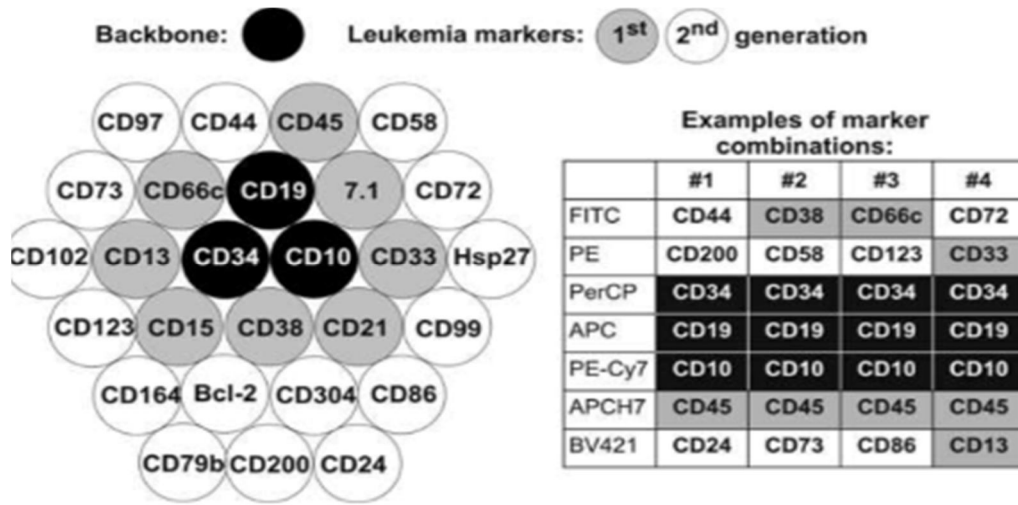
MRD tayini; kemoterapi tedavisi başlanmasından sonraki 15. günde kemik iliğinden alınacak numunedeki blastik hücre seviyesinin tüm çekirdekli hücre seviyesine bölünmesiyle yapılmaktadır (33).

Günümüzde MRD tayini için çeşitli yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlar;

- Akım Sitometri (Flow Cytometry, FC)
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR)

Tablo 4. MRD tayininde kullanılan temel yöntemler (35).

PARAMETRE	YÖNTEM	ADI
	FC	PCR
Duyarlılık	1/1000-1/10.000	1/10.000-1/100.000
Avantajlar	daha hızlı ve ucuz	standardizasyonu kolay, duyarlılığı yüksek
Dezavantajlar	kalifiye personel ihtiyacı	pahalı olma, hızlı sonuç verememe



Şekil 4. B-ALL’de kullanılabilecek hücre yüzey biyobelirteçleri (36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Demirbaş Malzemeler, Cihazlar ve Aletler

- İnvart ve Faz Kontrast Mikroskop
- Tartım cihazı ve tartım aletleri
- Karıştırıcı
- Buzdolabı
- Derin Dondurucu (-20°C)
- Derin Dondurucu (-80°C)
- Santrifüj
- Mikrosantrifüj
- Soğutmalı Santrifüj
- Laminer airflow
- İnkübatör
- Sıvı azot tankı
- Otomatik mikropipetler ve mikropipet uçları
- Otomatik pipetör ve pipet uçları
- Mıknatıs ve mıknatıs standı
- Hücre kültürü flaskları
- Steril filtreler
- 6 ve 12 kuyucuklu plakalar
- falkon tüpleri, ependorf tüpleri, CBC tüpleri, cryovialler

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

- Buz ve kuru buz
- Etanol
- Metanol
- Aseton
- Wright Boyası (HEMADIFF)
- dPBS (BIOLOGICAL INDUSTRIES)
- FBS (GIBCO)
- RPMI 1640 (BIOLOGICAL INDUSTRIES)
- L-Glutamin (GIBCO)
- Pensilin Streptomisin (GIBCO)
- BSA (SIGMA)
- EDTA (SIGMA)
- CD19-Bead (INVITROGEN)
- CD19 ve CD34 FC antikorları (NOVUS)
- CD34-Bead (INVITROGEN)
- CD10 antikoru (INVITROGEN)
- NaOH
- HCL
- Tripan mavisi (SIGMA)
- Au yüzey
- Pirahna Solüsyonu
- Tampon1
- H₂SO₄ (SIGMA)
- H₂O₂ (SIGMA)
- 1-Hexadecanethiol (SIGMA)
- 11-Mercaptoundecanoic acid (SIGMA)
- DMF (SIGMA)
- DCC (SIGMA)
- NHS (SIGMA)

3.3. Hücre Kültürü

CCRF-SB B-tip akut lenfoblastik lösemi hücre hattı kullanılmıştır (ATCC). Üreticinin belirttiği şekilde pasajlama ortamı hazırlanmıştır. Pasaj ortamı %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeridir. Pasajlamalar oda sıcaklığında 300 RCF'te 5 dakika boyunca hızlanma:yavaşlama oranı 9:2 olarak ayarlanan santrifüjün ardından 15 ml'lik polipropilen falkon tüpün tabanında çöken hücrelerin taze besiyerinde çözülmesi ve 75 cm ya da 175 cm flasklara ekilmesi şeklinde yapılmıştır. Kültür ortamı hazırlanırken kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması amacıyla tüm çalışmalar aseptik koşullara uygun şekilde biyogüvenlik seviyesi 2 kültür kabininde yapılmış, ayrıca 0.45µm çaplı filtre kullanılmıştır.

3.3.1. Hücre Kültür Sarfları

RPMI 1640 pH; 7.4

- 500 ml, 2-8°C'de son kullanım tarihine kadar saklanır.

Fetal Bovin Serum (FBS)

- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiş, böcek hücre kültüründe test edilmiş.
- Stok solüsyon 15 ml' lik falkon tüplere 10'ar ml alikotlanarak -80°C'de saklanır.

L-Glutamin 200mM, 20 ml

- Stok solüsyon 2 ml'lik ependorf tüplere 2'şer ml alikotlanarak -80°C'de saklanır.

Penisilin–Streptomisin Solüsyonu, 10.00* U/ml-10mg/ml

- 2ml' lik ependorf tüplere 2'er ml olacak şekilde alikotlanarak -80°C'de saklanır.

Fosfat Buffer Salin (dPBS) pH;7.4

Ca ve Mg içermez.

3.3.2. Hücre Kültürü İçin Tam Besiyeri Hazırlığı

- Biyogüvenlik seviye 2 çalışma kabinlerinde steril olarak hazırlanmıştır.
- Çalışmamızda kullanılan komplet medyum 500 ml'lik steril filtreler kullanılarak hazırlanmıştır.
- 440 ml RPMI 1640

- 5 ml penisilin streptomisin karışımı
- 5 ml L-Glutamin
- 50 ml FBS

Tablo 5. Tam besiyeri hazırlanması.

Eklenen Madde	Hacim	Konsantrasyon Oranı
FBS	50 ml	%10
Penisilin/Strep	5 ml	%1
L-Glutamin 200 mM	5 ml	%1
DMEM	440 ml	%88

3.3.3. Hücre Dondurma Besiyeri Hazırlığı

- 2 ml'lik cryovial hücre çalışma kabine alınır
- İçerisine toplam hacim 1 ml olacak şekilde 950 µl tam besiyeri içerisinde belirli sayıda hücre ve 50 µl DMSO eklenir.
- 24 saat -80°C de bekletilir, ardından -196°C azot tankına kaldırılır.

Tablo 6. Hücre dondurma çözeltisi hazırlanması.

Eklenen Madde	Hacim	Konsantrasyon Oranı
Tam besiyeri içinde hücre	950 µl	% 95
DMSO	50 µl	% 5

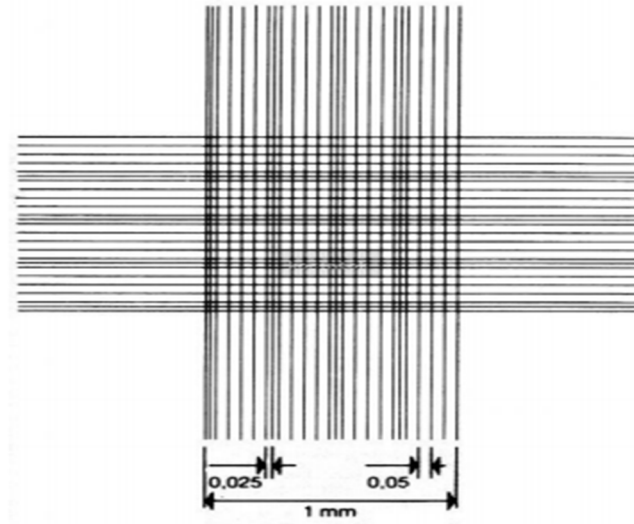
3.3.4. Hücrelerin Çözülmesi

- İçinde dondurulmuş hücre bulunan cryotüp 37°C benmaride hızlı, çok az buz kalacak şekilde çözülür.
- 10 ml tam besiyeri falkon içine yavaşça bırakılır.
- 350xg de 5 dakika satrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve 5 ml tam besiyerinde çözündürülür.
- 350xg 5 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatant atılır, pellet tam besiyerinde çözülür ve içerisinde belirli miktarda tam besiyeri içeren flaska ekim yapılır.

3.3.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı tripan mavisi ile boya dışlama metoduna göre yapılır. Bu yöntemde, canlı hücreler membran bütünlüğünü koruduğu için tripan boyası içine giremez; ölü hücrelerde membran bütünlüğü bozulduğu için boya içeri geçer ve bu nedenle mavi renk boyanır. Hücreler, Thoma lamı olarak adlandırılan bir çeşit bölmeli lama damlatılır ve üzeri lamel ile kapatılarak mikroskop altında tek tek sayılır. Hücreler pasaj işlemi esnasında Neubauer lamı ve Tripan mavisi boyası kullanılarak sayılır ve canlılık yüzdeleri tespit edilir. Sayım işlemi, Neubauer laminin 64 (16x4) karesindeki hücrelerin invert mikroskopta sayımı, ortalamalarının seyrelme faktörü, toplam hücre solüsyonunun hacmi ve 10^4 çarpanı ile çarpılması ile bulunur. Canlılık seviyesinin tespiti, hacimce 1:1 hücre ve Tripan mavisi karışımı pipetaj ile karıştırılır ve ardından invert mikroskopta görüntülenmesi ile yapılır. İnkübasyonun ardından Neubauer lamı üzerinde boyanan hücreler ölü, boyanmayan ve şeffaf rengini koruyan hücreler ise canlı olarak değerlendirilir.



Şekil 5. Thoma Laminin teorik gösterimi.

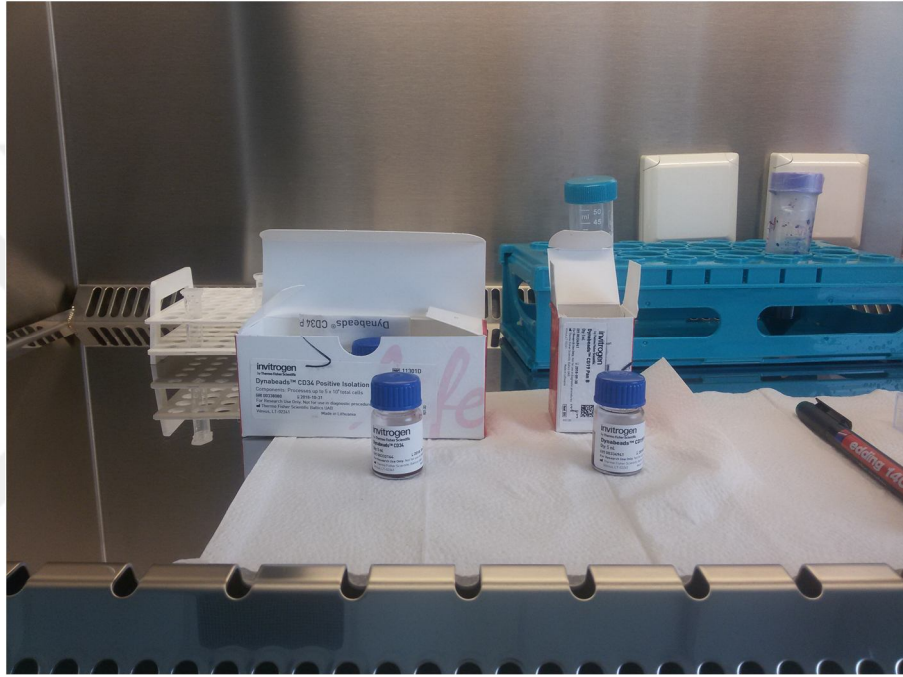
3.4. Hücre Yakalama Çalışmaları

Kullanılan CCRF-SB B-ALL hücreleri, literatür bilgilerine göre yüzeylerinde CD19 ve CD34 antijenlerini taşımaktadır. Bu hücreleri yakalamak için anti-CD19, anti-CD34 antikorları kullanılmıştır. Antikor çalışmaları kontaminasyon riskini minimize etmek ve deney sonuçlarının güvenilirliği açısından aseptik koşullarda, biyogüvenlik seviye 2 çalışma kabinlerinde yapılmıştır. Kullanılan bu antikorlar, antikor şişesinden 4.5um boyutlarda süperparamanyetik özellikte mikroboncuklara immobilize olarak çıkmaktadır. Hücre yakalama deneyinin mantığı, hücreleri ve antikorları belirli şartlarda inkübe etmek, inkübasyondan sonra ise bir manyetik güç ile antikorlar tarafından yakalanan hücreleri tutmak, yakalanamayan hücrelerin ise yıkamalarla uzaklaştırılmasını sağlamaktır.

Hücre yakalama çalışmaları şu sırayla yapılmaktadır;

- Kültür işlemi için hücreler 15 ml’lik falkona alınarak santrifüjlenir.
- Süpernatant atılır, hücreler tam besiyerinde çözülür.
- Thoma lamıyla Tripan mavisi boyası kullanılarak invert mikroskopta sayım yapılır.
- 500.000 hücre/ml olacak şekilde ayarlanır ve 2 ml’lik ependorf tüpe alınır.
- Diğer 2 ml’lik ependorf tüpe 1 ml Tampon 1 eklenir.
- Tampon 1 içerisine CD19 ve/veya CD34 antikor-bead eklenir.
- Antikor içeren tüp manyetik standı yerleştirilir ve 3 dk beklenir, süpernatant atılır.
- Üzerine 1 ml Tampon 1 eklenir.
- Tüp tekrar manyetik standı yerleştirilir, 2 dk beklenir ve süpernatant atılır.
- Daha sonra tüpte kalan beadlerin üzerine, diğer tüpte hazırlanmış olan tam besiyeri içerisindeki hücreler eklenir ve yavaş pipetlemeler ile karıştırılır.
- Bead ve hücreleri içeren tüp +4 °C’de karıştırıcı üzerinde 30 dk inkübe edilir.
- Inkübasyonun ardından tüp manyetik standı yerleştirilir ve 3 dk beklenir.
- Süpernatant bir falkon tüpe alınır.
- 1 ml Tampon 1 eklenir ve manyetik standı yerleştirilip 2 dk beklenir. Süpernatant bir falkon tüpe alınır. Bu işlem 3 kez daha tekrarlanır.

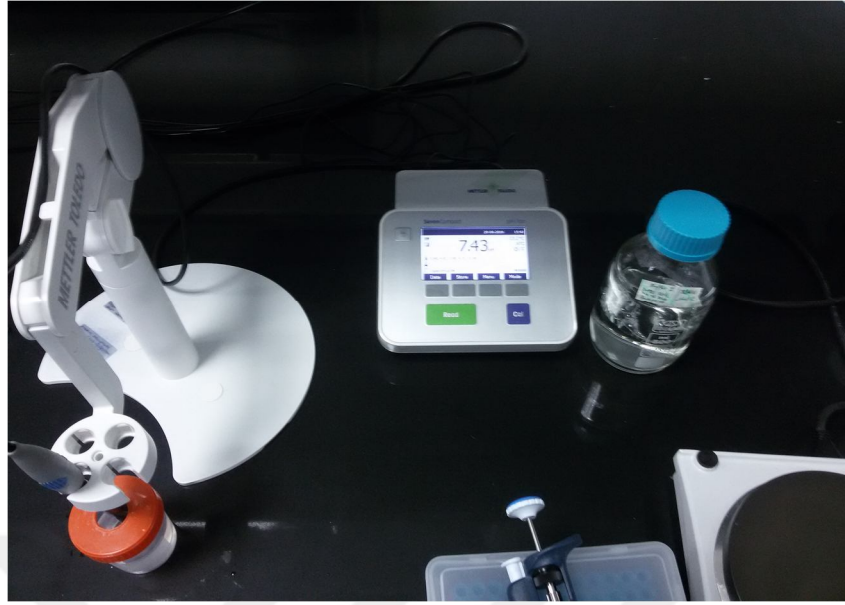
- İşlem sonucunda ependorf tüpte kalan bead-hücre topluluğu tam besiyeri veya PBS içinde çözülüp 6 veya 12 kuyucuklu plakaya alınarak görüntüleme ve incelemelerde kullanılır.
- Falkon tüplere alınan hücreler Thoma lamı ile invert mikroskopta sayılır. Sayım sonucunda yıkamalarda kaçan hücre sayısı, başlangıçta eklenen hücre sayısından çıkarılarak beadler kullanılarak elde edilen hücre yakalama oranları hesaplanır.



Şekil 6. Hücre yakalama çalışmalarında kullanılan CD19 ve CD34 antikorları.

3.4.1. Tampon 1'in Hazırlanması

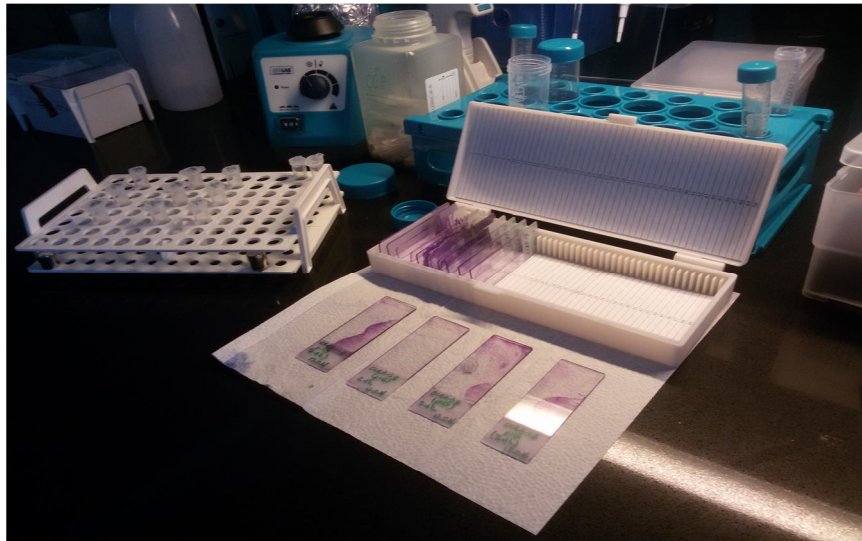
- Ca ve Mg içermeyen 100 ml PBS steril bir şişe içerisine alınır.
- %0.1 BSA ve 2mM EDTA ilave edilir.
- Karışması için manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılır.
- Tampon hazırlandıktan sonra son olarak pH ayarlaması yapılır.



Şekil 7. Tampon 1' in hazırlanması ve pH ayarlaması.

3.5. Wright Boyama

- Gerekli sayıda hücre bir falkon tüpte hazırlanır.
- Bir lam alınır ve üzeri temizlenir, daha sonra hücre lam yüzeyine yayılır.
- Fikse edilmesi amacıyla metanol damlatılır ve 15-30 sn beklenir.
- Ardından yüzey Wright boyası ile kaplanır ve 2-3 dk beklenir.
- Lam üzerine PBS eklenir ve 3-4 dk beklenir.
- Lam yüzeyi saf su ile yıkanır ve kurutulur.

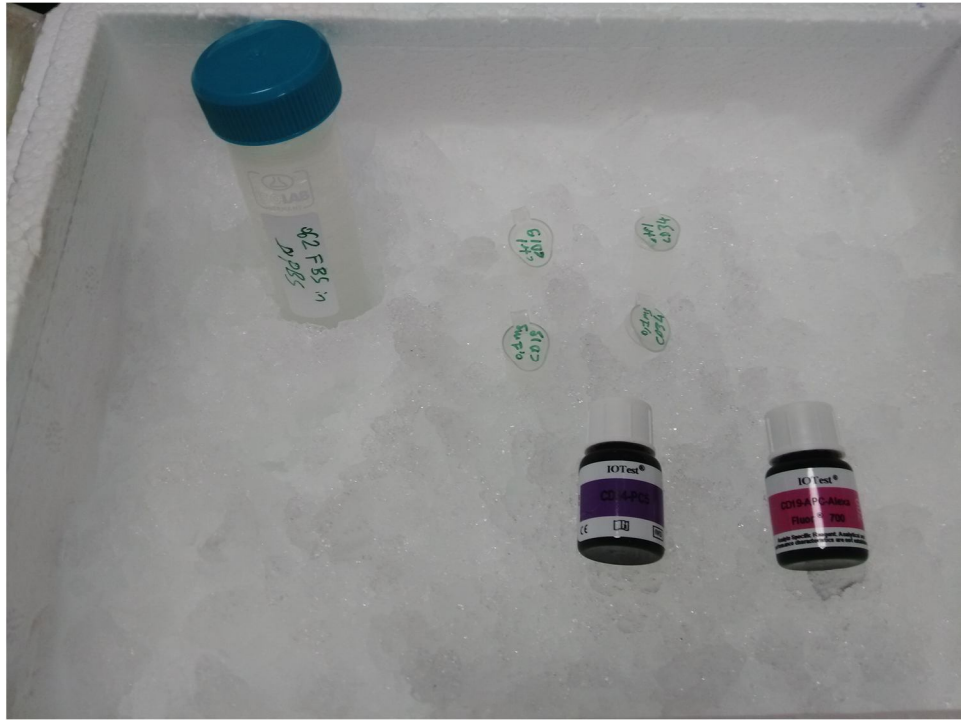


Şekil 8. Periferik yayma ve Wright Boyama preparatlarının hazırlanması.

3.6. Akım Sitometri Çalışmaları

Akım sitometri ölçümleri CD10, CD19, CD34, CD38 ve CD45 flow antikorları kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm için yapılan örnek hazırlık basamağı şu şekildedir;

- İnkübatörden alınan flaskın içerisindeki hücreler daha önce belirtilen şekilde santrifüj edilir, süpernatant atılır, falkon tabanındaki hücreler tam besiyeri içerisinde çözülür.
- Sayım yapılır.
- Yaklaşık 1 milyon hücre/ml olacak şekilde hücreleri içeren 1 ml tam besiyeri ependorf tüpe alınır ve işlem buz üzerinde yapılır.
- 2 µl Fc blok solüsyonu eklenir, 5 dk inkübe edilir.
- 10 µl akım sitometri antikor eklenir, 25 dk inkübe edilir.
- 300xg +4°C’de 7 dk santrifüj yapılır, süpernatant atılır.
- 500 µl staining tamponu eklenir.
- 300g +4°C’de 7 dk santrifüj yapılır, süpernatant atılır.
- 500 µl staining tamponu içerisine alınır, ölçüm yapılana kadar +4°C’de saklanır.



Şekil 9. Akım sitometri örnek hazırlığı.

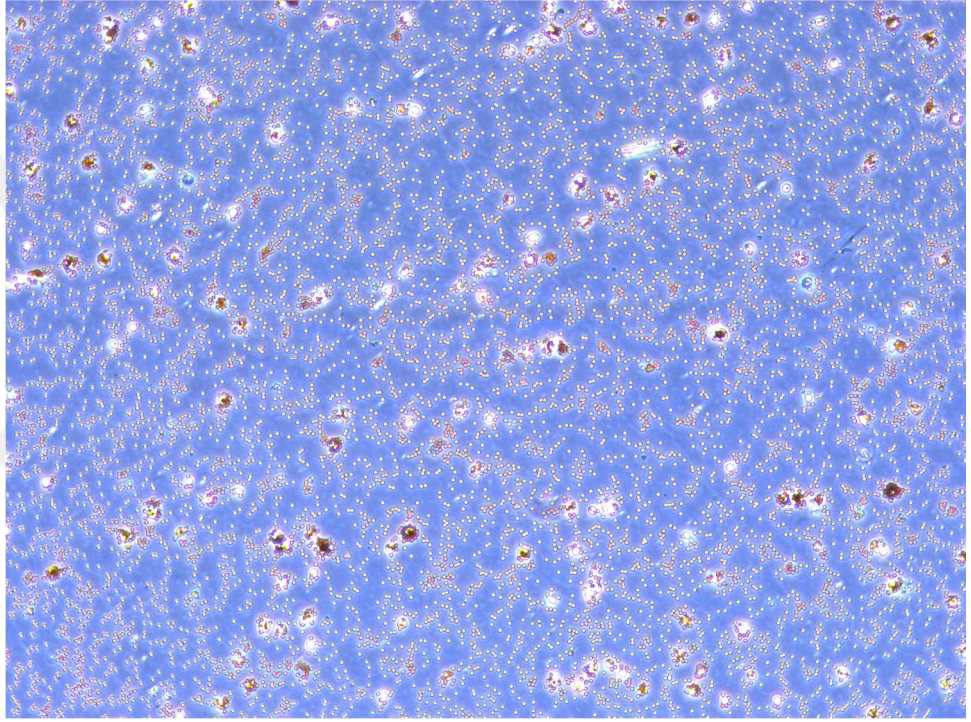
3.7. Altın Çip Yüzeyin Fonksiyonelleştirilmesi ve Antikor İmmobilizasyon Çalışmaları

Altın yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesi şu şekilde yapılmaktadır;

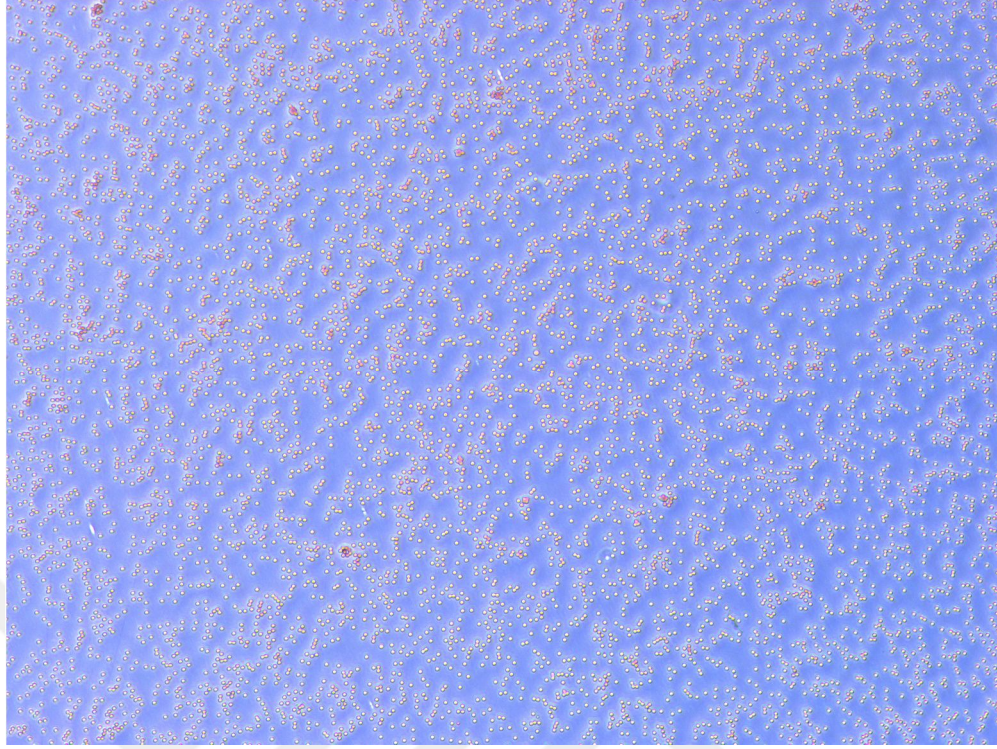
- Üst yüzeyi altın kaplı olan ve Silika ve Nikel katmanlarından oluşan yüzeyler etanol ve aseton ile ultrasonik banyoda 10 dk yıkanır.
- Temizlenen ve kurutulan yüzeyleri 30 dk air plazma ile temizlenir.
- Temizlenen yüzeyler saf etanol içine atılır ve 1 dk beklenir.
- Ayrı temiz bir kapta mercatoundecanoic asiti saf etanol içinde hacimce %1-2 (v/v) çözeltisini hazırlanır.
- Temizlenen ve etanol içinde duran yüzeyi bu çözelti içine alınır ve 3 saat beklenir.
- Daha sonra yüzey etanol ile 2-3 kez iyice yıkanır ve azot gazı ile kurutulur.
- Bu yüzey DCC-NHS çözeltisi ile aktive edilir ve sonra antibody immobilizasyonuna geçilir.
- PBS içerisinde hazırlanan CD19 antikoruna 12 saat inkübe edilen yüzeyler kullanılabilmesi için PBS içerisinde +4 °C’de bekletilir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Yakalama Deneylerinin Bulguları

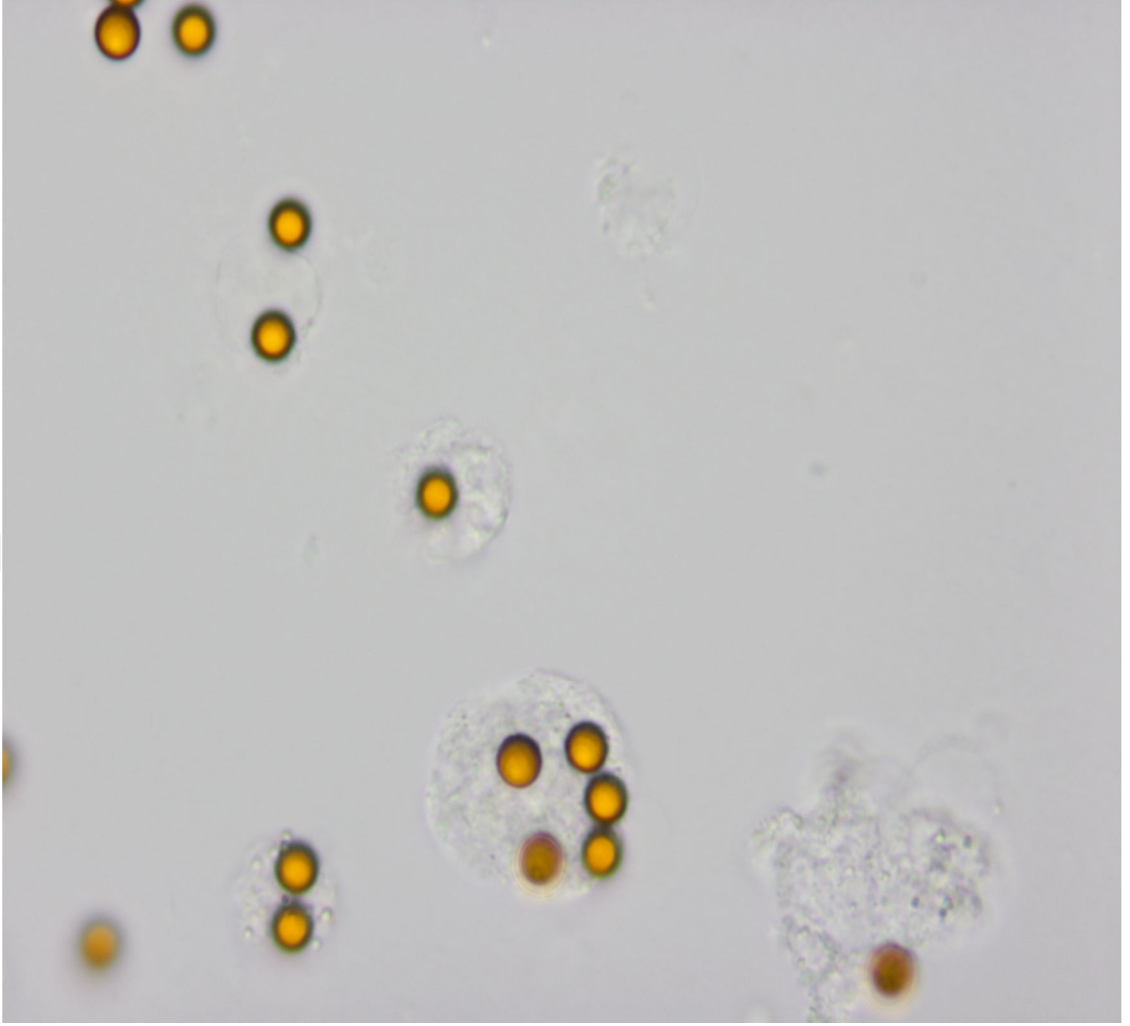


Şekil 10. CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, invert mikroskop, 10x.



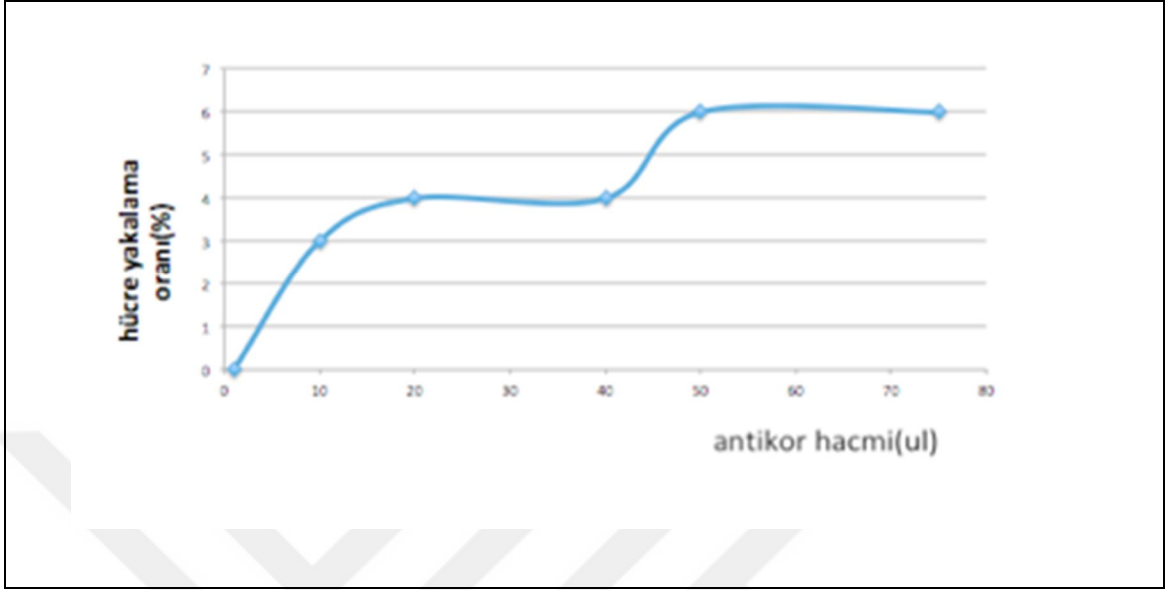
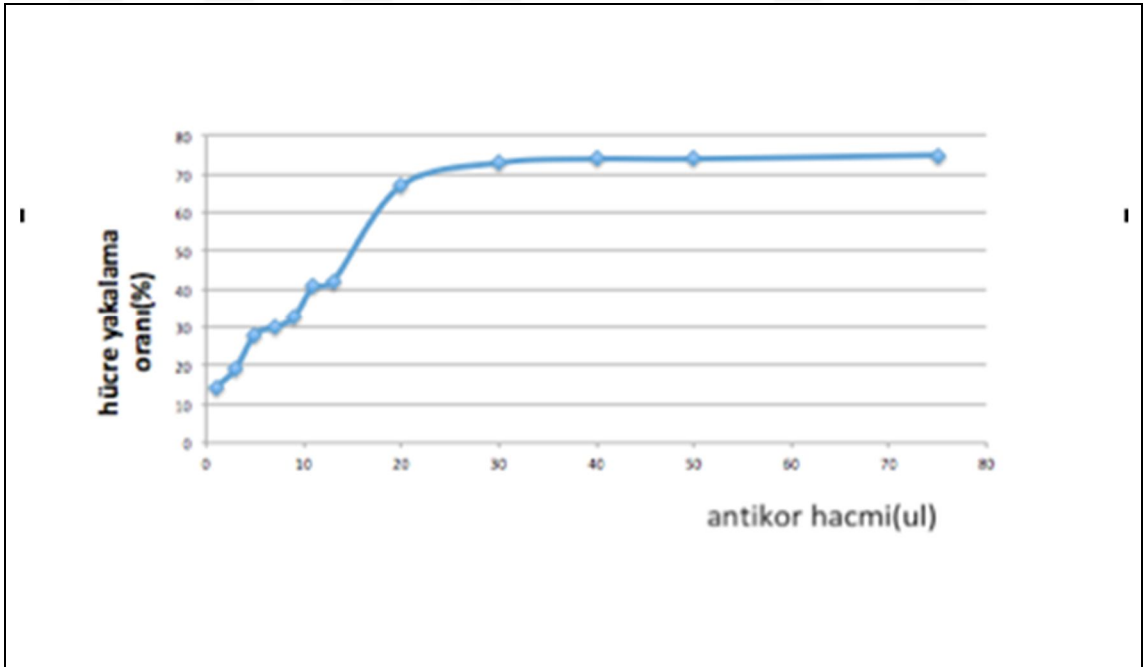
Şekil 11. CD34 ile hücre yakalama deney sonuçları, invert mikroskop, 10x.

Hücre yakalama deney sonuçlarına göre; CD19 beadleri ile CD34 beadlerine göre anlamlı olarak daha yüksek yakalama oranlarına ulaşıldığı mikroskop görüntüleriyle de desteklenmektedir. Şekil 11 ve Şekil 12’de bağlama oranları farklı olmasına rağmen arka planda her ikisinde de bağlanmamış beadler mevcuttur. Bead deneylerinin planlanması ve optimizasyonunda hücre yakalama oranı ve maliyetin yanı sıra bağlanmamış beadlerin oluşturduğu arka plan gürültüsü de önemli bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

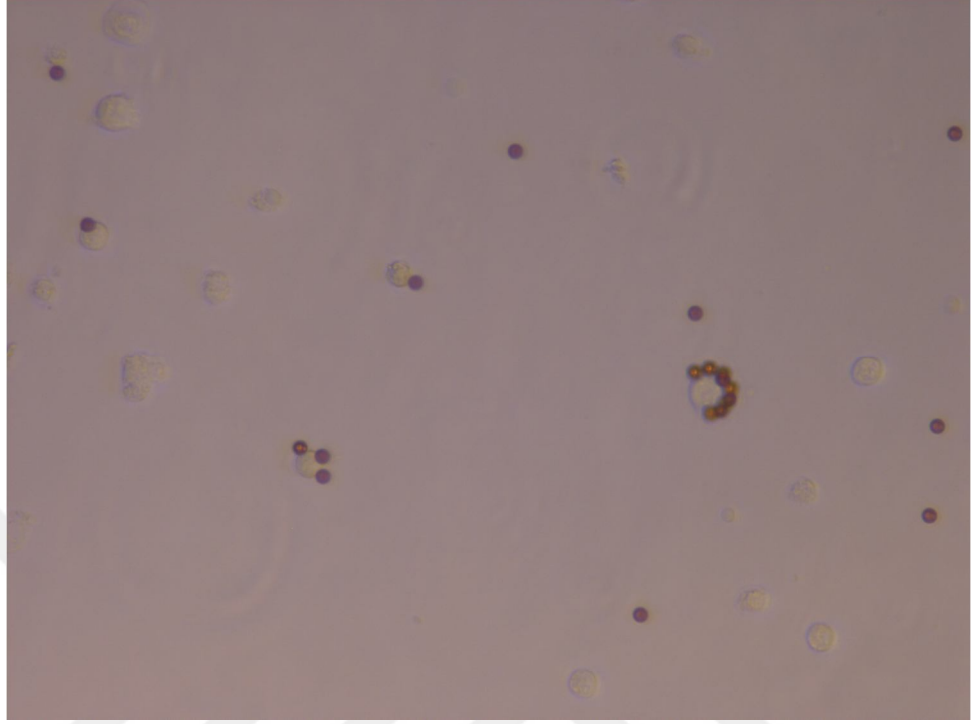


Şekil 12. CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, upright mikroskop, 100x.

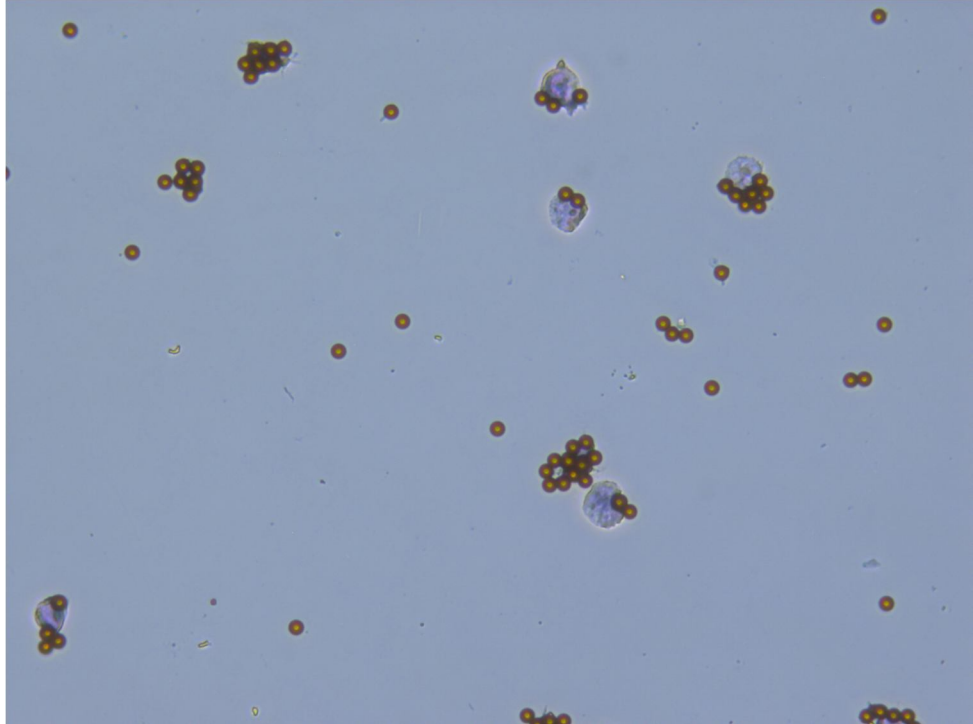
Upright mikroskop görüntülerinde boyutları değişen hücelere ve hatta hücre membran parçalarına CD19 ve CD34 beadlerinin bağlandığı görülmektedir. Hücrelerin morfolojilerindeki değişimler, onların Tampon 1 içerisinde bekletilmesi ve uygulanan manyetik alan ile ilgilidir.

Tablo 7. CD34 beadleri ile hücre yakalama oranları.**Tablo 8.** CD19 beadleri ile hücre yakalama oranları.

4.2. Wright Boyama Bulguları

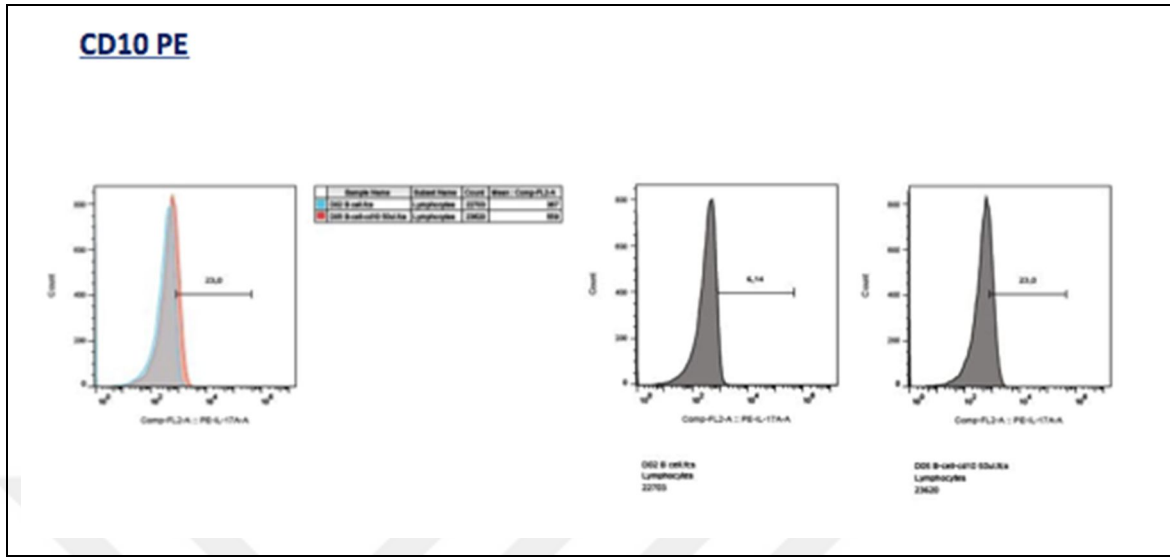


Şekil 13. CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, invert mikroskop, 40x



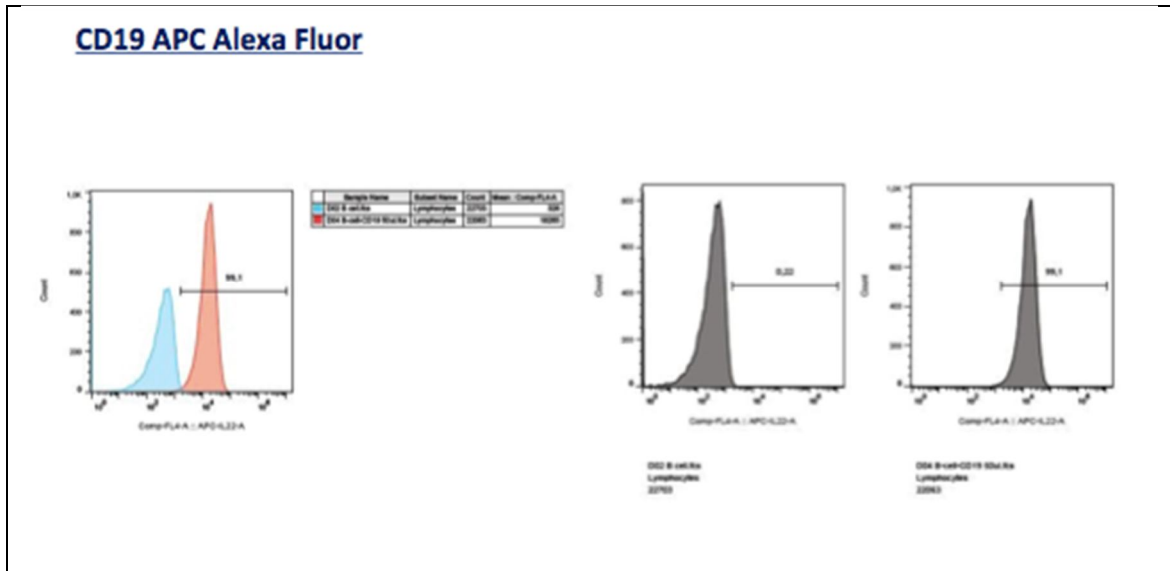
Şekil 14. CD19 ile hücre yakalama deney sonuçları, Wright Boyama, invert mikroskop, 40x

4.3. Akım Sitometri Bulguları



Şekil 15. CCRF-SB hücrelerinde CD10 PE Akım Sitometri sonuçları.

CCRF-SB hücrelerinde CD10 ekspresyon seviyesi %17 bulunmuştur.



Şekil 16. CCRF-SB hücrelerinde CD19 APC Alexa Fluor Akım Sitometri sonuçları.

CCRF-SB hücrelerinde CD19 ekspresyon seviyesi %99.1 bulunmuştur.

4.4. Altın Yüzey İşlemlerine Ait Bulgular



Şekil 18. Altın yüzeyler üzerinde bead-bağlı hücrelerin tutulması.

Silika, Nikel ve Altın katmanlarından oluşan preparatlar kullanılmıştır. Yüzeylerin fonksiyonel özellikteki üst kısmı Au katmanıdır. Bead deneyleri ile yakalanan hücreler altın yüzeyin üzerine pipetajla eklenir. Yaklaşık olarak 10 dk beklenir. Daha sonra yüzeye manyetik alan uygulanır ve beadlerin süperparamanyetik özelliklerinden yararlanılarak hücreler altın yüzey üzerinde yakalanır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lösemiler çocukluk çağında görülen tüm kanser olgularının yaklaşık %30'unu kapsar ve bunun yaklaşık %80'ini ise ALL meydana getirir (18). Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinde bulunan lenfoid öncü hücre olgunlaşma aşamalarının sekteye uğraması ve denetimsiz şekilde artışı ile tanımlanan neoplastik bir anormalliktir (16). Akut lenfoblastik lösemi yakın tarihe kadar çok ölümcül ve korkutucu bir hastalık olarak görülmekteyken son dönemlerdeki bilimsel yaklaşım ve tedavi stratejilerindeki gelişmeler ile bu hastalar için yaklaşık %80 tedavi kür seviyelerine ulaşılmıştır (12). Akut lenfoblastik lösemilerde farklı parametreler ve yöntemler kullanılarak birden fazla sınıflandırma metodu geliştirilmiş ve ALL kendi içinde sınıflandırılmıştır. B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL), B hücrelerinin gelişim evrelerinin ilk basamaklarında ortaya çıkan genetik değişimler neticesinde, B hücrelerin normalden fazla seyretmesi ile meydana gelen ve görece çocukluk çağında daha çok görülen bir lösemidir. Çocukluk çağı lösemilerinin yaklaşık %75'i B hücreli akut lenfoblastik lösemidir (29).

Minimal Residüel Hastalık (Minimal Residual Disease, MRD), morfolojik olarak saptanamayacak seviyede az oranda relaplara yol açan lösemik hücre varlığını ifade etmektedir (31). MRD tayini; kemoterapi tedavisi başlanmasından sonraki 15. günde kemik iliğinden alınacak numunedeki blastik hücre seviyesinin tüm çekirdekli hücre seviyesine bölünmesiyle yapılmaktadır (33). Akut lenfoblastik lösemili hastalarda tedaviye verilen cevabın araştırılmasında minimal residüel hastalık tayininin az veya fazla riskli grupları belirleme noktasındaki güvenilirliğinin yüksek olduğu belirtilmekte, bu sebeple MRD'nin ALL'li olguların tanısında önemli bir tanısal parametre olduğu düşünülmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MRD' nin rutin olarak uygulanan tedavi basamaklarında risk faktörü olarak dahil edilmesi mümkündür (32-34). MRD tayininde kullanılan temel yöntemler FC ve PCR'dır (35).

MRD ölçümünü hedefleyen FC ve PCR yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilecek ölçüm yolları araştırılmaktadır (37-40). Bu araştırmaların ortak noktası ise kanser olgularında hücrelerin ya da hücre metabolizmasıyla ilgili ürünlerin ölçülmeye çalışılmasıdır.

Bu çalışmada temel olarak iki hedef belirlenmişti. Bunlardan birincisi; bir ALL hücre hattı olan CCRF-SB hücrelerini bu hücrelerin yüzeylerinde eksprese ettiği antijenlerden faydalanarak yakalamaktı. İkinci hedef; Silika, Nikel ve Altın katmanlarından oluşan (aktif olan üst yüzeydir ve Altın ile kaplıdır) bir yüzeyi fonksiyonelleştirme işlemiyle temizleyip, antikor immobilize edilebilir hale getirmek ve yüzeyin manyetik özelliğinden faydalanarak bead-bağlı hücreleri bu yüzey üzerinde tutabilmektir.

Hücreleri yakalamak için yüzeyleri CD19 ve CD34 antikorlarıyla kaplı süperparamanyetik özelliğe sahip (manyetik alan varlığında manyetik özellik göstermesine karşın manyetik alan ortadan kaldırıldığında manyetik özellik göstermeyen) beadler kullanılmıştır.

Bead deneylerinde 1 ml tam besiyerinde 500.000 hücre olacak şekilde ayarlanmış, CD19 bead ve CD34 bead miktarı 30 µl olarak belirlenmiştir. Bu değer belirlenmesinde hücre yakalama başarısı, maliyet ve hücrelere bağlanmayan beadlerin oluşturduğu arka plan gürültüsü faktörleri dikkate alınmıştır. CD34 bead miktarı 100 µl'ye kadar çıkarılmış, hücre yakalama oranında anlamlı bir artış gözlenmemiş, buna karşın bağlanmayan beadlerin oluşturduğu arka plandaki gürültü artmıştır. CD19 bead miktarı 100 µl'ye kadar çıkarılmış ve hücre yakalama oranında yaklaşık %2'lik bir artış görülmüştür, buna karşın yine aynı şekilde bağlanmayan beadlerden kaynaklanan arka plan gürültüsü görülmüştür.

Bead ve hücreleri içeren ependorf tüpü 30 dk +4°C'de karıştırıcı üzerinde inkübe edildiğinde beadler hücrelere bağlanır. Bu işlem sonrası manyetik standa alınan ependorf tüpünde beadlere bağlanmayan hücreler yıkamalar ile uzaklaştırılmıştır. Beadlerin yakaladığı hücreler ise ependorf tüpünde kalmıştır. Beadlerin hücre yakalama başarısı; başlangıçta ependorf tüpe eklenen toplam hücre sayısından, yıkamalarda atılan hücre sayısı çıkarılarak bulunmuştur.

Hücre sayım işlemleri invert mikroskopta Thoma lamı ve Tripan mavisi kullanılarak yapılmıştır. Yapılan sayımların kontrolü olarak aynı örnekler Tam Kan Sayım (CBC) cihazında sayılmıştır. Sayım sonuçları karşılaştırıldığında; CBC sonuçlarının anlamlı olarak daha yüksek (%10 ve daha fazla) değerler verdiği görülmüştür. CBC cihazında yapılan ölçüm sonuçlarında görülen bu pozitif hata, bu cihazın rutin kan sayımları için geliştirilip optimize edilmiş olmasından ve bir ALL hücre hattı olan CCRF-SB hücreleri ve bu hücrelerin içerisinde bulunduğu tam besiyeri ortamı için ideal olmamasından kaynaklanmaktadır.

Beadler ile hücre yakalama deney sonuçlarına bakıldığında, CCRF-SB hücreleri CD19 beadleri kullanıldığında CD34 beadlerine göre daha fazla yakalanmıştır. (Sırasıyla %75 ve %10'dan az). Bu farkın nedeni hücrelerin yüzeylerinde bulunan CD19 ve CD34 antijenlerinin ekspresyon seviyeleri arasındaki farktan kaynaklanıyor olabilir diye düşünülmüş ve hücre yüzey antijen ekspresyon analizi için FC analizleri yapılmıştır. FC sonuçlarına göre; CCRF-SB hücrelerinde CD19 %99,1, CD34 %17 eksprese edilmektedir. (Bu oranlar hastadan alınan kandan izole edilen B-ALL hücrelerinde farklılık gösterebilir).

FC analiz sonuçlarıyla birlikte bead yakalama deneyleri sonuçlarında CD19 ve CD34'ün neden bu kadar farklı sonuçlar verdiği daha net görülebilmektedir. CD19 beadleri kullanılarak her 100 hücreden yaklaşık 75 tanesi yakalanabilmiştir ve bu 100 hücreden yaklaşık 99 tanesi CD19 antijenini eksprese etmektedir. CD34 beadleri kullanılarak her 100 hücreden 10 veya daha az sayıda hücre yakalanabilmiştir ve bu 100 hücreden yaklaşık 17 tanesi yüzeyinde CD34 antijenini eksprese etmektedir.

Altın kaplı yüzeylerin fonksiyonelleştirme çalışmaları metod kısmında belirtilen protokol ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda altın yüzey preparatlarının görüntülenmesi konusunda çeşitli zorluklar yaşanmıştır. Altın yüzeyler ışığı geçirmediği için bu yüzeylere immobilize edilen antikörlere hücre bağlanmalarını gösterebilmek Elektron Mikroskopu ve benzer diğer ölçüm yolları kullanılmalıdır. Altın kaplı yüzeyler, içeriğindeki Nikel dolayısıyla manyetik özellikler göstermektedir. Bu yüzeylere süperparamanyetik özelliğe sahip beadler ile yakalanan hücreler eklenmiş ve manyetik alan uygulanmıştır. Böylece beadlerin, beadler hücrelere tutunmuş olduğu için

dolayısıyla hücrelerin bu yüzeyler üzerinde tutulabilmesi sağlanmış ve görüntülemeleri yapılmıştır.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; B-ALL hücrelerinin çeşitli antikorlar ile kaplı süperparamenyetik beadler kullanılarak yakalanabileceğini ve bead-hücre yapılarının yüzey üzerinde tutulabileceğini gösterdik. Bu yöntem ALL dışında pek çok hastalığın tanısı ve tedavisinin izlenmesinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu yöntemde kullanılan antikorların ve beadlerin biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri değiştirilerek çok daha geniş bir uygulama ve kullanım alanı oluşturulabilir.



REFERANSLAR

1. Abbas, K., Abul, L.A.H., Basic İmmunology, Functions and Disorders of the immune system. Elsevier Inc., 2001.
2. Yalçın, I., Bağışıklık Sistemi ve Hastalıkları. Đç: Neyzi O, Ertuğrul T (editörler). Pediatri. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2002. 446-470.
3. Sun, T., Flow Cytometry and Immunohistochemistry for Hematologic Neoplasms, 1st Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
4. Hoffbrand, A.,C.D., Tuddenham E.G.D, Postgraduate Haematology, Fifth Edition. Blackwell Publishing, 2005.
5. Kondo, M., et al., Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. Curr Opin Genet Dev, 2001. 11(5): p. 520-6.
6. Özdemirli, S., B hücreli akut lenfoblastik lösemilerde pax5 geninin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010.
7. Özer, V., Akut lenfoblastik lösemi ve kronik myeloid lösemi ön tanılı olgularda füzyon gen ekspresyonlarının analizi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2011.
8. LeBien, T.W. and Tedder T.F., B lymphocytes: how they develop and function. Blood, 2008. 112(5): p. 1570-80.
9. Van, Z.M.C., et al., Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. J Immunol, 2005. 175(9): p. 5912-22. 16.
10. Biondi, A., Masera G., Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica, 1998. 83(7): 651-659.
11. Williams, W.J., Beutler E., Litchman M.A., Coler B.S., Kipps T.J., Mauner, A.M. William's Hematology. McGraw Hill Company, New York, 1991. 2209-2349. Woerden,

12. Niemeyer, C.M., Sallan S.E., Acute lymphoblastic leukemia: In Nathan DG, Oski FA (eds). Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. 1249-1287.
13. Ünal, Ş., Tuncer A.M., Lösemide epidemiyoloji, tanısal yaklaşım ve sınıflandırma. Katkı Pediatri dergisi, 2004. 338-349.
14. Ar, M.C., Öngören Ş., Ferhanoğlu B., Aydın Y., Eşkazan E., Soysal, T., Ülkü, B., Başlar, Z., Çetin, G., Akut Lösemiler. Hematoloji Ders Kitabı, İstanbul, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları 2008.
15. Lanskowsky, P., Leukemias In: P. Lanzkowsky (ed). Manual of Peadiatric Hematol and Oncol 4th ed. Elsevier Academic Press. San Diego, 2005. 415-53
16. Gale, R.E., Wainscoat, J.S., Clonal analysis using X-linked DNA polymorphisms. Br J Haematol 1993. 85: 2.
17. Mauer, A.M., Therapy of acute lymphoblastic leukemia in childhood. Blood 1980. 56:1-10
18. Linet, M.S., Ries L.A., Smith, M.A., Tarone, R.E., Devesa, S.S., Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. J Natl Cancer Inst 1999. 91: 1051-8.
19. Pieters, R., Carroll, W.L., Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatr Clin N Am 2008. 55: 1–20 17.
20. Arceci, R.J., Hann I.M., Smith O.P., Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia. In Arceci RJ, Hann IM, Smith OP editors. Pediatric Hematology. 3th ed Malden, Massechusetts Blackwell, 2006. 450-81
21. Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., Willemze, R., Adult acute lymphoblastic leukemia. Criticals in Oncology/Hematology. 2004. 50:223-261. 31.
22. Bhatia, S., Sather, H.N., Heerema, N.A., Trigg, M.E., Gaynon, P.S., Robison, L.L., Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2002. 100:1957-64 15.
23. Rooney, D.H., Czepulkowski, B., Gibbons B., Human Cytogenetics, Malignancy and Acquired Abnormalities. The Practical Approach Series, Oxford University Press, 2001.
24. Heil, G., Gunsilius, E., Raghavachar, A., et al., Ultrastructural demonstration of peroxidase expression in acute unclassified leukemias: correlation to immunophenotype and treatment outcome. Blood 1991;77:1305–12.

25. Camitta, B.M., Childhood Leukemias by C-H Pui MD (ed); Cambridge University Press; 1999, 567 pages. *Leukemia*. 2000 ;14:1332.
26. Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M.T., French-American British (FAB) Cooperative Group: the morphological classification of acute leukemias—concordance among observers and clinical correlation. *Br J Hematol* 1981;47:553-97.
27. Dewald, G.W., Ketterling, R.P., Wyatt, W.A., Stupca, P.J., Cytogenetic studies in neoplastic hematological disorders.32:3-30.
28. Ağaoğlu, L., Akçay, A., ALL: Tedavi. Anak S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G (editörler). *Pediyatrik Hematoloji İstanbul Medikal Yayıncılık* 2011; 597-609 47.
29. Look, A.T., Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, 1997. 278(5340): p. 1059-64.
30. Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., Willemze, R., Adult acute lymphoblastic leukemia. *Criticals in Oncology\Hematology*. 2004; 50:223-261. 5-Gökbuget
31. Mopett, J., Burke, A.A.G., Steward, C.G., et al., The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Pathol* 2003; 56:249-53.
32. Van, Dongen J.J., Seriu, T., Panzer-Grumayer Er., et al., Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998; 352:1731-8.
33. Coustan-Smith, E., Behm F.G., Sanchez J., et al., Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1998; 351:550-4.
34. Jacquy, C., Delepaut, B., van Daele, S., et al., A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997; 98:140.
35. Patiroğlu, T., (2011). *Lösemide Minimal Rezidüel Hastalık*. Paper presented at the 37. Ulusal Hematoloji Kongresi, Ankara.
36. Gaipa, G., Basso, G., Biondi, A., & Campana, D. (2013). Detection of Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*, 84(6), 359-369. doi: Doi 10.1002/Cyto.B.21101.□

37. Nagrath, S., Sequist, L.V., Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Toner, M., Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. 2007. *Nature*, 450(7173), 1235-U1210. doi: Doi 10.1038/Nature06385.
38. Zheng, S., Lin, H., Liu, J.Q., Balic, M., Datar, R., Cote, R.J., Tai, Y.C., Membrane microfilter device for selective capture, electrolysis and genomic analysis of human circulating tumor cells. 2007. *Journal of Chromatography A*, 1162(2), 154-161. doi: Doi 10.1016/J.Chroma.2007.05.064.
39. Chun-li, C., Wanfeng, H., Aamer, M., Daniela, E., Cagri A.S., High-Throughput Immunomagnetic Cell Detection Using a Microaperture Chip System. 2014. *IEEE Sensors Journal*, 14(9), 3008-3013.
40. Li, P., Stratton, Z.S., Dao, M., Ritz, J., Huang, T.J., Probing circulating tumor cells in microfluidics. 2013. *Lab on a Chip*, 13(4), 602-609. doi: Doi 10.1039/C2lc90148j.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ahmet ÇİFÇİ

Uyruğu : Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 24 Ekim 1989, Mersin

Medeni Durum : Bekar

Tel : 0536 958 59 43

Email : ahmetanamur35@gmail.com

Yazışma Adresi : Tuna Cd. Emirgan Apt. Kat:8 No: 25 Kocasinan/ Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Erciyes Üni. SBE Tıbbi Biyokimya AD	2016
Lisans	Ege Üni. Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü	2013
Lise	Anamur Lisesi	2007

YABANCI DİL

İngilizce