T.C.
ERCİYESÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

MULTİPL MİYELOM HÜCRELERİNE KARŞI OTOLOG KÖK HÜCRE VE MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEN DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİLMESİ (TÜMÖR AŞISI ÜRETİLMESİ)

Hazırlayan
Gülşen BUĞDAY

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL

Yüksek Lisans Tezi

ŞUBAT 2018
KAYSERİ

T.C.
ERCİYESÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

MULTİPL MİYELOM HÜCRELERİNE KARŞI OTOLOG KÖK HÜCRE VE MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEN DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİLMESİ (TÜMÖR AŞISI ÜRETİLMESİ)

Hazırlayan
Gülşen BUĞDAY

Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL

Yüksek Lisans Tezi

ŞUBAT 2018
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.

Gülşen BUĞDAY

YÖNERGEYE UYGUNLKUK SAYFASI

"Multipl Miyelom Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi (Tümör Aşısı Üretimi)" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Gülşen BUĞDAY

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNAL

Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Ali ÜNAL danışmanlığında **Gülşen BUĞDAY** tarafından hazırlanan **"Multipl Miyelom Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi (Tümör Aşısı Üretimi) "** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Kök Hücre** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

01/02/2018

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Ali ÜNAL

(İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

(İmmünoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Yusuf BARAN

(Abdullah Gül Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve .....sayılı kararı onaylanmıştır.

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

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşumu ve gelişimi sürecinde yardım eden, kendisinin yapmış olduğu tümör aşısı çalışmaları ile tezimin ana fikrinin oluşumunda ve hayata geçirilmesinde, eğitim sürem boyunda her daim yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNAL'a,

Tezin hayata geçirilmesinde gerekli akım sitometrik testler ve diğer materyallerin sağlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e ve akım laboratuvarında beraber çalışmaktan sonsuz keyif aldığım ve yardımlarını esirgemeyen Biyolog Huriye ÇELİKZENCİR ve Biyolog Esra AKPINAR'a,

Yardımları için değerli hocam Prof. Dr. Yusuf BARAN'a, Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi Kök Hücre Laboratuvarında çalışan Teknisyen Mahmut ÇİÇEK'e,

Bu süreçte varlıkları ile bana güç veren, hayatım boyunca karşılaştığım tüm zorluklar karşısında yardım ve desteklerini esirgemeyen, kendimi geliştirmemi sağlayan, eğitimin önemliliğini bana benimseten, her daim yanımda olan, sevgi ve saygıyla bağlı olduğum aileme; canım babam İsa BUĞDAY'a, canım annem Sevinç BUĞDAY'a ve ablalarım Rana AKSOY'a ve Raziye ASATEKİN'e, enişte Recep AKSOY'a sonsuz teşekkürler…

Gülşen BUĞDAY

Kayseri, Şubat 2018

MULTİPL MİYELOM HÜCRELERİNE KARŞI OTOLOG KÖK HÜCRE VE MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEN DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİLMESİ (TÜMÖR AŞISI ÜRETİMİ)

Gülşen BUĞDAY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Anabilimi

Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2018

Danışman: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ÖZET

Kanser aşıları, biyolojik tepki değiştiriciler olarak bilinen bir madde sınıfına aittir. Kanser aşısı, hem tümöre karşı spesifik olmasından dolayı konvansiyonel tedavilere göre yan etkisi daha az, hem de hafıza özelliğine sahip olmasından dolayı daha uzun koruma özelliğine sahiptir. Biyolojik yanıt modifikatörleri, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlar ve hastalıklarla mücadele kabiliyetini uyararak veya onararak çalışır.

Amaç; Dendritik hücre bazlı otolog kanser aşısının üretiminde kullanılabilecek dendritik hücrelerin elde edilip edilemediğini tespit etmek ve bunun için kullanılan sitokin kombinasyonunun olumlu sonuçlar doğurduğunu gösterebilmek üzerine uygulamalar yapıldı. Bu uygulamaların sonuçları hücrelerin viabilite ve apoptoz testinin yapılmasıyla ve moleküler yüzey belirteçleri kullanılarak akım sitometrik analizlerle kanıtlandı.

Yöntem; Otolog nakil için MM hastasından toplanan kök hücre ve mononükleer hücreler ile tümör hücre lizatı birleştirildi. Kontrol grubunun analizleri için bu karışımdan numune alındı. Daha sonra karışıma IL-4 ve GM-CSF sitokinleri eklenerek, doku hücre flasklarına ekimi gerçekleştirildi. Bu flaskların %5'lik CO_2, 37^o C sıcaklık, nemli ortama sahip inkübatörde inkübasyonu sağlandı. Kültür takip saati tamamlanan flasklardan alınan nunumelerin canlılık ve hücre sayım işlemleri akım sitometri laboratuvarında yapıldı.

Sonuçlar; Tümör aşısı geliştirebilmek için gerekli hücre grubu olan olgun dendritik hücrelerin üretimi doku hücre flaskları aracılığıyla sağlandı.

Anahtar Kelimeler: Multipl miyelom, dendritik hücre, tümör aşısı, hücre kültürü

GENERATION OF DENDRITIC CELLS FROM AUTOLOGOUS STEM CELL AND MONONUCLEAR CELLS AGAINST MULTIPLE MYELOMA CELLS (TUMOR VACCINE PRODUCTION)

Gülşen BUĞDAY

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Sciences

Master's Thesis, February 2018

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜNAL

ABSTRACT

Cancer vaccines belong to a matter class which is known as reaction converter. Cancer vaccine both has less side effect when compared with conventional treatments because of being specific against tumor and it has a long protective feature because of having memory characteristic. Biological response modificators work by stimulating and repairing immune system's fighting ability with infections and diseases.

Objective: İmplementations have been done to determine whether to get dendritic cells to be used in producing dendritic cell-based autologous cancer vaccine and to show ctokine combination used for this has positive effects. The results of these implementations have been proved with current sitometric analyses by doing cell viability and apoptosis test.

Method: For autologous transfer mononuclear cells and stem cell taken from MM patient and tumor cell lysate have been united. Samples from this triturate have been taken for the analyses of the control group. Later IL-4 and GM-CSF cytokines have been added to the triturate and planting onto the tissue cell flasks has been realized. The incubation of the flask has been enabled in the incubator which has a temperature of 37^0C of and %5 CO_2, stimina and cell counting processes of the samples taken from flaks whose culture tracking hour has been completed has been done in the flow cytometry laboratory.

Conclusion; Mature dendritic cells required to develop tumor vaccine were generated via tissue culture flask in this study.

Keywords: Multiple myeloma, dendritic cell, tumor vaccine, cell culture

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
ONAY iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR VE SİMGELER xii
TABLOLAR VE GRAFİKLER LİSTESİ xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. MULTİPL MİYELOM 3
2.1.1. Epidemiyoloji 3
2.1.2. Etyoloji 4
2.1.3. Patogenez ve Patofizyoloji 5
2.1.4. Klinik Özellikler 7
2.1.5. Tanı 8
2.1.6. Evreleme ve Prognoz 9
2.1.7. Tedavi 12
2.2. KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU 13
2.2.1. Hematopoetik Kök Hücre Nakli 13
2.2.1.1. Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli 14
2.2.1.1.1. Multipl Miyelom Hastasının OHKHN Adayı Olması. 15
2.3. KÖK HÜCRELERİN MOBİLİZASYONU 16
2.3.1. Kök Hücrelerin Mobilizasyon Teknikleri 17

2.3.1.1.Kemoterapi ile Mobilizasyon 17

2.3.1.2. Hematopoetik Büyüme Faktörleri ile Mobilizasyon 17

2.3.1.3. Büyüme Faktörü ve Kemoterapi ile Mobilizasyon 17

2.4. KÖK HÜCRE TOPLANMASI (AFEREZ)..... 17

2.5. KANSER VE İMMÜN SİSTEM..... 18

2.5.1. Kanser İmmünoterapisi..... 22

2.5.1.1. İmmünoterapinin Avantajları ve Dezavantajları..... 22

2.5.1.2. Multipl Miyelom İmmünoterapisi 23

2.5.1.3. Kanser Aşısı 23

2.5.1.3.1. Kanser Aşısının Tipleri..... 24

2.6. DENDRİTİK HÜCRELER VE DENDRİTİK HÜCREDEN KANSER AŞISI ELDE EDİLMESİ..... 27

2.6.1. Dendritik Hücrenin Tanımı..... 27

2.6.2. Dendritik Hücrenin Tarihçesi..... 27

2.6.3. Dendritik Hücre Fenotipi, Dağılımı ve Alt çeşitleri..... 28

2.6.3.1. Myeloid Dendritik Hücreler..... 30

2.6.3.2. Lenfoid Dendritik Hücreler (Plasmasitoid DH)..... 31

2.6.3.3. Interferon-Üreten Katil Dendritik Hücreler (Interferon-producing Killer DC=IKDC) 32

2.6.4. Reseptör ve Sitokinleri..... 32

2.6.5. Matür ve İmmatür Dendritik Hücreler..... 33

2.6.6. Fonksiyonları..... 35

2.6.7. Dendritik Hücre Kanser Aşısı Elde Edilmesi..... 36

2.6.7.1. Multipl Miyelom İçin Dendritik Hücre Bazlı Kanser Aşısı..... 36

2.7. AFEREZ ÜRÜNÜ İLE TÜMÖR HÜCRE LIZATININ ELDE EDILMESI VE ANALIZ IŞLEMLERI 37

2.7.1. Tümör Hücre Lizatı Elde Edilmesi (Kemik iliği aspirayasyonu) 37

2.7.1.1. Miyelom Tanısı Konmasına Yönelik Akım Sitometrik Analiz . 38

2.7.2. Multipl Miyelom Hastasının Kök Hücre Aferezi 39

2.7.2.1. Aferez Ürününün Hücre Sayımı ve Canlılık Testinin Yapılması 40

3. GEREÇ VE YÖNTEM 42

3.1. GEREÇLER 42

3.1.1. Kullanılan Cihazlar 42

3.1.2. Plastik Malzemeler 43

3.1.3. Kullanılan Kitler, Sitokinler ve Sitokinler 43

3.2. YÖNTEM 44

3.2.1. Hastalar 44

3.2.1.1. Otolog Kök Hücre Nakil İçin Hücreleri Toplanmış MM Hastaları 44

3.2.1.2. Kemik İliği Kullanılan MM Hastaları 45

3.2.2. Aferez Ürünü ve Tümör Hücre Lizatının Birleştirilmesi 47

3.2.3. Hücre Kültürü Için Hazırlık Süreci 49

3.2.4. Dendritik Hücre Kültürü Yapım Aşaması 49

3.2.5. Kültür Öncesi ve Sonrası Analizleri 50

3.2.5.1. Kültür Öncesi ve Sonrası Hücrelerin Viabilite ve Apoptoz Analizi 50

3.2.5.2.Kültür Öncesi ve Kültür Sonrası Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi 51

4. BULGULAR 53

4.1. DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİMİ İÇİN YAPILAN UYGULAMALAR 54

4.1.1. 1.UYGULAMA 54

4.1.2. 2. UYGULAMA 60

4.1.3. 3. UYGULAMA 69

4.1.4. 4. UYGULAMA 78

4.1.5. 5. UYGULAMA 87

4.1.6. 6. UYGULAMA 96

4.1.7. 7. UYGULAMA 105

4.1.8. 8. UYGULAMA 113

4.1.9. 9. UYGULAMA 122

4.1.10. 10. UYGULAMA 131

4.2. AKIM SITOMETRIK ANALIZLERIN KÜLTÜR SAATLERİNE GÖRE YORUMU 139

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 146

6. KAYNAKLAR 151

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR VE SİMGELER

MM : Multipl Miyelom

OKH : Otolog Kök Hücre

OKHN : Otolog Kök Hücre Nakli

AKHN : Allojeneik Kök Hücre Nakli

MNH : Mononükleer Hücre

DH : Dendritik Hücre

WBC : Beyaz Kan Hücresi

APC : Antijen Sunan Hücre

KİT : Kemik İliği Transplantasyonu

Ig : İmmünoglobülin

CD : Cluster of Differentiation

IL-4 : İnterlökin-4

GM-CSF : Granülosit Makrofaj Koloni Stimülan Faktör

G-CSF : Granülosit Koloni Stimülan Faktör

PBS : Phosphate Buffer Saline

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS : Fetal Bovine Serum

MNS : Mutlak Nötrofil Sayısı

µl : Mikrolitre

PI : Propidium Lodide

7-AAD : 7-Amino-Aktinomisin D

MP : Melfelan, Predrizon ilaçlarını içeren bileşim tedavisi

VAD : Vinkristin, Doksorubisin ve Deksametazon

IL-6 : İnterlökin-6

IL-1β : İnterlökin1β

VEGF : Vasküler Endotel Growth Faktör

MIP-1α : Makrofaj İnflamatuar Protein1α

BMSC : Kemik İliği Stromal Hücresi

CEP : Sirkulatuar Endotelial Progenitör

DH : Dendritik Hücre

EC : Endotelial Hücre

ECM : Ekstrasellüler Matriks

HKH : Hemapoetik Kök Hücre

NK : Naturel Killer / Doğal öldürücü hücre

CRP : C-Reaktif Protein

ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinase

JAK2 : Janus Kinaz 2

STAT3 : Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktive Edici 3

PI3K : Fostatidilinositol 3-Kinaz

NFκB : Nükleer Faktör kappa B

IGF1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1

IAP : Apoptoz İnhibitörü Protein

VEGF : Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü

TNF : Tümör Nekroz Faktör

VLA : Very Late Antigen

PGE2 : Prostoglandin E2

MCL1 : Miyeloid Hücre Lösemi Sekansı 1

IMWG : Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu

DS : Durie-Salmon

EWGCCA : Avrupa Klinik Hücre Analizi Çalışma Grubu

ISHAGE : Uluslararası Hematoterapi ve Graft Mühendisliği Derneği

ISS : Uluslararası Evreleme Sistemi

KH : Kök Hücre

HKH : Hematopetik Kök Hücreler

HKHN : Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu/Nakli

AKHN : Allojeneik Kök Hücre Transplantasyonu/Nakli

APKHN : Allojeneik PeriferikKök Hücre Transplantasyonu/Nakli

KİT : Kemik İliği Transplantasyonu

GVHH : Greft Versus Host Hastalığı

HLA : İnsan Lökosit Antijeni

OPKHN : Otolog Periferik Kök Hücre Nakli

APKHN : Allojeneik Periferik Kök Hücre Nakli

MDSC : Miyeloid Kaynaklı Baskılayıcı Hücre

MDCS : Miyeloid Tip Dendritik Hücre

T_{reg} : T Regülatuar

Th : T hücre

cDH : Konvansiyonel Dendritik Hücre

IKDC : İnterferon- Üreten Öldürücü Dendritik Hücre

CTC : Kanda dolaşan tümör hücre

M1 : Proinflamatuar yanıt

MKBH : Miyeloid Kaynaklı Baskılayıcı Hücre

LH : Langerhans Hücresi

FITC : Floresan İzolorescein İsotiyosiyanat

p53 : Tümör Protein 53 geni

DNA : Deoksiribonükleik Asit

cDNA : Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit

mRNA : Haberci Ribonükleik Asit

FLT3 : Fms Releated Trozin Kinaz-3

BDCA2 : Lökosit yüzey antijeni

CD45 : Ortak lökosit antijeni

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

Id : İdiyotip

ALL : Akut Lenfoblastik Lösemi

KLL : Kronik Lenfositik Lösemi

FL : Foliküler Lenfoma

GVHH : Graft Versus Host

rpm : Bir dakikadaki devir sayısı

TABLOLAR VE GRAFİKLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Multipl miyelom etyolojisinde rol alan faktörler 5

Tablo 2.2. Multipl miyelomlu hastalarda semptom ve bulguları..... 8

Tablo 2.3. Multipl miyelomun majör ve minör tanı kriterleri 9

Tablo 2.4. Durie- Salmon Evreleme Sistemi 10

Tablo 2.5. Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS) 11

Tablo 2.6. Multipl miyelomda prognostik faktörler..... 11

Tablo 2.7. Dendritik hücrelerin matürasyon özellikleri 34

Tablo 3.1. Otolog kök hücre nakil MM hastaların..... 45

Tablo 3.2. Kemik iliği kullanılan MM hastası..... 46

Tablo 3.3. Doku kültür flaskı içine eklenen maddeler 50

Tablo 4.1. 1. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 58

Tablo 4.2. 2. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 66

Tablo 4.3. 3. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 75

Tablo 4.4. 4. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 84

Tablo 4.5. 5. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 93

Tablo 4.6. 6. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 102

Tablo 4.7. 7. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 111

Tablo 4.8. 8. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 119

Tablo 4.9. 9. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri..... 128

Tablo 4.10. 10. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri 137

Grafik 4.1. HLA-DR ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu 139

Tablo 4.11. HLA-DR antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri 140

Grafik 4.2. CD80 ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu 141

Tablo 4.12. CD80 antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri..... 141

Grafik 4.3. CD83 ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu 142

Tablo 4.13. CD83 antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri..... 143

Grafik 4.4. CD86 ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu 144

Tablo 4.14. CD86 antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri..... 144

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanserde immün sistemin rol 19

Şekil 2.2. Kanserde immün sistemin düzenlenmesi 20

Şekil 2.3. Kanser oluşumunda immün sistemde rol oynayan hücreler 21

Şekil 2.4. Kanser hastalıklarında monositlerin rolü 21

Şekil 2.5. İmmünoterapi ve kanser aşı çeşitleri 25

Şekil 2.6. Dendritik hücre alt tipleri ve etkileşimde bulundukları T hücre çeşitleri 29

Şekil 2.7. Dendritik hücrelerin gelişimi 31

Şekil 2.8. Dendritik hücrelerin matürasyonu esnasındaki değişimi 33

Şekil 3.1. Çalışma Yönteminin Genel Basamakları 48

Şekil 4.1. 1. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 54

Şekil 4.2. 1. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 55

Şekil 4.3. 1. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 56

Şekil 4.4. 1. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 56

Şekil 4.5. 1. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 57

Şekil 4.6. 1. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 57

Şekil 4.7. 2. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 60

Şekil 4.8. 2. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 61

Şekil 4.9. 2. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 62

Şekil 4.10. 2. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 63

Şekil 4.11. 2. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 64

Şekil 4.12. 2. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 64

Şekil 4.13. 2. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 65

Şekil 4.14. 2. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 65

Şekil 4.15. 3. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 69

Şekil 4.16. 3. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 70

Şekil 4.17. 3. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 71

Şekil 4.18. 3. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 72

Şekil 4.19. 3. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 73

Şekil 4.20. 3. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 73

Şekil 4.21. 3. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 74

Şekil-4.22. 3. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 74

Şekil 4.23. 4. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 78

Şekil 4.24. 4. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 79

Şekil 4.25. 4. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 80

Şekil 4.26. 4. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 81

Şekil 4.28. 4. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 82

Şekil 4.29. 4. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 83

Şekil 4.30. 4. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 83

Şekil 4.31. 5. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 87

Şekil 4.32. 5. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 88

Şekil-4.33. 5. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 89

Şekil 4.34. 5. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 90

Şekil 4.36. 5. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 91

Şekil 4.37. 5. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 92

Şekil 4.38. 5. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 92

Şekil 4.39. 6. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 96

Şekil 4.40. 6. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 97

Şekil 4.41. 6. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 98

Şekil 4.42. 6. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 99

Şekil 4.43. 6. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 100

Şekil 4.44. 6. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 100

Şekil 4.45. 6. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 101

Şekil 4.46. 6. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 101

Şekil 4.47. 7. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 105

Şekil 4.48. 7. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 106

Şekil 4.49. 7. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 107

Şekil 4.50. 7. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 108

Şekil 4.51. 7. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 109

Şekil 4.52. 7. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 109

Şekil 4.53. 7. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 110

Şekil 4.54. 7. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1. tüpünün akım sitometrik analizi 110

Şekil 4.55. 8. uygulamanın kültür öncesindeki canlılık oranı 113

Şekil 4.56. 8. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. Tüplerinin akım sitometrik analizi 114

Şekil 4.57. 8. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 115

Şekil 4.58. 8. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 116

Şekil 4.59. 8. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 117

Şekil 4.60. 8. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 117

Şekil 4.61. 8. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 118

Şekil 4.62. 8. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 118

Şekil 4.64. 9. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 123

Şekil 4.65. 9. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 124

Şekil 4.66. 9. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 125

Şekil-4.67. 9. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı 126

Şekil 4.68. 9. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 126

Şekil 4.69. 9. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 127

Şekil 4.70. 9. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 127

Şekil 4.71. 10. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı 131

Şekil 4.72. 10. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 132

Şekil 4.73. 10. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı 133

Şekil 4.74. 10. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 134

Şekil 4.76. 10. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 135

Şekil 4.77. 10. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı 136

Şekil 4.78. 10. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi 136

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl Miyelom (MM) anemi, litik kemik lezyonları, böbrek fonksiyon bozukluğu, hiperkalsemi, hipogammaglobulinemi ve artmış enfeksiyon riski ile giden kemik iliğinde plazma hücrelerinin klonal çoğalması ile karakterize malign bir hastalıktır (1,2). MM tanısı için yukarıda bahsi geçen klinik bulguların yanı sıra kemik iliğinde en az %10 klonal plazma hücresi ve/veya dokuda plazmasitom varlığı ile serum ve/veya idrarda monoklonal (M) proteinin gösterilmesi gerekir (3). MM hematolojik kanserlerin % 10'unu, tüm kanserlerin % 1'ini oluşturan yaygın malign hematolojik hastalıklar arasında yer almaktadır (4).

Yeni geliştirilen ilaçların kullanıma girmesi ve otolog hematopoetik kök hücre nakli (OHKHN) ile yüksek tedavi oranlarına ulaşılmasına rağmen, halen uzun süreli tam kür sağlanamayan bir hastalık olmaya devam etmektedir (5). Malign hastalıklarda; radyoterapi, cerrahi ve kemoterapi gibi standart tedaviler uygulanmasına rağmen direnç gelişen, cevap alınamayan veya nüks gelişen hastalarda; tümör aşısı olarak da bilinen dendritik hücre (DH) immunoterapisi gibi alternatif tedavi uygulamaları yapılmaktadır (6). DH'ler, antijen sunumunda görev almaları nedeniyle, bağışık yanıtın etkene karşı harekete geçirilebilmesinde kullanılabilecek önemli hücre gruplarından biridir. Bu özelliklerinden dolayı DH'lerin spesifik bağışık yanıt oluşturmada aşı yöntemi olarak kullanılabileceği fikri en çok kanser hastalıkları için düşünülmektedir (7,8). Tümör aşısı minimal rezidüel hastalığın olduğu vakalarda ve kanserin erken evresinde uygulandığında, daha iyi sonuçların alınabileceği bilinmektedir (7). Kanser aşılaması, anti-tümör immünitesini üretmek, artırmak veya bunların bir kombinasyonunu arayan bir dizi yaklaşım içermektedir. Bu amaca ulaşmak için birçok yaklaşım vardır. Bunlardan bazıları antijen sunan hücrelerle (APC'ler) veya diğer immün modülatörlerle veya tümörü doğrudan şekillendiren, tümör antijenlerinin uygulanmasıdır.

MM hastalığında hedef immünoterapötik ajan olarak birçok antijen kullanılmaktadır. Bunlar arasında; MM hücrelerindeki hücre yüzey proteinleri veya kemik iliği stromal

hücreler ve kemik iliği nişindeki hücresel olmayan büyüme faktörleri ve sitokinler yer almaktadır (77). Yapılan çalışmalara göre, yaşamsal faaliyetler, hücre sağ kalımı, proliferasyon, anjiyogenezis ve ayrıca MM ve kemik iliği hücreleri arasındaki etkileşimlerde dâhil olmak üzere birçok mekanizmalar sayesinde tümör ilerlemesini kolaylaştırmaktadır (78). Bu yüzden MM için ideal bir immünoterapi geliştirmenin önündeki engeller; öncelikli olarak hastalığın heterojenitesi ve sadece malign hücreler tarafından ifade edilen "ideal hedef" tanımlamadaki güçlüklerdir. Habis plazma hücreleri, agresif büyümelerini destekleyen bir tümör ortamı ile korunmuştur. Bu nedenle bu tümör ortamı hedefleyerek yapılan çalışmalar makul bir yaklaşım gibi gözükmektedir (79).

DH'lerinden tümör aşısı elde edilmesinde en çok dikkat edilmesi gereken, üretimi gerçekleştirilen tümör aşısının etiğe ve hastaya verilebilecek standartlarda uygun bir şekilde elde edilmesidir. Bunun içinde etik izinlerin ilgili yerlerden alınması ve tümör aşısının üretimi için ihtiyaç duyulan cihazlara sahip laboratuvarlarda titizlikle çalışmanın yürütülmesi gerekmektedir.

Tümör aşısının üretimi oldukça uzun süren ve pahalı bir süreçtir. Bu yüzden bu çalışmada amaçlanan, MM hastası için tümör aşısı için gerekli olan olgunlukta dendritik hücrelerin steril şartlara uygun bir kültür ortamında ve çok fazla bir maliyete sebebiyet vermeden üretebilmektir. Bu üretim için gerekli olan tümör lizatı ile otolog nakil için MM hastasından toplanan CD34+ kök hücre ve mononükleer hücreleri birleştirildi. Kontrol grubu için karışımından numune alındı. Daha sonra dönüşümü ve matürasyonu sağlayacak uygun sitokinler olan IL4 ve GM-CSF eklenerek, bu karışımın steril şartlar altında doku kültür flasklarına ekim işlemi yapıldı ve uygulamaların kontrolü için kültürün uygun saatlerinde ekim ürününden numune alınarak canlılık testi ve hücre sayımı işlemleri flow sitometri laboratuvarında gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MULTİPL MİYELOM

MM, tek klondan köken alan plazma hücrelerinin malign çoğalmasıdır. Tümör, tümör ürünleri ve konağın yanıtı bir dizi organ disfonksiyonu, kemik ağrısı, kemik fraktürü, böbrek yetmezliği, enfeksiyona eğilim, anemi, hiperkalsemi, pıhtılaşma anormallikleri, nörolojik semptomlar ve hiperviskozite belirtileri ile kendilerini gösterebilirler (9).

MM, plazma hücre diskrazileri olarak adlandırılan hastalıklar grubundandır. Aşırı monoklonal immunoglobulin (IgG, IgA, IgD, IgE) veya Bence-Jones protein (serbest monoklonal κ veya λ hafif zinciri) yapımıyla kendini belli eden ve sıklıkla hiperkalsemi, anemi, böbrek hasarı, bakteriyal enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artmasına ve plazma hücreleri kemik iliğinde prolifere olup ve osteolitik lezyonlar, osteopeni veya patolojik kırıklar ile sonuçlanan kemik yıkımına neden olmaktadırlar (10).

MM hastalığıyla ilk kez 19. yüzyılın ortalarında karşılaşılmıştır. İlk myelom hastası olan Sarah Newbury, 1844 tarihinde Samuel Solley tarafından bildirilmiştir. Daha sonra Von Rustizky, 1873 tarihinde multipl kemik tümörü olan bir hastada multipl myelom terimini ilk kez kullanmıştır. Dr. Otto Kahler tarafından 1889'da kemik ağrısı, anemi ve proteinürisi olan MM'lu 46 yaşında bir hasta rapor edilmiştir (11).

MM tanısı koymak, genellikle zor olmamakla beraber, zaman zaman güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Bu nedenle, MM tanısı kemik iliği aspirasyonu, kemik iliği biyopsisi ve immunohistokimyasal incelemenin yanı sıra klinik ve laboratuvar bulgular ışığında konmalıdır(12).

2.1.1. Epidemiyoloji

Tüm yetişkin malignitelerin %1 'ini, hematolojik malignitelerin ise %10 'unu kapsamaktadır (13). Konvansiyonel yüksek doz kemoterapi uygulamalarına rağmen tamamen tedavi edilemeyen MM hastalarının sağ kalım süresi birkaç aydan birkaç yıla

kadar değişmektedir. Yıllık ölüm oranı 4.1/100000, 5 yıllık sağ kalım oranı %28'dir. Ortalama sağ kalım standart tedavi ile yaklaşık 3 yıl olup %5 gibi küçük bir hasta grubu 10 yıldan fazla yaşamını sürdürebilmektedir (14). Yeni tedavilerin klinik uygulamaya girmesi ile sağ kalım oranı artmaktadır. Bu heterojen durumun tümörün kendisinin ve konakçısının özgün karakteristik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. ABD'de her yıl yaklaşık 14.000 kişiye MM tanısı koyulurken Türkiye'de bu rakam yaklaşık 3.000 olarak belirlenmiştir. Genellikle çok sinsi bir şekilde başlayarak yavaş ilerleyen MM hastalığı bir ileri yaş hastalığı olarak da bilinir (15).

En sık görüldüğü yaş grubu 65 ile 70 iken son yıllarda bu hastalığın yaş ortalaması 50 ile 55 yaş arasına doğru kayma eğilimindedir. MM çocuklarda görülmez (16). Ancak son yıllarda hastalık giderek daha genç bireylerde ve daha sık gözlenmektedir. Bu hastalık için yaş etkeni dışında cinsiyet ve ırk gibi faktörler kesin değerler ifade edilemese de yapılan çalışmalara göre hastalığın erkeklerde görülme sıklığının kadınlardakine kıyasla yaklaşık iki katı ve zenci ırkta görülme sıklığının da beyaz ırka kıyasla yaklaşık iki katı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucundan elde edilen verilere göre, tüm ırklarda ve tüm coğrafik bölgelerde görülür. Ancak Afrika kökenli Amerikalı bireylerde ve beyaz ırkta en yüksek, Asyalılar da ise en düşük insidansa sahiptir (17).

2.1.2. Etyoloji

MM'nin ortaya çıkış nedeni kesin olarak bilinmemekle beraber radyasyon, benzen ve diğer organik çözücülere maruziyetin veya böcek ilaçlarının etkin olabileceğine dair veriler çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir (18). Ayrıca genetik faktörlerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak genetik faktörün rolü kesin olmamakla birlikte, aynı monoklonal potansiyele sahip MM tanısı olan aileler tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların bazılarında MM hastalarının bir kısmı ailevi geçişli olduğu saptanmış ve birinci dereceden yakınlarında MM görülen kişilerde hastalık gelişme riski 3,7 kat artmakta olduğu gözlenmiştir (19). MM hastalığının etyolojisinde rol alan faktörler genel hatları ile Tablo 2.1.'de belirtilmiştir (20).

Tablo 2.1. Multipl miyelom etyolojisinde rol alan faktörler (20)

Radyasyon	•Tanısal ve tedavi amaçlı X-ışınına maruziyet •Radyasyonla ilişkili bir işte çalışma
Mesleki maruziyet	•Tarımsal işte çalışma (domuz, koyun ve sığır yetiştiricilerinde, mandıra çalışanlarında) •Metal endüstrisi (maden fırını, metalurji sanayinde çalışanlar) •Benzen
Yaşam tarzı	•Sigara-alkol kullanımı •Diyet alışkanlığı •Boya endüstrisi (saç boyaları) •Sosyoekonomik durum
Önceki medikal durumlar	•Viral enfeksiyonlar •Kronik antijenik stimülasyon

2.1.3. Patogenez ve Patofizyoloji

MM gelişiminde birçok sistematik bozukluğunun rol aldığı düşünülmektedir. Bunlar arasında sinyal ileti sistemi, apoptoz, kemik iliği mikroçevresi ve hücre siklus bozuklukları gösterilebilmektedir. Malign plazma hücreleri oluşumunda hücre siklusunda yer alan gen ekspresyon bozuklukları rol almaktadır. Spesifik genetik anormalliğin varlığı veya yokluğu ile hastalar hiperdipliod veya nonhiperdiploid olarak ayrılabilir. Hiperdiploid miyelom farklı kromozomların trisomisi ile karakterizedir. Özellikle 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 veya 21. kromozomda olur ve bu durum tüm hastaların %50-%60'ında görülmektedir. Buna karşılık nonhiperdiploid grup (hastaların %40-%50'si) tipik olarak 14. kromozomdaki ağır zincir lokusu içeren translokasyonlara sahiptir (21).

B hücreli bir neoplazi olan MM, kemik iliği postgerminal merkez plazmablast veya plazma hücrelerinden kaynaklanmaktadır. MM patogenezinde birçok onkojenik olay tanımlanmıştır (22). İmmatür B lenfositlerin matür plazma hücrelerine dönüşmesi için birçok DNA kırılması gerektiği için B hücreleri genetik olarak çok değişkenlik göstermektedir. DNA kırıkları ile somatik mutasyonlar ve izotip değişikliklerine sebep olmakta ve sıklıkla Ig ağır zincir bölgesinde (IgH) 14q32'de genetik değişiklikler

meydana gelmektedir. MM hastalarının yaklaşık %75'inde bu bölgede anormallikler tespit edilmektedir (23). Spesifik IgH translokasyonları arasında t (11;14) (q13;q32), t(4;14) (p16.3;q32.3), t (6;14) (p25:q32), t (8;14) (q24;q32) ve t (14;16) (q32.3;q23) olmakla beraber (24), en sık görülen translokasyon ise t (11;14) (q13;q32) olup siklin D1 artışı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca t (4;14), t (14;16), t (14;20), del17p13 ve p53 delesyonu hastalarda yüksek risk ile birliktelik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda p53 mutasyonunun daha çok lösemik MM ile ilişkili olduğunu gösterilmektedir (25). Ayrıca kromozom 13 anomalileri ve hipodiploidi varlığı sağ kalım oranını azaltırken (26), trizomiler, hiperdiploidi ve IgH translokasyonları ise standart risk oluşturmaktadır (27). Hastalarda saptanan N-RAS ve daha az oranda da K-RAS onkogen aktivasyonu daha çok tedavi sonrası relaps ile ilişkilendirilmektedir (28).

Kemik iliği stromal hücreleri (BMSC/KİSH), ekstrasellüler matriks proteinleri, vasküler endotelyal hücreler, osteoklastlar, osteoblastlar ve lenfositlerden oluşan kemik iliği mikroçevresi, miyelom hücrelerinin kemik iliği stromal hücreleri ve ekstrasellüler matriks proteinleri ile etkileşimi, kemik ilik mikroçevresine ait sitokinler ve anjiogenez gibi faktörler birlikte miyelom patogenezinde önemli rol oynamaktadırlar (29).

BMSC'lerin adhezyonu sonucu sitokin aracılı tümör hücresi gelişimi, sağ kalım, ilaç direnci ve migrasyon olaylarını tetiklediği gözlenmiştir. MM hücrelerinin BMSC'lerine bağlanması ile BMSC'lerden ve tümör hücrelerinden sitokin sekresyonu artmaktadır (30). Bu sitokinler majör sinyal yolaklarını aktive etmektedirler. Bu yolaklar extracellular signal-regulated kinase (ERK); Janus kinaz 2 (JAK2)– sinyal ileticisi ve trankripsiyon aktivatörü 3 (STAT3); fostatidilinositol 3-kinaz (PI3K)–Akt; ve/ veya nükleer faktörκB (NFκB) 'dir. Bu yolakların sonunda yer alan hedefler IL-6, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) ve VEGF gibi sitokinler, Bcl-X_L gibi antiapoptotik proteinler, apoptoz inhibitörü proteinleri (IAP), miyeloid hücre lösemi sekansı 1 (MCL1) ve hücre-hücre modülatörleri olan siklin D'dir (31).

Miyelom patogenezinde adhezyon moleküllerinin de önemli yeri vardır. Miyelom plazma hücreleri için en önemli büyüme faktörü ve anti-apopitotik faktör IL–6'dır. IL-6, başlıca kemik iliği mikro çevresindeki stromal hücrelerinden salgılanır. Miyelom hücreleri IL-1 β, makrofaj inflamatuvar protein 1α (MIP 1α), vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), tümör nekroz edici

faktör α (TNFα) ve az miktarda IL-6 salgılarlar. Bu sitokinler, stromal hücreleri uyararak bu hücrelerden IL–6 salınımına yol açar (32). Ayrıca, miyelom hücrelerinden salgılanan VEGF, endotel hücrelerini prolifere ederek anjiogeneze sebep olurken, aynı zamanda endotel hücrelerinden IL-6 salınımına yol açar. Miyelom patogenezinde, adezyon molekülerinin de önemli bir yeri vardır. Birçok miyelom hücresi; CD 56, very late antijen (VLA-4 ve VLA-5) ve β1 integrin gibi adezyon moleküllerini eksprese ederler. Miyelom hücreleri bu moleküller ile bir taraftan birbirlerine diğer taraftan stromal hücrelere tutunurlar ve stromal hücrelerden IL-6 salınımına yol açarlar. Kemik iliği ekstrasellüler matriksinde bulunan hiyaluronin de stromal hücrelerden IL-6 salgılanmasına yol açar. Böylece, stromal hücre ve endotel kaynaklı IL-6 miyelom hücrelerinin apoptozisini önleyerek miyelom hücre kitlesinin genişlemesini sağlar. CD56+ miyelom hücrelerinin osteoblastlarla etkileşimi, osteoblastların inaktivasyonuna yol açarak yeni kemik oluşumuna engel olmaktadır. Miyelomda osteoporoz gelişiminde bu mekanizmanın rolü çok önemlidir. Adezyon moleküllerinden β1 integrinler, miyelom hücrelerinden MIP-1α ve IL -1β ile birlikte osteoklastları aktive ederek litik kemik lezyonlarının gelişimine sebep teşkil etmektedir (33).

2.1.4. Klinik Özellikler

Plazma hücreli tümörlerin oluşumu kemik harabiyetine, kemik iliği yetersizliğine, monoklonal antikorların yapımına, normal antikor yapımının supresyonuna ve böbrek yetersizliğine yol açar. Kemik iliğinden köken almış olan tümör, tanı konulduğu zaman hastaların %80'inde tipik zımba deliği gibi tanımlanan osteolitik lezyonlar görülebilir (4).

Miyelomlu hastalar genellikle halsizlik, anemi, kemik ağrısı, patolojik kırıklar, böbrek yetersizliği, kanamalar, infeksiyon, hiperviskosite, trombositopeni, hiperkalsemi, periferik nöropati gibi semptom ve bulgularla karşımıza çıkmaktadır. MM tespitinde belirlenen klinik bulgularının sıklığı Tablo 2.2.'de gösterilmiştir (34).

Tablo 2.2. Multipl miyelomlu hastalarda semptom ve bulguları (34)

SEMPTOM VE BULGULAR	HASTA (%)
Kemik ağrısı	66
Halsizlik	32
Kilo kaybı	12
İnfeksiyon ve kanama	<15
Parestezi	5
Tümör ateşi	<1
M protein idrar ve serumda	97
Litik lezyon, osteoporosis veya kırık	79
Hemoglobin <12 g/dl	73
Kreatinin >2 mg/dl	19
Kalsiyum >11 mg/dl	13
Viskosite > 4 cP	<7

2.1.5. Tanı

Yaklaşık yarım yüzyıldır MM hastalığı için birçok tanı kriteri oluşturulmuştur. Ancak bunların içerisinde günümüzde en çok kullanılan kriter Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu (International Myeloma Working Group, IMWG)'nun düzenlendiği kriterlerdir. MM hastalığının tanısı, basitçe en az %10 klonal kemik iliği plazma hücrelerinin aynı zamanda serum veya idrarda monoklonal proteinlerin bulunmasına dayanmaktadır (35). MM vakalarının %2'sini oluşturan gerçek sekretuar olmayan miyelom vakalarında tanı, kemik iliğinde %30 plazma hücre varlığı ya da biyopsi ile kanıtlanmış plazmositom ile konulmaktadır. MM hiperkalsemi, renal yetmezlik, anemi, kemik hastalığı ve diğer miyelom ilişkili semptomları içeren miyelom ilişkili organ ve doku hasarı varlığına göre semptomatik ya da asemptomatik olarak ayrılmaktadır. IMWG tanı kriterlerine göre detaylı tıbbi hikâye, fizik muayene, rutin laboratuvar testleri ve kemik iliği biyopsi veya aspirasyonunun yapılmasını önermektedir (36).

Tanı için hastada tespit edilmesi gerekenler;

1. Serumda M protein (genellikle 3 gr/dl'den yüksek)
2. İdrarda M protein (genellikle 1 gr/dl'den yüksek, amiloidoz yokluğnda)
3. Kemik iliği aspirasyonunda %10'dan fazla plazma hücresinin varlığı
4. Litik kemik lezyonları veya grafilerde kemik erimesi (osteoporoz)
5. Yumuşak dokuda plazmositomların varlığı.

MM hastalığının tanısının koyulabilmesi için herhangi bir iki majör kriter veya bir majör ve bir minör kriter ya da en az 3 minör kriterin varlığı yeterli olacaktır (4).

Tablo 2.3. Multipl miyelomun majör ve minör tanı kriterleri (4).

MULTİPLE MİYELOM TANI KRİTERLERİ	
Major Kriterler	Doku biyopsisinde plazmositom varlığı
	Kemik iliğinde > %10 plazma hücresi
	Serum elektroforezinde monoklonal globülin pik seviyesi IgG >3.5 g/dl ya da IgA >2.0 g/dl veya 24 saatlik idrar elektroforezinde ve hafif zincir sekresyon seviyesi 1.0g/24 h
Minör Kriterler	Kemik iliği plazmasitozu %10-30
	Monoklonal globülin pik seviyesi varlığı fakat düzeyinin majör kriterlerdekinden daha az olması
	Litik kemik lezyon varlığı
	Normal IgM <0.05 g/dl, IgA <0.1g/dl ya da IgG<0.6 g/dl

2.1.6. Evreleme ve Prognoz

Tümör yükünü ortaya koymak üzere MM değişik evreleme sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Durie-Salmon (DS) evreleme sistemidir. Bu evreleme sistemi tümör yükünün tespiti için kullanılan pratik bir yöntem olup, çok uzun süredir kullanılan standart evreleme sistemidir (Tablo 2.4.) (37). Diğer bir sistem ise; β-2 mikroglobulin ve albumin düzeyleri esas alınarak yapılan ve uygulama kolaylığı sağlayan Uluslararası Evreleme Sistemi (International Staging System/ISS) 'dir (Tablo 2.5.) (38).

MM'da prognozu belirlemekte birçok faktör kullanılmaktadır. Bunlar klinikte tümör yükünü ve malignitenin proliferasyon hızını gösteren faktörlerdir. İlk ve yaygın olarak kullanılan faktör Durie-Salmon evreleme sistemidir. Bununla beraber sitokinler (IL-6 IL-2) β2 mikroglobülin prognoz göstergesi olarak kullanılmaktadır. Elli yaş altı hastalarda MM 'nin daha iyi prognozlu olduğu bilinmektedir (39).

Tablo 2.4. Durie- Salmon Evreleme Sistemi (37)

EVRE	**KRİTERLER**	**TÜMÖR KİTLESİ**
I	Aşağıdakilerin hepsi Hb>10 g/Dl Serum kalsiyum normal Normal kemik tarama (osteoporoz dâhil) M-komponenti düzeyi düşük Ig G < 5 g/dL Ig A < 3 g/dL İdrar hafif zinciri < 4 g/24 saat	<0,6 x 10^{12} hücre/m^2
II	EVRE I ve EVRE III ölçütlerini karşılamayan	0,6-1,2 x 10^{12} hücre/m^2
III	Aşağıdakilerin 1 veya daha fazlası Hb< 8,5 g/dL Serum kalsiyum artmış Yaygın iskelet hasarı (>3 litik lezyon) veya kırık M-komponenti düzeyi yüksek Ig G > 7 g/dL Ig A > 5 g/dL İdrar hafif zinciri > 12 g/24 saat	>1.2 x 10^{12} hücre/m^2

Alt grup	
A	Serum Kreatin <2 mg/dL
B	Serum Kreatin >2 mg/dL

Tablo 2.5. Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS) (38)

Evre	B_2-MG (mg/dL)	Albumin (g/dL)	Sağ kalım (ay)
Evre 1	<3.5	> 3,5	62
Evre 2	Evre I ve III ölçütlerini karşılamayan durumlarda		44
Evre3	>5,5	-	29

MM biyolojik davranışı yönünden oldukça heterojen bir hastalık olması nedeni ile yalnızca birkaç parametreyi içeren evreleme sistemleri kimi hastaların prognoz değerlendirmesinde yeterli olmamaktadır. Bu yüzden hastalık seyrinin tahmininde yardımcı prognostik faktörler belirlenmiştir (Tablo 2.6.) (36).

Tablo 2.6. Multipl miyelomda prognostik faktörler (36)

Bağımsız prognostik faktörler
-Performans durumu
-ISS
-DS evreleme sistemi
-Hiperdiploidi, t (6;14), t (11;14) (iyi prognoz)
-Hipodiploidi, t (4; 14), t (14; 16), 13q-17p delesyonu (kötü prognoz)
-Laktat dehidrogenaz (artmış tümör yükü-ekstramedüller tutulum)
-Plazmoblastik morfoloji (İlikte >%2 plazmoblast)
-Plazma hücre döngüsü sentez fazı (plazma cell labeling index)
Ek prognostik faktörler
-Yaş (<50 yaş iyi prognoz)
-C-reaktif protein (CRP) (in-vivo IL-6 aktivitesi)
-Serum kreatinin
-Trombosit sayısı

2.1.7. Tedavi

MM'de tedaviye başlamak için en az bir hedef organ hasarının (hiperkalsemi, anemi, böbrek yetmezliği veya kemik lezyonları) bulunması gereklidir. Hedef organ hasarı olmayan semptomsuz hastalarda tedaviye erken başlamanın sağ kalıma etkisi tam olarak gösterilememiştir (40). MM, hastaların yaklaşık %15'inde asemptomatik olup, bu hastaların tedavi edilmeksizin 3 ayda bir takip edilmesi önerilmektedir. MM'da tedavi gerektiren hastalarda, tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde temel alınan özellik yaş, performans durumu ve ek hastalıkların değerlendirilmesi ile hastanın OKHN adayı olup olmamasıdır. Hatta günümüzde yeni tanı MM hastasının tedavi planını yapılırken ilk değerlendirilen durumu hastanın OKHN aday olup olmadığı ve bu hastalarda tedavi genellikle yüksek doz kemoterapi ve OKHN uygulanması şeklide gerçekleşmektedir (41).

OKHN adayı olan hastalarda indüksiyon tedavisinin amacı OKHN öncesi tümör kitlesini azaltmak ve mümkün olan en az malign plazma hücresi ile bulaşı olan kök hücre ürünü elde etmektir (42). Bu hastalarda 2-4 kür indüksiyon tedavisi sonrasında OKHN yapılması planlanmaktadır. OKHN adayı olan hastalarda başlangıç tedavi rejimlerinde melphalan-pred (MP) kullanımı, yetersiz miktarda kök hücre toplanmasına neden olacağından pek tercih edilmez (43). İndüksiyon tedavisinde, uzun zamandır deksametazon tek başına veya vinkristin ve adriamisin ile birlikte verilmesi standart prosedür de uygulanmakta olup, son yıllarda deksametazonun bortezomib, talidomid ve lenalidomid ile birleşen tedavilerinin yanıt oranlarını çok belirgin oranda arttırdığı belirtilmektedir (44). MM hastası 65 yaşın altında ve belirgin bir ek hastalığı yoksa güncel tedavi önerisi bortezomib, lenalidomid veya talidomid içeren indüksiyon tedavisidir ve daha sonrasında OKHN uygulanmaktadır. Konvansiyonel tedavi sonrası ortalama sağ kalım süresi 3-4 yıl olup ve bunun ardından yapılan OKHN'nin toplam sağ kalım süresini 5-7 yıla kadar yükseltebileceği gösterilmiştir (45). Ancak ülkemizde bortezomib, talidomid veya lenalidomid gibi ajanların tedavinin birincil basamağında kullanımı, özel durumlar dahilde kısıtlandığından (13q delesyonu gibi), indüksiyon tedavisi için vinkristin, doksorubisin ve deksametazon (VAD) içerikli kemoterapi tedavisi yaygın olarak kullanıldığı saptanmıştır (46).

2.2. KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONU

2.2.1. Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Kök hücreler kendi kendilerini yenilemek ve yüksek derecede özelleşmiş işlevsel hücre serisi oluşturmak üzere sınırsız bölünme yetisine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hücre grubunun alt grubu olan hematopetik kök hücreler (HKH) multipotent kök hücreler grubunda yer almaktadır. İnsanlarda kemik iliğinde bulunan HKH'ler aktif hematopoezi yalnızca kemik iliğinde yapmaktadır (47). Genellikle G0 istirahat fazında bekleyerek mutasyonlara ve miyelotoksik hasarlara karşı kendilerini koruyarak genomik bütünlüklerini muhafaza ederler. Ancak herhangi bir stres durumunda (kan kaybı, enfeksiyon veya tedaviye bağlı pansitopeni gibi) hızla aktif faza geçerek, hematopoezi ve farklılaşmayı başlatırlar. Bu çoğalma işlemi ile yeni hücreler yapılırken kök hücre kaynağı korunarak devamlılığı sağlanır (48).

Transplantasyonlarda HKH kaynağı kemik iliği, periferik kan veya kordon kanı kullanılmaktadır. Bu yüzden işlemin kemik iliği transplantasyonu (KİT) yerine hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) olarak adlandırılması daha doğru olmaktadır. Kemik iliği toplanması genel anestezi altında posterior ve anterior iliak kristadan standart steril teknikle yapılırken, periferik kandan kök hücre toplanması ise sitoferez işlemi ile yapılmaktadır (49).

HKH, kemik iliği ve periferik kandan elde edilebilen, kendini yenileme ve diferansiyasyon olgun kan hücrelerini oluşturma yeteneğine sahip erişkin tip bir kök hücredir. Bulundukları ortamda az sayıda bulunmaktadırlar. Kemik iliğinde 10.000-15.000 kemik iliği hücresinden bir tanesi HKH iken periferik kanda bu oran 1:100.000 olarak saptanmıştır (50).

Her üç kök hücre kaynağı birbiriyle karşılaştırıldığında farklı hastalıklarda değişiklikler göstermekle birlikte her birinin diğerlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, periferik kan kök hücre ile yapılan transplantasyon da Greft Versus Host Hastalığı (GVHH) riski, kemik iliği ve kordon kanı ile yapılan transplantasyonlardan daha yüksektir. Kordon kanı ile HKHT ise, HLA (İnsan Lökosit Antijeni/Human Leukocyte Antigen) uyumsuz transplantasyonlara sebep olmaktadır. Ancak HLA sayısının yetersiz olması kordon kanının kullanılmasını kısıtlamaktadır (51).

HKHT, hastalıklı veya hasarlı olan kemik iliğini yeniden oluşturmak amacıyla HKH'lerin genellikle damar yolu kullanılarak verilmesi işlemi ile gerçekleştirilmektedir. HKHT'nin amacı bir kanseri veya hastalığı hazırlama rejimi kullanarak yok etmek ve sonrasında boşalan kemik iliği kavitesine hastanın damar yolundan verilen kök hücrelerin yerleşmesini sağlamaktır. Bazen de hematopoetik bozukluk olmayan kalıtsal hastalıklarda enzim salınımını sağlayarak klinik iyileşme sağlayabilmektir (52). HKH verici tiplerine göre HKHT genel olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

1. Allojeneik Kök Hücre Nakli (AKHN); sağlıklı, doku grubu uygun başka bir insandan alınan HKH'lerin hazırlık rejimi sonrasında alıcıya verilmesi işlemidir.
2. Otolog Kök Hücre Nakli (OKHN); hastanın kendisinden toplanan HKH'lerin hazırlık rejimi sonrasında tekrar hastaya verilmesi işlemidir.
3. Singeneik Kök Hücre Nakli (SKHN); genetik olarak tam uyumlu tek yumurta ikizlerinden yapılan nakil şeklidir.

HKHT hematolojik malignitelerde, kemik iliği yetmezliklerinde, immün yetmezliklerde, konjenital hematolojik hastalıklarda ve bazı solid tümörlerde etkin bir tedavi yöntemi olduğu gibi bazı nörolojik ve kalıtsal metabolik hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır (53).

Ülkemizde ilk OKHN 1984 yılında, ilk AKHN ise 1985 yılında GATA'da yapılmıştır. Ülkemizde ilk otolog periferik kök hücre nakli (OHKHN) 1992 yılında ilk allojeneik periferik kök hücre nakli (APKHN) de 1993 yılında Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesinde gerçekleştirilmiştir (54).

2.2.1.1. Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli

OHKHN yüksek doz kemoterapi ve radyoterapi sonrası kemik iliği fonksiyonunun yeniden sağlanması için hastadan daha önce toplanan kök hücrelerinin tekrar verilmesi işlemidir. Geri verilen bu hücreler hastanın kemik iliği veya periferik kanından elde edilmektedir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), lenfomalar, MM, non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoma, nöroblastom, germ hücreli tümörler, otoimmün hastalıklarda uygulanmaktadır. Avantajı donör gereksiniminin olmamasıdır (55).

Otolog hematopoetik kök hücre nakli (OHKHN) birbirini takip eden aşamalardan oluşur:

1.aşama; kök hücrelerin toplanması, işlenmesi ve ardından sıfırın altındaki sıcaklıklarda azot tanklarında dondurularak saklanması,

2.aşama; kemik iliğini baskılayacak kemoterapi veya radyoterapinin uygulanması,

3.aşama; saklanmış olan kök hücrelerin hastaya infüze edilmesi,

4.aşama;tedavi sonrası kemik iliği aplazisi düzelene kadar destek tedavisi uygulanmasıdır.

Nakil sonrası kemik iliğinin yeniden şekillenebilmesi için yeterli sayıda HKH gerekmektedir. OHKHN için yeterli CD34(+) hücre miktarı >$2x10^6$/kg hücre'dir (56). Hastalara verilecek olan KH'ler iki şekilde toplanabilir. Birinci seçenek kemik iliği aspirasyonu ile toplanılması olup, bu işlem ameliyathane şartlarında steril ortamda yapılması ve çoklu kemik iliği aspirasyonu uygulanması gerekmektedir. İkinci seçenek ise çeşitli hazırlık rejimleri ile KH'ler uyarılarak aferez yöntemleri ile periferik kandan CD34 (+) KH'lerin toplanılması ile gerçekleştirmektedir. Periferik kandan HKH toplanabilmesi için kandaki lökosit sayısının en az $1x10^9$/L olması gereklidir. Gerçekleştirilen bu işleme mobilizasyon denilmektedir. Günümüzde aferez tekniklerinin gelişimi ile OHKHN yapılan neredeyse tüm hastalarda periferik kandan elde edilen HKH'ler kullanılmaktadır (57).

2.2.1.1.1. Multipl Miyelom Hastasının OHKHN Adayı Olması

Kronolojik veya biyolojik yaşı 65'in altında olan ve ciddi bir kalp, akciğer ve karaciğer fonksiyon bozukluğu olmayan MM hastalarda indüksiyon tedavisini izleyen OHKHN standart tedavi yaklaşımını oluşturmaktadır (58).

Mayo Kliniği'nin tedavi önerileri dışında genel olarak kabul gören yöntem MM hastaların OKHN adayı olup olmamasına göre tedavi planının düzenlenmesidir. OKHN adayı olan hastalara IMID/proteozom inhibitörlerini içeren ikili (bortezomib/deksametazon ya da lenalidomid/deksametazon) ya da üçlü ilaç (bortezomib/deksametazon+ siklofosfamid ya da lenalidomid ya da talidomid) kombinasyonları ile indüksiyon verilmesi önerilmektedir. Daha sonra ise OKHN ve ardından talidomid veya lenalidomid idamesi önerilmektedir. OKHN adayı olmayan hastalarda ise ikili (bortezomib/deksametazon ya da lenalidomid/deksametazon) veya

üçlü (melphalan/prednizolon/talidomid ya da melphalan/prednizolon/bortezomib) kombinasyon tedavileri ile indüksiyon önerilmektedir (59).

MM'li hastalarda OHKHN uzun yıldır yapılmakta olup, bu indüksiyon rejiminin tamamlanması, KH toplanması ve yüksek doz tedaviyi izleyen OKH infüzyonu 4-6 aylık bir süreçten oluşmaktadır (60).

2.3. KÖK HÜCRELERİN MOBİLİZASYONU

Mobilizasyon, iyatrojenik etki ile normalde periferik kanda çok az miktarda bulunan HKH'lerin dolaşımda daha fazla oranda bulunması amacıyla tek başına kemoterapi, kemoterapi ve büyüme faktörü veya tek başına büyüme faktörü kullanımı ile gerçekleştirilen işleme mobilizasyon denir (61). Kök hücre toplanması ve transplantasyonu için belli işlemler gerçekleşmesi gerekir. Bunlar;

1) Hastaya OHKHN kararı alınması,
2) Mobilizasyon rejiminin tespit edilip uygun zamanda başlanması,
3) Damar yolunun tespit edilmesi,
4) KH'lerin yeterli olduğunu gösteren parametrelerin (lökosit sayısı 10.000m^3, trombosit sayısı 50.000m^3, CD34 sayısı >20 µl) günlük olarak bakılarak KH toplanma tarihine karar verilmesi,
5) Toplama işleminin yapılması,
6) Toplanan ürünün yeterliliğinin saptanması,
7) OHKHN için elde edilen KH'lerin dondurulması,
8) İşlem komplikasyonları ve tedavisi (62).

İşlem komplikasyonu olarak periferik kök hücre aferezi esnasında iyonize kalsiyum seviyesi düşebilir. Hasta ya da donör Chevostek ve Trausseau (+) bulguları, kas krampları, tremor, anksiyete, üşüme hissi, baş dönmesi gibi hipokalsemi belirtileri açısından dikkatle izlenmelidir. Toplanan KH'ler allojeneik kemik iliği transplantasyonun da ise aynı gün içinde nakil ünitesinde hastaya uygun şartlar altında infüzyonu gerçekleştirilmektedir (62).

2.3.1. Kök Hücrelerin Mobilizasyon Teknikleri

2.3.1.1.Kemoterapi ile Mobilizasyon

Klinik uygulamalarda ilk kullanılan yöntemdir. Kemoterapi ile mobilizasyonun amacı antitümör etkiye ilave olarak yüksek sayıda progenitor hücrenin perifer kana geçmesini sağlamaktır. Myelosüpresif kemoterapinin iyileşme döneminde periferik kanda granülosit ve GM-CFU sayısında 50 kata varan bir artış saptanmıştır. Yüksek dozlarda verildiğinde siklofosfamid ve etoposid, kök hücre toksisitesine neden olmadan etkili mobilizasyon yapan ajanlar arasındandır. Optimal progenitör hücre mobilizasyonu için uygun kemoterapi rejim planı henüz tam olarak tesit edilememiştir (63).

2.3.1.2. Hematopoetik Büyüme Faktörleri ile Mobilizasyon

Birçok faz II çalışmasında, myelosüpresif kemoterapiye granülosit koloni stümüle edici faktör (G-CSF) ve granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) eklemenin miyelotoksik etkiyi azalttığı ve kök hücrelerin periferik kana geçişini artırdığı gösterilmiştir. Kemoterapiden sonra birinci veya beşinci günde başlamak ve aferez gününe kadar sürmek üzere G-CSF 3-6 µg/kg/gün (64) ve GM-CSF 5µg/kg/gün dozunda subkutan olarak uygulanmaktadır. GM-CSF, mobilizasyon amacıyla kullanılan ilk sitokin olmasına rağmen günümüzde G-CSF daha sık kullanılmaktadır. Önceki zamanlarda birden fazla aferez işlemi gerekirken, artık G-CSF ile yapılan mobilizasyon işleminin ardından bir aferez işlemi aracılığıyla yeterli sayıda CD34+ hücre ($2x10^6$/kg üzerinde) toplanabildiği tespit edilmektedir (65).

2.3.1.3. Büyüme Faktörü ve Kemoterapi ile Mobilizasyon

Kemoterapi ve büyüme faktörleri birlikte kullanıldığında hem daha çok sayıda mononükleer hücre toplanabilmekte hem de kemoterapiye bağlı nötropenik komplikasyonlar daha aza indirgenmiş olmaktadır (66).

2.4. KÖK HÜCRE TOPLANMASI (AFEREZ)

Aferez, kanın bir komponentinin alınıp geri kalanının hastaya veya donöre geri verilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır. Kanın bileşenlerine ayrılması iki amaçla yapılır. Birincisi, sağlıklı kişilerin verici olarak kullanılmasıyla olan, periferik kanın bileşenlerine ayırması işlemidir (buradaki verici sağlıklıdır ve hasta olan kişi için

istenilen ürünün ayrılmaktadır) ve kan merkezlerinde gerçekleştirilmektedir. İkincisi ise hastalara uygulanan tedavi amaçlı (terapötik) aferezdir. Hemaferezis, aferez ile eş anlamlı olarak kullanılır ve ilk kez 1666'da Dr. Richard Lower tarafından deneysel olarak köpeklerde uygulanmıştır (67).

Günümüzde, OKHT'nın neredeyse tamamı, AKHT'nın ise büyük bir bölümü periferik kan kök hücreleri ile yapılmaktadır. Bunun en önemli nedenleri;

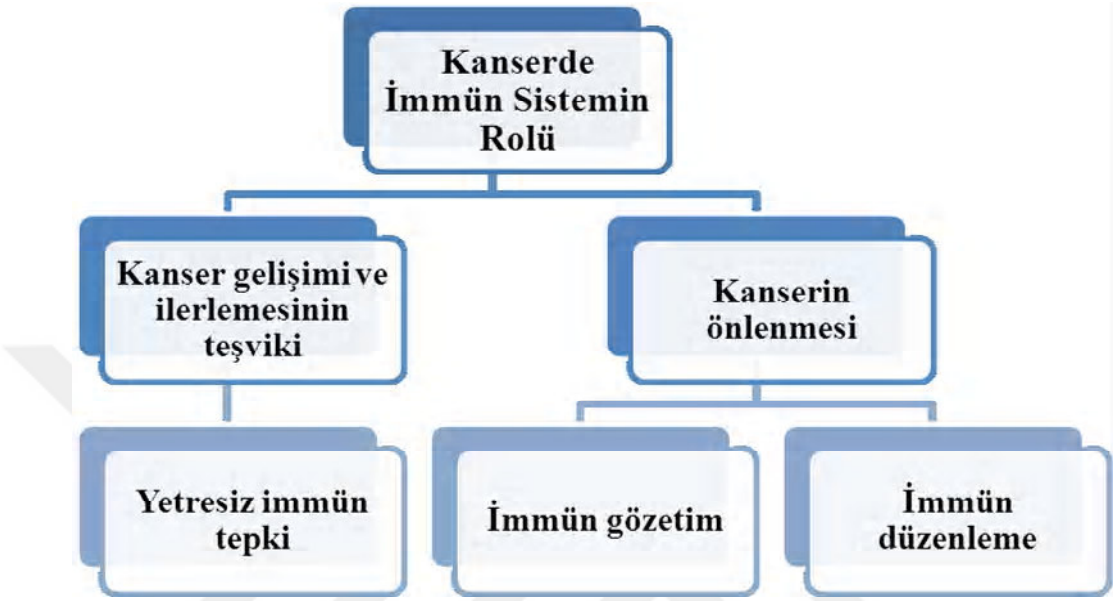
- Kemik iliği toplama işleminin genel anestezi altında gerçekleştirilmesi,
- Toplama (aspirasyon) işlemine bağlı uzun süreli ağrı ve infeksiyon tehlikesi,
- Ürünün işlenmesi sırasında meydana gelen KH kayıpları,
- Otolog transplantlarda, rezidüel tümörlerden kaynaklanan relaps görülme olasılığı,
- Periferik kandan toplanan üründe daha fazla CD34+ hücre bulunması ve buna bağlı olarak trombosit ile nötrofil engrafman süresinin daha kısa olması,
- Ayrıca, periferik kök hücre transplantasyonunda daha yüksek oranda akut ve kronik GVHH görülmesine rağmen, birçok çalışmada transplanta bağlı mortalite, relaps oranı ve yaşam süresi üzerinde önemli farklılıklar olmadığı belirtilmiştir (68).

Periferik kandan kök hücre toplama işlemlerinde kullanılan çeşitli aferez cihazları bulunmasına rağmen, tüm cihazlar, antikoagüle edilen kanın santrifüj yöntemi kullanılarak komponentlerine ayrılması prensibi ile çalışmaktadır. Hasta/donörden alınan tam kan, antikoagüle edilir ve cihazın santrifüj sistemine gönderilir. Santrifugasyon ile tam kan; plazma, trombosit, lenfosit-monosit-granülosit (Buffy coat) ve eritrosit tabakası olarak, spesifik gravitelerine göre, farklı katmanlara ayrılır. Kök/progenitör hücrelerin morfolojik olarak lenfositlere benzediği düşünüldüğünden, toplama işlemlerinde trombosit ile granülositlerin arasındaki tabaka toplanmaktadır (69).

2.5. KANSER VE İMMÜN SİSTEM

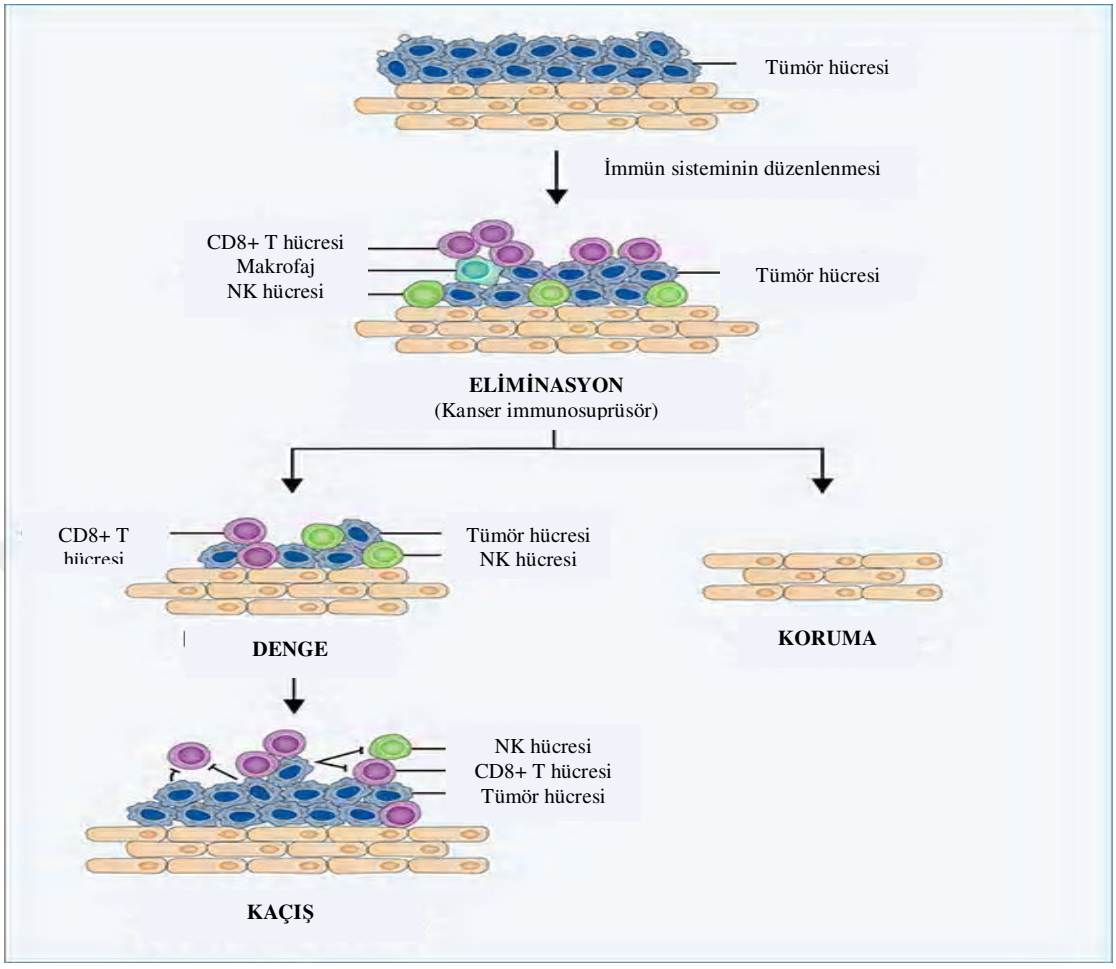
İnsanların immün sistemi; kemik iliği, dalak, lenf nodları gibi organlar immün sistemin spesifik hücreleri, immünglobulinler, sitokinler ve büyüme faktörler tarafından oluşmaktadır. İmmün sistem, normal yapısını kaybetmiş hücreleri ve kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerini ortadan kaldırırlar. İmmün sistem; organizmada bulunan tüm hücre

ve dokuları tanıma yeteneğine sahip olup, immün sistemin tanımadığı bir madde organizmaya girdiğinde, sistem alarm verir ve bu maddeye karşı sistem harekete geçer ve yabancı maddeyi ortadan kaldırmak için mekanizmaları devreye sokmaktadır (70).



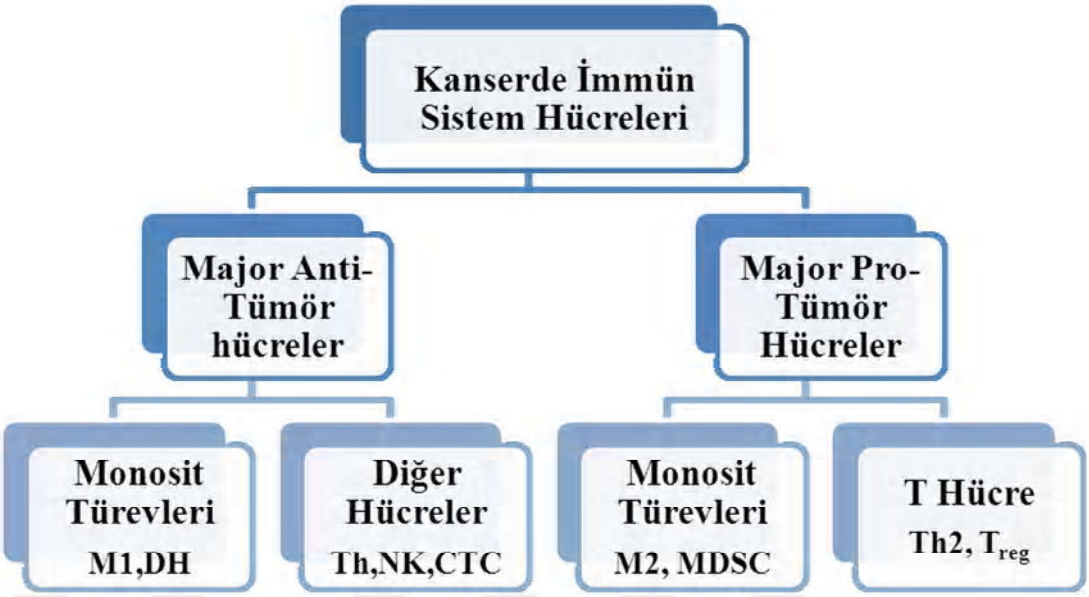
Şekil 2.1. Kanserde immün sistemin rolü (71)

Kanser hücreleri, yapılarını değiştirip, kontrolsüz olarak çoğalmaya başladıklarında, immün sistem tarafından yabancı olarak tanınmaya başlar ve kanserin bir aşamasına kadar immün sistem, kanser hücresini yabancı tanımayabilir ve onu hedeflemeyebilir. Bu yüzden sağlıklı ve immün sistemi sağlam kişilerde de kanser başlayabilir. Çünkü immün sistemin kanser hücrelerine karşı savaşma kabiliyetinin bir sınırı vardır. Bazen, immün sistem, kanser hücresini yabancı olarak görememesinin sebebi başlangıçta kanser hücreleri, normal hücrelerin yapısından farklı olmamasıdır (71). Kanser hücreleri, immün sistemin tanıyacağı yüzey antijenlerini gizleyerek kendilerini normal hücreler gibi göstereceğinden kontrolsüzce çoğalmasını devam ettirebilmektedir. Bu durumda, immün sistem, kanser hücrelerini tanımasına rağmen, onlara karşı yeterince güçlü cevap veremeyebilir ve tolerans oluşuna neden olmaktadır (72).

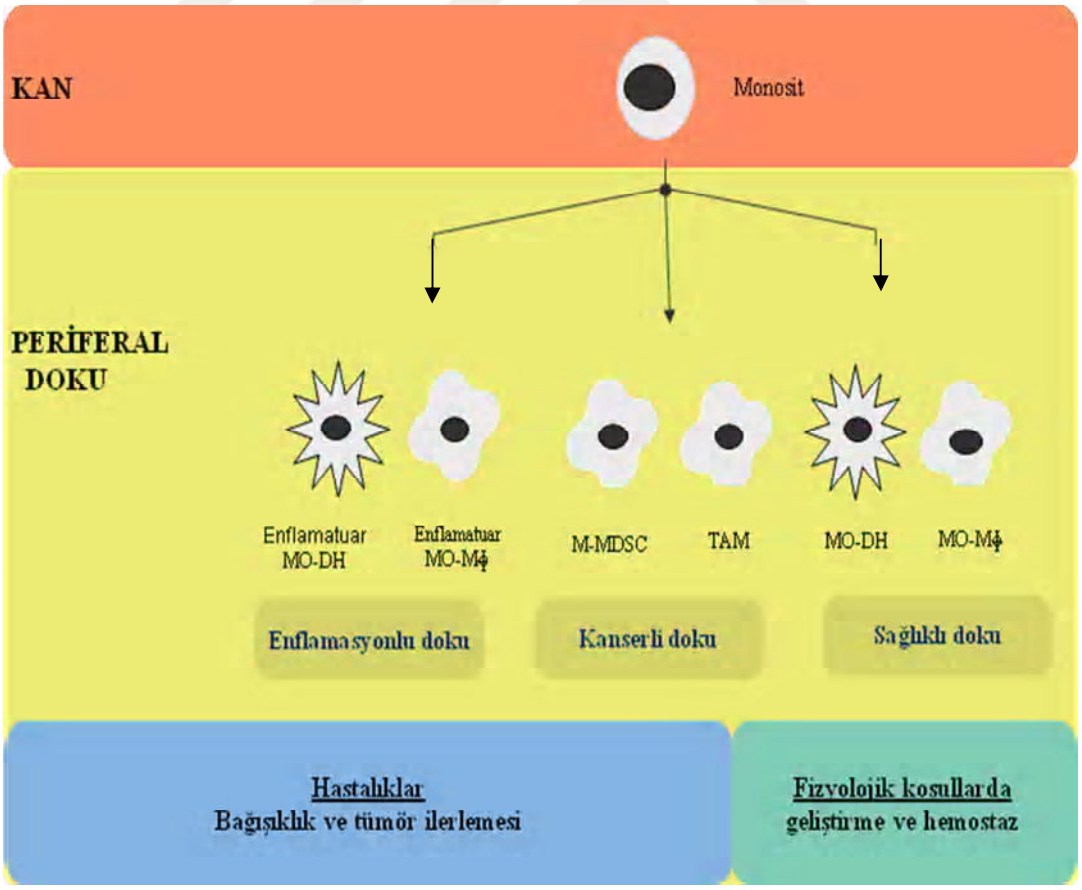


Şekil 2.2. Kanserde immün sistemin düzenlenmesi (72)

İmmün sistem tarafından kanser hücrelerinin ortadan kaldırması ilk kez 1950 yılında Macfarlane Burnet tarafından keşfedilmiş olup son yıllarda kanser biyolojisi ve temel immünolojinin daha iyi anlaşılmasıyla kanser hücrelerin immün sistem ile ortadan kaldırılması üzerinde durulmaya başlanmıştır (73). Kanser hücreleri kostimülatuar molekül ve majör histokompatibilite kompleks (MHC) moleküllerini azaltarak, immün supressif sitokinler salgılayarak ve T regülatuar (Treg) hücre ile miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreleri (MKBH) uyararak immün sistemden kaçabilmekle birlikte, immün sistem kanser hücrelerinin büyümesini ve gelişmesini engellemede önemli rol oynamaktadır. DH, humoral ve sitotoksik hücresel immüniteyi uyararak kanser gelişimini engelleyen profesyonel ASH'lerdir (74).



Şekil 2.3. Kanser oluşumunda immün sistemde rol oynayan hücreler (71)



Şekil 2.4. Kanser hastalıklarında monositlerin rolü (71)

2.5.1. Kanser İmmünoterapisi

Kanser immünoterapi, kanser tedavisinde immün sistemin uygun metodlarla aktive edilip kullanılmasıdır. Amaç immün sisteme ait hücrelerin kanser hücrelerini hedef alarak yok etmesini sağlamaktır. Bu amaç temel olarak üç yöntemle sağlanabilmektedir. Bunlar;

- Birinci yöntem kanserde üretilen proteinler kullanılarak hastaların aşılanmasına dayanır.
- İkinci yöntem terapi amaçlı spesifik antikorların hastaya verilmesi esasına dayanır.
- Üçüncü yöntem ise hastaya sitotoksik T lenfosit ya da dendritik hücreler gibi immün sistem hücrelerinin transfer edilmesi ile gerçekleştirilir (7,8).

2.5.1.1. İmmünoterapinin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları:

- İmmün sistem hücreleri, vücut içerisinde doğal olarak vardır ve etkisi güçlendirilebilir.
- Tümör hücrelerinin karakter değiştirmelerine karşı immün sistem hemen adapte olabilir.
- Tümör hücrelerine karşı geliştirdiği hafıza hücreleri yoluyla, daha uzun süreli tümör kontrolü sağlanabilir.
- Vücudun kendi doğal immün ve kontrol mekanizmaları, dışarıdan verilen tedavilere göre, tümör kontrolü için daha etkilidir.

Dezavantajları:

- İmmün sistemin kanser hücreleri üzerindeki devamlı baskısı nedeniyle, kanser hücreleri, immün sistemden kaçmaya çalışırlar.
- Kanser hücreleri, immün sistemden kaçmak ve ona karşı koyabilmek için antijenik yapılarını değiştirmeye çalışırlar.
- Kanser hücreleri, immün sisteme karşı koyma yeteneklerini artırmaya çalışır.
- İmmün sistem, kanser hücrelerine karşı reaksiyon verirken, normal dokulara karşı da immün cevabı başlatabilir ve zarar verebilir (75).

2.5.1.2. Multipl Miyelom İmmünoterapisi

MM tedavisinde, immünoterapi günümüzde çok cazip bir gelişmedir. Bu immünoterapi ile kanser hücrelerine karşı bağışıklık yanıt oluşması sağlanabildiği gibi olaşan bağışıklık yanıtı çok daha fazla artmasını çalışmalar ile kanıtlanmıştır (76).

MM hastalığında hedef immünoterapötik ajan olarak birçok antijen kullanılmaktadır. Bunlar arasında; MM hücrelerindeki hücre yüzey proteinleri veya kemik iliği stromal hücreler ve kemik iliği nişindeki hücresel olmayan büyüme faktörleri ve sitokinler yer almaktadır (77). Yapılan çalışmalara göre, yaşamsal faaliyetler, hücre sağ kalımı, proliferasyon, anjiyogenezis ve ayrıca MM ve kemik iliği hücreleri arasındaki etkileşimlerde dahil olmak üzere birçok mekanizmalar sayesinde tümör ilerlemesini kolaylaştırmaktadır (78). Bu yüzden MM için ideal bir immünoterapi geliştirmenin önündeki engeller; öncelikli olarak hastalığın heterojenitesi ve sadece malign hücreler tarafından ifade edilen "ideal hedef" tanımlamadaki güçlüklerdir. Habis plazma hücreleri, agresif büyümelerini destekleyen bir tümör ortamı ile korunmuştur. Bu nedenle bu tümör ortamı hedefleyerek yapılan çalışmalar makul bir yaklaşım gibi gözükmektedir (79).

2.5.1.3. Kanser Aşısı

Kanser aşıları, biyolojik tepki değiştiriciler olarak bilinen bir madde sınıfına aittir. Kanser aşısı, hem tümöre karşı spesifik olmasından dolayı konvansiyonel tedavilere göre yan etkisi daha az, hem de hafıza özelliğine sahip olmasından dolayı daha uzun koruma özelliğine sahiptir (80). Biyolojik yanıt modifikatörleri, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlar ve hastalıklarla mücadele kabiliyetini uyararak veya onararak çalışır. Kanser aşıları:

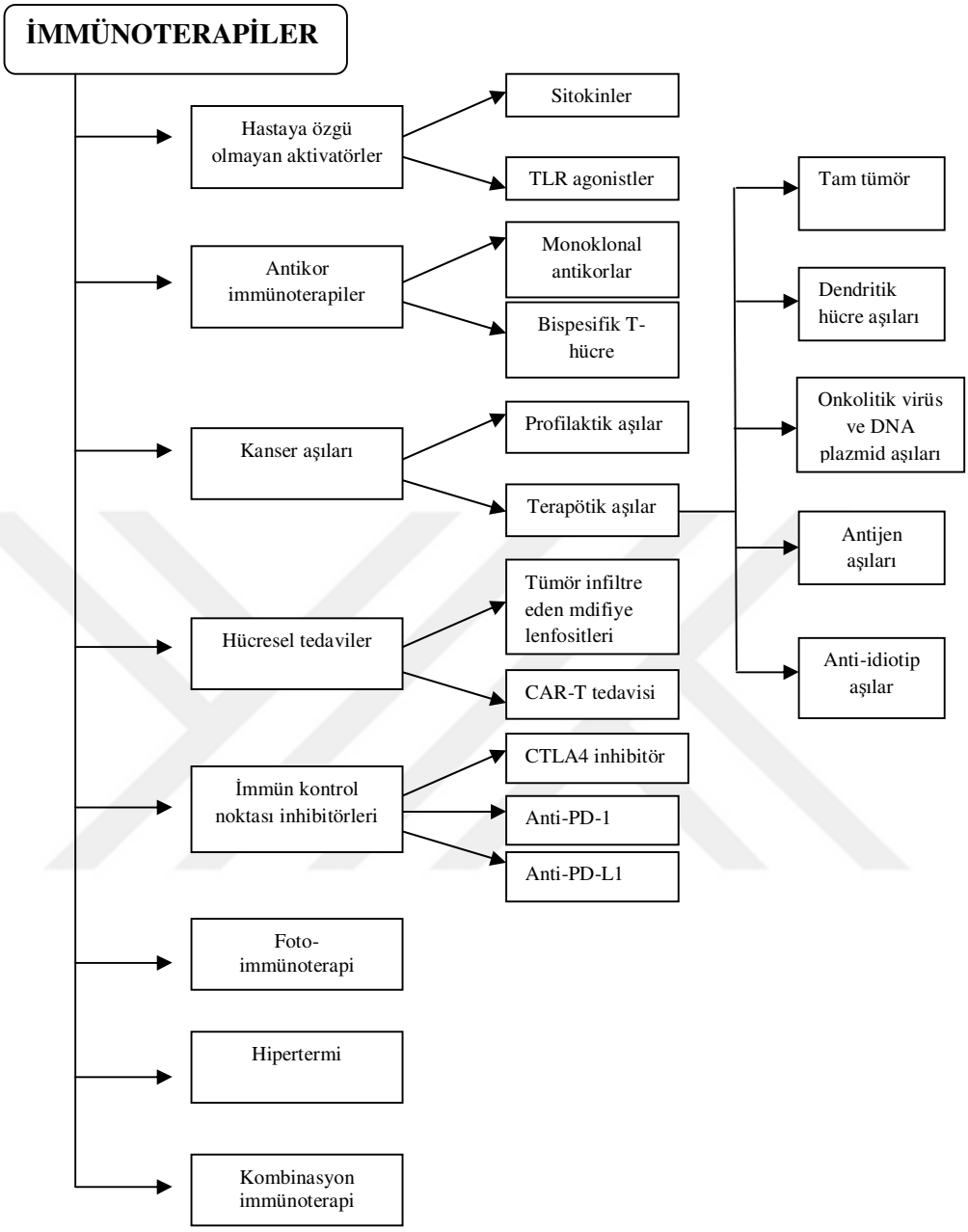
- Kanserin sağlıklı insanlarda gelişmesini önlemeyi amaçlayan önleyici (profilaktik) aşılar,
- Kansere karşı vücudun doğal bağışıklık tepkisini güçlendirerek mevcut bir kanseri tedavi etmeyi amaçlayan tedavi (terapötik) aşılar olmak üzere iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Bu tedavi aşıları immünoterapinin bir şeklidir (81).

Amerika Birleşik Devletleri'nde iki tür kanser önleyici aşı (insan papilloma virüsü aşıları ve hepatit B virüsü aşıları) mevcuttur ve bir tedavi aşısı (metastatik prostat kanseri için) mevcuttur. İdeal kanser aşısı, tümörojenik olan ve tümörojenik olmayan

hücreleri birbirinden ayırmalı, primer odakla birlikte rezidüel ve mikrometastatik kanser hücrelerini de ortadan kaldırmalı ve uzun süren immünolojik hafıza özelliğine sahip olmalıdır (82).

2.5.1.3.1. Kanser Aşısının Tipleri

Tümör aşılarında kullanılan kaynaklar, canlı bütün tümör hücreleri olduğu gibi tümör hücrelerinin purifiye veya saf olmayan ekstraktları, peptitler, ısışok proteinleri, rekombinant viral aşılar, DNA aşıları, dendritik hücre aşıları ve bunların immünojenik adjuvanlarıdır. Aşılar kişinin kendi tümöründen elde edilebildiği gibi (Otolog Aşılar), aynı tip hücre kültürlerinden elde edilmiş allojeneik aşılar da olabilir. Avantajı MHC tarafından denetlenmemiş olması ve tümörün spesifik antijenlerine yönelen kişiye özgü butik bir aşı (Lenfomadaki My Vax gibi) olmasıdır. Ancak immünojenitesi yetersiz olabileceğinden, immünojenik adjuvanlar veya tümör hücresinin immünojenitesini arttıracak genetik manipülasyonlar genellikle gerekli olur (83).



Şekil 2.5. İmmünoterapi ve kanser aşı çeşitleri (84)

Kanser aşıları; tümör hücre aşısı, peptid bazlı kanser aşısı, virüs bazlı kanser aşısı, DNA bazlı kanser aşısı ve DH kanser aşısı olmak üzere 5 farklı şekilde sınıflandırılır (85).

Virüs Bazlı Kanser Aşısı; Virüs bazlı kanser aşısında retrovirüs, adenovirüs ve pox virüs gibi ajanlar viral vektör olarak kullanılır (85).

Tümör hücre aşısı; Hastadan alınan kanser hücreleri inaktive edilerek tekrar hastaya verilir. İnaktive edilmiş hücreye saldıran immün sistem hücrelerinin, diğer kanser hücrelerine de saldıracağı düşüncesiyle yapılmıştır. Bu aşı ile tümör spesifik CD4+ ve CD8+ T lenfositleri aktive ederek immün sistemi uyarırlar. Bu aşılar ile yapılan çalışmalarda melanom, böbrek ve prostat kanserli hastalarda tümöre karşı spesifik immün yanıt gözlenmiştir (86).

Peptid Bazlı Kanser Aşısı; Kanser hücreleri üzerinde bulunan tümör antijenlerinin küçük peptid epitoplarından elde edilen peptid bazlı kanser aşısı sitotoksik T hücre cevabını uyararak malign hücreleri ortadan kaldırmasına rağmen, yarı ömürleri kısa olmasından dolayı yeteri kadar yanıt oluşturamazlar. Bu aşılarda kullanılan sentetik peptidler kimyasal olarak stabil olup, bakteri ve virüs kontaminasyonuna neden olmazlar (87).

DNA Bazlı Kanser Aşısı; Tümör antijenini kodlayan plazmid adı verilen DNA transferi ile yapılmaktadır. B hücreli lenfoma ve MM hastalarının tümöründen kaynaklanan VH ve VL genlerinden oluşan kimerik immünoglobulin (Ig) molekülünü kodlayan scFc'e dayalı DNA aşılarının hayvan modellerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca foliküler lenfomada (FL), idiyotipik scFv'ı kodlayan DNA aşılaması sonrasında hastaların % 38'inde hücresel ya da humoral immün yanıtın olduğu tespit edilmiştir (88).

Dendritik Hücre Kanser Aşısı; Bu tür aşılar, kansere karşı en etkili olanıdır. DH'ler, immün sistemin kanser hücrelerini tanımasına yardım eden özel antijen sunan hücrelerdir. DH'ler, kanser hücrelerinin antijenik parçalarını ayırır ve bu antijenik yapıyı immün sistemin T lenfositlerine tanıtır. T lenfositler, yabancı tanıdıkları bu antijeni taşıyan tüm hücrelere karşı reaksiyon başlatır ve onları ortadan kaldırmaya başlar (6,8).

2.6. DENDRİTİK HÜCRELER VE DENDRİTİK HÜCREDEN KANSER AŞISI ELDE EDİLMESİ

2.6.1. Dendritik Hücrenin Tanımı

DH'ler, kemik iliğinden farklılaşmış bir hücre ailesidir. Neredeyse tüm dokularda bulunur ve antijen sunan bir hücre ağı oluşturur. Yüzeyden projekte eden dendrit olarak adlandırılan birçok uzun örümceksi sitoplazmik uzantıları vardır. Dendritler ve diğer özellikleri bu hücre ailesinin antijen prezentasyonunda ve T hücre aktivasyonunda etkili olmasını sağlar. Uyarılmamış T hücrelerini en etkili şekilde aktive eden hücre grubudur (89).

DH'ler oldukça heterojen bir gruptur. Birçok organın bağ dokusunda bulunurlar. Lenfoid organların T bağımlı bölgelerinde daha boldur. Mononukleer hücrelerin %0,1-1'ni oluşturur. Deri, burun mukozası, respiratuar sistem ve intestinal sistem (mide, barsak) gibi vücudun dışa açılan bölgelerinde genelde yerleşim gösterirler (90).

DH'lerin fagositik aktiviteleri yok veya çok düşüktür. MHC Class I ve Clas II molekülü eksprese ederler. ATPaz aktiviteleri mevcut olup, çok az pinositik aktiviteleri vardır. Buna karşın peroksidaz aktiviteleri yoktur. Hareketli olabilirler. Örneğin; deriye temas eden antijeni alan LH'leri dermal lenfatikler yoluyla bölgesel lenf nodlarının T hücre zonlarına geçerek antijeni T hücrelerine sunarlar (91).

2.6.2. Dendritik Hücrenin Tarihçesi

DH'ler ilk olarak 1868 yılında Langerhans tarafından epidermis tabakasında gözlenmiştir. Daha sonra 1970 yılında Steinman tarafından, sıçan dalağında ve lenf düğümlerinde ışık ve elektron mikroskobu ile kesin olarak bulunup adlandırılmıştır. Bu hücreler morfolojik olarak makrofajlara benzemeyen hücrelerdir. Endositoza aracılık etmeleri oldukça zordur. Aynı zamanda, Veerman ratların dalağının timüs bağımlı alanında bulunan 'kenetlenen hücre grubunun' T hücrelerin farklılaşmasına ve çoğalmasına izin veren bir mikroçevre oluşturduğunu ileri sürmüştür (92).

DH'lerin fonksiyonlarını değerlendirmek için kemik iliği veya monosit türevli DH'ler kullanarak uygulamalar yapılmıştır. 1970'lerin sonunda Steinman ve Witmer DH'lerde bol miktarda MHC molekülleri olduğunu ve "karma lökosit reaksiyonunun" kuvvetli

indükleyicileri olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma DH üzerinde gerçekleştirilen ilk fonksiyonel uygulamadır (93).

Zinkernagel ve Doherty'nin ortaya attıkları hipotezde T hücrelerinin MHC molekülleriyle ve yabancı antijenlerle belirli karmaşık bir yapılarda olduklarını ileri sürmüşler ve bu sayede 1996 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülünü almışlardır (109). Nessenzweig, DH'lerin MHC'ye kısıtlı bir biçimde T hücrelerine ekzojen antijen sunduklarını saptamışlardır. Böylece DH'lerin güçlü birer T hücre indükleyicisi olduğu ve aynı zamanda doku reddinin nedenine de açıklık getirmişlerdir. 1982'de Van Voorhis ve ark. tarafından ilk insan DH'leri periferik kandan izole edilmiştir (94).

Witmer ve Steinman, DH'lerin lenfoid organlarda T hücre alanlarında yoğunla T hücrelerini aktive etmek için lenf düğümlerinden ayrıldıklarını ve enflamasyon alanına göç ettiklerini tespit etmişlerdir. Dahası Schuler ve Steinman fare epidermal LH'leri üzerinde incelemeler yaparken DH'lerin maturasyonu hakkında birçok bilgi elde etmiştir (95). Witmer-Pack ve ark. ise DH maturasyonu için GM-CSF gerektiğini ispat etmişlerdir (96).

Daha sonra araştırmacılar 1990'larda hücrelerin CD34+ kemik iliği hücrelerinden ya da CD14+ monositlerden çoğaldığını tespit etmişlerdir. Yapılmış olan bu keşifler sonucunda bu alana klinik çalışmalar giderek artmıştır.

2.6.3. Dendritik Hücre Fenotipi, Dağılımı ve Alt çeşitleri

DH'lerin birbirlerinden farklı fenotipik özelliklere, işlevlere ve dokulardaki yerleşimlere sahip olmaları DH'lerin çeşitli tiplerde heterojen bir grup oluşturduğunu göstermektedir. DH'ler HKH kökenli lenfoid ve miyeloid öncül hücrelerinden farklılaşmaktadır. Bu serinin ara öncülleri DH'lere farklılaşmanın tamamlanacağı ve potansiyel antijen girişinin olabileceği bölgelere yerleşmektedirler. DH'lerin alt tiplerinin şema hali Şekil 2.6.'de belirtilmektedir (97).



Şekil 2.6. Dendritik hücre alt tipleri ve etkileşimde bulundukları T hücre çeşitleri (97)

Diğer hemopoetik hücreler gibi kemik iliği progenitör hücrelerinden kaynaklanırlar. Hücreler daha sonra dalak ve deride özelleşirler. DH progenitörleri, kemik iliği dışında periferik kan, kord kanı ve timustan da kaynaklanabilir. Genel olarak antijen sunan hücrelere benzer ve yüzey antijeni (CD) taşırlar (98).

Periferik dokuda DH immatür karakterde iken matür formları timus ve sekonder lenfoid organlarda bulunur.

Dendritik hücrelerin 2 major tipi vardır:

1. Folliküler dentritik hücre-interdigitating hücre
2. Myeloid dendritik hücre (Langerhans hücresi vs.)

Myeloid tip, lenfoid doku ve lenfoid dışı doku olmak üzere iki kısımda incelenir (99).

2.6.3.1. Myeloid Dendritik Hücreler

İnsanda myeloid DH'lerin klasik (konvansiyonel=cDH) DH'ler olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler CD34+ myeloid kök hücreden ve monositlerden başlıca GM-CSF, IL-4 ve TNF-α varlığında oluşmaktadır. Oluşan DH matür hale geldiğinde "interstisyel DH" olarak bilinir. Bu hücreler başlangıçta CD14+, HLA-DR+, CD11a+ iken, matür hale gelince CD14 negatifleşir, HLA-DR ekspresyonu artar ve CD11c ile CD83 pozitifleşir. Bu hücrelerin, farklılaşmamış CD4 ve CD8 T lenfositleri aktive etme yetenekleri olduğu gibi, aynı zamanda B lenfositlerin plazma hücrelerine doğru farklılaşmasını sağlama yetenekleri de vardır (100).

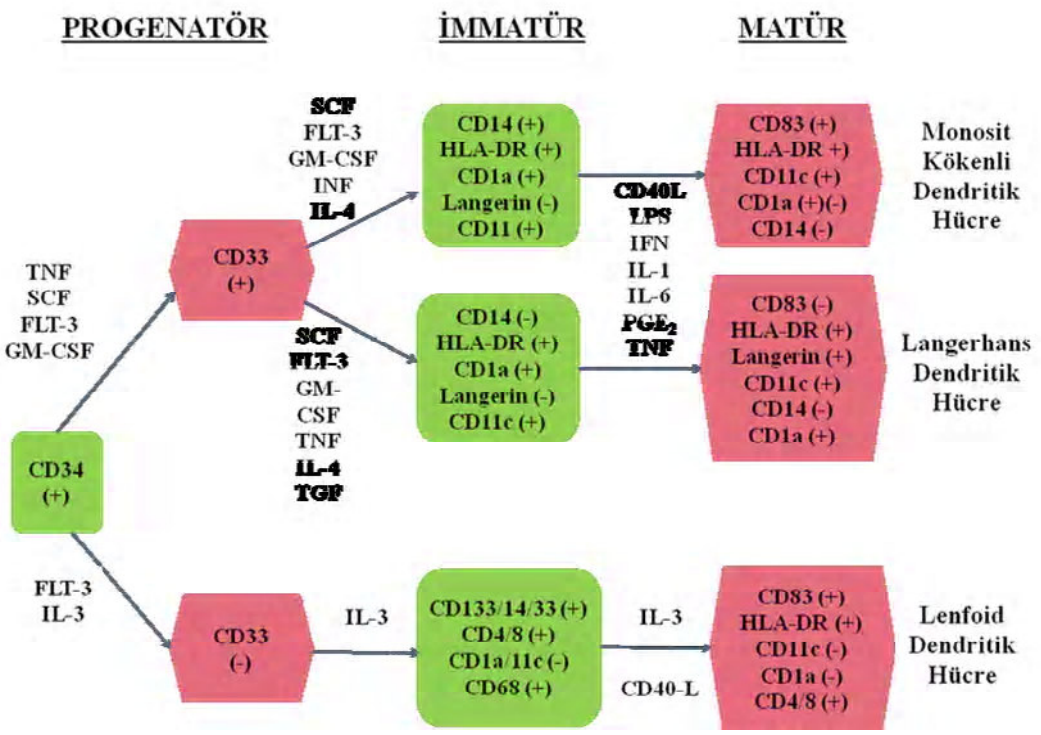
Myeloid DH'ler, cilt epitelinde bulunan LH'leri ve cildin dermisinde veya solid organların interstisyumunda bulunan dermal veya interstisyel DH olmak üzere başlıca iki tiptir. DH çeşitleri:

1. Langerhans hücresi (LH): En iyi tanınmış DH tipi olan LH, ilk kez 1868 yılında bir tıp öğrencisi olan Paul Langerhans tarafından gösterilmiştir. Epidermisin tüm tabakalarında olmakla beraber, özellikle stratum spinosumun üst bölümünde tanımlanmıştır. Kemik iliğindeki CD34+ kök hücresinden kaynaklanır. Vücuttaki birçok epitelde, deri (epidermis), konjunktiva, rektal ve vaginal mukoza, nazofarengiyal mukozada % 3-8 oranında bulunur. Lenfositlere ASH'lerin fonksiyonuna sahiptir. Antijeni yakalar ve lenf düğümüne taşır.
2. Foliküler Dendritik Hücre: Lenf düğümlerinin germinal merkezinde bulunur. Çok sayıda, ince, saç teli gibi sitoplazmik dallar ile B lenfositlerin arasına uzanır. Bu hücreler yalnızca primer ve sekonder lenfoid folliküllerde bulunur. Kemik iliğinden türemez, antijen sunamaz, endositoz yapamaz. Fagositik aktivitesi yoktur. Bununla birlikte antijeni yakalamada ve antikor ile birleşmesinde oldukça etkindir. Bu hücreler IgG için Fc reseptörleri taşır. Antijen endositozla alınmaz, sitoplazmik uzantılar arasında yüzeyde kalır. Foliküler DH'ler, ASH'ler değildir ve yüzeylerinde MHC Class II antijeni yoktur.
3. İnterdigitating Dendritik Hücre (Parmaksı Foliküler DH): Özellikle timusta bulunur. Lenf düğümünün T hücre zonunda (parakorteks) da bulunmakla beraber sayıları çok fazla değildir. Görünüm olarak ince sitoplazmik uzantıları

vardır ve yandaki diğer hücrelerle yakın temas halindedir. Bu nedenle bu hücrelere "interdigitating DH"ler denir. Deriye temas eden antijeni alan LH'leri dermal lenfatikler yoluyla bölgesel lenf düğümlerinin T hücre zonlarına geçerek antijeni interdigitating hücre vasıtasıyla T hücrelerine sunar. İnterdigitating hücreler immün işaretlemede CD11a ile boyanır. Timusta yer alan timik DH'ler ise T hücrelerin negatif seleksiyonunu sağlar (101).

2.6.3.2. Lenfoid Dendritik Hücreler (Plasmasitoid DH)

Lenfoid DH'ler CD34+ hücrelerden köken alıp lenfoid hücre yapısına yönelen ve IL-3, CD40L ile oluşumu gerçekleşen CD11c-, CD11a, CD8-/CD4+ ve CD83+ hücrelerdir. Bunlar "plasmasitoid DH" (pDH) olarak da adlandırılır ve lenfoid dokulardaki T lenfosit bölgesinde bulunur. CD123+ olan bu hücreler Th2 immün yanıta yol açar. In vivo toleransta görev alır (102).



Şekil 2.7. Dendritik hücrelerin gelişimi (102)

2.6.3.3. Interferon-Üreten Katil Dendritik Hücreler (Interferon-producing Killer DC=IKDC)

Yeni tanımlanan hücre tipidir. MHC Clas II, CD80/86, CD40, CD116, CD11c, B220 gibi yüzey belirteçleri eksprese eder. Belirgin olarak IFN-α ve IL-12 üretir, ayrıca NK hücrelere benzer mekanizmada hedef hücreyi öldürmeye yönelik yetenekleri vardır. Antijenle temas sonrası IKDC hücreleri öldürme aktivitesine geçer, antijen sunma özellikleri konkomitant olarak artış gösterir ve bu hücreler IFN-α, IL-15, IL-12 sekrete eder. Böylece viral patojenlere karşı doğal immün yanıtın oluşumu ve kuvvetlendirilmesinde görev alır (103).

2.6.4. Reseptör ve Sitokinleri

DH'lerin saptanmasındaki başlıca zorluk henüz DH'yi spesifik olarak tanımlayan hücre yüzey belirleyicisinin tespit edilememiş olmasıdır. Bundan dolayıda DH'yi tanımlamak için çeşitli yüzey belirleyicilerinin varlığı veya yokluğunun birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunların neler olduğuna baktığımızda;

- CD3 (T cell), CD14 (monosit), CD19 (B cell), CD56 (NK cell), CD66b (granulosit) gibi çeşitli spesifik yüzey belirleyicilerinin yokluğunda, bol miktarda MHC Clas I-II, CD1a gibi antijen sunan moleküllerin varlığı,
- CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-3),CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) ve CD58 (LFA-3)'yi içeren adezyon moleküllerinin varlığı,
- Kostimülan moleküllerden aktivasyon belirleyici olarak CD40, CD80, CD83 ve CD86 ekspresyonu,
- Reseptör aracılı antijen alımı için Fc reseptörleri CD32, CD64 ve immün kompleks endositosisi için C3bi-kompleman reseptörleri CD11b gibi reseptörleri içerirler (99).

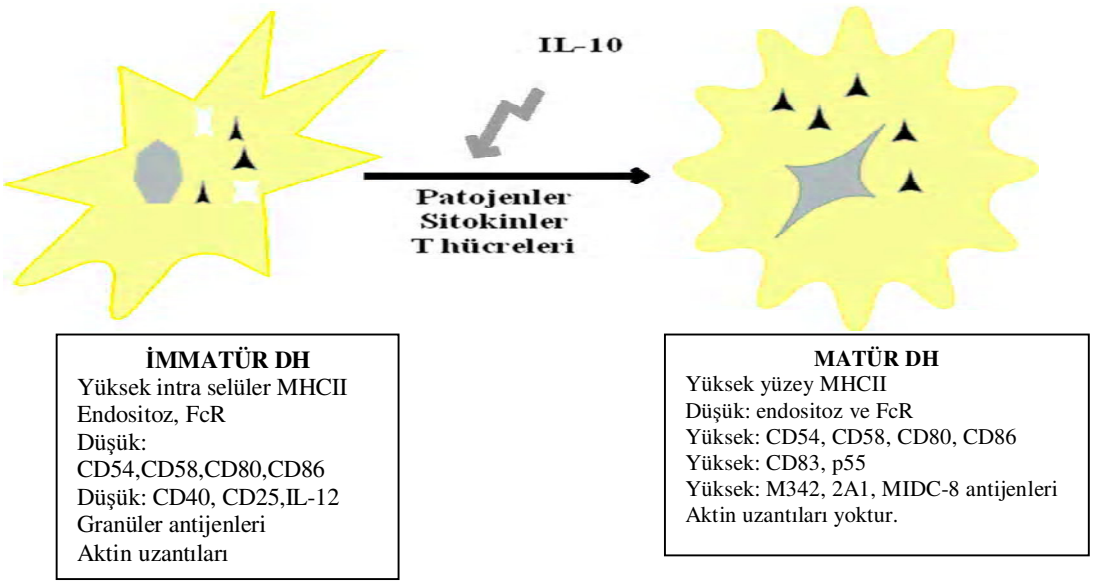
Aynı zamanda bakteri karbonhidratlarına bağlanan DEC-205 ve makrofaj mannoz reseptörleri gibi C-tip lektin reseptörleride mevcuttur. DH'lerin linage negatif ancak HLA-DR pozitif hücreler olduğu ve gelişim evrelerine göre önce erken evrede CD86 ekspresse ederken, ardından matürasyonla birlikte CD54, CD58, CD80, CD83 ekspresyonunun gerçekleşmesi ve CD1a ekspresyonunun matürasyonla birlikte belirginleştiği saptanmıştır (102).

Buna göre özetle; spesifik yüzey belirleyicileri (CD3, CD14, CD4, CD8, CD19, CD56, CD66b, CD20, CD11a, CD40, CD80, CD83, CD86) olarak tanımlanır. HLA-DR, CD80 veya CD83 pozitifliği matür DH için; HLA-DR, CD86 pozitifliğinin ise immatür DH tanımlamakta kullanılan temel yüzey molekülleri olduğu gösterilmektedir. DH'ler ayrıca IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF, trans-forming growth factor (TGF)-β, IL-1, IL-4, IL-10, GM-CSF, interferon (IFN) gibi sitokinleri eksprese etme özelliğine sahiptir (103).

2.6.5. Matür ve İmmatür Dendritik Hücreler

DH'lerin matürasyon fenotipi, immün yanıtın düzenlenmesinde ve Th1/Th2 yanıtlarının oluşumunda önem taşır. Son çalışmalarda DH'lerin gelişim aşamalarına göre immatür ve matür olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. İmmatür DH'ler antijeni yakalayıp işler, yüksek oranda IL-10 salgılayarak Th2 yanıtı oluşturur ve IL-12 salınımı da baskılar. Antijenik uyarı devam ettikçe DH'ler matürasyona uğrar, sekonder lenfoid organlara göç eder, burada antijeni sunarken yüksek oranda IL-12 salgılayarak Th1 yanıtını tetikler (103).

Aynı zamanda immatür DH'lerin üretebildiği anjiogenik faktörlerin (VEGF, bFGF) matür DH'lerde azaldığı görülür. İmmatür karakterdeyken antijeni yakalama ve işleme tabi tutma özelliği olan DH'nin çevresel uyaranlarla matürasyon süreci geliştikçe, T hücre uyarımı yapan hücre karakteri taşımaya başlamaktadır (104).



Şekil 2.8. Dendritik hücrelerin matürasyonu esnasındaki değişimi (104)

Matür dendritik hücreler, kemokinlerin bir cinsini üreterek, saf T hücrelerini çekmek ve toplamak gibi eşsiz bir kabiliyete sahiplerdir. Bununla birlikte böylece birincil T hücreleri yanıtlarını uyarma kabiliyetine sahip olurlar. Morfolojik olarak geniş tabakalar halinde işlenmesi ile karakterize, matür CD83+ dendritik hücreler, adhezyon ve sinyali çoğaltmak için T hücreleri üzerindeki reseptörler ile etkileşime giren ko-sitimulatör molekülleri de ekspres ederler. Bununla birlikte, matür dendritik hücreler, LPS aktivasyonu sırasında veya CD40 ligasyonu sonrası yüksek miktarda IL-12 üretirler (105).

Tablo 2.7. Dendritik hücrelerin matürasyon özellikleri (106)

	İmmatür DH	**Matür DH**
1-Dendritik çıkıntılar	Belirgin değildir	Çok belirginleşmiştir
2-Antijen yakalama		
Makropinositoz	++	-
Mannoz reseptörü	++	-
Fc reseptörleri	++	-
3-Antijen sunumu		
Klas II Ag	++	++
Klas II sentezi	++	-
Klass II yarı ömrü	10 saat	>100 saat
Klas I Ag	+	++
Klas I sentezi	-	++
4-Co-stimülan moleküler		
CD80 (B7.1)	-	++
CD86 (B7.2)	-	++
5-Adhezyon molekülleri		
CD54 (ICAM-1)	-	++
CD58 (LFA-3)	±	++
CD83	±	++
6-T hücre stimülasyonu	+	+++

2.6.6. Fonksiyonları

Vücudumuz patojenlere karşı hem doğal hem de kazanılmış immün mekanizma ile yanıt vermektedir. Doğal immün mekanizma hızlı olmakla birlikte hafıza özelliğine sahip değilken, kazanılmış immün mekanizma günler ya da haftalar içerisinde gelişmesine rağmen hafıza özelliğine sahiptir. Hem doğal hem de kazanılmış immüniteyi uyarma özelliğine sahip olan DH'nin immün sistemde birçok görevi bulunmaktadır (107). Bu hücreler periferik dokularda antijenleri yakalayıp bunları lenfoid dokulara taşıyarak hücresel immün cevabı başlatmak için T lenfositlerine tanıtır. Ayrıca NK, T ve B lenfositleri aktive ederken, diğer taraftan ekzojen uyaranlara karşı IL-12 ve IFN, endojen uyaranlara karşı TNF-α, IL-1 ve IFN gibi sitokinler salgılayarak immün sistemin uyarılmasına katkıda bulunurlar. Farklı olarak vücudun kendi kendine uyarılmış T lenfositlerinin anerji ya da delesyonunu sağlayarak ve Treg hücreleri uyararak immün tolerans gelişimine neden olurlar (108).

DH'nin fonksiyonları başlıca 3 grupta toplanır:

1. Antijen sunumu ve T lenfosit aktivasyonu,
2. İmmün toleransın oluşumu ve devamı,
3. Özellikle folliküler DH'de olmak üzere B lenfositler üzerinden humoral (bellek) immünitenin oluşturulması (108).

DH'ler normalde immatür formda bulunmaktadırlar. Yüksek endositik aktivite ve düşük T hücre aktivasyonu bulunur. Virus, bakteri, fungus ile temas ettiğinde matür dendritik hücre haline dönüşmektedirler. İnflamasyon, DH'lerin kemik iliğinden kan veya lenf yoluyla periferal lenfoid organların T bağımlı bölgelerine göçünü uyarır. Patojenleri fagosite eder. Hücre yüzeylerindeki MHC moleküllerini kullanarak proteinleri degrade eder. Aynı zamanda T hücre aktivasyonu gerçekleştirir. Kan yoluyla, dalak ve lenfoid dokulara antijen sunan hücre görevi görerek yardımcı ve killer T hücre ile B hücreleri aktive etmektedir. Antijen taşıyan hücreler afferent lenfatikler yoluyla komşu lenf nodlarına ulaşırlar. T hücre parakortikal zonunda interdigitating hücrelere, B hücre germinal matrikste ise folliküler dendritik hücrelere antijen sunarlar (109).

2.6.7. Dendritik Hücre Kanser Aşısı Elde Edilmesi

DH kanser aşısının geliştirilmesinde ex vivo ve in vivo DH tedavisi olmak üzere iki yöntem kullanılır. Ex vivo DH tedavisi, vücut dışında tümör antijenlerinin olgun DH'lere yüklenmesi ile gerçekleştirilir. Kanserli hastaların periferik kanından lökoferez yöntemiyle DH elde etmek için periferik kan MNH, monosit ya da CD34+ hematopoietik hücreler toplanır. Monositler GM-CSF, IL-4 ve IL-13 ile CD34+ hematopoietik hücreler ise GM-CSF, TNF, FLT3 ligand ve c-kit ligand ile kültüre edilerek olgunlaşmamış DH'ye dönüştürülür. Olgunlaşmamış DH'lerin IL1β, IL-6, TNF-α, IFN-α, IL-15 ve PGE2 içeren sitokin kombinesi ile inkübe edilerek olgunlaşması sağlanır. Ex vivo olarak elde edilen DH'ye peptid, protein, tümör lizatı, apopitotik tümör cisimciği gibi tümör antijenleri yüklenerek DH kanser aşısı elde edilir. Ayrıca tümör hücresi ile birleşmiş DH ve tümör antijeni kodlayan cDNA ya da mRNA transfer edilmiş DH'de aşı metodu olarak kullanılmaktadır (110).

2.6.7.1. Multipl Miyelom İçin Dendritik Hücre Bazlı Kanser Aşısı

MM anemi, litik kemik lezyonları, böbrek fonksiyon bozukluğu, hiperkalsemi, hipogammaglobulinemi ve artmış enfeksiyon riski ile giden kemik iliğinde plazma hücrelerinin klonal çoğalması ile karakterize malign bir hastalıktır. MM hematolojik kanserlerin % 10'unu, tüm kanserlerin % 1'ini oluşturan en yaygın görülen malign hematolojik hastalıklar arasında yer almaktadır (4). MM'de OKHN ile % 22 oranında tam yanıt, % 81 oranında toplam yanıt elde edilmiş ve standart kemoterapiye göre hastalıksız yaşam süresi ve toplam yaşam süresinin daha uzun olduğu saptanmıştır. Ayrıca yeni geliştirilen ilaçların kullanıma girmesi ile yüksek tedavi yanıt oranlarına ulaşılmasına rağmen, halen uzun süreli tam yanıt sağlanamamaktadır. Günümüzde MM hastaları için kullanılan DH kanser aşısı olarak idiyotip (Id) protein antijeni yüklü DH kanser aşısı ve tüm tümör kullanılmaktadır (111).

Kanserli hastaların periferik kanından lökoferez yöntemiyle DH elde etmek için periferik kan MNH, monosit ya da CD34+ hematopoietik hücreler toplanır. Monositler GM-CSF, IL-4 ve IL-13 ile CD34+ hematopoietik hücreler ise GM-CSF, TNF, FLT3 ligand ve c-kit ligand ile kültüre edilir. Böylece immatür DH'ye dönüştürülür. Olgunlaşmamış DH'lerin IL1β, IL-6, TNF-α, IFN-α, IL-15 ve PGE2 içeren sitokinler ile inkübe edilerek olgunlaşması sağlanır (48).

MM hastalığının immünoterapi tedavisi için kullanılması amacıyla; DH bazlı kanser aşısı üretimi çalışmasında izlenen işlem basamakları:

- MM hastadan aferez işlemi ile toplanan periferal kandan MNH'ler ve CD34+ HKH elde edilesi,
- MM hastasından tanı için elde edilen ve biyopsi ile toplanan tümör kemik iliği numunesinin tümör lizatı olarak kullanılması,
- Daha sonra aferez ürünü ve tümör lizatı, MNH ve CD34+ HKH'lerin in vitro şartlarda IL-4 ve GM-CSF sitokinleri desteği ile immatür DH'lere dönüştürülmesi,
- Üretimin kontrolleri için akım sitometrik analizler gerçekleştirilmesi.

2.7. AFEREZ ÜRÜNÜ İLE TÜMÖR HÜCRE LIZATININ ELDE EDILMESI VE ANALIZ IŞLEMLERI

2.7.1. Tümör Hücre Lizatı Elde Edilmesi (Kemik iliği aspirayasyonu)

Doktor kan kanseri türlerinden (lösemi, lenfoma veya MM dâhil olmak üzere) herhangi birisinden şüphelendiği hastalar için kemik iliği örneği toplanmasını isteminde bulunur. Böylece kemik iliğinde bulunan kırmızı kan hücrelerin, beyaz kan hücrelerin ve trombosit hücrelerin gelişimi ve işlevinin incelemesi ile hastaya teşhis koymaktadır. Genelde aspirasyon işlemi iki bölgeden yapılır: Göğüs kemiği veya kalça kemiği (pelvis dediğimiz leğen kemiği). Göğüs kemiğinden yapılacak ise hasta sırt üstü yatırıldı ve göğüs kemiğinin (iman tahtası da denir) ikinci kaburga hizasına gelen kısmından örnek alınır. Kalça kemiğinden örnek alınacak ise hasta sırt üstü veya yan yatırılır. Kemik iliği aspirasyon ve biyopsisinin yapılacağı alanda cilt antiseptik solüsyonla (genellikle batikon) silinerek üzeri delikli steril örtü ile örtülür. Girişim sırasında hastanın ağrı duymaması için cilt, cilt altı ve kemiğin yüzeyi lokal anestetik bir ilaç ile uyuşturulur. Bu sırada hasta iğnenin batmasına bağlı hafif acı ve lokal anestezi (sınırlı uyuşma) ilacın verilirken oluşturduğu hafif yanma benzeri bir his duyar. Lokal uyuşturucunun etkisi hemen başlayacağı için bu his kısa sürer. Bu basamakta aceleci olmamak, bölgenin iyi uyuştuğundan emin olmak gereklidir. Aksi halde hasta beklenenden daha fazla ağrı hissedecektir. Doğru şekilde yapılmış uyuşturma işlemi örnek alımının daha kolay olması ve hastanın daha az ağrı hissetmesine yarayacaktır (112).

Uyuşturma işlemi ardından özel aspirasyon iğnesi ile kemik iliği boşluğuna varılır ve sıvı şeklinde kemik iliği örneği enjektöre çekilir. Hasta bu esnada 1-2 saniye süreyle

hafif bir acı veya ağrı hissedebilir. Uyuşturma işlemi yapıldığından hasta bu basamaklarda ağrı hissetmez ancak iğnenin ilerletilmesi esnasındaki bastırmaya bağlı bir basınç hissedebilir. İlik örneğinin alınmasının ardından aspirasyon iğnesi çıkarılır. Kemik iliği örneğinin alınmasından sonra, kanama durana kadar hemşire iğnenin girdiği yerin üzerine geniş basınçlı bir bandaj uygulayacaktır. Sonrasındaysa bunun yerini daha küçük bir bandaj alacaktır (113).

Toplanmış kemik iliği örnek flow sitometri laboratuvarına Heparin ya da EDTA'lı tüpün içinde getirilir. Aspirasyon örneklerinde immünofenotipleme (akar hücre ölçümü = flow cytometry) dışında; metafaz sitogenetiği, FISH, moleküler genetik (PCR, vd), mikrobiyolojik kültür (mikobakteriler, leishmania, histoplasma) ve boyama (aside dirençli mikobakteriler) ile çeşitli hücre kültürü (örneğin; koloni oluşturucu birimler = colony forming units) gibi analizleri yapma olanağı da vardır (114).

2.7.1.1. Miyelom Tanısı Konmasına Yönelik Akım Sitometrik Analiz

MM olduğundan şüphelenilen hastadan kemik iliği alınmasına karar verilmektedir. Flow sitometri laboratuvarına gelen kemik iliği numunesinin analizinde akım sitometri cihazının tıkanmaması için uygun boyutlara sahip filtre ile süzülmektedir. Bu kemik iliği numunesinin akım sitometrik analizi için yüzeyel ve hücre içi çalışma olmak üzere iki farklı çalışma yapılmaktadır. Bu işlemler Erciyes Üniversitesi flow sitometri laboratuvarında rutinde yapılan bir işlemdir

Elde edilmiş olan kemik iliği numunesi flow sitometri laboratuarındaki rutin tanı koyma işlemlerinde kullanıldıktan sonra kalan numune çalışmada tümör lizatı olarak kullanılmak üzere -80^{o}C buzdolabına kaldırıldı.

Yüzeyel Çalışması

1. Tüp içine CD38 (10 µL), CD138 (10 µL), CD56 (5 µL), CD19 (5 µL), CD45 (5 µL) ve CD27 (5 µL) antikorları eklenir.
2. Antikorların bulunduğu tüpün üzerine 100 µL süzülmüş olan kemik iliği numunesinden eklenir.
3. Tüp 15 dakika karanlıkta inkübe edilir.
4. Tüpün üzerine 500 µL lizing solüsyonu eklenir.
5. Tüp 10 dakika karanlıkta inkübe edilir.

6. Yıkama işlemi için 3 µL izoflow eklendi ve 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. süpernatant döküldü. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmaktadır.
7. Yıkama işlemi bittikten sonra oluşan pelet üzerine birkaç damla izoflow eklenip, kısa bir süre vortekslendi. Böylece hazırlanan tüp Beckman Coulter Navios akım sitometri cihazında okunma yapılabilmesi için hazır hale gelmektedir.

Hücre İçi Çalışması

1. Tüpe uygun filtre ile süzmüş olan kemik iliği numunesinden 100 µL eklenir.
2. Bu kemik iliği numunesi üzerine reagent-1 solüsyonu eklenir.
3. Tüp 15 dakika karanlıkta inkübe edilir.
4. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilerek pelet oluşması sağlanır.
5. Süpernant atılarak pelletin üzerine reagent-2 solüsyonu eklenir.
6. Tüp 5 dakika karanlıkta inkübe edilir.
7. Daha sonra bu tüpün üzerine kappa (10 µL), lamdba (10 µL), CD38 (5 µL), CD45 (5 µL), CD19 (5 µL) ve CD27 (5 µL) antikorları ilave edilip 15 dakika karanlıkta inkübe edilir.
8. Yıkama işlemi için 3 µL izoflow eklenip, 5 dakika 1500 rmp'de santrifüj edilerek pelet oluşumu sağlanır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmaktadır.
9. Yıkama işlemi bittikten sonra oluşan pelet üzerine birkaç damla izoflow eklenip, kısa bir süre vortekslendi. Böylece hazırlanan tüp Beckman Coulter Navios akım sitometri cihazında okunma yapılabilmesi için hazır hale gelmektedir.

2.7.2. Multipl Miyelom Hastasının Kök Hücre Aferezi

Aferez ünitesinde CD34+ KH ve MNH toplanması iki farklı toplama yöntem uygulanmaktadır. Bunlardan birincisi kemoterapi ve büyüme faktörünün hastaya bir arada uygulanmasından sonra kök hücre aferezi ile hücrelerin toplanmasışeklinde gerçekleşmektedir. Diğer yöntem ise sadece büyüme faktörünün hastaya uygulanmasından sonra kök hücre aferezi ile hücrelerin toplanması şeklinde gerçekleşmektedir. Genelde hasta prosedüründe uygulanması en çok tercih edilen yöntem kemoterapi ile büyüme faktörünün bir arada kullanıldığı yöntemdir.

Erciyes Üniversitesi Mehmet Dedeman Hematoloji ve Onkoloji Hastahane'sine başvuran ve OKHN adayı olan MM hastalarına doktor kontrolünde ve uygun tetkikler sonucu kemoterapiye başlanmaktadır. Kemoterapi uygulanan MM hastasının mutlak

nötrofil sayısı (MNS) düzenli olarak kontrol edilip ve genellikle kemoterapi işleminin uygulanmaya başlandığı günden itibaren 5. günde hastanın mutlak MNS'e 500'ün altına düştüğü anda OKHN için uygun olan MM hastasına otolog mobilizasyon standart uygulama kılavuzu 208 (115) göre, 10 µg/kg/gün dozunda subkutan G-CSF (1 MIU/kg) (büyüme faktörü) uygulanmaya başlanmaktadır. Bunun sonucunda MM hastası nötropeniye girer ve daha sonra lökopenin ardından lökosit sayısı µl'de 1000'in üzerine çıktığı günden itibaren başlayarak günlük olarak hedef CD34+ düzeyine ulaşılıp ulaşılmadığının kontrolü yapılarak beklenen hedefe ulaşıldığında (≥20 CD34 + hücre / µl periferik kan) hücre toplanmaya başlanmaktadır. Bu süre kişiye bağlı olarak 10 ile 15. gün arasında gerçekleşmektedir. Etkin miktara ulaştığı tespit edilen hücreler aferez laboratuvarında, OKHN hasta için amicus aferez cihazı kullanılarak CD 34+ kök hücre ve mononükleer hücrelerin mikrolitredeki sayısı $3x10^6$ /kg hücre olacak şekilde toplanmaktadır.

Toplanmış olan aferez ürününün nakil için yeterli olduğunun belirlenmesinde kullanılan formül;

$$\frac{\text{Toplanmış ürünün hacmi x Mikrolitredeki CD34+ kök hücre sayısı}}{100}$$

Hastaya göre bu değer değişkenlik göstermektedir. Yapılan hesplama ile hastaya 2-4 kere nakil yapılabilmek üzere yetecek kadar aferez ürününü toplanması ve flow sitometri laboratuarında bu aferez ürününün canlılık ve hücre sayım testlerle kontollünün yapılması gerekmektedir.

2.7.2.1. Aferez Ürününün Hücre Sayımı ve Canlılık Testinin Yapılması

Anti-CD34/CD45 gibi monoklonal antikorlarla HKH oranının belirlenebilmesi ve bu hücre grubunun potansiyel tedavi edici olarak yoğunlaşmış şeklinde kullanılmasını kolaylaştırmaktadır. Metod, akım sitometrinin tekil bir platformda (Ishage yöntemi) gerçekleşmektedir ve bu analizler Protokol Ishage tarafından kabul edilen ve EWGCCA tarafından modifiye edilen, uygun kapılama ile CD34+ hücrelerin mutlak miktarı ölçülmektedir. Ayrıca stem kit içindeki diğer bir ürün olan intakt membrana sahip olmayan ve bu sayede apoptoza uğramış hücreleri boyayan, çift sarmallı DNA'ya bağlanabilen, 7-amino-aktinomisin D (7-AAD) boyası ile canlılık testi yapılmaktadır.

Multipl miyelom hastasından toplanan CD34+kök hücrelerin varlığı ve canlılık oranları Erciyes Transplant Merkezi, CD 34 (+) Hücre Sayımı Standart Uygulama Kılavuzu sop no: 196 'ya (116) göre analiz edildi. Buna göre;

1. OKHN hastasının toplama işlemi sırasında aferez ünitesi toplanan üründen numune göndererek biyokimya laboratuarından tam kan sayım testi isteminde bulunmaktadır. Böylece yapılan tam kan sayım analizi sonucunda WBC sayısı belirlenmektedir.
2. Belirlenen WBC sayısına göre aferez ünitesi flow sitometri laboratuvarına periferik kan numunesi gönderir.
3. Akım sitometrik analiz için gönderilen periferik kan numunesi WBC değerine göre distile su ile 20.000'e sulandırılarak kullanılır.
4. Test tüpünün içine stem kit antikorları olan CD45/CD34/7AAD'dan 20 µL eklenir.
5. Bu tüpün üzerine daha sonra 100 µL sulandırılmış periferik kan numunesi eklenip, tüp 15 dakika karanlıkta inkübe edilir.
6. Tüpün üzerine 500 µL stem kit lizing solüsyonu eklenip, tüp 10 dakika karanlıkta inkübe edilir.
7. Stem count solüsyonu eklenir ve hazırlanan tüp Beckman Coulter akım sitometri cihazında Ishage yöntemi ile analizi yapılmaktadır.

Burada yapılan analizler sonucunda elde edilen canlılık yüzdesi ve hücre sayımı değerleri aferez ünitesine verilir ve bu değerlere göre otolog nakil için toplanan ürünün içinde yeterli miktarda CD34+ kök hücre ve mononükleer hücrelerin bulunup bulunmadığı belirlenmektedir. Eğer yeterli sayıda ürün elde edilmiş ise toplama işlemine son verilmektedir.

Tez çalışmasındaki uygulamaların gerçekleştirmek üzere elde edilen aferez ürünün durumuna göre yaklaşık $12x10^6$- $25x10^6$ hücre içerecek şekilde laminar hava kabinde numune falkon tüpüne alındı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Hematoloji kliniğine başvuran 10 multipl miyelom hastası ve Aferez ünitesinde otolog nakil için kök hücre toplanan 10 hastanın örnekleri kullanılarak çalışmalar yürütüldü. Yapılan uygulamalar Erciyes Üniversitesi Genkök Araştırma Merkezi'nin kök hücre laboratuvarındaki imkânlar kullanılarak gerçekleştirildi. Bu uygulamaların yürütülebilmesi için gerekli olan Etik Kurul Onayı 22/01/2016 tarihli ve 2016/50 nolu protokol kodu ile Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan izin alındı. Bu çalışma için kullanılan araç-gereçler, kimyasallar maddeler ve sarf malzemeler aşağıda belirtilmektedir.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- $4^{o}C$ Buzdolabı (Siemens)
- $-20^{o}C$ Buzdolabı (Panasonic)
- $-80^{o}C$ Buzdolabı (Panasonic)
- Laminar Hava Akış Kabinleri (Biosafety Cabinet Class2 ve ADS)
- Pipetör (Gilson)
- CO_2 İnkübatörü (Panasonic, MCO-170AICUVH)
- Inverted Mikroskop (Leica)
- Santrifüj Cihazları (Nuve ve Hettich Zentrifugen Rotina 380R)
- Vorteks Cihazı (Dragon Labs MX-S ve Heidolph)
- Akım Sitometri Cihazı (Beckman Coulter Navios, 3 Lazer / 10 Renk)

3.1.2. Plastik Malzemeler

- Filtresiz Kapak 175 cm^2 Flask (Sigma, CLS431079)
- Steril Pipetler (Nest)
- Pipet Uçları (Isolab)
- 50 ml Vida Kapaklı Konik Tüp (Falkon) (Nest, 602051)

3.1.3. Kullanılan Kitler, Sitokinler ve Sitokinler

- rHuGM-CSF (Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) (Genaxxon Bioscience)
- IL-4 (Recombinant Human Interleukin-4) (Genaxxon Bioscience)
- HLA-DR (Beckman Coulter, B36291)
- CD34 (Beckman Coulter, A21691)
- CD45 (Beckman Coulter, B36294)
- CD14 (Becton Dictinson, 333951)
- CD80 (Beckman Coulter, IM1853U)
- CD83-86-209 (Becton Dictinson, 334098)
- Steril DPBS (Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen) (Gibco, 14190094)
- ANNEXİN-V KİTİ (Macs, 130092052)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar

- İzoflow (Beckman Coulter, 41116015)
- FBS (Fetal Bovine Serum)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Genaxxon, C4024.050)
- L-Glutamine (Biological İndustries, 03-022-1B)
- Penisilin/ Streptomisin (Gibco, 15140122)

3.2. YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji kliniğine başvuran, hastane konseyinden OKNH yapılması için onay kararı alınan ve daha sonra nakil işlemine onam veren MM hastalarına ilk yapılan işlem mobilizasyonu rejiminin belirlenmesidir. Daha sonra mobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan MM hastalarından otolog nakil için kullanmak üzere kök hücre aferez işlemi CD34+ kök hücre ve MNH' ler toplanmaktadır. Toplanmış olan bu aferez ürününden çalışmada kullanılmak üzere $12x10^6$-$25x10^6$ hcre içeren miktarda numune alındı. Ayrıca flow sitometri laboratuvarına multipl miyelom hastalığından şüphelenilen ve bu amaçla hastadan toplanan kemik iliği numunesi için rutin tanı işlemleri yapıldı. Bu tanı işlemleri sonucunda %30-100 arasında CD45 lokalizasyonu oranına sahip MM hastalığı tanısı konmuş hastalar çalışmaya dâhil edildi. Bu MM hastasının toplanmış kemik iliği numuneleri tümör hücre lizatı olarak çalışma da kullanıldı. Çalışmaya dâhil edilen tüm hastalar için bilgilendirme onam formları doldurulduu.

Bu tez çalışması ile uygun in vitro şartlar altında DH'lerin dönüşüm ve matürasyonu için uygun kültür saatleri seçilerek DH bazlı tümör aşısında kullanılabilecek formda olgun DH'lerin üretilmesi amaçlandı.

3.2.1. Hastalar

Erciyes Üniversitesi Hematoloji Kliniğine başvuran 10 multipl miyelom hastası ve Aferez ünitesinde otolog nakil için kök hücreleri toplanan 10 hastanın örnekleri kullanılarak çalışmalar yürütüldü.

3.2.1.1. Otolog Kök Hücre Nakil İçin Hücreleri Toplanmış MM Hastaları

Tez çalışmasına dâhil edilen aferez ürünü kullanılan OKHN MM hastaların yaş aralığı 51-71 ve bu hastaların 4'ü kadın, 6'sı erkektir.

Tablo 3.1. Otolog kök hücre nakil MM hastaların

HASTA	YAŞ	CİNSİYETİ	NUMUNE MİKTARI	PERİFERİK KANDAKİ CD34+ KÖK HÜCRE SAYISI	HÜCRE CANLILIK ORANI
1. Hasta	51	Kadın	2,2ml	$12x10^6$	%99,4
2. Hasta	51	Erkek	2ml	$15x10^6$	%99,5
3.Hasta	57	Erkek	4,5ml	$15x10^6$	%99,8
4. Hasta	66	Kadın	4ml	$16,5x10^6$	%99,7
5. Hasta	65	Kadın	1,5ml	$12x10^6$	%99,7
6. Hasta	60	Erkek	4,5ml	$20x10^6$	%99,8
7. Hastası	65	Erkek	6ml	$22x10^6$	%99,7
8. Hasta	57	Erkek	6ml	$24x10^6$	%99,8
9. Hasta	71	Erkek	5ml	$21x10^6$	%99,3
10. Hasta	59	Kadın	2ml	$16x10^6$	%99,6

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji kliniğine başvuran ve hastane kurul kararı ile kök hücre nakli onayı verilen MM hastaları Aferez Ünitesinde mobilizasyon sonrası kök hücreleri toplandı. Toplanmış olan bu aferez ürününün içinde KH'ler ile MNH'lerin bulunmaktadır. Bu hücrelerin canlılıkları ve hücre sayımı işlemleri akım sitometri laboratuarında gerçekleştirildikten sonra bu aferez ürününden çalışmada kullanılmak üzere en az $12x10^6$-$25x10^6$ hücre içeren miktar hesaplanıp çalışmada kullanıldı. Alınmış olan bu aferez ürününün içindeki hücrelerin canlılıklarını kaybetmemesi için aynı gün içerisinde DH'lerin hücre kültüründe üretimi işlemine başlandı.

3.2.1.2. Kemik İliği Kullanılan MM Hastaları

MM hastalığından şüphelenilen ve bu amaçla hastadan toplanan kemik iliği numunesi flow sitometri laboratuarındaki rutin anlazlerde kullanıldıktan sonra kalan kemik iliği

numunesi tümör hücre lizatı olarak kullanıldı. Çalışmaya dâhil edilen bu MM hastalarının yaş aralığı 56-83 ve bu hastalardan 3'ü kadın, 7'si erkektir.

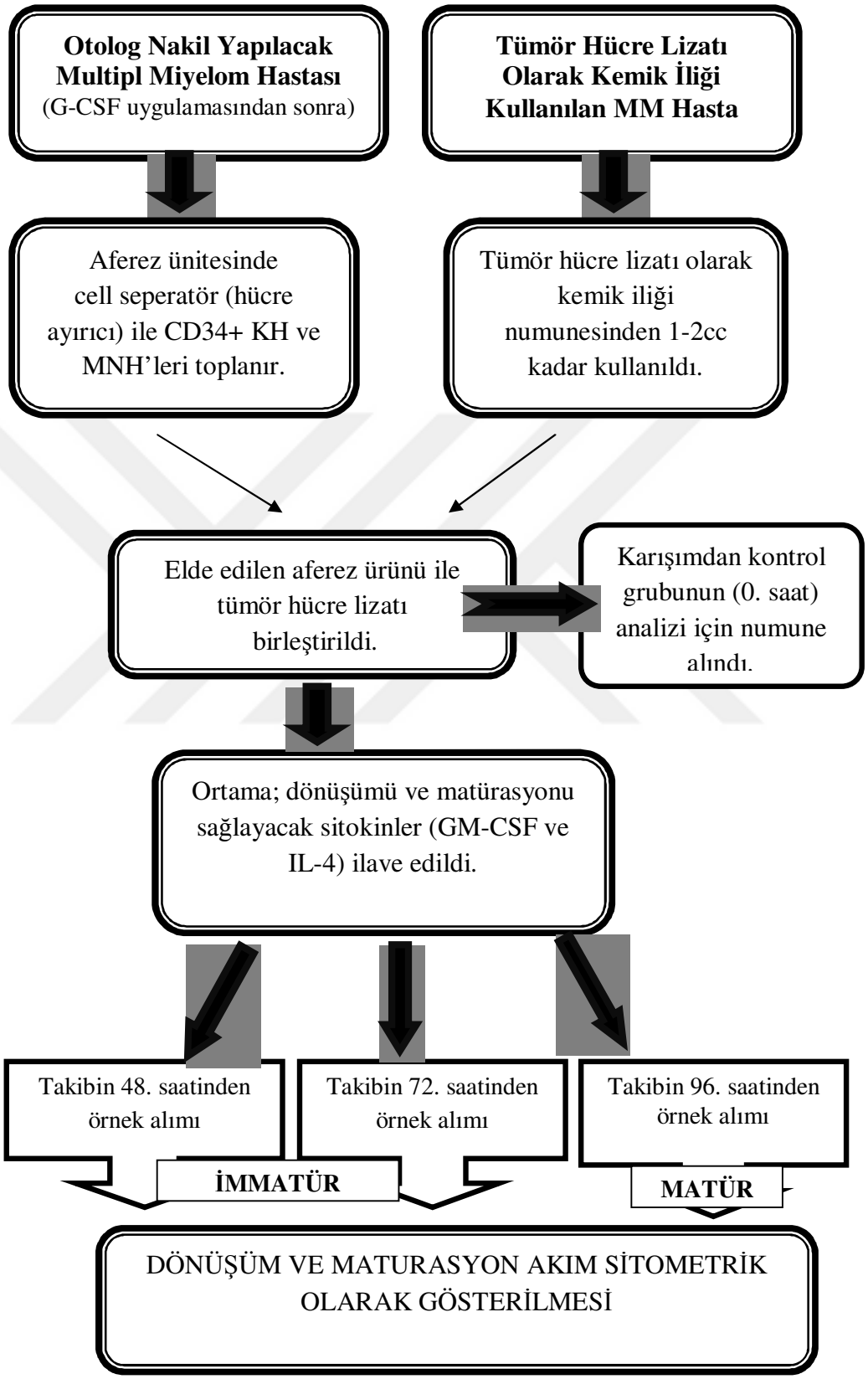
Tablo 3.2. Kemik iliği kullanılan MM hastası

HASTA	YAŞ	CİNSİYET	TÜMÖR LİZATI MİKTARI	MM HASTASININ CD45'DE LOKALİZASYONU
1. Hasta	69	Erkek	2ml	%42
2. Hasta	74	Erkek	1,5ml	%30
3. Hasta	61	Erkek	2,5ml	%75
4. Hasta	83	Erkek	1,5ml	%30
5. Hasta	59	Kadın	1,5ml	%65
6. Hasta	65	Kadın	1,2ml	%75
7. Hasta	62	Kadın	1ml	%45
8. Hasta	58	Erkek	2,3ml	%50
9. Hasta	56	Erkek	1,8ml	%90
10.Hasta	58	Erkek	1,3ml	%30

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji servisinde malign hastalık tanısı olabilecek hastadan alınan kemik iliği numuneleri tanı için kullanıldıktan sonra kalan numune çalışmada kullanılmak üzere -80^{0}C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.2. Aferez Ürünü ve Tümör Hücre Lizatının Birleştirilmesi

OKHN için toplanmış aferez ürününden alınan en az $12x10^6$ hücre içeren numune ile tümör hücre lizatı olarak kullanılan kemik iliği numunesi steril şartlar altında laminar hava kabini içerisinde falkon tüpünde birleştirildi. İlk olarak bu karışımdan kültür öncesi kontrol grubun olan 0. saatin akım sitometrik analizleri için bir miktar örnek alındı ve bu akım sitometri analizler ile kontrol grubunun hücrelerinin canlılık yüzdeleri ve bu hücrelerin dendritik hücreler olup olmadığı tespit edildi. Hazırlanmış olan karışımın üstüne DH'ye dönüşümü ve maturasyonu sağlanması için seçilen GM-CSF (0,1 mg/mL) ve IL-4 (1 mg/mL) sitokin kombinasyonu ilave edildi ve bu karışım eşit miktarda üç tüpe bölündü. Hücre kültür işlemlerinin yapılabilmesi için bu üç numune GENKÖK (Genetik ve Kök Hücre Merkezi)'ün Kök hücre laboratuvarına getirildi. Çalışmanın işlem basamakları şematik olarak Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma Yönteminin Genel Basamakları

3.2.3. Hücre Kültürü İçin Hazırlık Süreci

Tez çalışmasında kullanılmak üzere aferez laboratuvarında kök hücre aferezi ile elde edilen aferez ürünün durumuna göre yaklaşık $12x10^6$- $25x10^6$ hücre içeren (CD34+ kök hücre ve mononükleer hücrelere) miktarda laminar hava kabinde numune alınarak falkon tüpüne aktarıldı.

1. Toplanmış kemik iliği örneğini tümör hücre lizatı olarak kullanılmak üzere -80^oC buzdolabına kaldırılan numune oda sıcaklığında bir süre bekletildi.
2. Aferez laboratuvarında otolog nakil için toplanma üründen alınan periferik kan numunesi ve oda sıcaklığına gelen tümör lizatı ependorf tüpünde birleştirildi.
3. Elde edilen bu karışımdan kontrol grubun (0. saat) canlılık yüzdesi ve hücre sayımını akım sitometri cihazında yapmak için numune alındı.
4. Dendritik hücreye dönüşümü ve matürasyonu sağlayacak sitokinlerden IL-4 (1 mg/ml) ve GM-CSF (0,1 mg/ml) oda sıcaklığında fazla bekletilmeden karışıma eklendi.
5. Karışıma eklenen sitokin ilavesinden sonra üç eşit miktarda tüplere bölündü.
6. Daha sonra bu karışım, hücre kültür ortamında istenilen dendritik hücrelerin üretilmesi için GenKök Merkezi'ndeki Kök Hücre Laboratuvarı'na götürüldü.

3.2.4. Dendritik Hücre Kültürü Yapım Aşaması

$+4^0C$'de saklanan DMEM ve -20^0C'de saklanan FBS in vitro hücre kültür işleminde kullanılabilmesi için oda sıcaklığında en az 1 saat bekletildi. GenKök Merkezi'ndeki Kök Hücre Laboratuvarı'nda bulunan laminar hava kabin içinde yapılan hücre kültür ekim işleminde tüm malzemeler hazırlanıncaya kadar üç eşit parçaya ayrılmış tüpler $+4^0C$ buzdolabında bekletildi. Bu sırada laminar hava kabininin steril hala geldikten sonra ilk olarak ekim işleminin yapılacağı $175cm^2$ doku kültür flasklarının etiketleme işlemi yapıldı. Hücre kültürü yapılacak olan karışım, DMEM, FBS, serolojik pipetler laminar hava kabini içine getirildi. Daha sonra $175cm^2$ doku kültür flasklarında $3x10^6$-$6x10^6$ hücre/flask yoğunlukta olacak şekilde eklendi.

Hücre kültürü için 175cm^2 doku kültür flaskı içine eklenenler;

Tablo 3.3. Doku kültür flaskı içine eklenen maddeler

Takip saatleri	**DMEM miktarı**	**FBS miktarı**	**GM-CSF miktarı**	**IL-4 miktarı**	**Kök hücre + Lizat + Sitokinler**
48. saat	35 ml	4 ml	11 µL	4 µL	Her üç kültür grubu için karışımın eşit üç miktarı eklendi.
72. saat	40 ml	5 ml	11 µL	4 µL	
96. saat	45 ml	6 ml	11 µL	4 µL	

Kültür için hazırlanan bileşimde her flask başına düşen miktar eğer 7-8x10^6 hücreye yakın bir miktar düşerse eklenecek olan DMEM, FBS miktarı 5 µL daha fazla eklendi.

3.2.5. Kültür Öncesi ve Sonrası Analizleri

Kültür sonrası saatlerin analizinlerinin karşılaştırmalı bir şekilde yapılabilmesi için kültür öncesi akım sitometrik analizleri çok önemlidir. Hücre kültür ürününün canlılık testi için Annexin-V kitini kullanılarak ve hücre sayım işlemleri için DH'lerin yüzey belirteçleri kullanılarak Beckman Coulter Navios Akım Sitometri cihazı aracılığıyla analizleri gerçekleştirildi.

3.2.5.1. Kültür Öncesi ve Sonrası Hücrelerin Viabilite ve Apoptoz Analizi

Kök Hücre Laboratuvarı'nda hücre kültür süresi tamamlanmış doku kültür flaskları inkübatörden alınıp, laminar hava kabini içinde hücre kültürü ürünü serolojik pipet yardımıyla (inkübasyon sırasında oluşan pıhtıları almadan) ependorf tüpüne alındı. Bu tüp flow sitometri laboratuvarına canlılık ve hücre sayımı işlemleri için getirildi.

Viabilite (canlılık) ve apoptoz testinin olan Annexin-V kitinin protokolü;

1. İlk olarak efendorf tüpdeki ekim ürünü pelet elde edilmesi için 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.
2. Süpernatat atılıp, pelet üzerine 3-4 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) eklenerek sulandırıldı ve 15 saniye kadar vortekslendi. Daha sonra test tüpüne aktarıldı.
3. ANNEXİN-V kiti için uygun protokolüne göre, tüpün içine 1 ml binding buffer solüsyonu (4 ml distile su + 200 µL Annexin V-FITC binding buffer) ve 100 µL ekim ürünü-PBS karışımından eklendi.
4. Tüp 10 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Süpernant dökülüp, pelet üzerine 100 µL binding buffer solüsyonu eklendi ve 15 saniye pipetaj yapıldı.
6. Daha sonra tüpe 10 µL Annexin V-FITC eklendi ve 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
7. Tüpe 1 ml binding buffer solüsyonu eklenip, 10 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.
8. Süpernant dökülüp, pelet 10 saniye kadar vortekslendi.
9. Son olarak pelet üzerine 500 µL binding buffer solüsyonu ve 5 µL Propidium lodide (PI) eklendi. Böylece ürün akım sitometrik cihazında okuma işlemi için uygun hala geldi.

3.2.5.2.Kültür Öncesi ve Kültür Sonrası Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi

DH'lerin elde eldesinin doğrulaması ve hücre sayımı için uygun yüzey belirteçlerinin akım sitometri cihazı aracılığıyla gösterilmesiyle gerçekleştirildi.

Kök Hücre Laboratuvarı'nda kültür süresi tamamlanmış flasklardaki kültür ürünün ependorf tüpüne alınarak flow sitometri laboratuvarına getirildi.

DH'lerin elde eldesinin doğrulaması ve hücre sayımı akım sitometri cihazında okuma işleminin yapılması için uygulanan protokol;

1. İlk olarak efendorf tüpdeki ekim ürünü pelet elde edilmesi için 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.

2. Süpernatat atılıp, pellet üzerine 3-4 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) eklenerek sulandırıldı ve 15 saniye kadar vortekslendi. Daha sonra test tüpüne aktarıldı.

Protokole göre kullanılan antikorların akım sitometri cihazında okunma formlarından dolayı uygun antikorlar bir tüp için olacak şekilde iki ayrı tüpün hazırlandı. Buna göre;

1. Birinci tüpe CD14 (5 µL), CD45 (5 µL) ve kompleks olan CD209/83/86 (10 µL) antikorları eklendi. İkinci tüpe ise CD14 (5 µL), CD45 (5 µL), CD80 (10 µL) ve CD34 (5 µL) antikorları eklendi.
2. Her iki tüpün üzerine 100 µL test tüpüne ekim ürünü-PBS karışımı eklendi.
3. Tüpler 12 dakika karanlıkta inkübe edildi.
4. Daha sonra bu tüplerin üzerine Stem Cell Lysis solüsyonundan 1,5 ml ilave edildip, 15 saniye vortekslendi ve 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
6. Yıkama işlemi için pellet üstüne 3 ml izoflow eklenip, 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.
7. Eğer yıkama işlemi gerek görülürse bir kez daha tekrarlandı. Daha sonra süpernant döküldü ve pellet vortekslendi, akım sitometrik analiz işlemi için peletlerin üstüne birkaç damla izoflow eklenip, 15 saniye vortekslendi.

Akım sitometrik analiz sonucunda incelecek olan yüzey belirteçleri;
0.saatte alınan numune de, içerisinde dendritik hücre olmadığını belirlemek için CD14+, CD45+, HLA-DR+, CD80-, CD83-, CD86- ekspresyonları değerlendirildi.
48 ve 72. saatlerdeki kültür örneklerine uygulanan işlemlerden sonra immatür dendritik hücre oluşumunu göstermek için CD14-, CD45+, HLA-DR+, CD86+ ekspresyonları değerlendirildi.
96. saatte kültür örneklerine uygulanan işlemlerden sonra matür dendritik hücre oluşumunu göstermek için HLA-DR+, CD80+ veya CD83+ ekspresyonları değerlendirildi.
Akım sitometrik analizde %60 üzerinde dendritik hücre ekspresyonu gözlemlenmesi anlamalı kabul edilmektedir (6).

4. BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Hematoloji servisine başvuran 10 yeni tanısı konmuş multipl miyelom hastası ve Erciyes Üniversitesi Aferez ünitesinde otolog nakil için kök hücre toplanan 10 hastaların örnekleri kullanılarak çalışmalar yürütüldü. Tez çalışmasına dâhil edilen;

- Tümör lizat olarak kullanılacak kemik iliği numunesi alınmış MM hastalar yaş aralığı 56-83 ve bu hastalardan 3'ü kadın, 7'si erkektir. Hastalardan alınan numune miktarı 1-2cc arasındadır.
- Aferez ürünü kullanılan OKHN MM hastaların yaş aralığı 51-71 ve bu hastaların 4'ü kadın, 6'sı erkektir. Hastalardan alınan numune en az $12x10^6$ hücre içeren miktarda alındı. Toplanan aferez ürününden alınan numunenin içinde bulunan CD34+ kök hücre ve MNH'lerin canlılıklarını kaybetmeden alınan numune ile vakit kaybetmeden çalışmak büyük önem arz etmektedir.

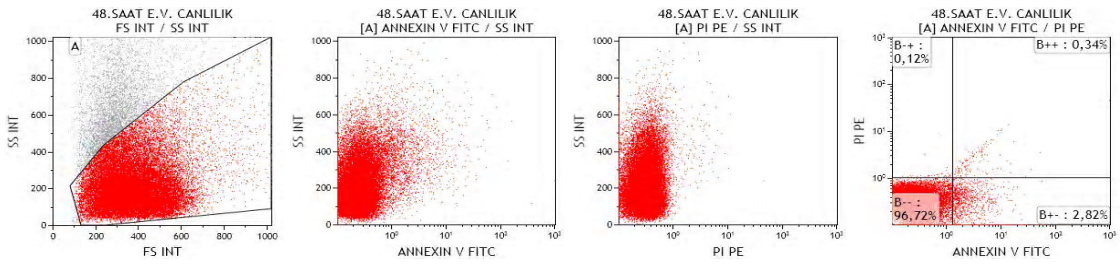
4.1. DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİMİ İÇİN YAPILAN UYGULAMALAR

4.1.1. 1.UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/69

OKHN hastasından toplanmış hasta: Kadın/51

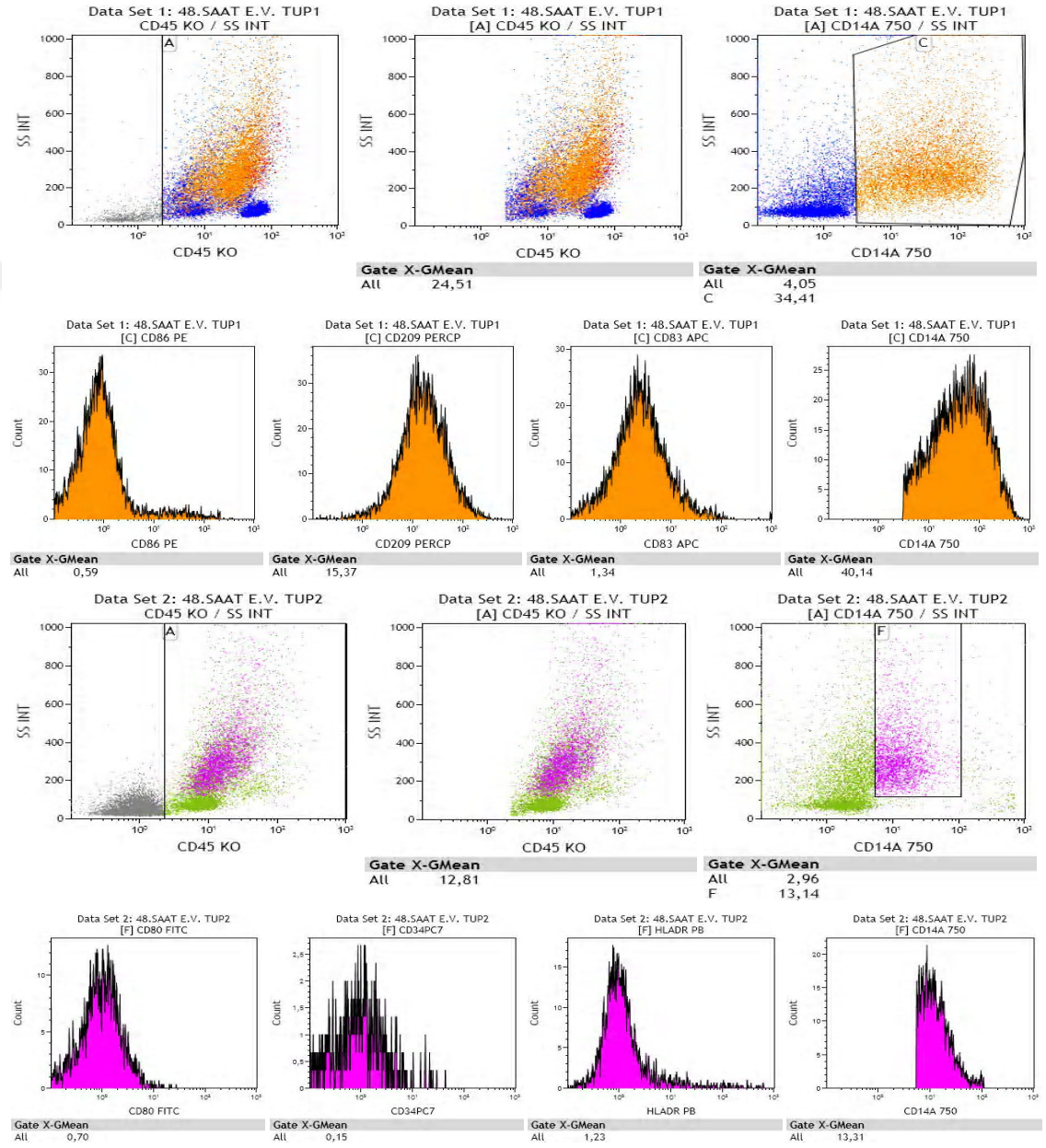
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde birleştirildi ve bu tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu birleşimin hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak ;+37^{0}C , %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.



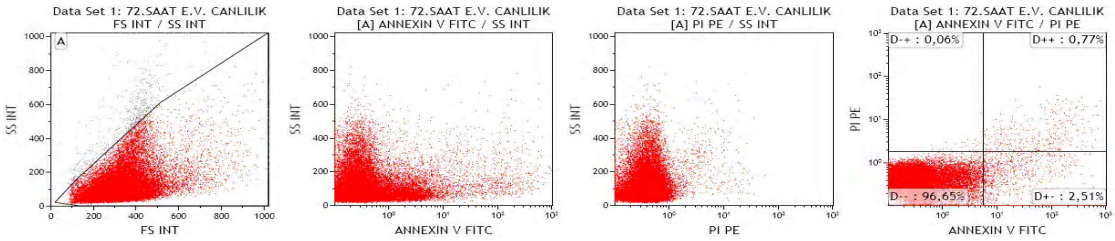
Şekil 4.1. 1. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %96,72 canlı, %2,82 pre-apoptoz döneminde, %0,34 apoptoz döneminde ve %0,12 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.

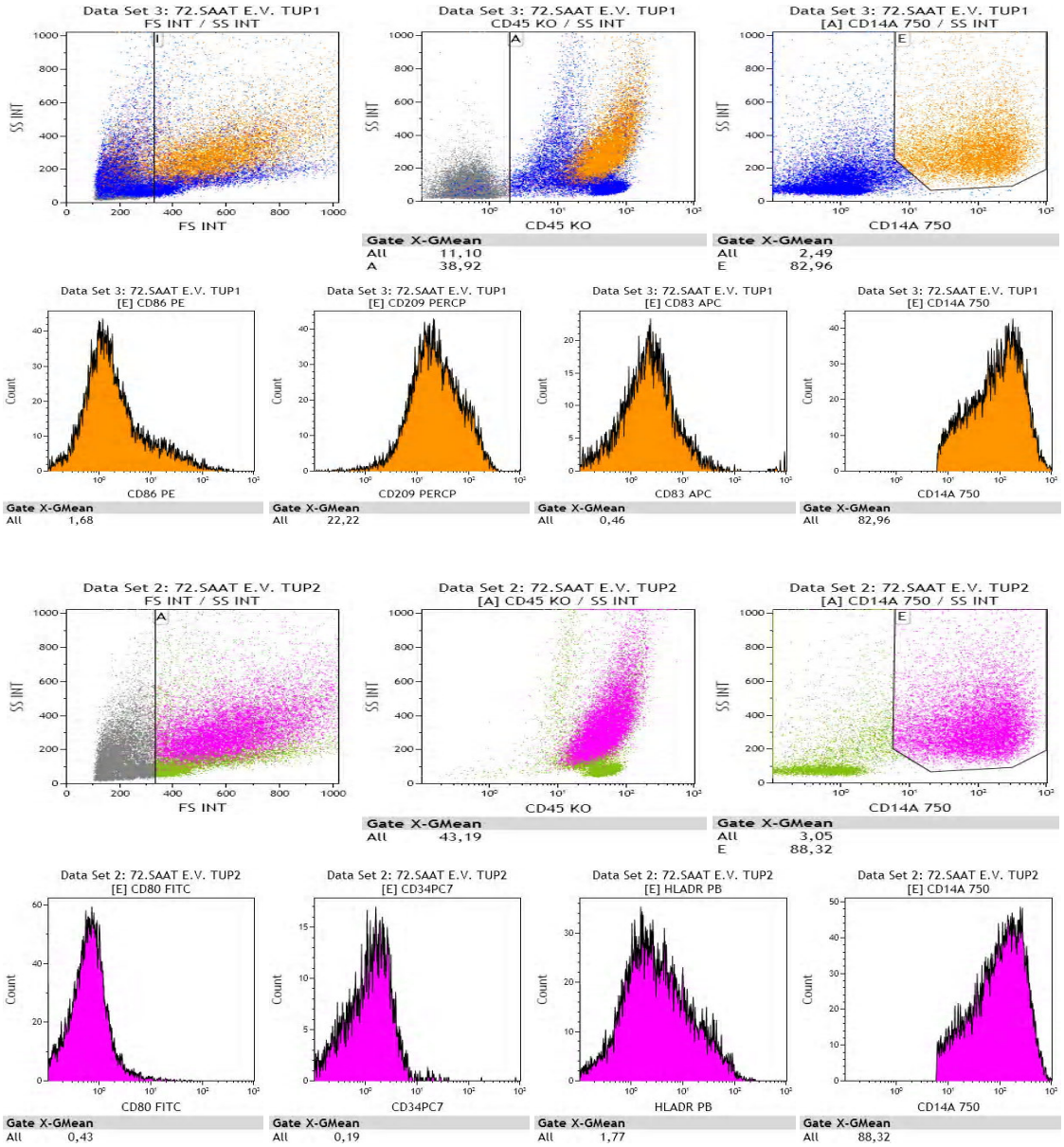


Şekil 4.2. 1. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

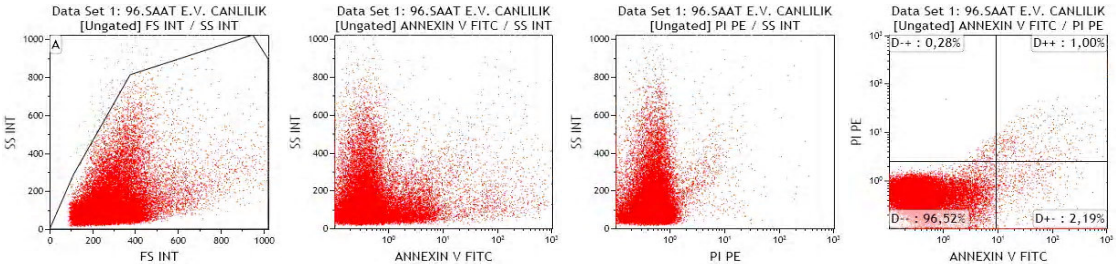


Şekil 4.3. 1. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %96,65 canlı, %2,51 pre-apoptoz döneminde , %0,77 apoptoz döneminde ve %0,06 ölü olarak tespit edildi.

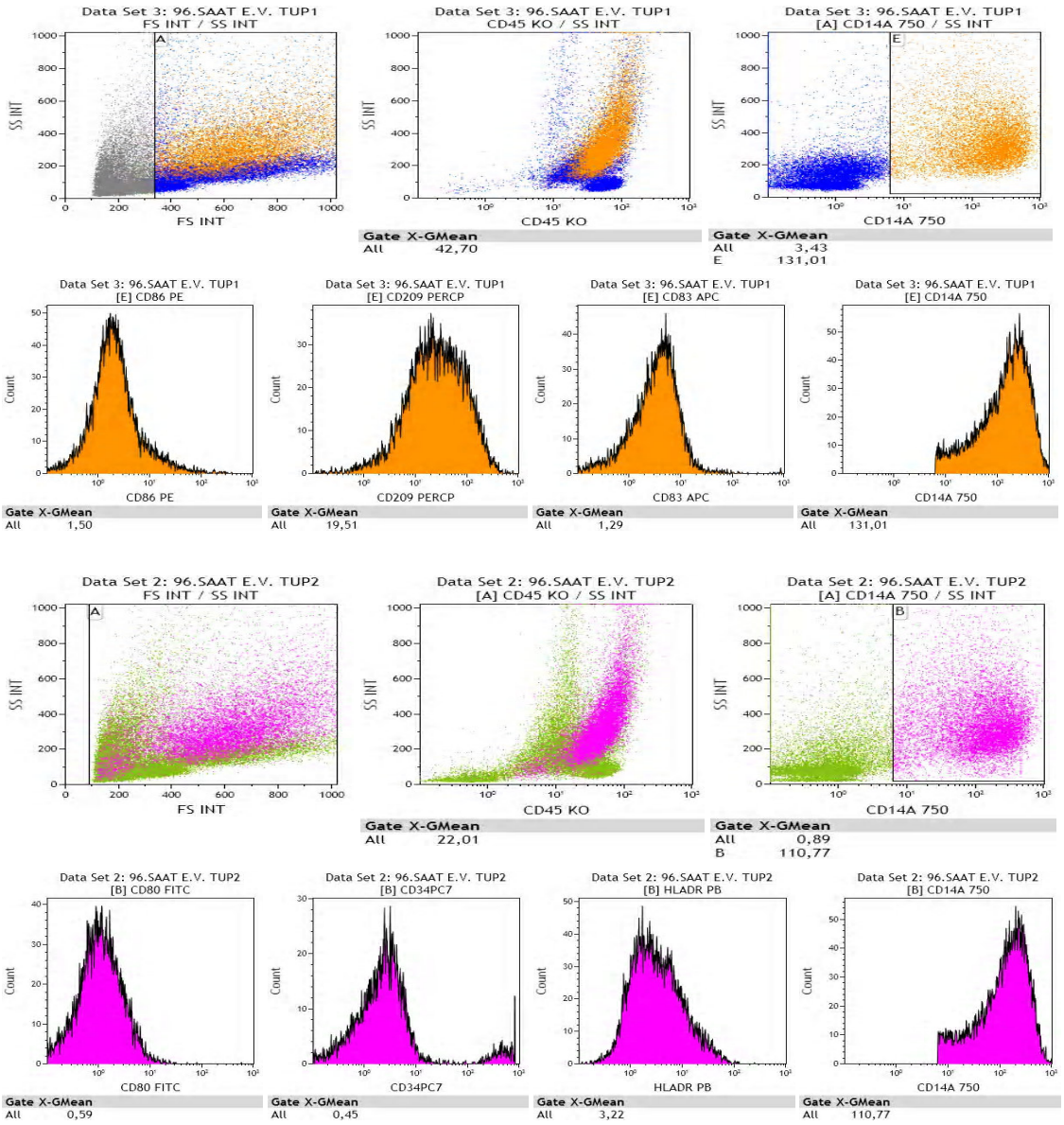


Şekil 4.4. 1. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.5. 1. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %96,52 canlı, %2,19 pre-apoptoz döneminde, %1,00 apoptoz döneminde ve %0,28 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.6. 1. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.1. 1. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	–	40,14	82,96	131,01
CD34	–	0,15	0,19	0,45
CD45	–	28,08	38,92	42,70
CD80	–	0,70	0,43	0,59
CB83	–	1,34	0,46	1,29
CD86	–	0,59	1,68	1,50
CD209	–	15,37	22,32	19,51
HLA-DR	–	1,23	1,77	3,22

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Kültürün 72. saatteki ekspresyon düzeyi 48. saattekine göre 2 kat artış görülürken, kültürün 96. saatteki ekspresyon düzeyi 48. saattekine göre yaklaşık 3 katı kadar artış gözlemlendi. Buna göre CD14+ antikorunun ekspresyonunda azalma beklenirken bu hücrelerin kültür süreci boyunca düzenli bir şekilde artışı gözlemlendi, bu da istenmeyen bir sonuçtur. Çünkü CD14 dendritik hücre matürasyon sürecinde azalması beklene temel antikorlardan biridir.

CD34+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 48. saatinde 0,15 , 72. saatinde 0,19 ve 96. saatinde 0,45 olduğu tespit edildi. Dendritik hücre oluşumunun çok az bir kısmını kök hücreler oluşturmaktadır. Yapılan analizler sonucunda kök hücrelerin yüzey belirteci olan CD34+ antikorundaki düzenli artış istenmeyen bir sonuç teşkil etmektedir.

CD86+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 48. saatinde 0,59 , 72. saatinde 1,68 ve 96.saatinde 1,50 olduğu tespit edildi. Kültür saatleri boyunca düzenli bir artış gözlenmemesine rağmen ekspresyon düzeyi göstermesi kültürün 48 ve 72. saatlerinde

ortamındaki hücrelerin immatür dendritik hücreler olabileceği, kültürün 96 saatinde matür dendritik hücreler olabileceği düşünülmesine sebebiyet verdi.

HLA-DR+ ve CD45+ ekspresyonu; Kültür saatleri boyunca düzenli bir artış görüldü. Bunda dendritik hücre gelişimin olduğu gösteren bir sonuç elde edildiğini gösterir.

CD80+ ve CD83+ ekspresyonu; Dendritik hücre matürasyonunda ekspersyon düzeylerinde artışı görülmesi beklenen en önemli iki antikor olup, her ikisinden birinin pozitif sonuç vermesi de dendritik hücre dönüşümü için yeterli olmaktadır. Yapılan analizler sonucunda bu antikorların ekspresyon düzeylerinde beklene düzenli ve yeterli artış elde edilemedi.

Yapılan tüm analizler göre; 1. uygulamanın hücre kültürü işlemi sonu kültür ortamında bulunan mononükleer hücrelerin ve kök hücrelerin kültür takip saatlerin hiçbirin de dendritik hücre dönüşümünün gerçekleşmediği tespit edildi. Ancak kültür ortamında dendritik hücreye dönüşmeyen çok fazla miktarda mononükleer hücrelerin olduğu söylenilebilir.

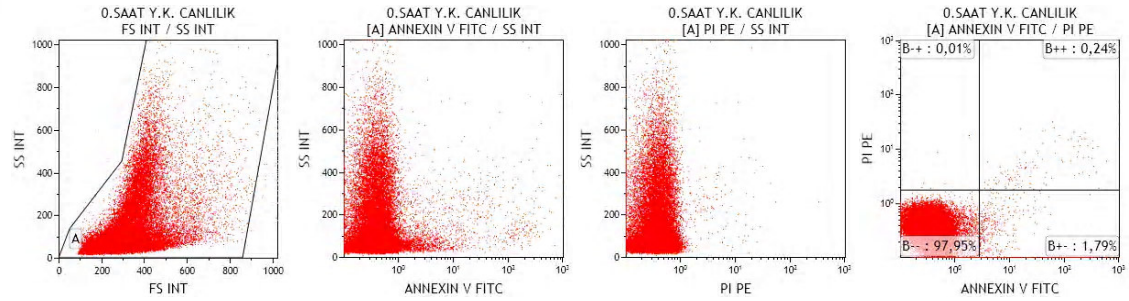
Bu uygulamada yapılan gözlemler sonucu, kıyaslamaların yapılabilmesi ve net veriler elde edilebilmesi için kontrol grubu olarak kullanılmak üzere kültür öncesi analizinin yapılması uygun görüldü. Böylece bundan sonraki uygulamalara bir kontrol grubunıun analizleri dâhil edildi.

4.1.2. 2. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/74

OKHN hastasından toplanmış hasta: Erkek/51

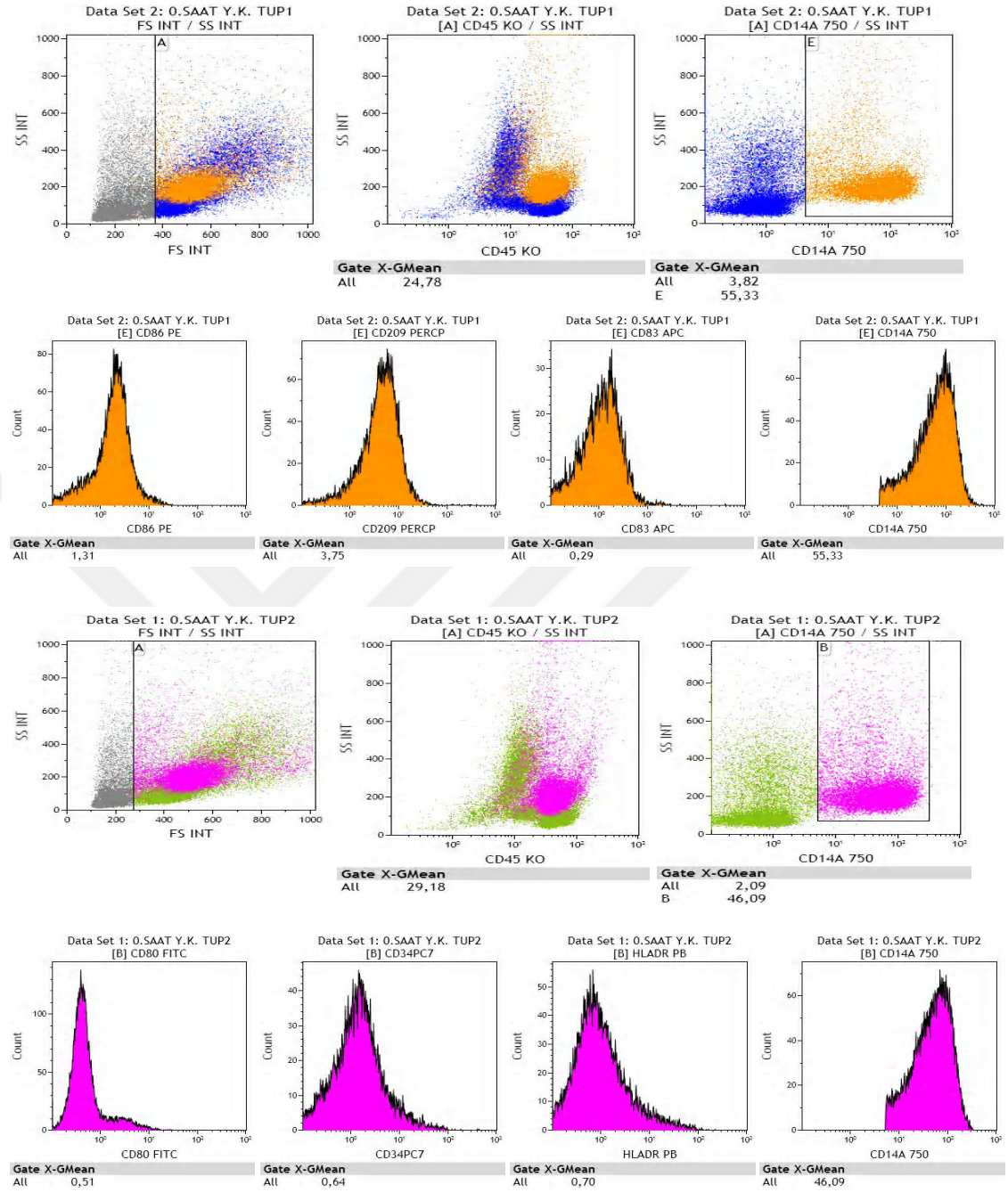
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.7. 2. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

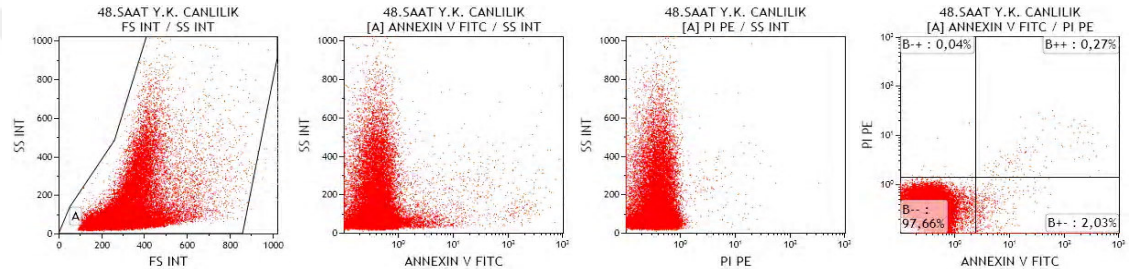
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültür öncesi numunede bulunan hücrelerin %97,95 canlı, %1,79 pre-apoptoz döneminde, %0,24 apoptoz döneminde ve %0,01 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



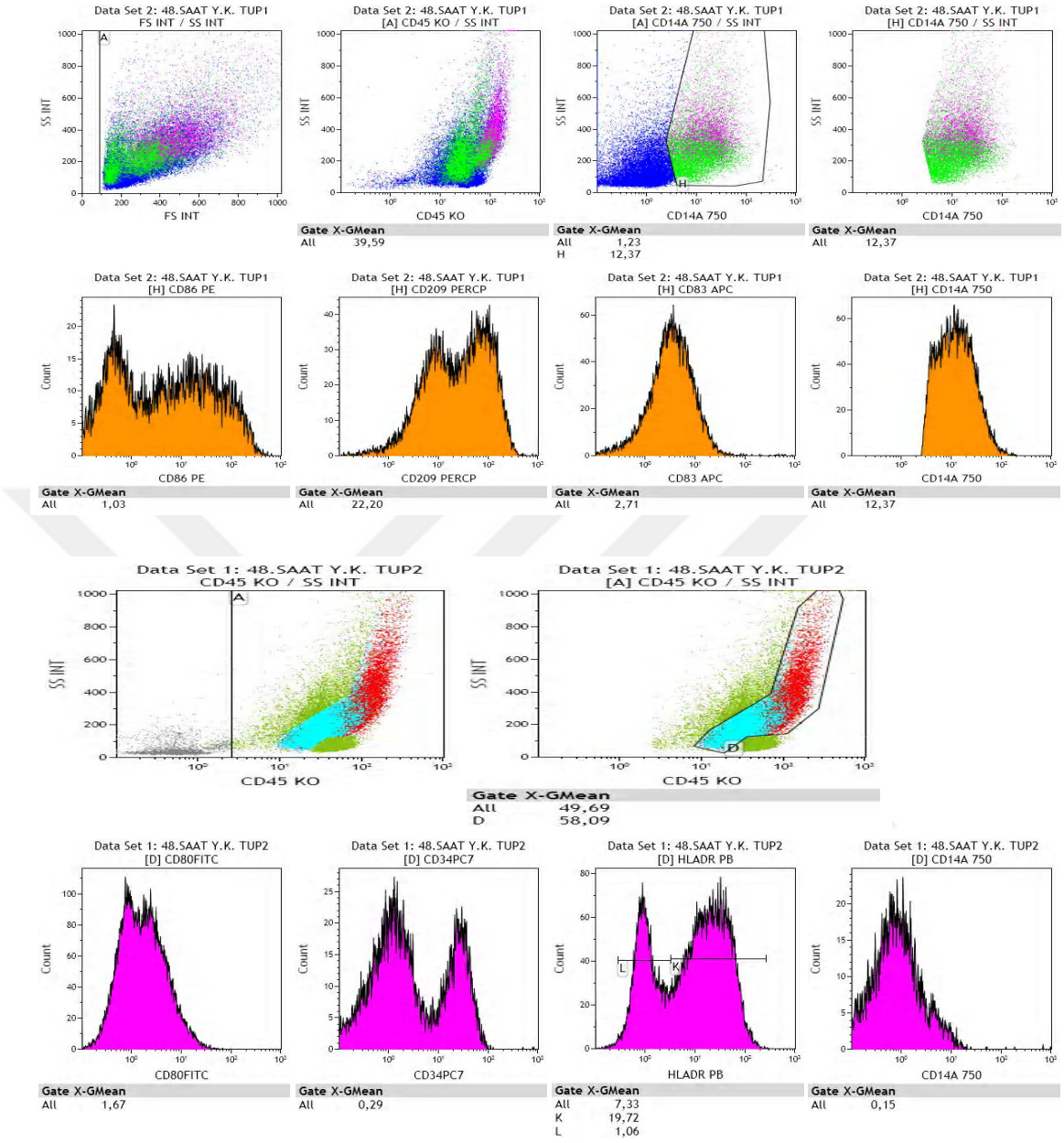
Şekil 4.8. 2. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

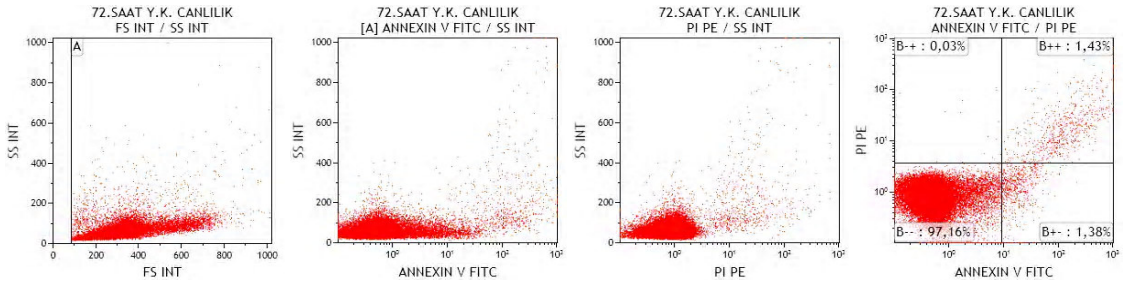


Şekil 4.9. 2. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %97,66 canlı, %2,03 pre-apoptoz döneminde, %0,27 apoptoz döneminde ve %0,04 ölü olarak tespit edildi.

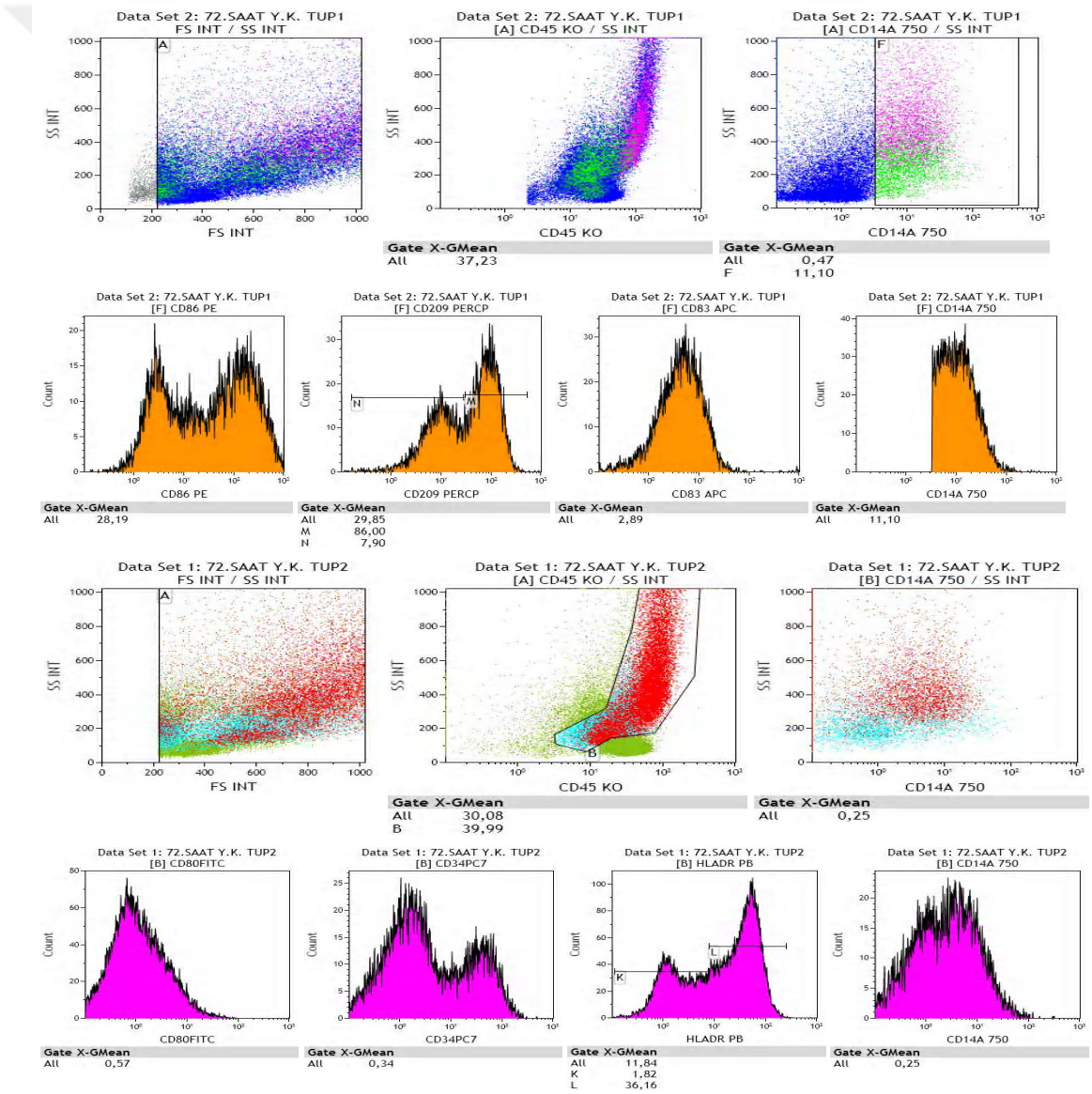


Şekil 4.10. 2. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

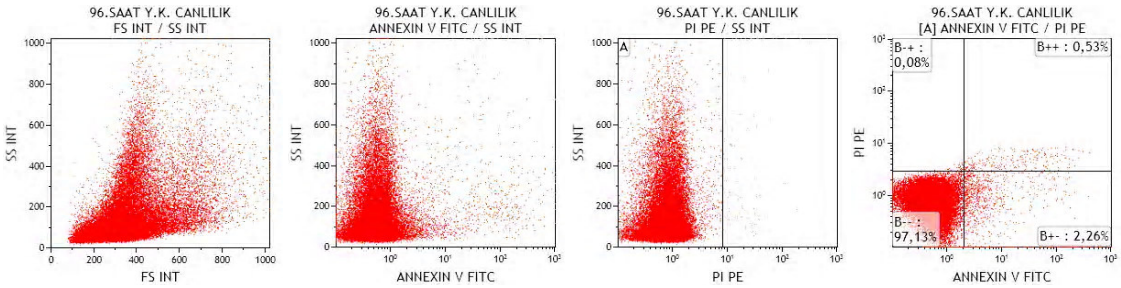


Şekil 4.11. 2. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %97,16 canlı , %1,38 pre- apoptoz döneminde , %1,43 apoptoz döneminde ve %0,03 ölü olarak tespit edildi.

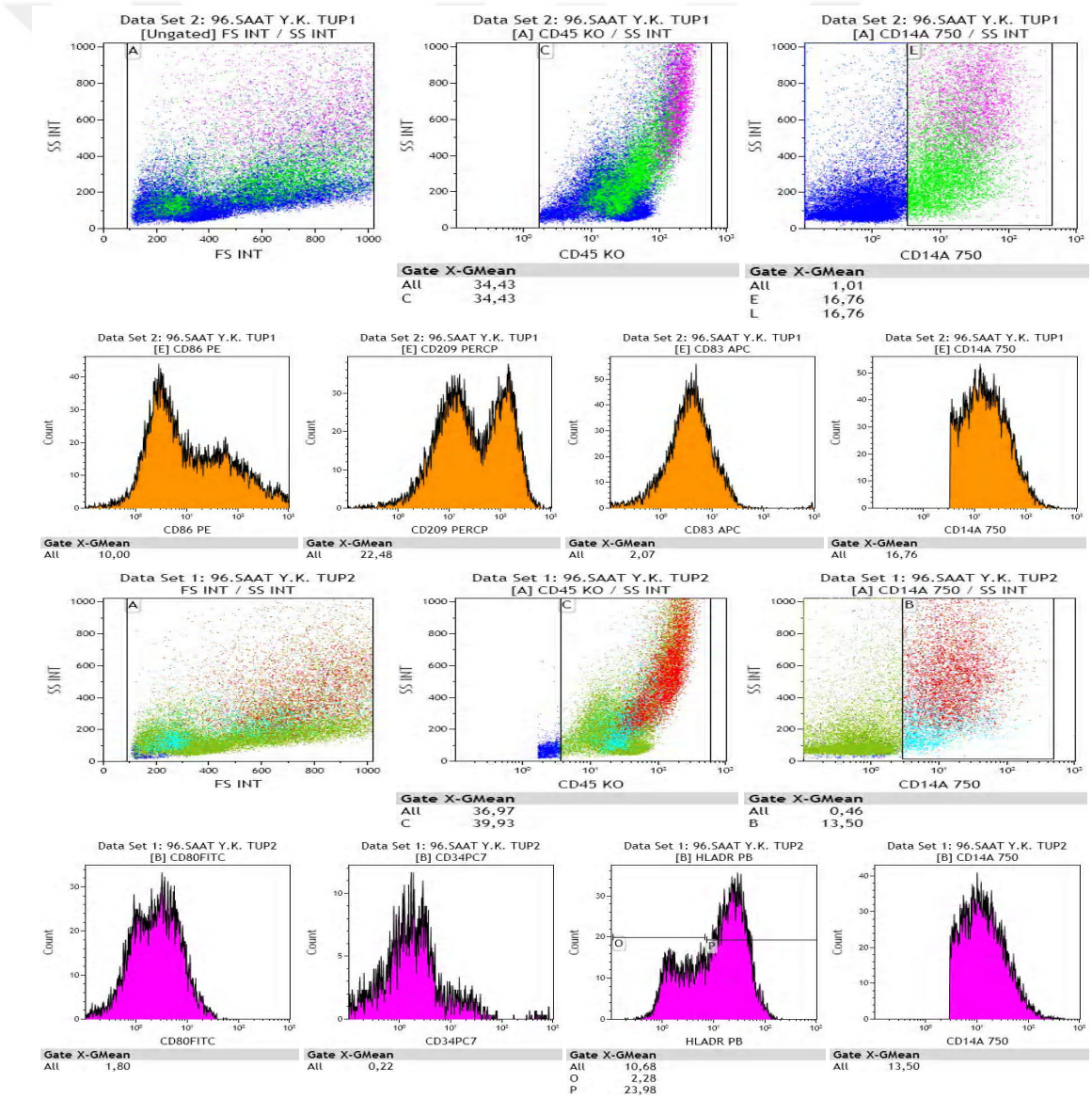


Şekil 4.12. 2. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.13. 2. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %97,13 canlı, %2,26 pre-apoptoz döneminde, %0,53 apoptoz döneminde ve %0,08 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.14. 2. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.2. 2. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	55,03	12,37	11,10	13,50
CD34	0,64	0,29	0,34	0,22
CD45	24,78	39,59	37,23	36,97
CD80	0,51	1,67	0,57	1,80
CB83	0,29	2,71	2,89	2,07
CD86	1,31	1,03	28,19	10
CD209	3,75	22,20	29,85	22,48
HLA-DR	0,70	7,33	11,84	10,68

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 55,03, 48. saatinde 12,37, 72. saatinde 11,10 ve 96. saatinde 13,50 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda düzenli bir biçimde azalış olmamakla beraber 0. saate göre diğer kültür takip saatlerindeki ekspresyon düzeyinde belirgin bir azalış tespit edildi. Buna göre kültür ortamdaki mononükleer hücrelerinde ciddi oranda azaldığı ve buna göre mononükleer hücrelerin dendritik hücreye dönüşmek için değiştiği söylenebilir.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,64, 48. saatinde 0,29 , 72. saatinde 0,34 ve 96. saatinde 0,22 olarak tespit edildi ve bu antikorun ekspresyon düzeylerinde düzenli bir biçimde azalış olmamakla beraber 0. saatte göre diğer kültür takip saatlerinde belirgin bir azalış görüldü. Buna göre kültür ortamdaki kök hücrelerin oranında azaldığı ve buna göre kök hücrelerin dendritik hücreye dönüşmek için değiştiği söylenebilir.

C86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,03 (belirgin bir artış gözlenmedi) ve 28,19 (21,5 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyonunda düzgün bir artış görüldü. Buna göre 48 ve 72. saatlerde CD86 antikorunda beklenen çok yüksek miktardaki artış kültür ortamındaki hücrelerin immatür denritik hücreler olduğu söylenebilir. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 10,00 (7,5 kat artış) olarak tespit edildi. Buna göre 96. saatteki CD86 antikoru diğer kültür saatlerine göre azalış gösterip, kontrol grubuna göre ise artış göstermesi immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücreye dönüşüm aşamasında olduğunu göstermektedir.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 24,78 , 48. saatinde 39,59 , 72. saatinde 37,23 ve 96. saatinde 36,97 olduğu tespit edildi ve düzenli biçimde artış olmamakla beraber 0. saate göre diğer saatlerdeki ekspresyon düzeyinde belirgin bir artış tespit edildi.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 7,33 (10,5 kat artış) ve 11,84 (17 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Bu ekspresyondaki artış, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 10,68 (15 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi. Ancak 96. saatteki ekspresyon düzeyindeki artış 72. saatteki artış kadar yüksek bir seviyeye ulaşamadı.

CD80+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,67 (3 kat artış) ve 0,57 (belirgin bir artış gözlenmedi) olarak tespit edildi. Bu kültür saatlerinde ekspresyon düzeyleri 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre artış göstermesi ortamdaki hücrelerin immatür dendritik hücreler olduğunu gösterir. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+

ekspresyonunda düzeyi 1,80 (3,5 kat artış) olarak tespit edildi. Kültür bu saatinde ekspresyon düzeyi 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre artış göstermesi ortamdaki hücrelerin matür dendritik hücreler olduğunu gösterir.

CD83+ ekspresyonu; 0. saat analizde CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,29 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 2,71 (9 kat artış) ve 2,89 (10 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyonunda düzeyi 2,07 (7 kat artış) olarak tespit edildi.

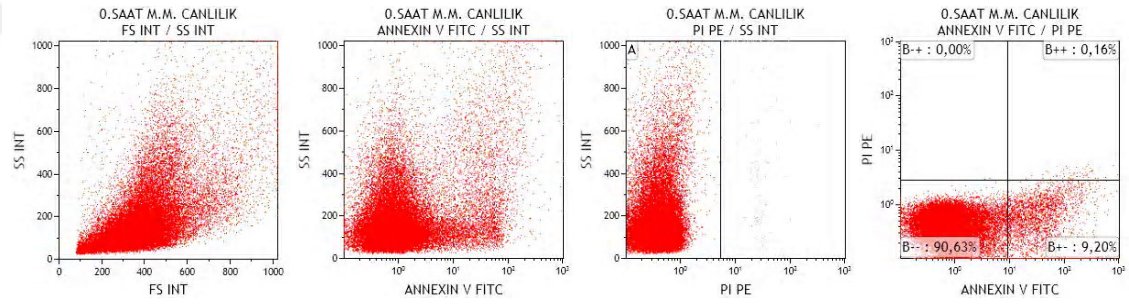
2. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Böylece yapılan gözlemler sonucu kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu tespit edildi.

4.1.3. 3. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/61

OKHN hastasından toplanmış hasta: Erkek/57

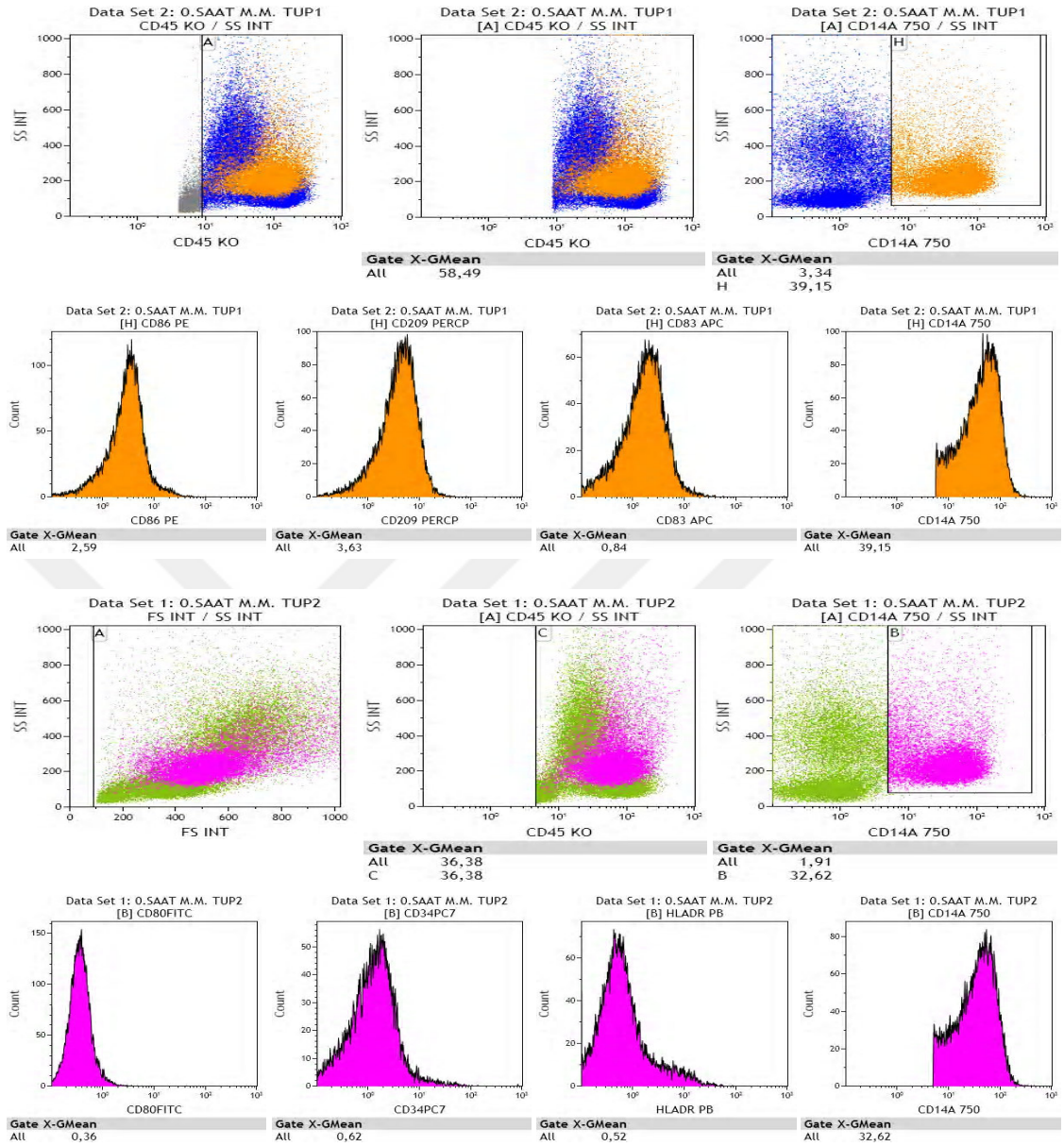
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.15. 3. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

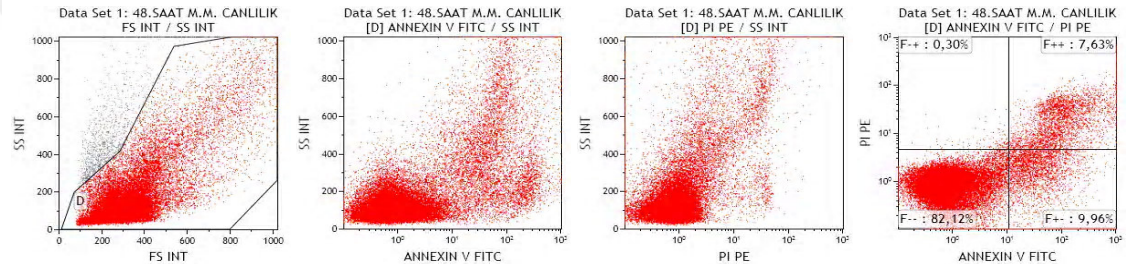
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün öncesi numunede bulunan hücrelerin %90,63 canlı, %9,20 pre-apoptoz döneminde, %0,16 apoptoz döneminde ve %0,00 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



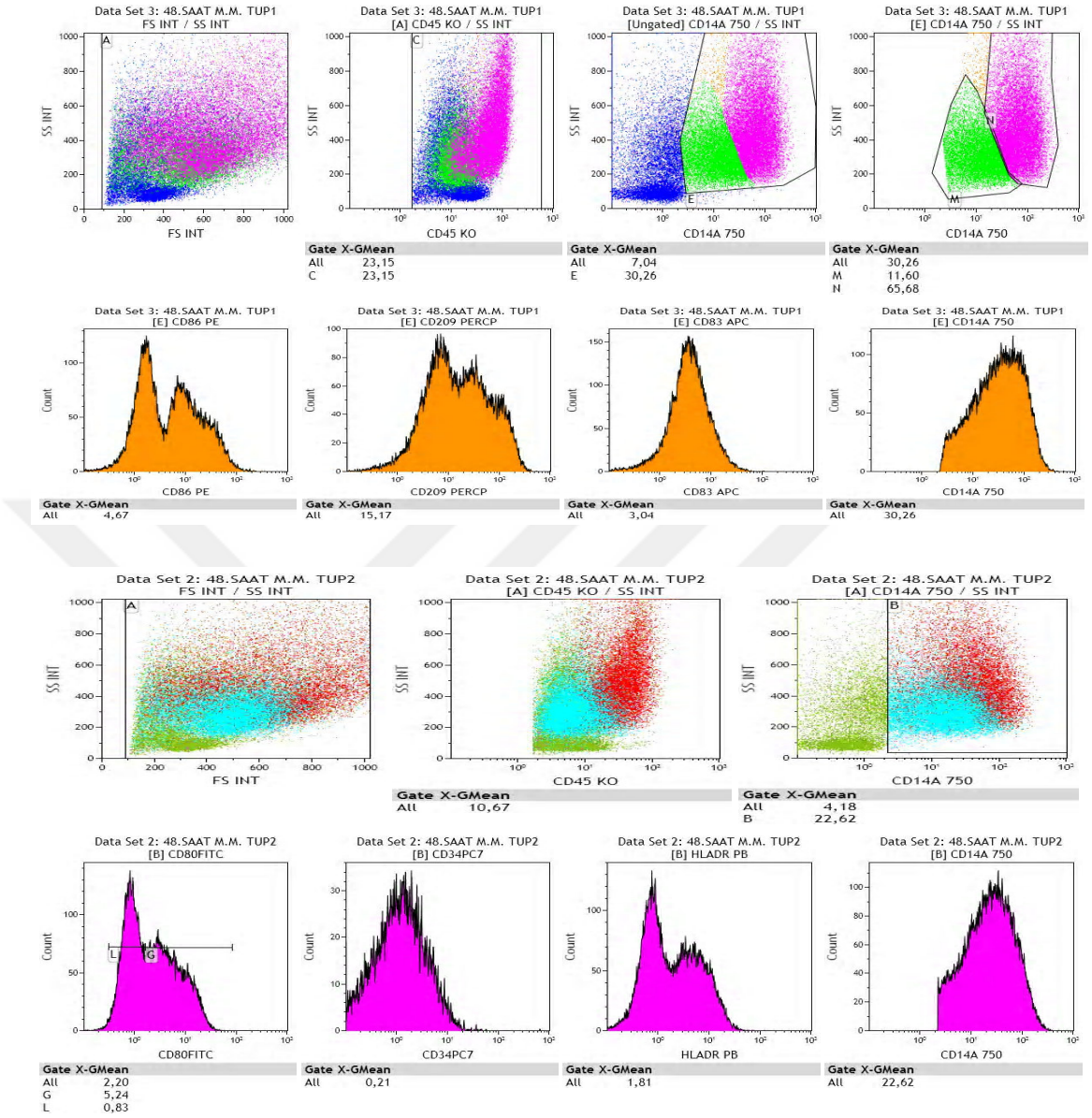
Şekil 4.16. 3. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

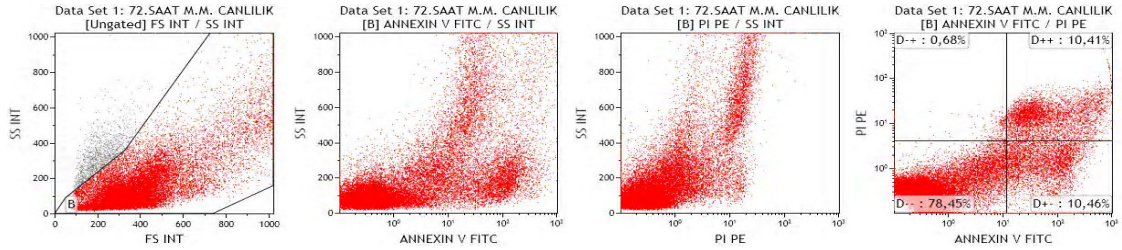


Şekil 4.17. 3. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %82,12 canlı, %9,96 pre-apoptoz döneminde, %7,63 apoptoz döneminde ve %0,30 ölü olarak tespit edildi.

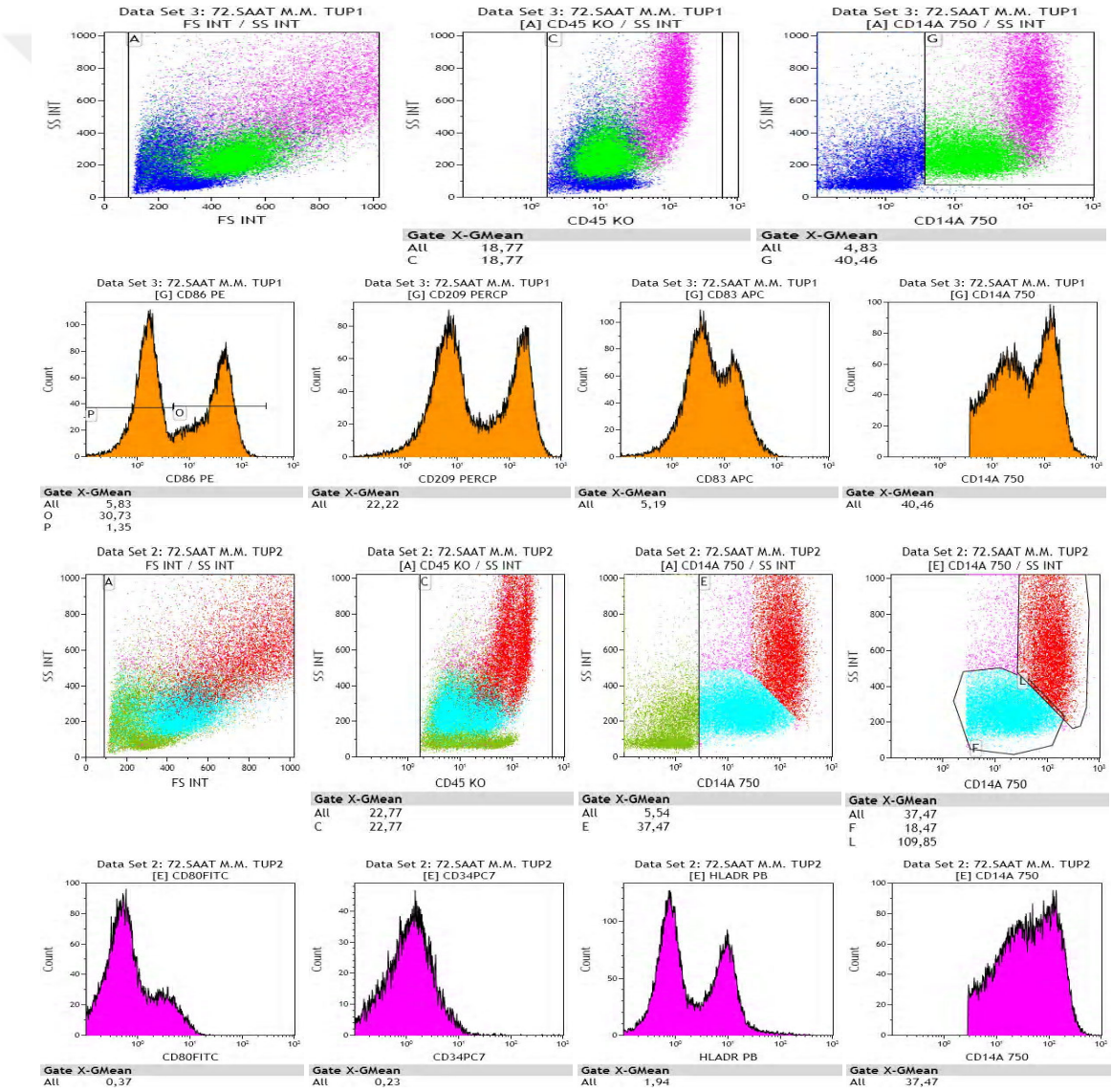


Şekil 4.18. 3. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

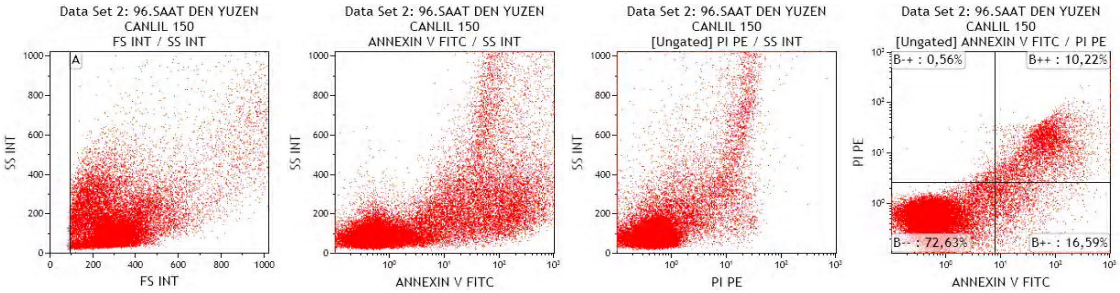


Şekil 4.19. 3. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %78,45 canlı, %10,46 pre-apoptoz döneminde, %10,41 apoptoz döneminde ve %0,68 ölü olarak tespit edildi.

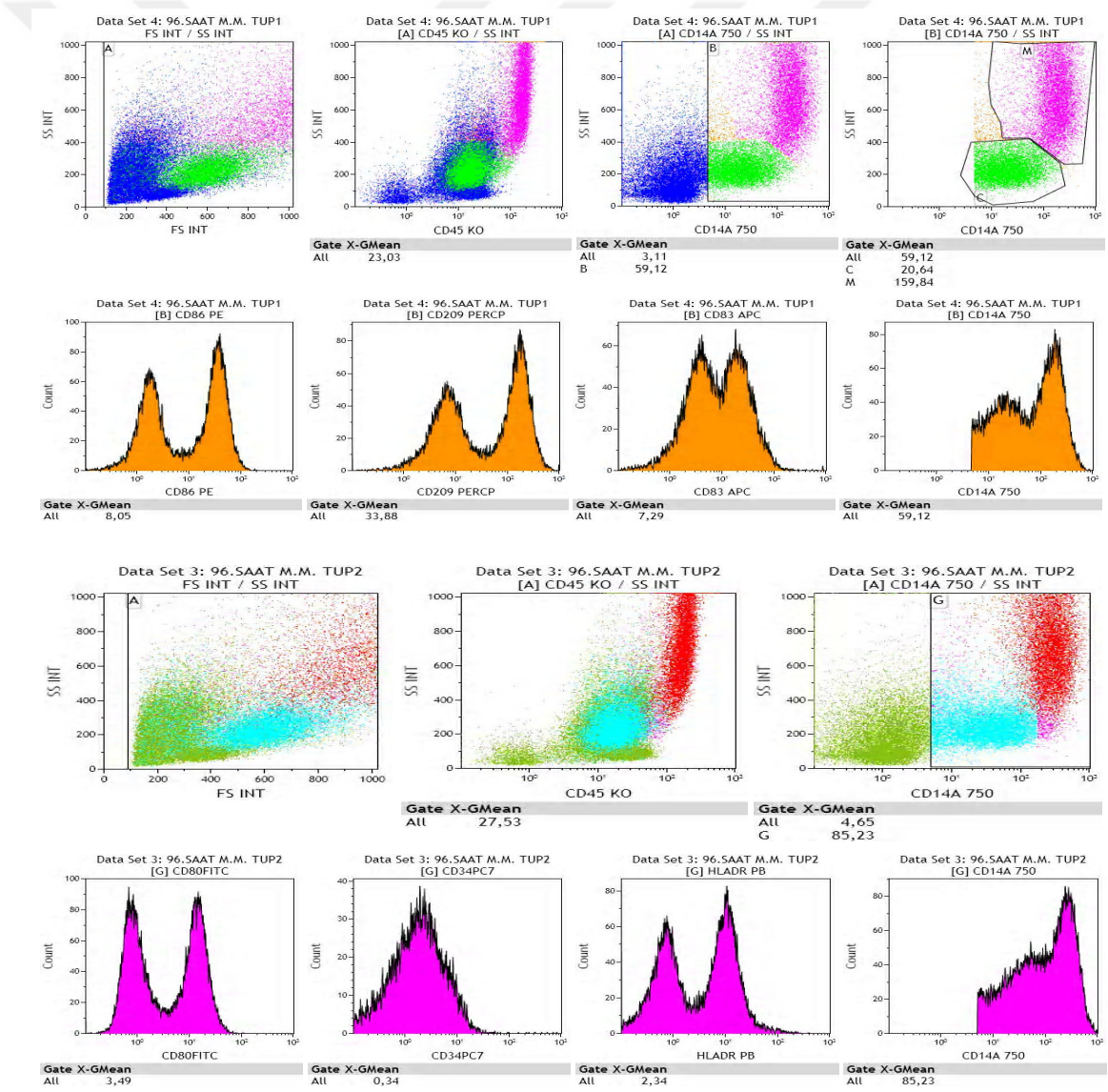


Şekil 4.20. 3. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.21. 3. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %72,63 canlı, %16,59 pre-apoptoz döneminde, %10,22 apoptoz döneminde ve %0,56 ölü olarak tespit edildi.



Şekil-4.22. 3. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.3. 3. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	39,15	30,26	40,46	59,12
CD34	0,62	0,21	0,23	0,34
CD45	58,49	23,15	18,77	23,03
CD80	0,36	2,20	0,37	3,49
CB83	0,84	3,04	5,19	7,29
CD86	2,59	4,67	5,83	8,05
CD209	3,63	15,17	22,22	33,88
HLA-DR	0,52	1,81	1,94	2,34

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 39,15 , 48. saatinde 30,26 , 72. saatinde 40,46 ve 96. saatinde 59,12 olarak tespit edildi. Buna göre CD14antikorunun ekspresyon düzeyinde beklenen belirgin bir azalış gözlenmedi.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,62 , 48. saatinde 0,21 , 72. saatinde 0,23 ve 96. saatinde 0,34 olarak tespit edildi ve bu antikorun ekspresyon düzeylerinde düzenli

bir biçimde azalış elde edilememesine rağmen 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre diğer kültür takip saatlerinde belirgin bir azalış gözlendi.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 4,67 (2 kat artış) ve 5,83 (2,2 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Buna göre 48 ve 72. saatlerde CD86 antikorunda beklenen çok yüksek miktardaki artış kültür ortamındaki hücrelerin immatür denritik hücreler olduğu söylenebilir. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 8,05 (3 kat artış) olarak tespit edildi.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri 0. saatinde 36,38 , 48. saatinde 23,15 , 72. saatinde 22,77 ve 96. saatinde 27,53 olarak tespit edildi. Kültür saatlerinin CD45 antikor ekspresyon düzeylerinde düzensiz bir azalış gözlendi.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,81 (3,5 kat artış) ve 1,94 (3,7 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Bu ekspresyondaki artış, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 2,34 (4,5 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi.

CD80+ ekspresyonu; 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,84 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 2,20 (6 kat artış) ve 0,37 (belirgin bir artış gözlenmedi) olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeyleri 0.saatteki ekspresyon düzeyine göre artış göstermesi ortamdaki hücrelerin immatür dendritik hücreler olduğunu gösterir. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 3,49 (9,6 kat artış) olarak tespit edildi. Kültür bu saatinde ekspresyon düzeyleri 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre artış göstermesi ortamdaki hücrelerin matür dendritik hücreler olduğunu gösterir.

CD83+ ekspresyonu; Kültürün 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,84 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 3,04 (3,6 kat artış) ve 5,19 (6,2 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 7,29 (7 kat artış) olarak tespit edildi.

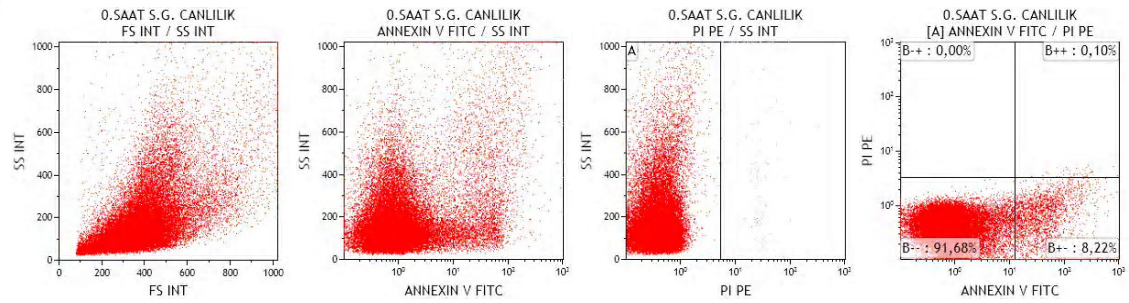
3. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.1.4. 4. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/83

OKHN hastasından toplanmış hasta: Kadın/66

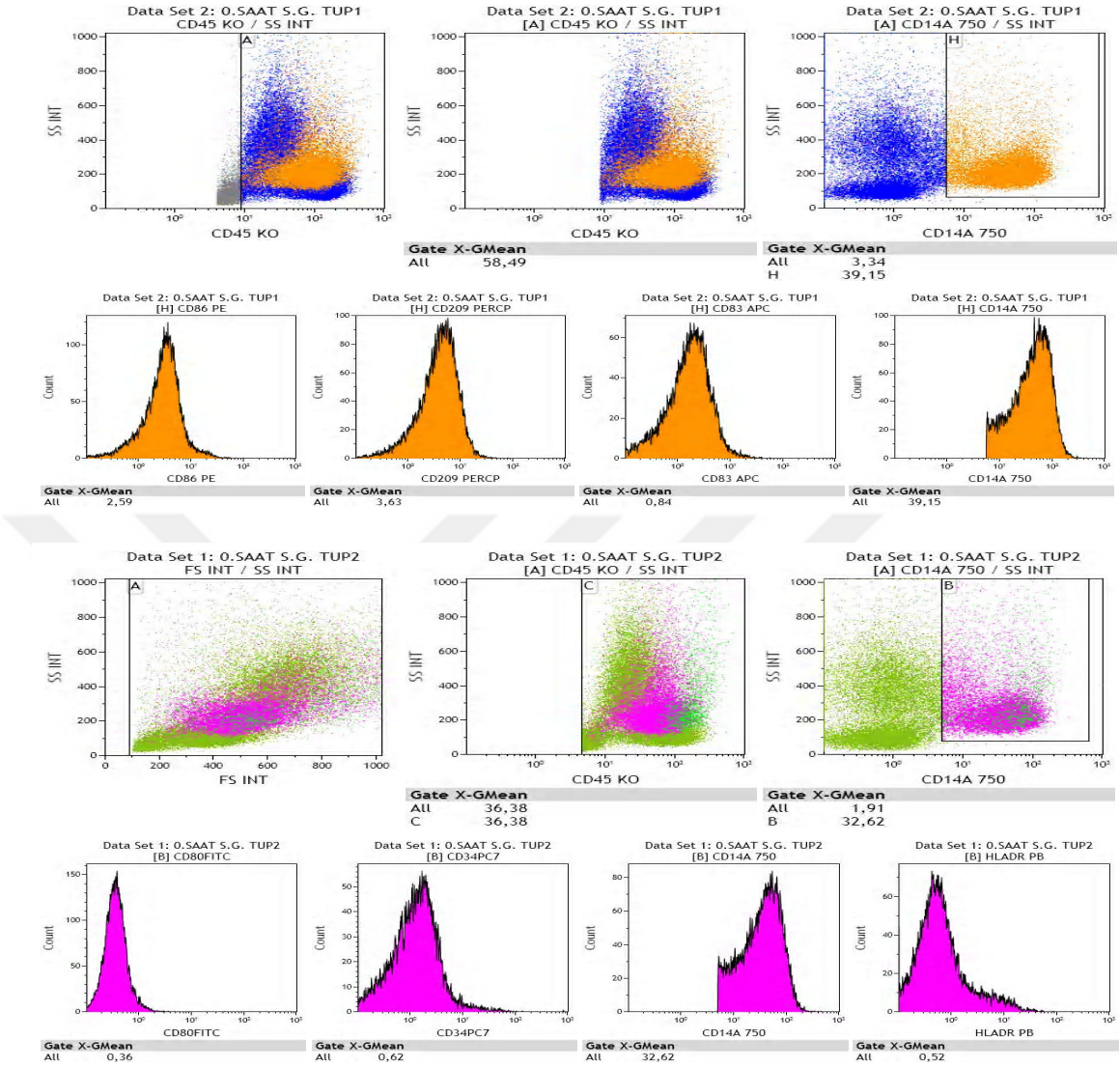
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.23. 4. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

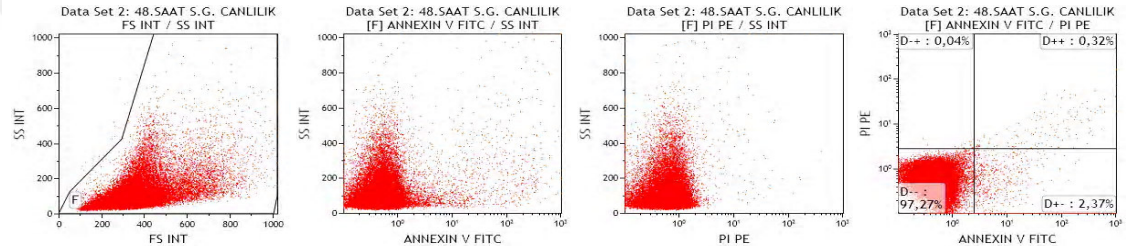
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün öncesi numunede bulunan hücrelerin %91,68 canlı, %8,22 pre-apoptoz döneminde, %0,10 apoptoz döneminde ve %0,00 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



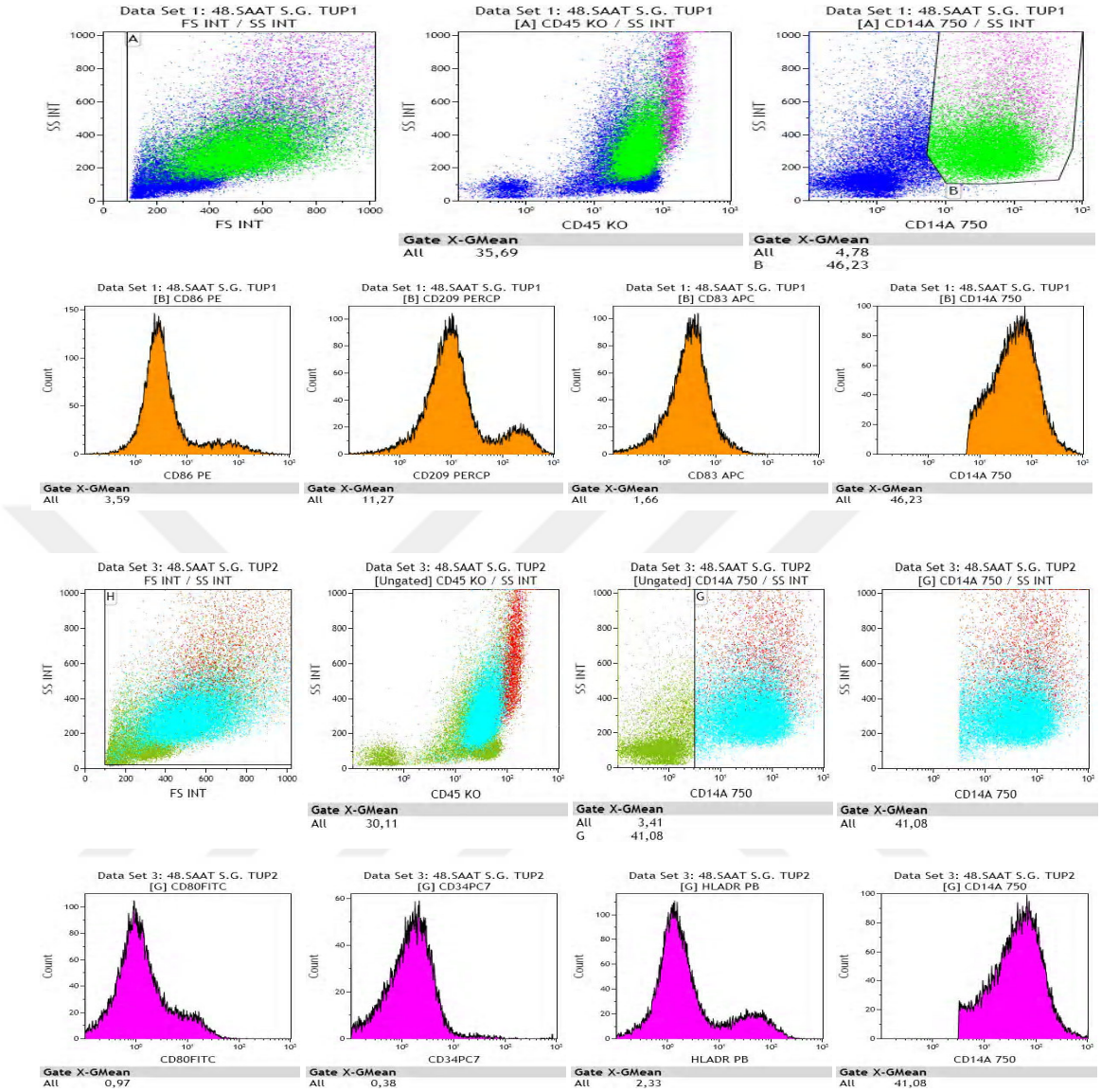
Şekil 4.24. 4. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

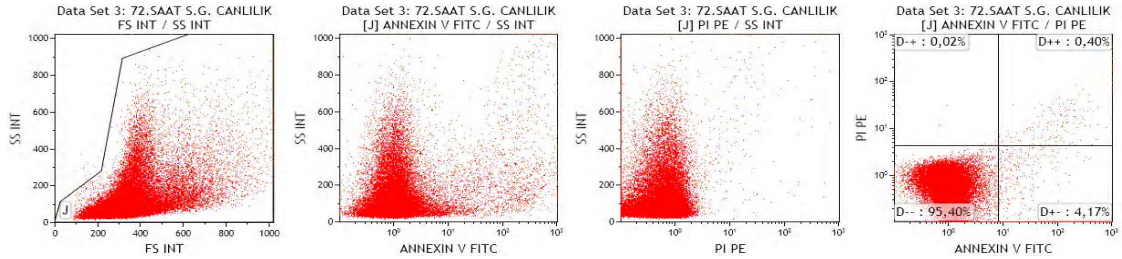


Şekil 4.25. 4. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %97,27 canlı, %2,37 pre-apoptoz döneminde, %0,32 apoptoz döneminde ve %0,04 ölü olarak tespit edildi.

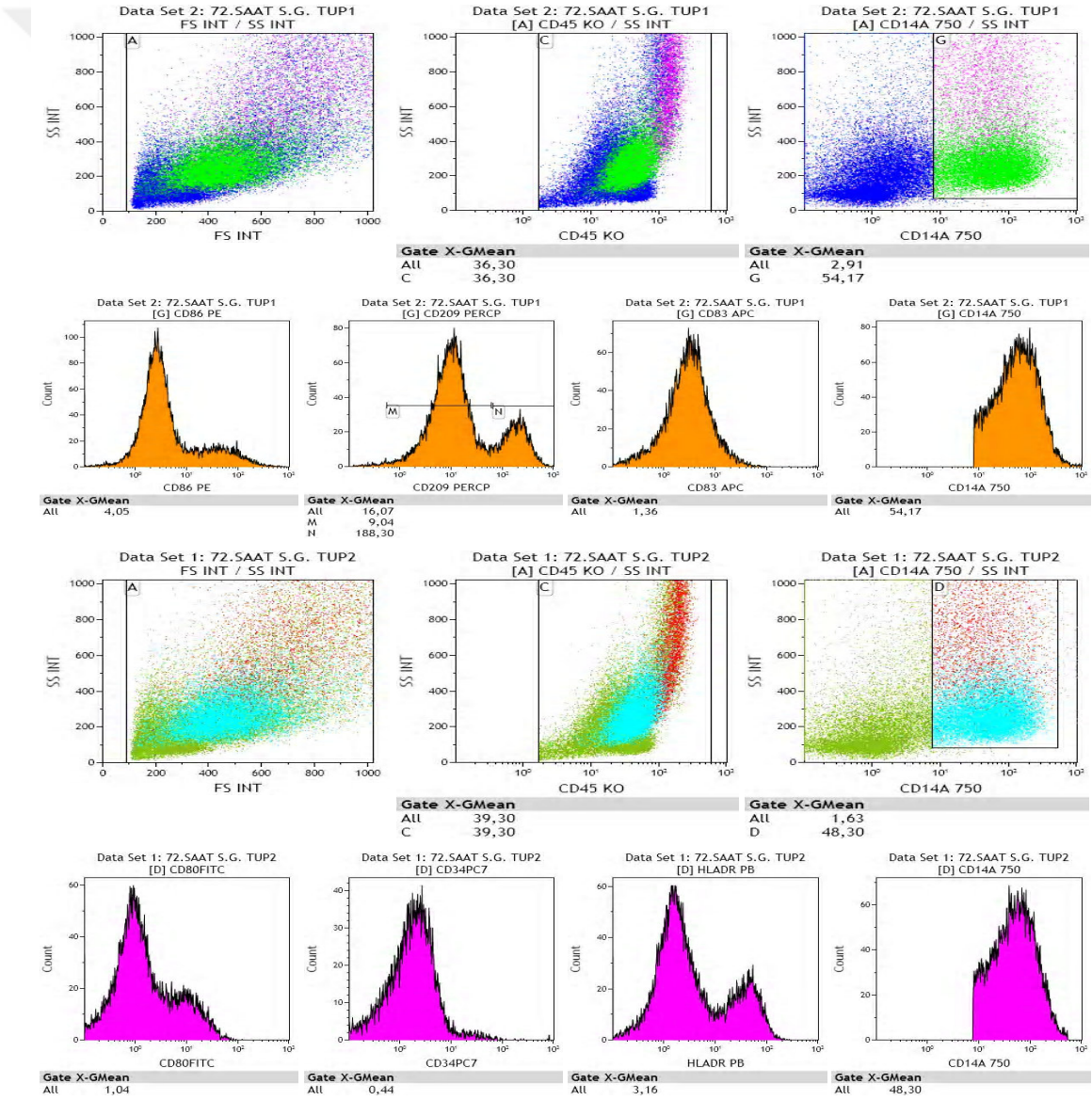


Şekil 4.26. 4. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

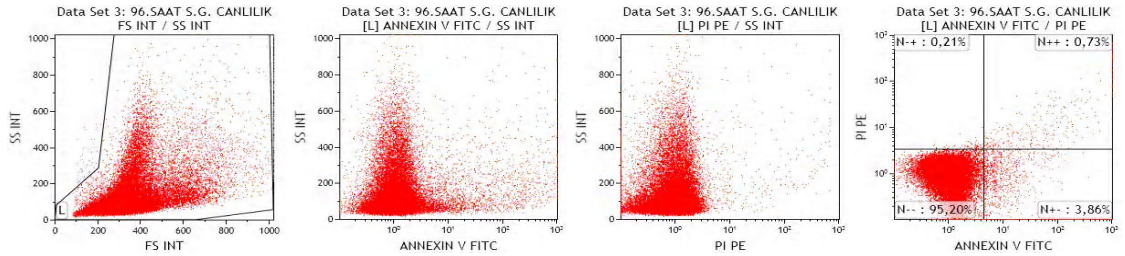


Şekil 4.27. 4. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %95,40 canlı, %4,17 pre-apoptoz döneminde, %0,40 apoptoz döneminde ve %0,02 ölü olarak tespit edildi.

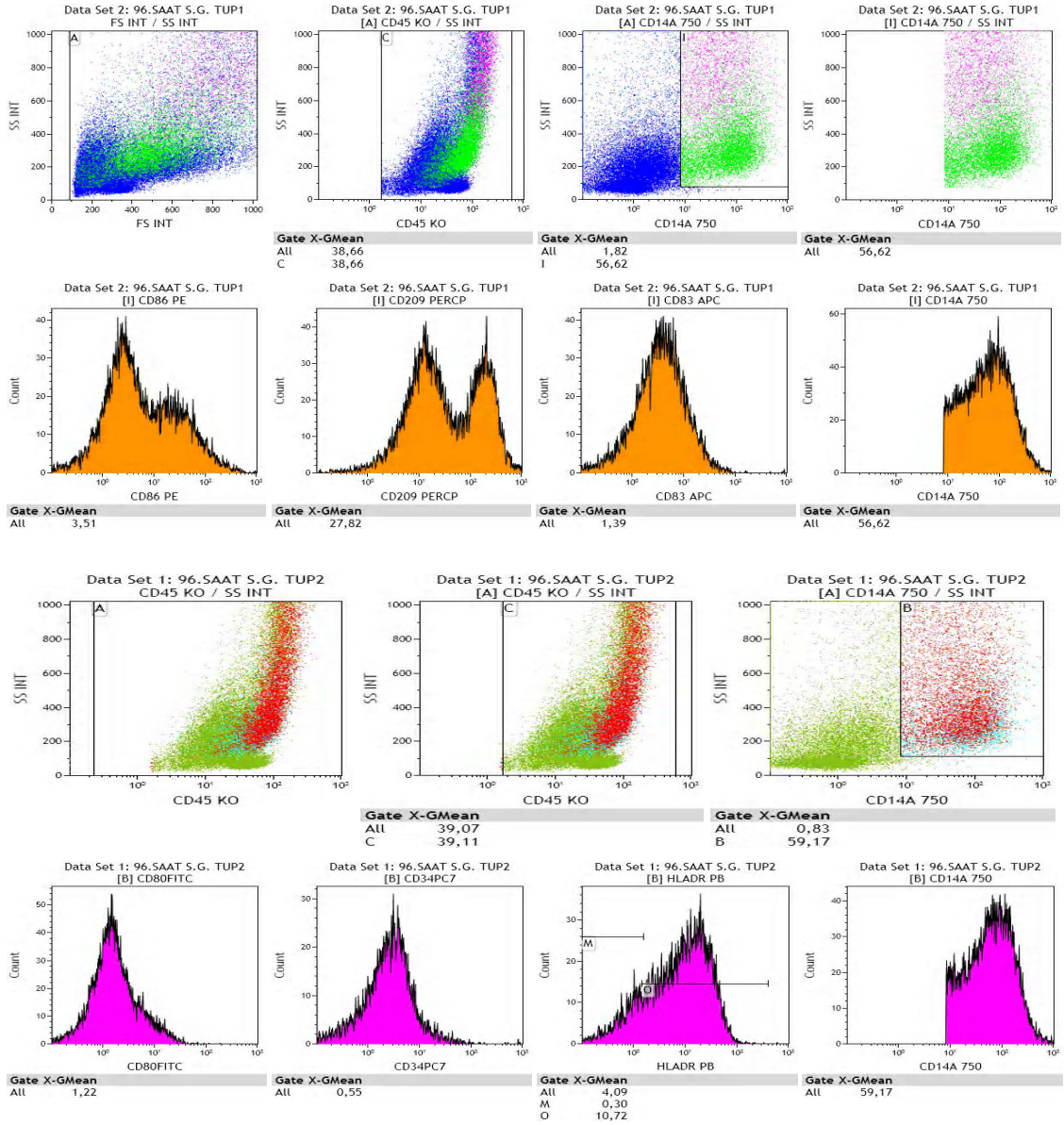


Şekil 4.28. 4. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.29. 4. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %95,20 canlı, %3,86 pre-apoptoz döneminde, %0,73 apoptoz döneminde ve %0,21 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.30. 4. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.4. 4. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	32,62	41,08	48,30	59,17
CD34	0,62	0,38	0,44	0,55
CD45	36,38	30,11	39,30	39,11
CD80	0,36	0,97	1,04	1,22
CB83	0,84	1,66	1,36	1,39
CD86	2,59	3,59	4,05	3,51
CD209	3,63	11,27	16,07	27,82
HLA-DR	0,52	2,33	3,16	4,09

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 32,62 , 48. saatinde 41,08 , 72. saatinde 48,30 ve 96. saatinde 59,17 olarak tespit edildi. Bu antikorun ekspresyon düzeyinde düzenli bir azalış gözlenmedi.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,62 , 48. saatinde 0,32 , 72. saatinde 0,44 ve 96. saatinde 0,55 olarak tespit edildi ve bu antikorun ekspresyon düzeylerinde düzenli bir biçimde azalış elde edilememesine rağmen 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre diğer kültür takip saatlerinde belirgin bir azalış gözlendi.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 3,59 (1,4 kat artış) ve 4,05 (1,6 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 3,51 (1,3 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonunda belirgin bir artış gözlendi.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri 0. saatinde 36,38 , 48. saatinde 30,11 , 72. saatinde 39,30 ve 96. saatinde 39,11 olarak tespit edildi. Buna göre kültür saatlerinde CD45 antikorunun ekspresyonunda belirgin değişiklik gözlenmedi.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 2,33 (4,5 kat artış) ve 3,16 (6 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Bu ekspresyondaki artış matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 4,09 (7,9 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi. Bu artış kültürün her basamağında belirgin bir düzenlilikte gerçekleşti.

CD80+ ekspresyonu; 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,84 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,97 (2,7 kat artış) ve 1,04 (2,9 kat artış) olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeyleri 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre artış göstermesi ortamdaki hücrelerin immatür dendritik hücreler olduğunu gösterir. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 1,22 (3,4 kat artış) olarak tespit edildi.

CD83+ ekspresyonu; 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,84 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,66 (2 kat artış) ve 1,36 (1,6 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 1,39 (1,7 kat artış) olarak tespit edildi.

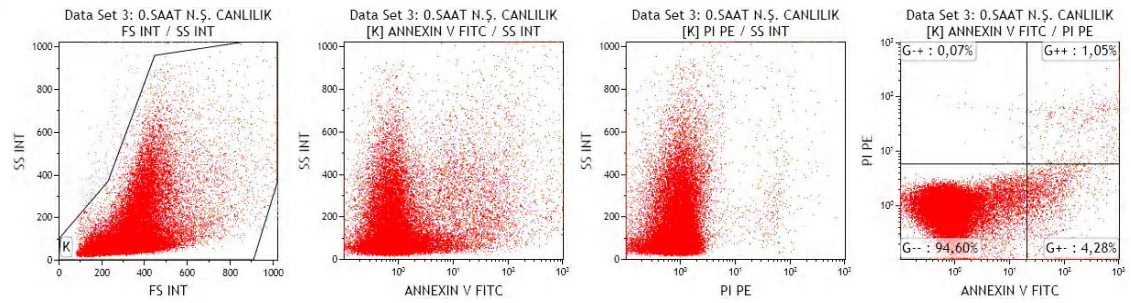
4. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.1.5. 5. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Kadın/59

OKHN hastasından toplanmış hasta: Kadın/65

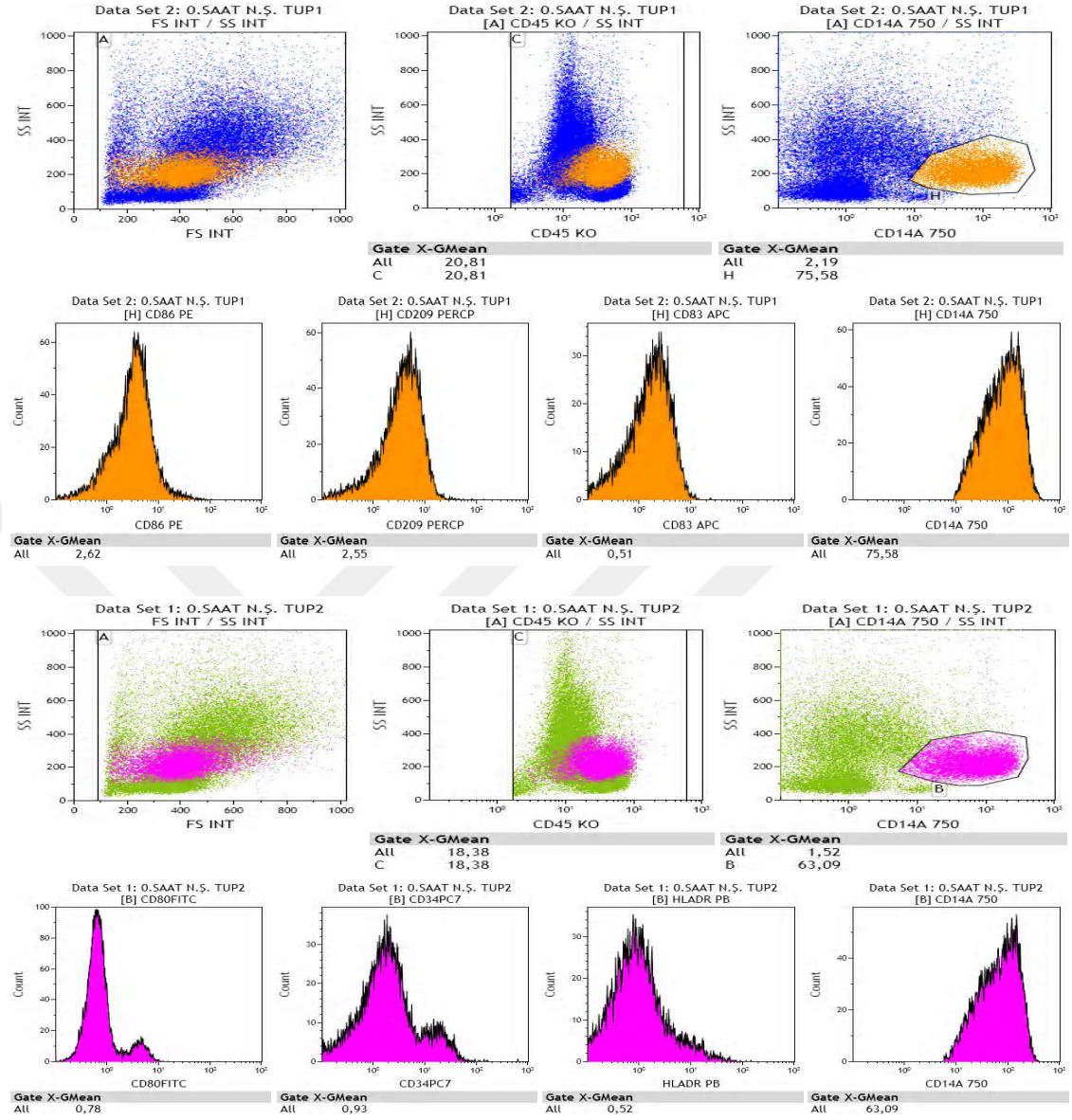
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.31. 5. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

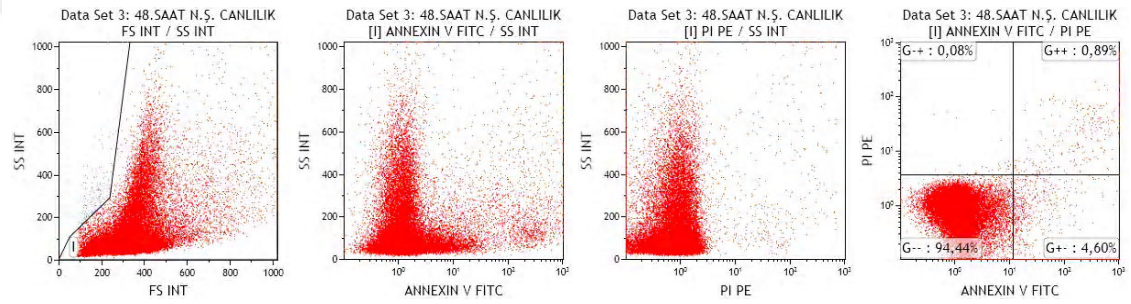
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün ekim öncesi numunede bulunan hücrelerin %94,60 canlı, %4,28 pre-apoptoz döneminde, %1,05 apoptoz döneminde ve %0,07 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



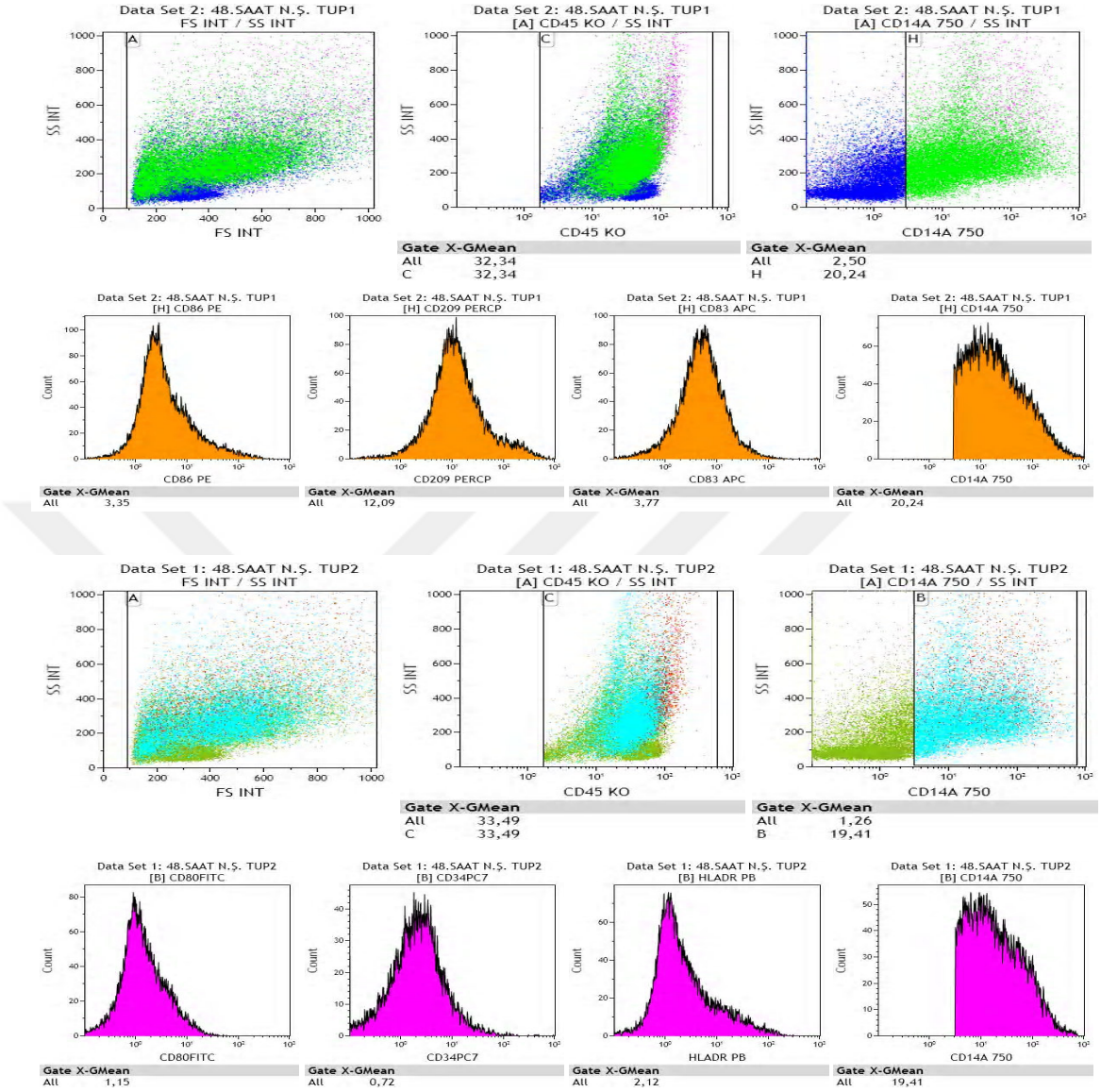
Şekil 4.32. 5. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

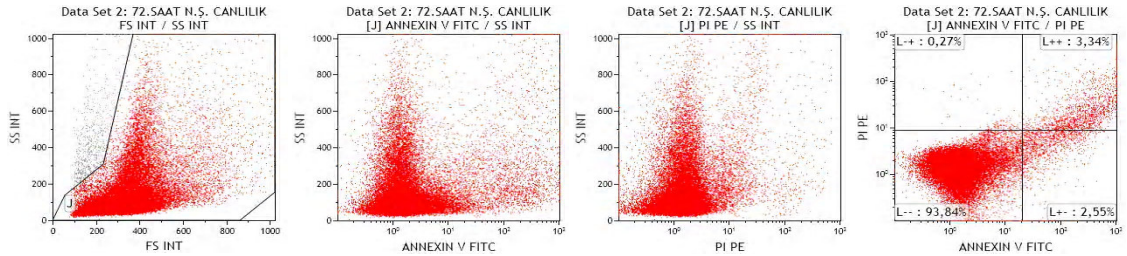


Şekil-4.33. 5. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %94,44 canlı, %4,60 pre-apoptoz döneminde, %0,89 apoptoz döneminde ve %0,08 ölü olarak tespit edildi.

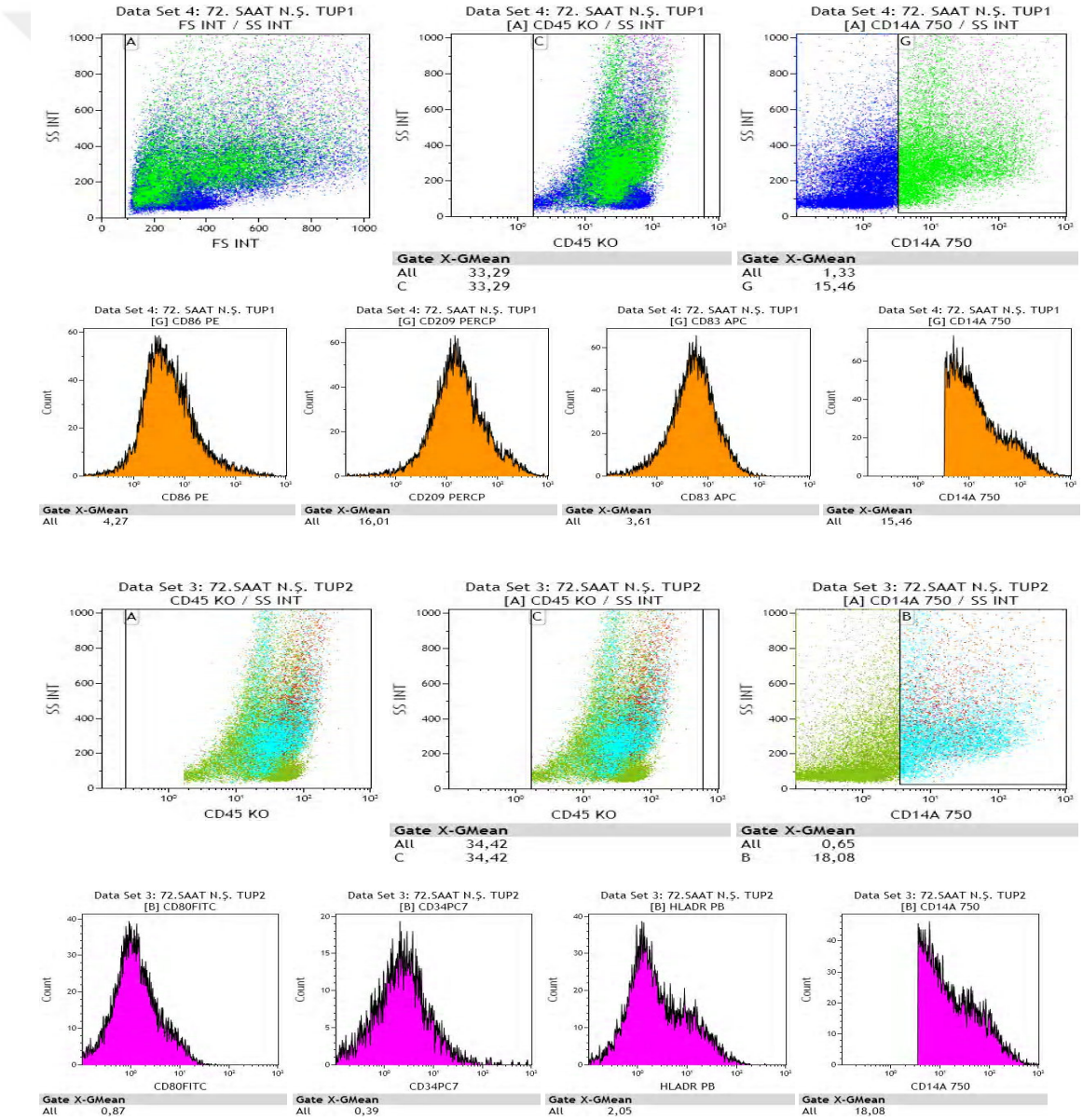


Şekil 4.34. 5. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

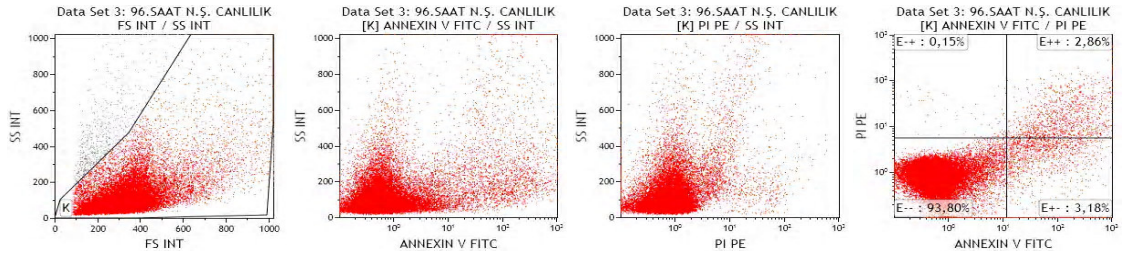


Şekil 4.35. 5. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %93,84 canlı, %2,55 pre-apoptoz döneminde, %3,34 apoptoz döneminde ve %0,27 ölü olarak tespit edildi.

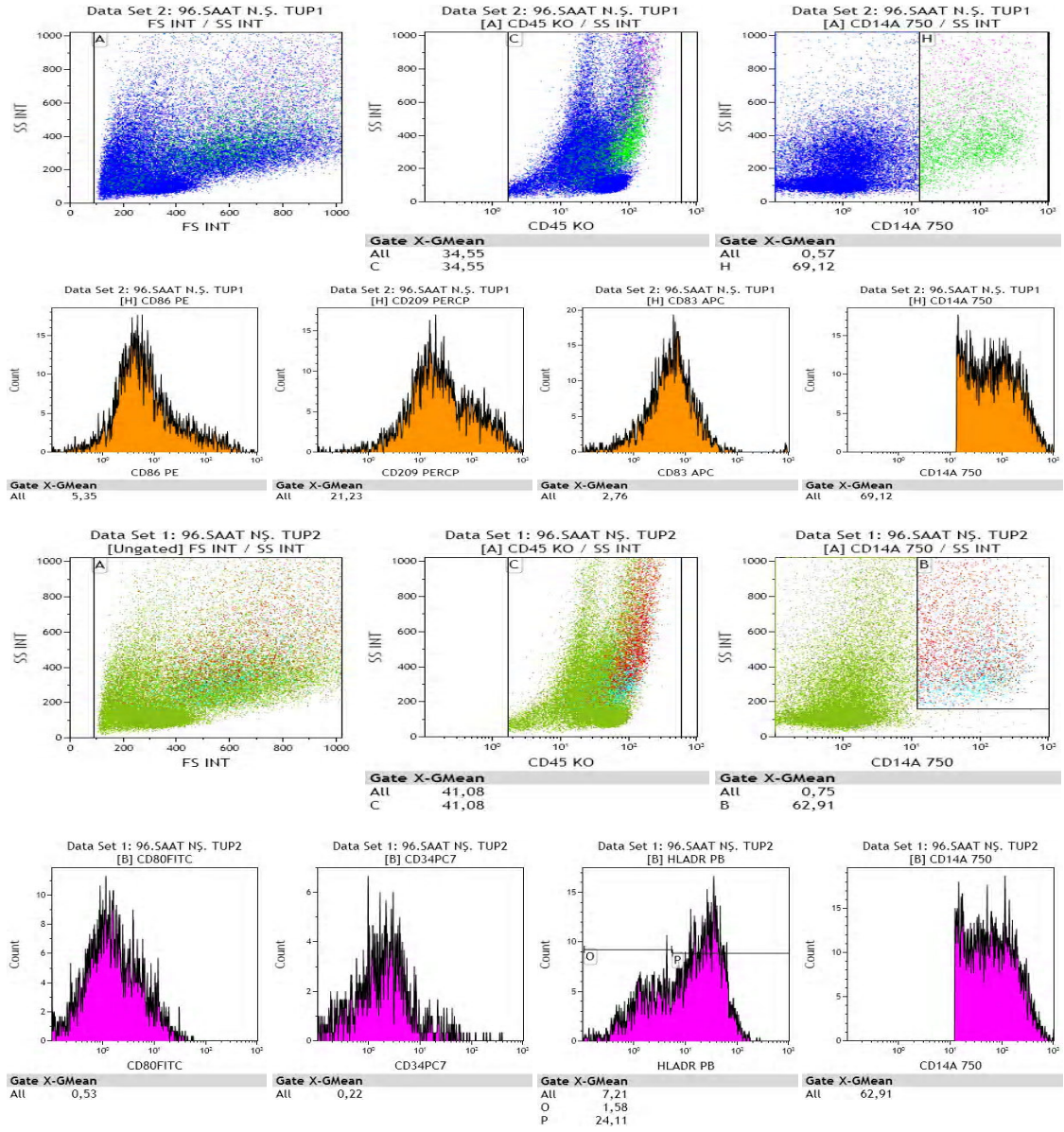


Şekil 4.36. 5. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.37. 5. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %93,80 canlı, %3,18 pre-apoptoz döneminde, %2,86 apoptoz döneminde ve %0,15 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.38. 5. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.5. 5. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	63,09	19,41	18,08	62,91
CD34	0,93	0,72	0,39	0,22
CD45	20,81	32,34	33,29	34,55
CD80	0,78	1,15	0,87	0,53
CB83	0,51	3,77	3,61	2,76
CD86	2,62	3,35	4,27	5,35
CD209	2,55	12,09	16,01	21,23
HLA-DR	052	2,12	2,05	7,21

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 75,58 , 48. saatinde 20,24 , 72. saatinde 15,46 ve 96. saatinde 62,91 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda düzenli bir azalış gözlenmedi.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,93 , 48. saatinde 0,72 , 72. saatinde 0,39 ve 96. saatinde 0,22 olarak tespit edildi. Bu antikorun ekspresyon düzeylerinde düzenli ve belirgin bir azalış gözlendi. Buna göre kültür ortamdaki kök hücrelerin oranında azaldığı ve kök hücrelerin dendritik hücreye dönüşmek için değiştiği söylenebilir.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 3,35 (1,3 kat artış) ve 4,27 (1,6 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 5,35 (2 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonunda belirgin bir artış gözlendi.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 20,81 , 48. saatinde 32,34 , 72. saatinde 33,29 ve 96. saatinde 34,55 olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonunda düzenli ve belirgin bir artış gözlendi.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 2,12 (4,1 kat artış) ve 2,05 (4 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Bu ekspresyon artışı, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 7,21 (13,9 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonunda belirgin bir artış gözlendi.

CD80+ ekspresyonu; 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,78 olarak belirlendi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,15 (1,5 kat artış) ve 0,87 (belirgin bir artış gözlenmedi) olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeyleri 0. saatteki ekspresyon düzeyine göre artış gözlendi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 0,53 (artış gözlenmedi) olarak tespit edildi.

CD83+ ekspresyonu; 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,51 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 3,77 (7,4 kat artış) ve 3,61 (7,1 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 2,76 (5,4 kat artış) olarak tespit edildi.

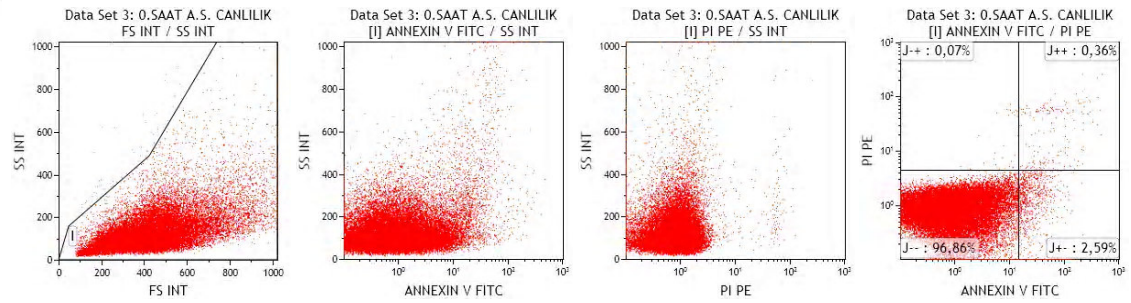
5. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde 96. saatinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.1.6. 6. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Kadın/65

OKHN hastasından toplanmış hasta: Erkek/60

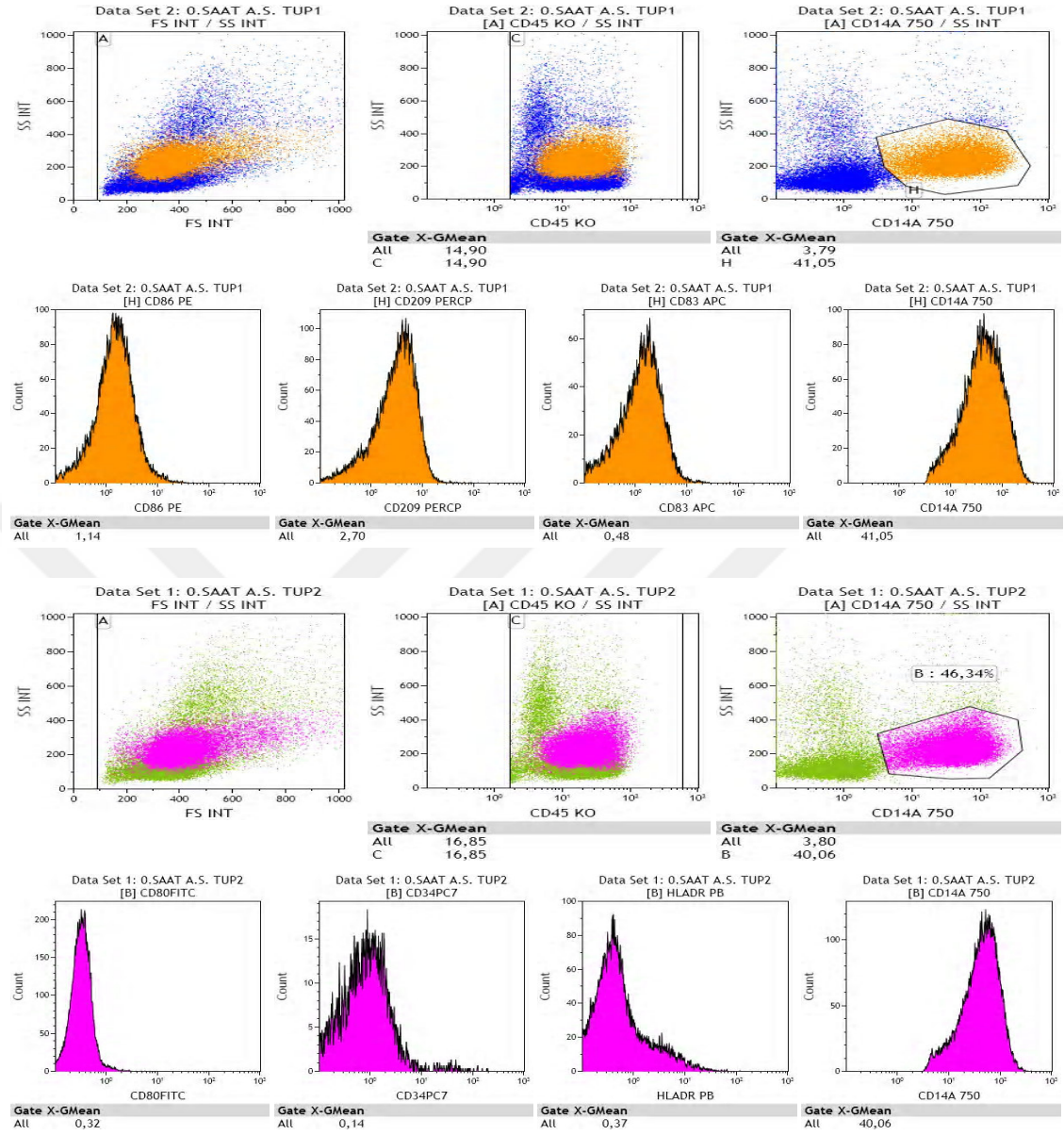
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.39. 6. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

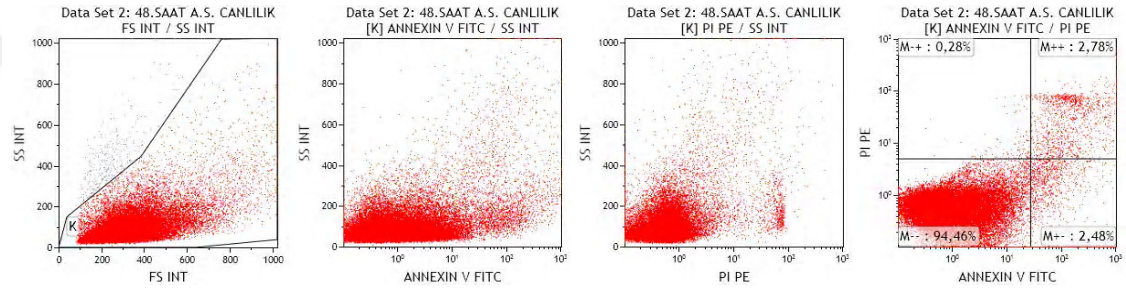
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültür öncesi numunede bulunan hücrelerin %96,86 canlı, %2,59 pre-apoptoz döneminde, %0,36 apoptoz döneminde ve %0,07 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



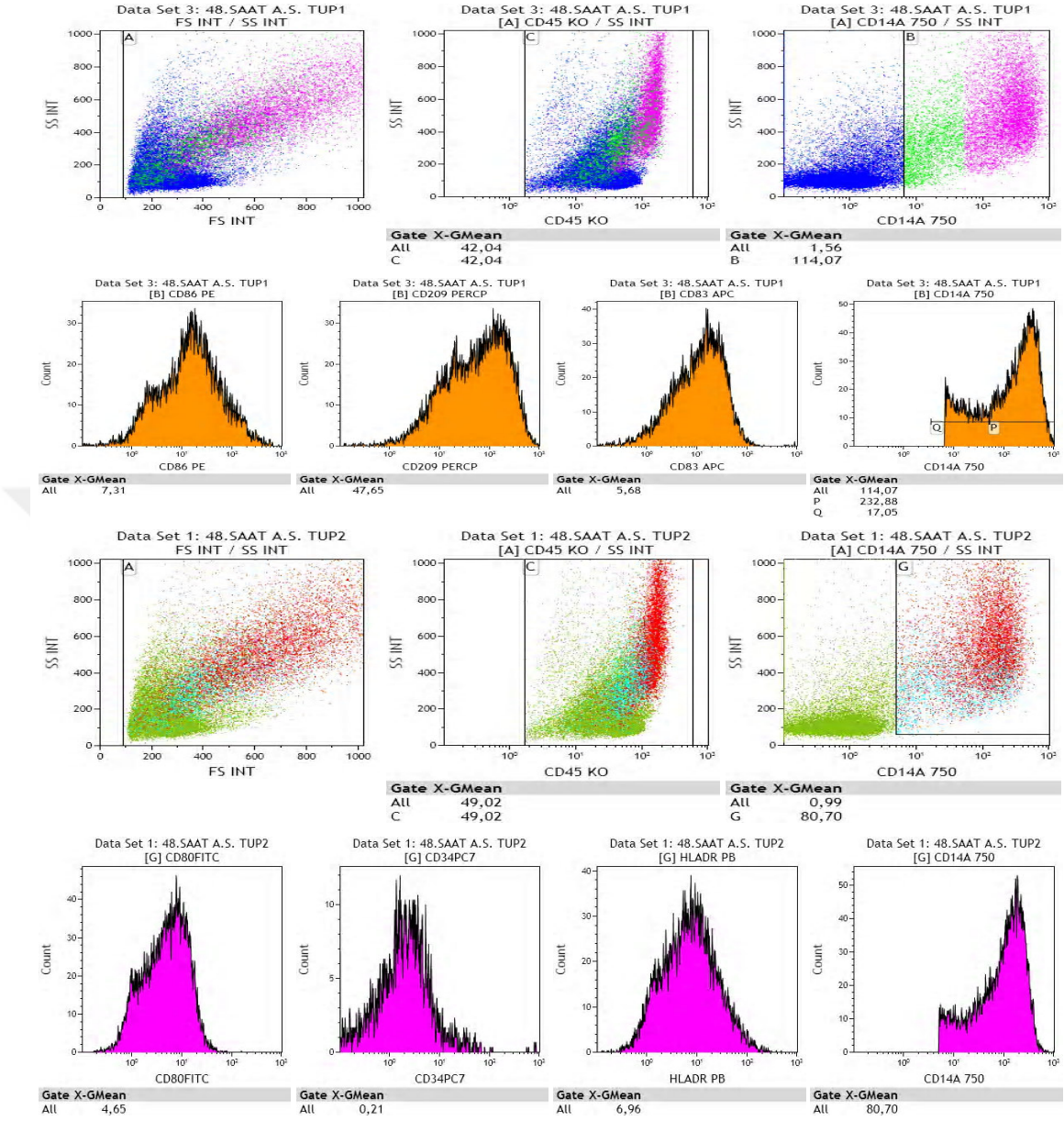
Şekil 4.40. 6. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0$C , %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

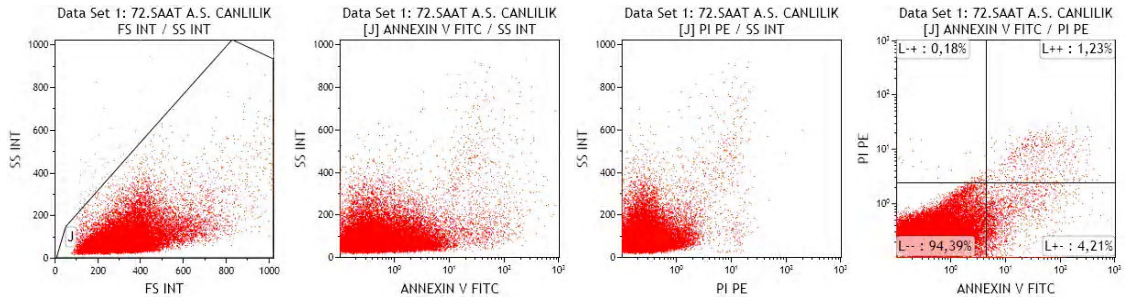


Şekil 4.41. 6. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %94,46 canlı, %2,48 pre-apoptoz döneminde, %2,78 apoptoz döneminde ve %0,28 ölü olarak tespit edildi.

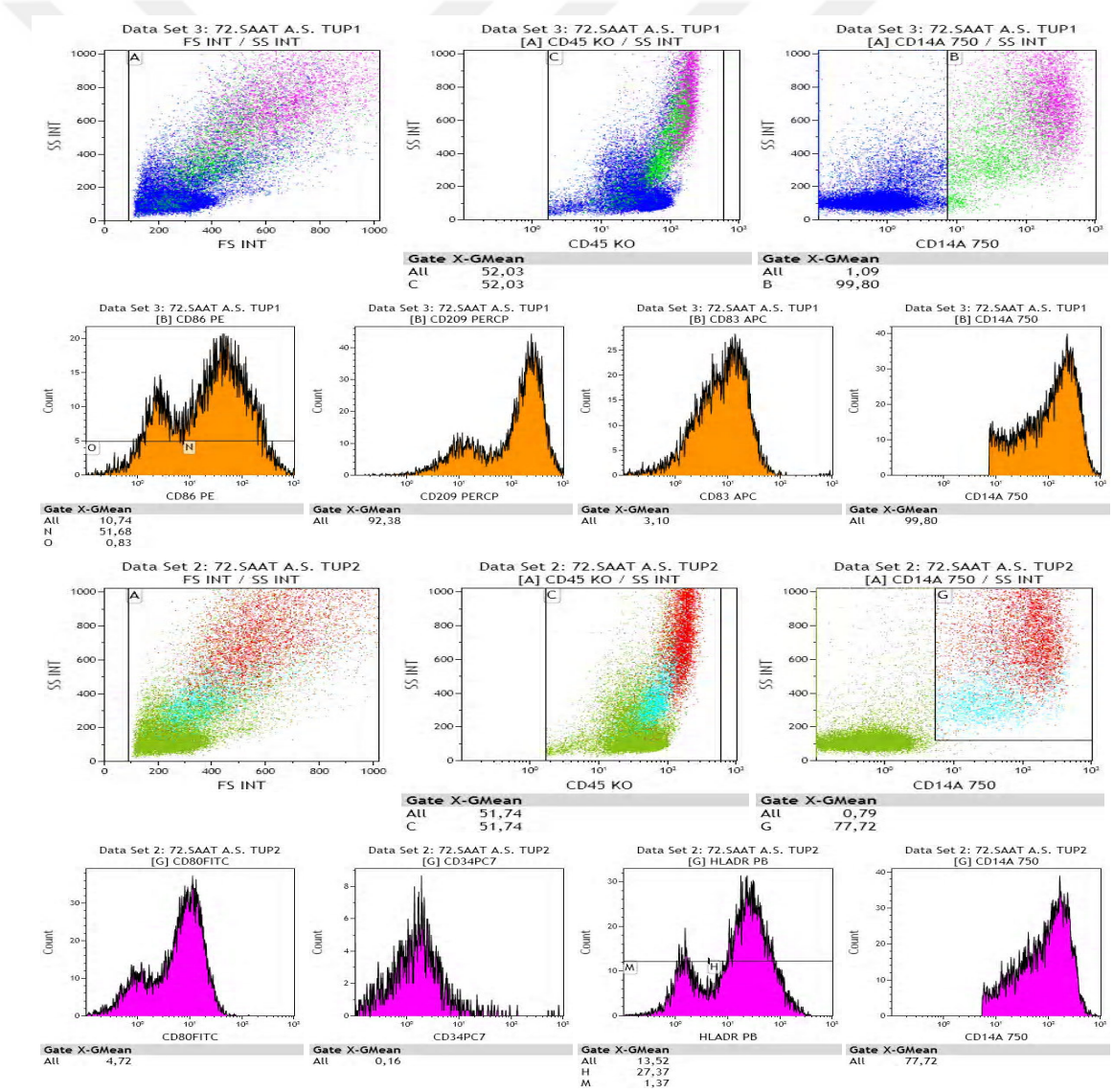


Şekil 4.42. 6. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

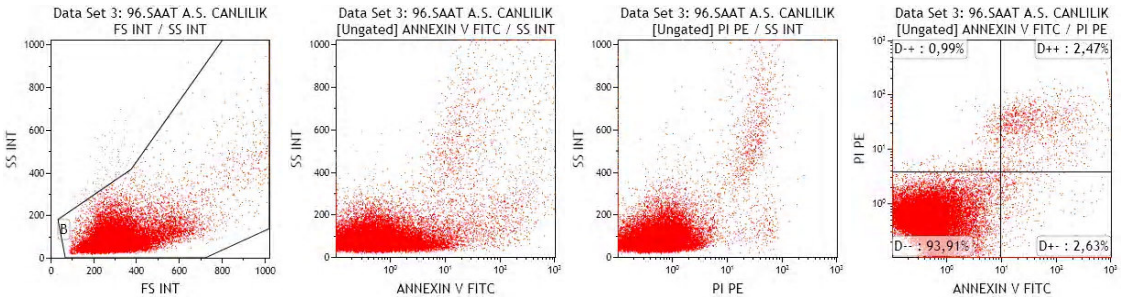


Şekil 4.43. 6. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %94,39 canlı, %4,21 pre-apoptoz döneminde, %1,23 apoptoz döneminde ve %0,18 ölü olarak tespit edildi.

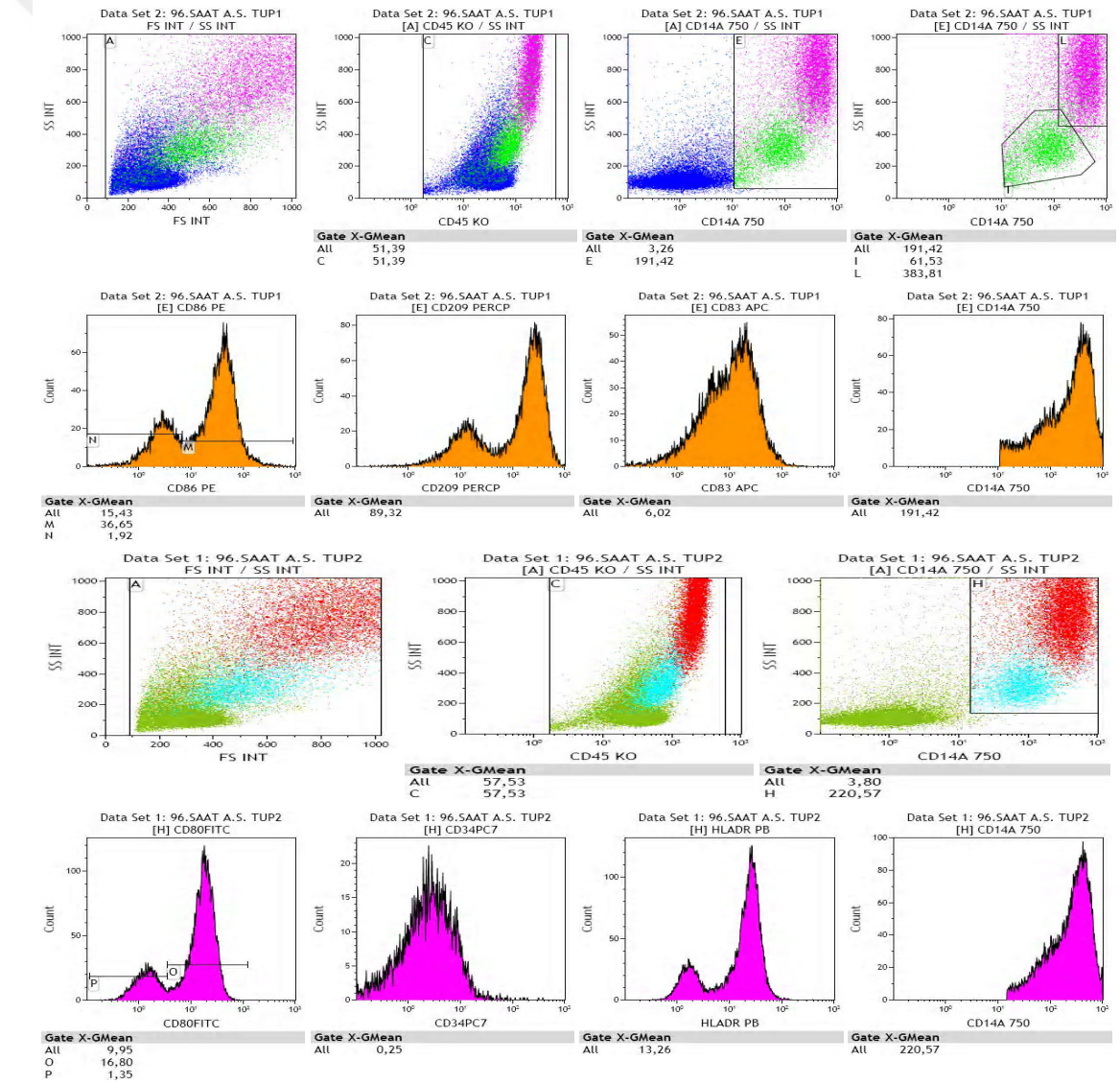


Şekil 4.44. 6. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.45. 6. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %93,91 canlı, %2,63 pre-apoptoz döneminde, %2,47 apoptoz döneminde ve %0,99 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.46. 6. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.6. 6. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	40,06	80,70	77,72	220,57
CD34	0,14	0,21	0,16	0,25
CD45	16,85	49,02	51,74	57,53
CD80	0,32	4,65	4,72	9,95
CB83	0,48	5,68	3,10	6,02
CD86	1,14	7,31	10,74	15,43
CD209	2,70	47,65	92,38	89,32
HLA-DR	0,37	6,96	13,52	13,26

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 40,06 , 48. saatinde 80,70 , 72. saatinde 77,42 ve 96. saatinde 220,57 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda bir azalış beklenirken çok fazla miktarda artış görüldü.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,14 , 48. saatinde 0,21 , 72. saatinde 0,16 ve 96. saatinde 0,25 olarak tespit edildi ve bu antikorun ekspresyon düzeylerinde belirgin bir değişiklik gözlenmedi.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 7,31 (6,4 kat artış) ve 10,74 (9,4 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 15,43 (13,5 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon artışı düzenli ve belirgin bir şekilde görüldü.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri 0. saatinde 16,85 , 48. saatinde 49,02 , 72. saatinde 51,74 ve 96. saatinde 57,53 olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon artışı düzenli ve belirgin bir şekilde görüldü.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 6,96 (18,8 kat artış) ve 13,52 (36,5 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı belirgin bir şekilde gözlendi. Bu ekspresyon artışı, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 13,26 (35,9 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonunda belirgin bir artış görüldü.

CD80+ ekspresyonu; 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,32 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 4,65 (14,5 kat artış) ve 4,72 (14,75kat artış) olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeylerinde beklenen artış belirgin olarak görüldü. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 9,95 (31,1 kat artış) olarak tespit edildi. Buna göre ortamdaki mononükleer ve kök hücrelerin matür dendritik hücreye dönüştüğünü söylenebilir.

CD83+ ekspresyonu; 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,48 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 5,68 (11,9 kat artış) ve 3,10 (6,5 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 6,02 (12,5 kat artış) olarak tespit edildi. Beklenen ekspresyon artışı kültür saatlerinde düzenli olmamasına rağmen belirgin artış gözlemlendi.

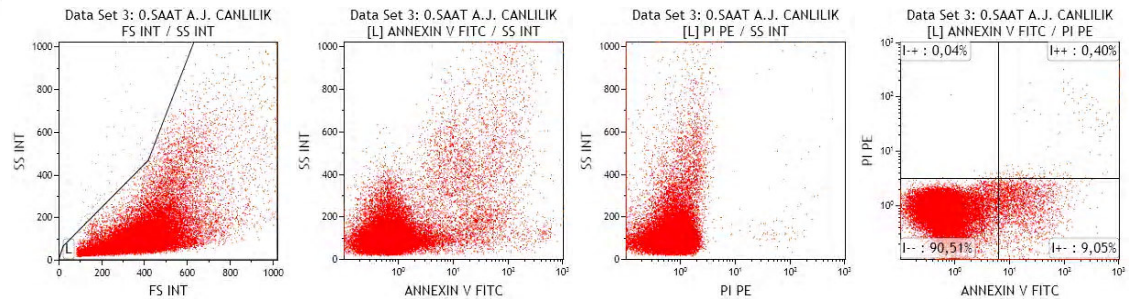
6. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.1.7. 7. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Kadın/62

OKHN hastasından toplanmış hasta: Erkek/65

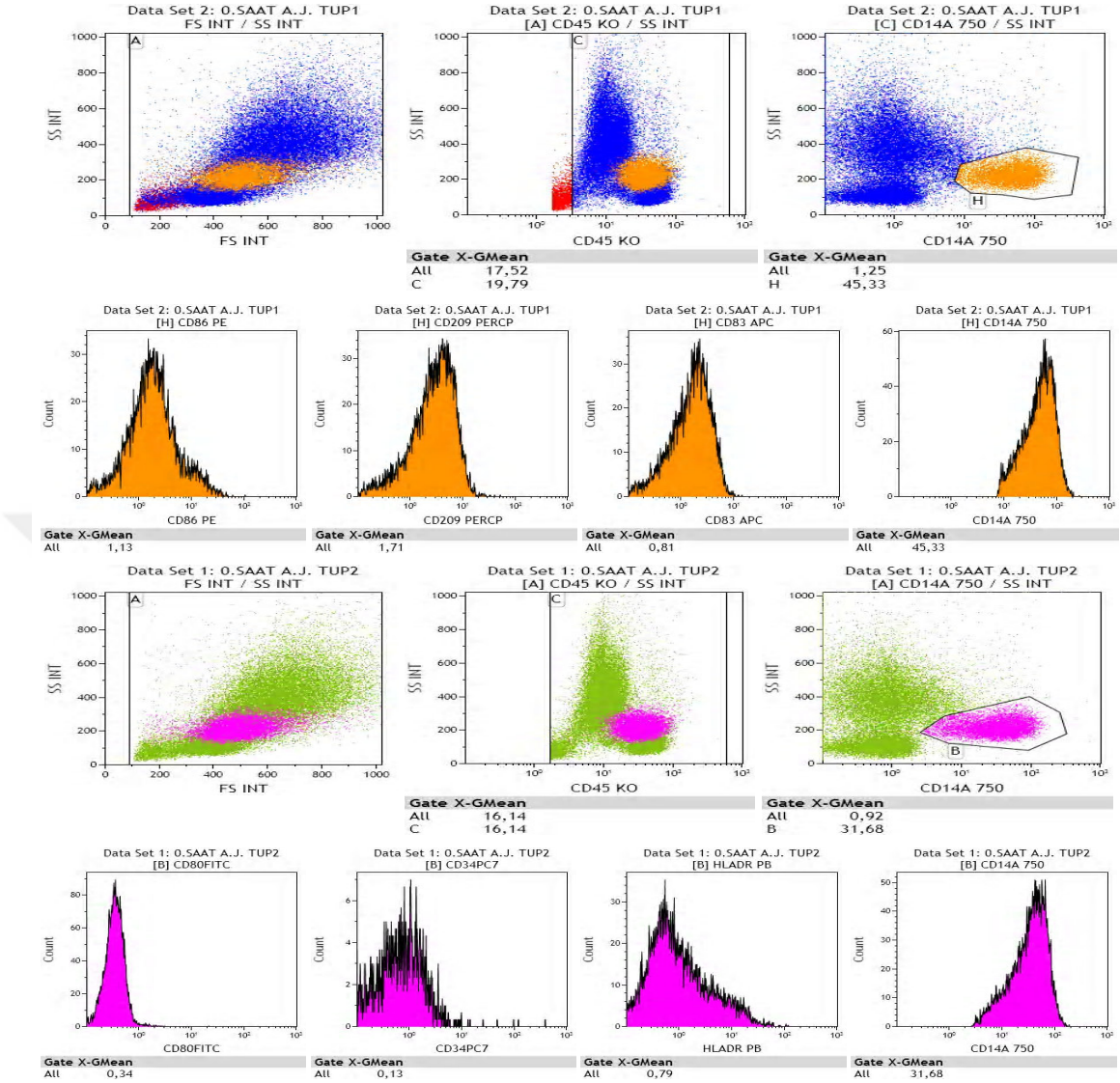
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.47. 7. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

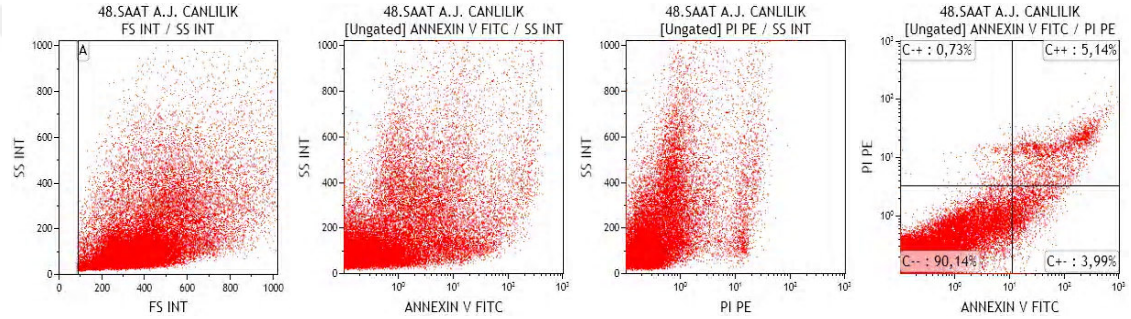
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültür öncesi numunede bulunan hücrelerin %90,51 canlı , %9,05 pre-apoptoz döneminde, %0,40 apoptoz döneminde ve %0,04 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



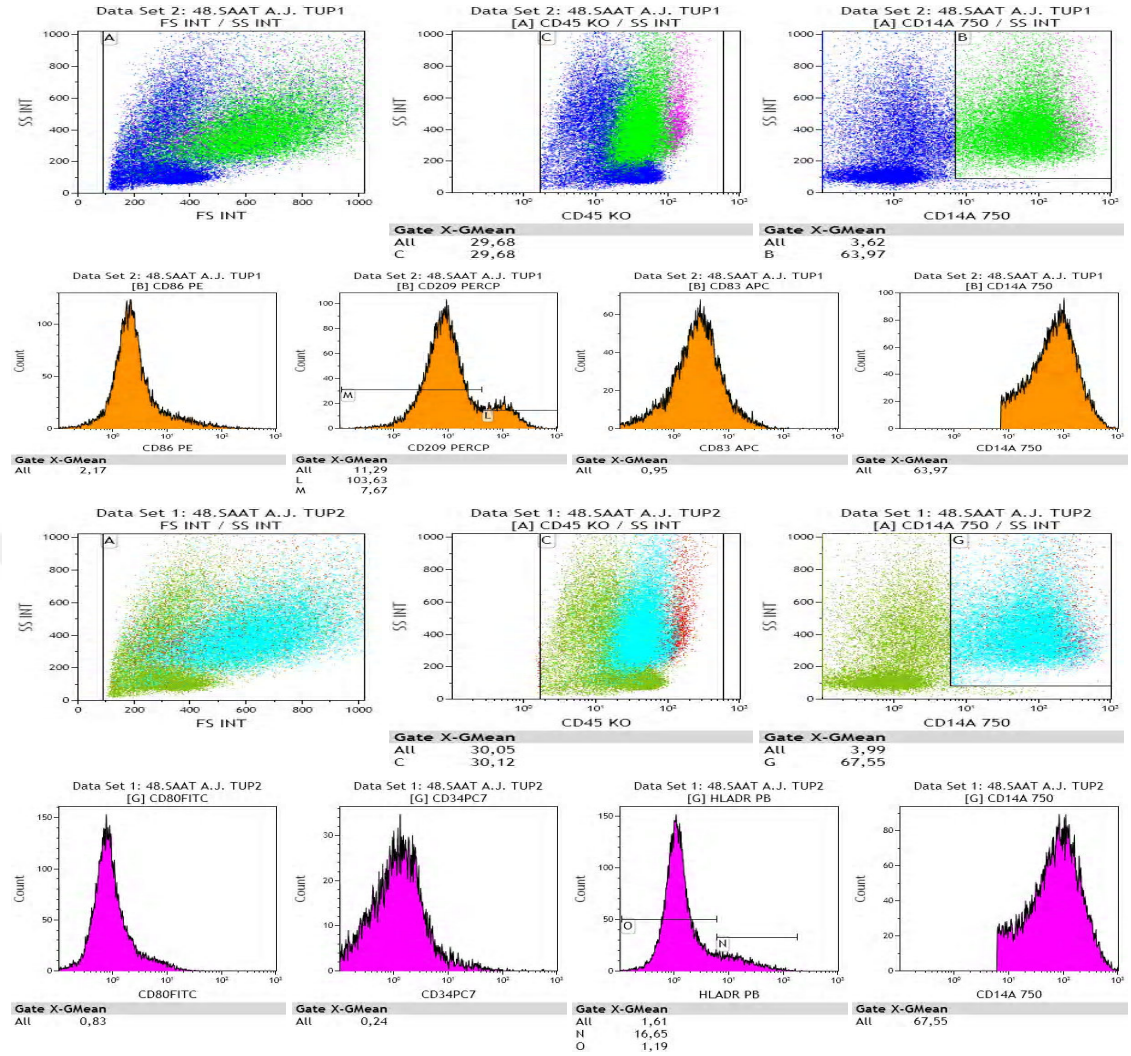
Şekil 4.48. 7. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; +37^{0}C , %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

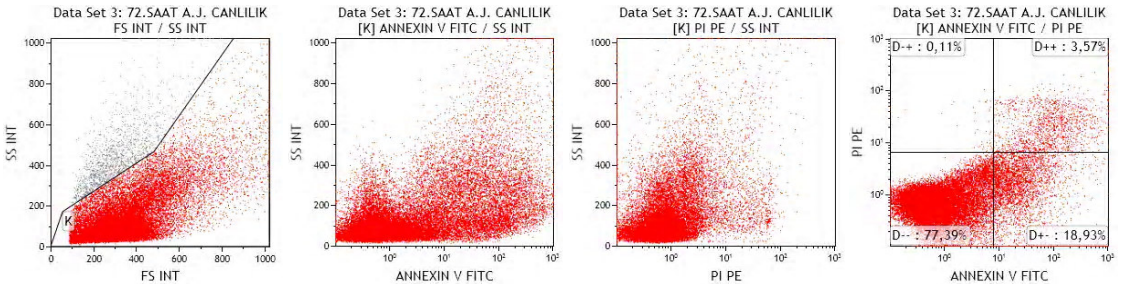


Şekil 4.49. 7. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %90,14 canlı, %3,99 pre-apoptoz döneminde, %5,14 apoptoz döneminde ve %0,73 ölü olarak tespit edildi.

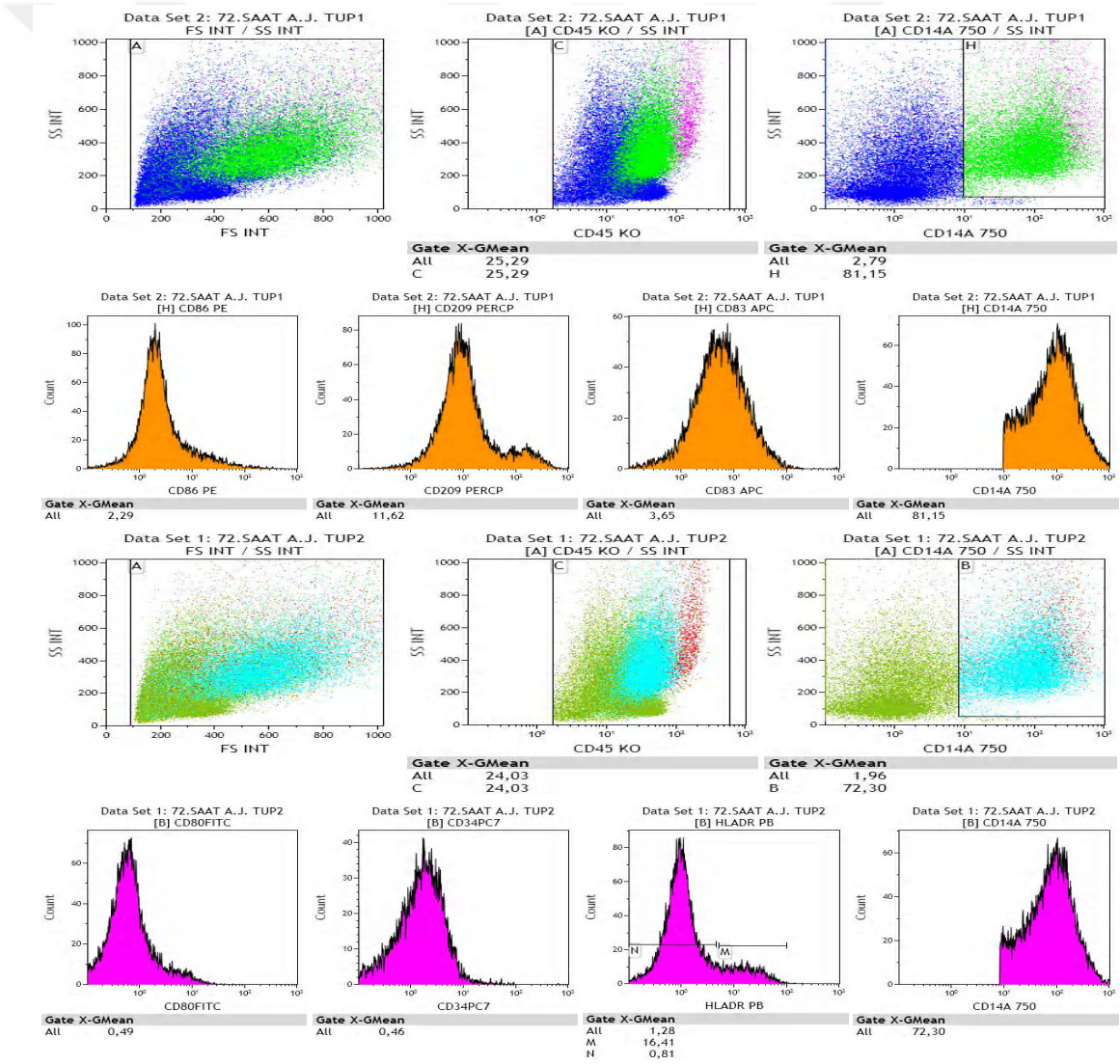


Şekil 4.50. 7. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

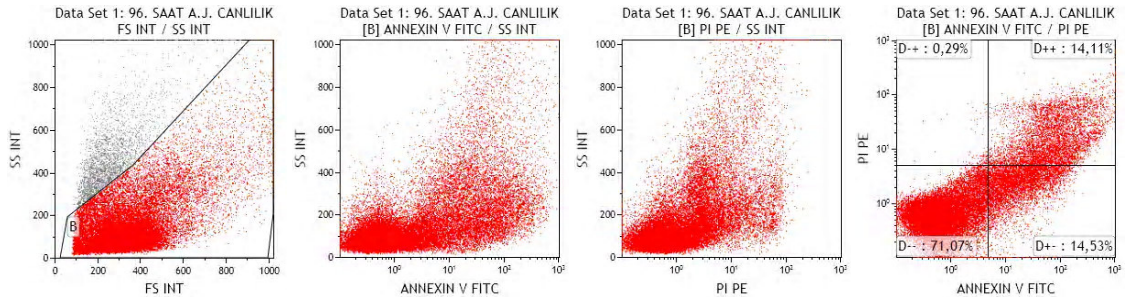


Şekil 4.51. 7. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %77,39 canlı , %18,93 pre-apoptoz döneminde, %3,57 apoptoz döneminde ve %0,11 ölü olarak tespit edildi.

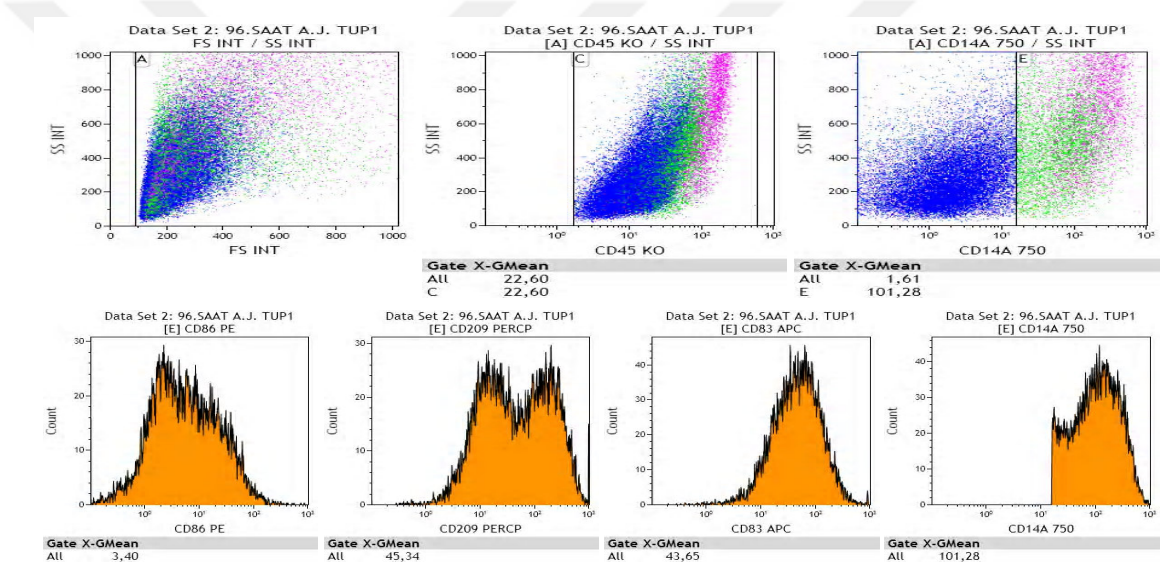


Şekil 4.52. 7. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.53. 7. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %71,07 canlı , %14,53 pre- apoptoz döneminde , %14,11 apoptoz döneminde ve %0,29 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.54. 7. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1. tüpünün akım sitometrik analizi

Yaşanan bazı teknik arızalar sebebiyle 7. uygulamanın kültür takibinin 96. saatinin 2. tüpünün akım sitometrik analizi yapılamadı.

Tablo 4.7. 7. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	45,33	63,97	81,15	101,28
CD34	0,13	0,24	0,46	–
CD45	16,14	30,12	24,03	22,60
CD80	0,34	0,83	0,49	–
CB83	0,81	0,95	3,65	43,65
CD86	1,13	2,17	2,29	3,40
CD209	1,71	11,29	11,62	45,34
HLA-DR	0,79	1,61	1,28	–

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 45,33 , 48. saatinde 63,97 , 72. saatinde 81,15 ve 96. saatinde 101,28 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda bir azalış beklenirken çok fazla artış görüldü.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,13 , 48. saatinde 0,24 ve 72. saatinde 0,46 olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde yaşanan teknik bir arıza sonu okunamayan tüpün içinde bulunan antikorlardan biri olan CD34 antikorunun ekspresyon düzeyi belirlenemedi. Bu yüzden bu antikorun tespitleri tam olarak yapılamadı.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 2,17 (1,9 kat artış) ve 2,29 (2 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 3,40 (3 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon artışı düzenli ve belirgin bir şekilde görüldü.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri 0. saatinde 16,14 , 48. saatinde 30,12 , 72. saatinde 24,03 ve 96. saatinde 22,60 olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon düzenli artış görülmedi.

HLA-DR+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,79 , 48. saatinde 1,61 ve 72. saatinde 1,28 olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde yaşanan teknik bir arıza sonu okunamayan tüpün içinde bulunan antikorlardan biri olan HLA-DR antikorunun ekspresyon düzeyi belirlenemedi. Bu yüzden bu antikorun tespitleri tam olarak yapılamadı. Ancak kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyonunda belirgin bir artış görüldü.

CD80+ ekspresyonu; 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,34 olarak belirlendi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,83 ve 0,49 olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeylerinde beklenen artış görülmedi. Kültürün 96. saatinin analizinde yaşanan teknik bir arıza sonu okunamayan tüpün içinde bulunan antikorlardan biri olan CD80 antikorunun ekspresyon düzeyi belirlenemedi. Bu yüzden bu antikorun tespitleri tam olarak yapılamadı.

CD83+ ekspresyonu; 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,81 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,95 (belirgin bir artış görülmedi) ve 3,65 (4,5kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 43,65 (53,9 kat artış) olarak tespit edildi. Beklenen ekspresyon artışı düzenli ve belirgin bir artış görüldü.

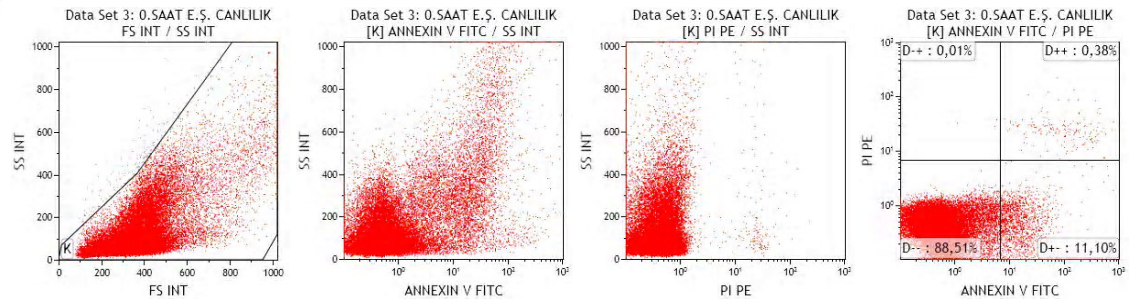
7. uygulamada yaşanılan teknik aksaklıklar sonucu dendritik hücre dönüşümünün gerçekleşip gerçekleşmeyeceği tam olarak tespit edilemedi. Ancak CD14 ve CD34 antikorların ekspresyonunda azalış olması beklenirken artış görülmesi kültür ortamında çok fazla miktarda mononükleer ve kök hücre olduğunu gösterir.

4.1.8. 8. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/58

OKHN hastasından toplanmış hasta: Erkek/57

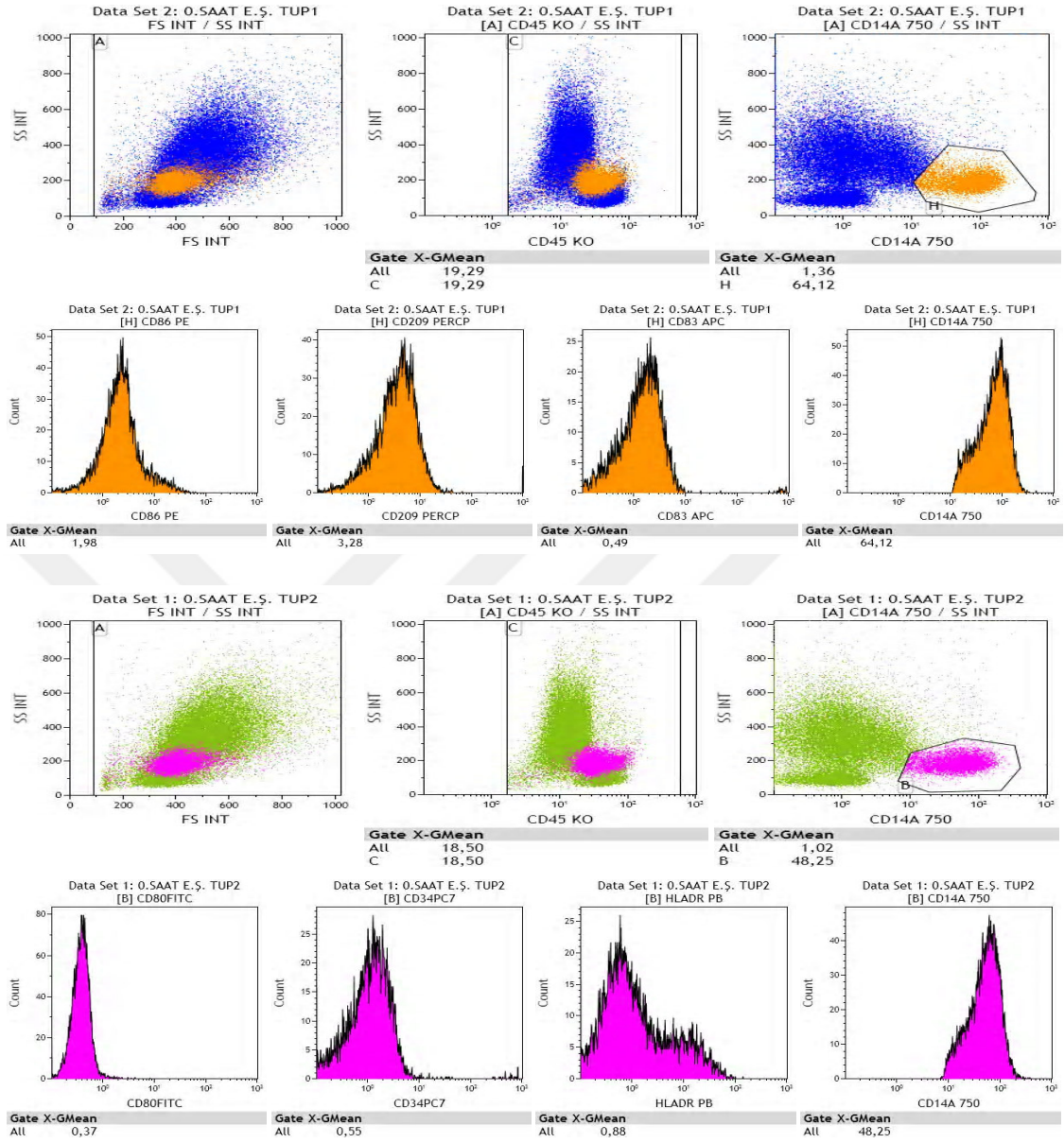
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.55. 8. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

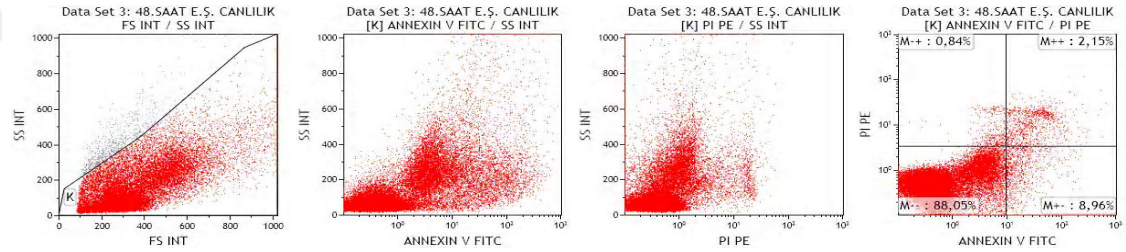
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültür öncesi numunedeki bulunan hücrelerin %88,51 canlı, %11,10 pre-apoptoz döneminde, %0,38 apoptoz döneminde ve %0,01 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



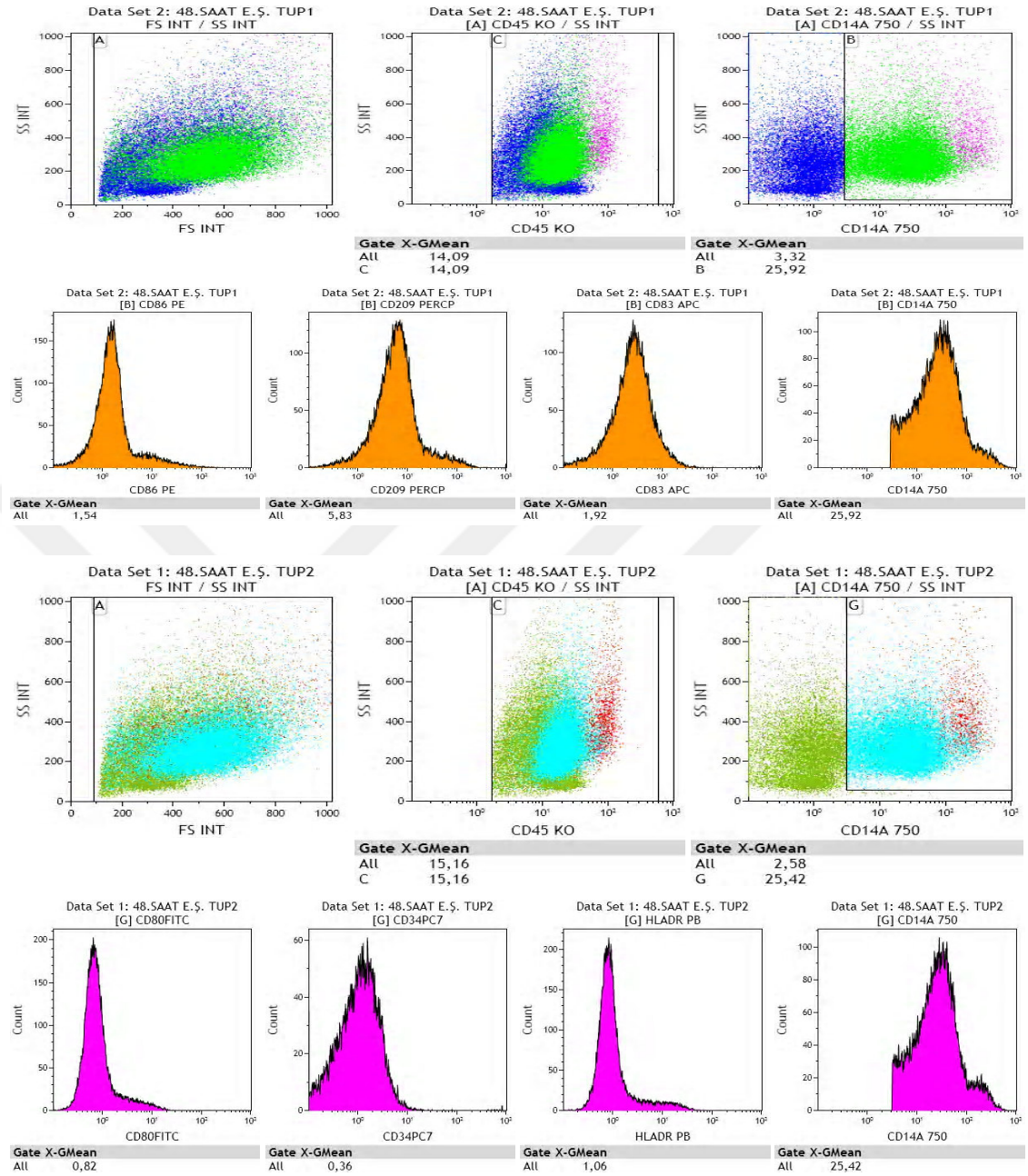
Şekil 4.56. 8. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. Tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

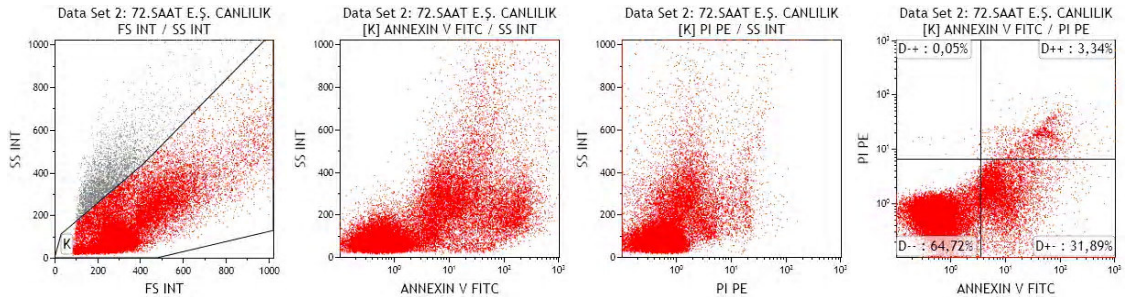


Şekil 4.57. 8. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %88,05 canlı, %8,96 pre-apoptoz döneminde, %2,15 apoptoz döneminde ve %0,84 ölü olarak tespit edildi.

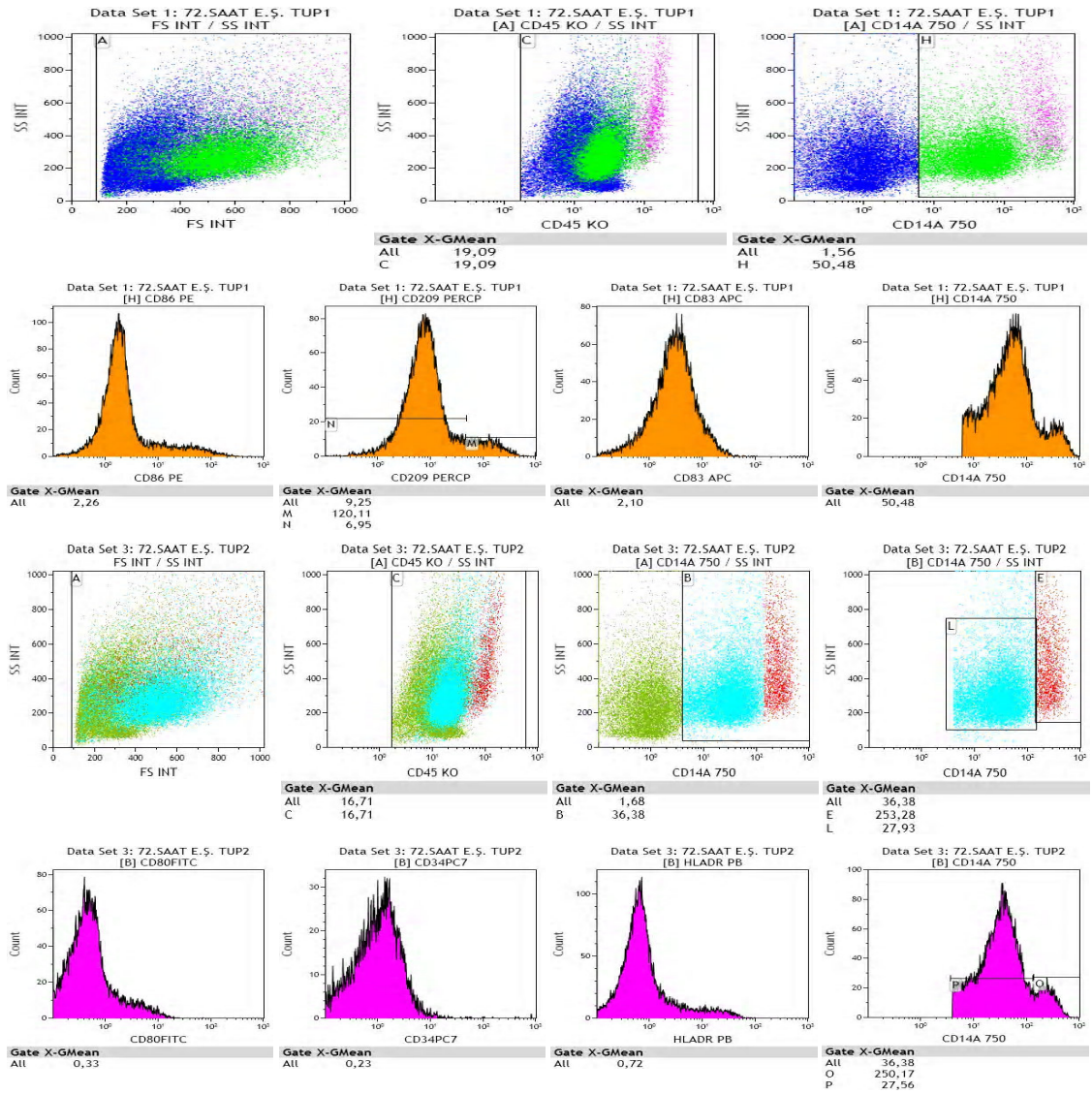


Şekil 4.58. 8. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

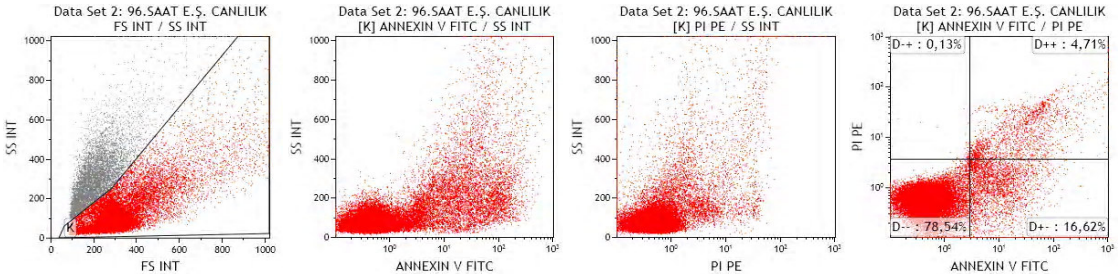


Şekil 4.59. 8. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %64,72 canlı, %31,89 pre-apoptoz döneminde, %3,34 apoptoz döneminde ve %0,05 ölü olarak tespit edildi.

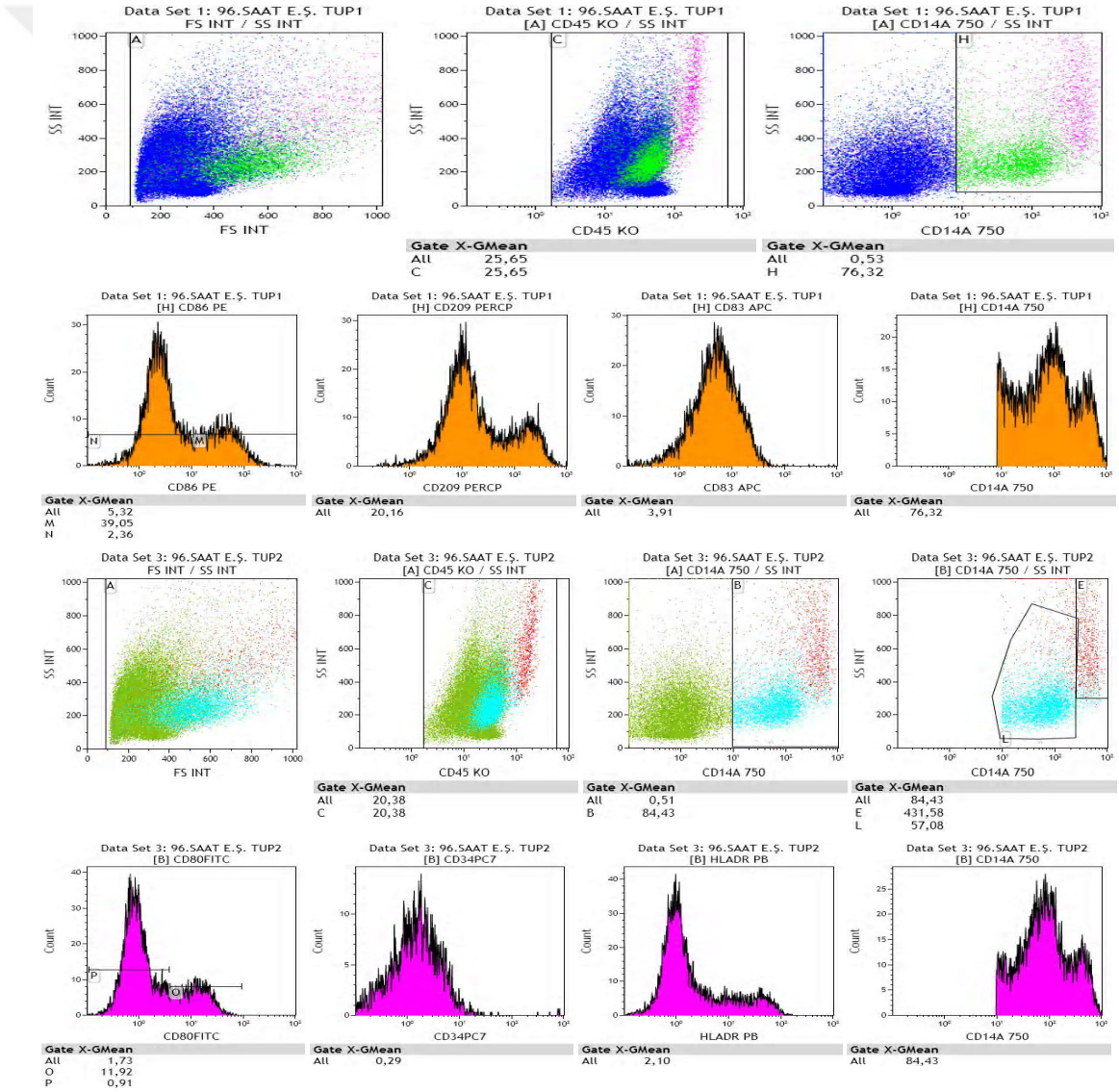


Şekil 4.60. 8. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.61. 8. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %78,54 canlı, %16,62 pre-apoptoz döneminde, %4,71 apoptoz döneminde ve %0,13 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.62. 8. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.8. 8. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	64,12	25,92	50,48	76,32
CD34	0,55	0,36	0,23	0,29
CD45	19,29	14,09	19,09	25,65
CD80	0,37	0,82	0,33	1,73
CB83	0,49	1,92	2,10	3,91
CD86	1,48	1,54	2,26	5,32
CD209	3,28	5,83	9,25	20,16
HLA-DR	0,88	1,06	0,72	2,10

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve hücrelerin canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür takip saatlerinde de hücre sayımları ve hücrelerin canlılık yüzdeleri tespit edildi.

Antikorların ekspresyon düzeylerinin mean floresan değerlerini tespit edilip elde edilen değerlere göre antikorların tek tek analizi yapıldı. Buna göre antikorlar;

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi. Ekspresyon düzeyleri 0. saatinde 64,12 , 48. saatinde 25,92 , 72. saatinde 50,48 ve 96. saatinde 76,32 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda bir azalış beklenirken çok fazla miktarda artış gözlendi.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,55 , 48. saatinde 0,36 , 72. saatinde 0,23 ve 96. saatinde 0,29 olarak tespit edildi ve bu antikorun ekspresyon düzeyinde düzenli olmayan azalış gözlendi.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,54 (belirgin bir artış görülmedi) ve 2,26 (1,5 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 5,32 (3,6 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon düzeyinde artış görüldü.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 19,29 , 48. saatinde 14,09 , 72. saatinde 19,09 ve 96. saatinde 25,65 olarak tespit edildi. Kültürün sadece 96. saatinde ekspresyon artışı belirgin bir şekilde görüldü.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,06 (belirgin bir artış görülmedi) ve 0,72 (artış görülmedi) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı elde edilemedi. Bu ekspresyon artışı, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 2,10 (2,4 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi ve sadece kültürün 96. saatinde belirgin bir artışı görüldü.

CD80+ ekspresyonu; 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,37 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,87 (2,2 kat artış) ve 0,33 (bir azalma görüldü) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 1,73 (4,7 kat artış) olarak tespit edildi.

CD83+ ekspresyonu; 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,49 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,92 (4 kat artış) ve 2,10 (4,3 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 3,91 (8 kat artış) olarak tespit edildi. Beklenen ekspresyon artışı düzenli ve belirgin bir şekilde görüldü.

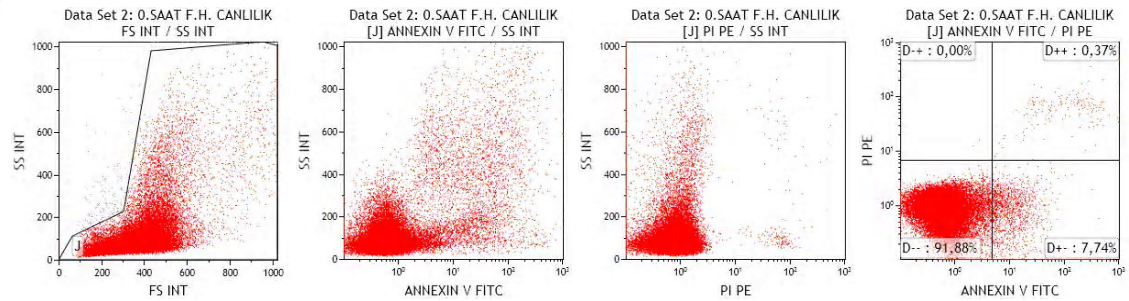
8. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde 96. saatinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.1.9. 9. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/56

OKHN hastasından toplanmış hasta: Erkek/71

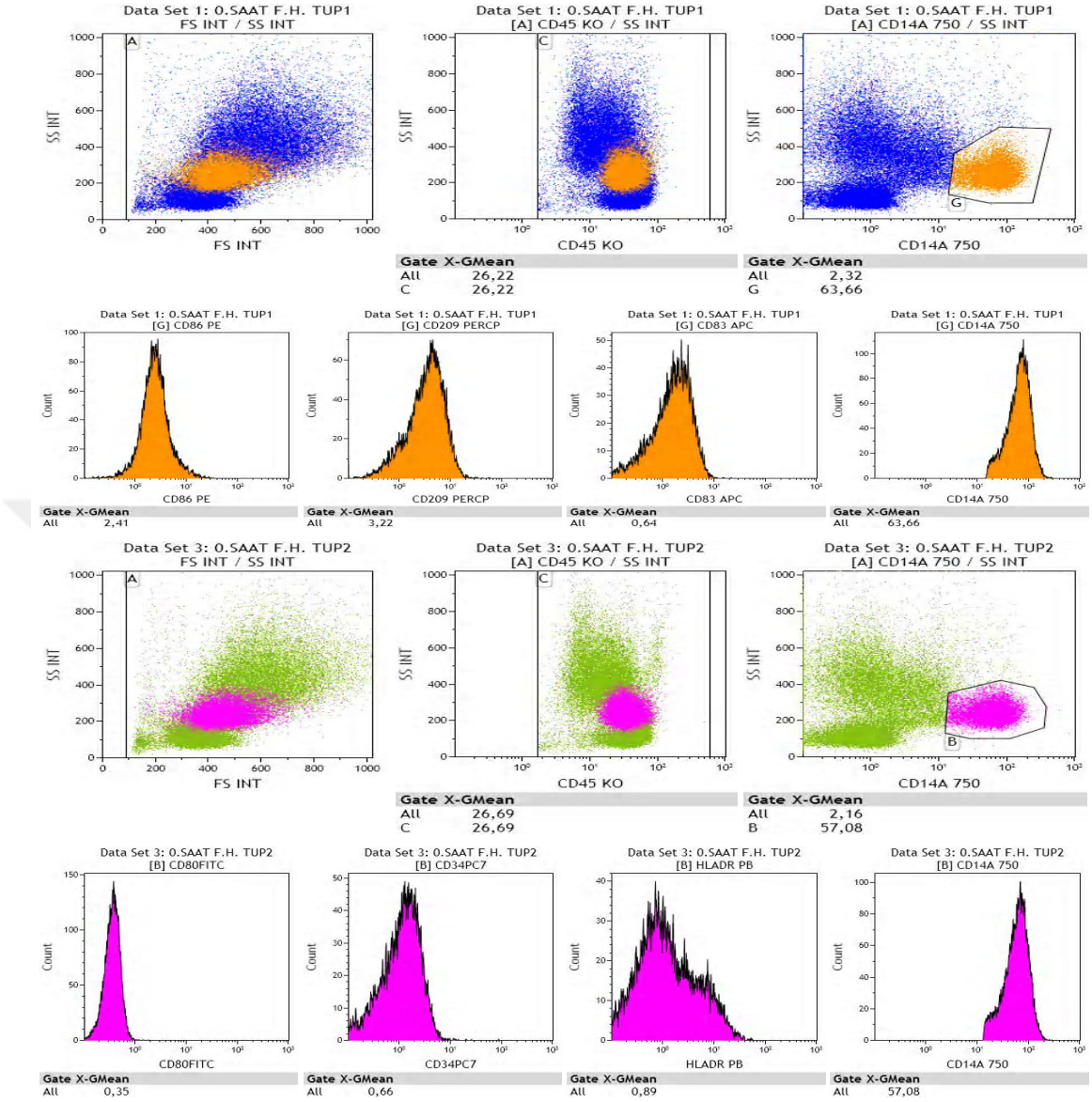
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.63. 9. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

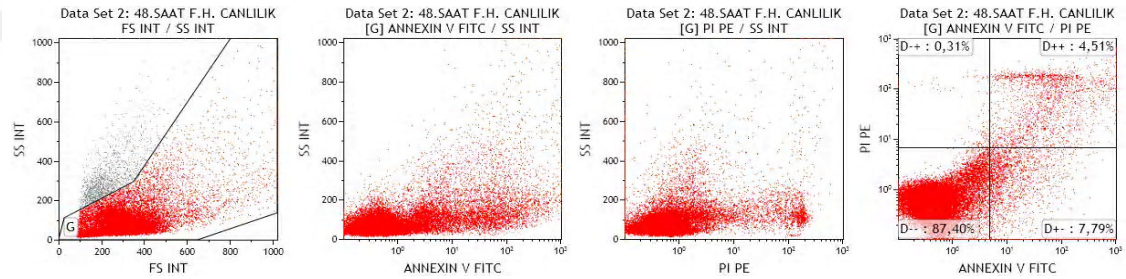
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültür öncesi numunedeki bulunan hücrelerin %91,88 canlı, %7,74 pre-apoptoz döneminde, %0,37 apoptoz döneminde ve %0,00 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



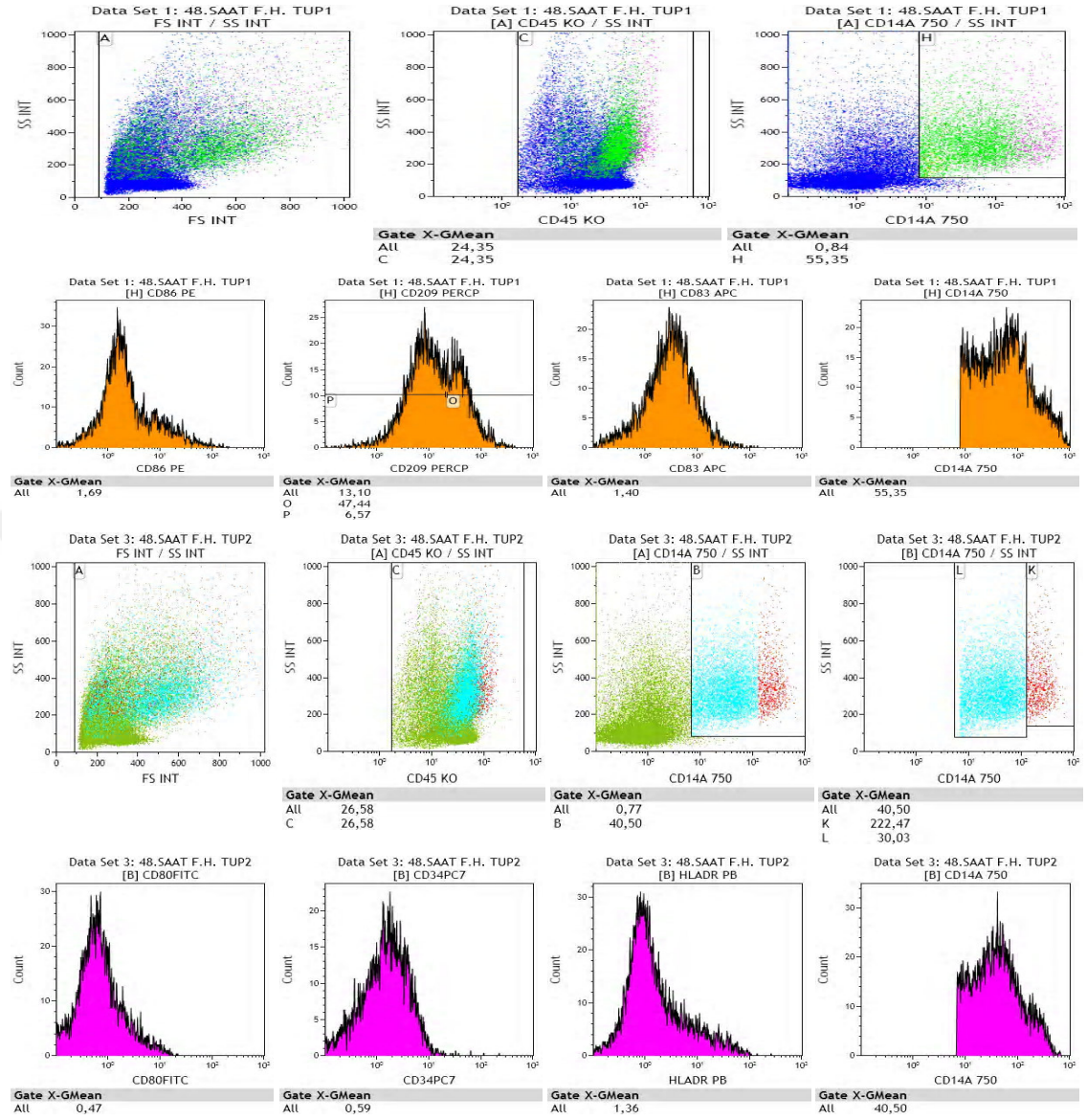
Şekil 4.64. 9. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

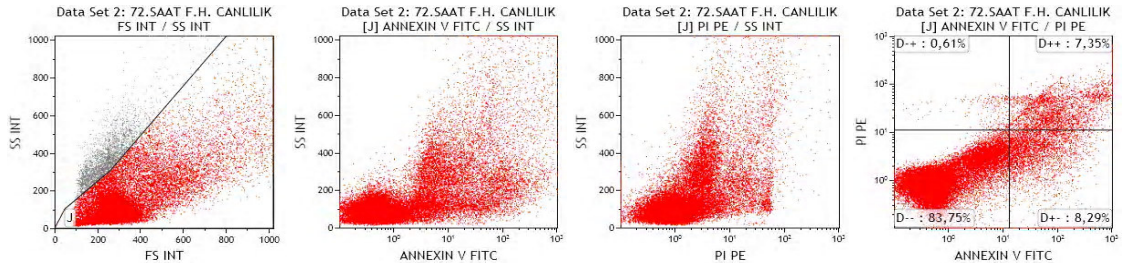


Şekil 4.65. 9. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %87,40 canlı, %7,79 pre-apoptoz döneminde, %4,51 apoptoz döneminde ve %0,31 ölü olarak tespit edildi.

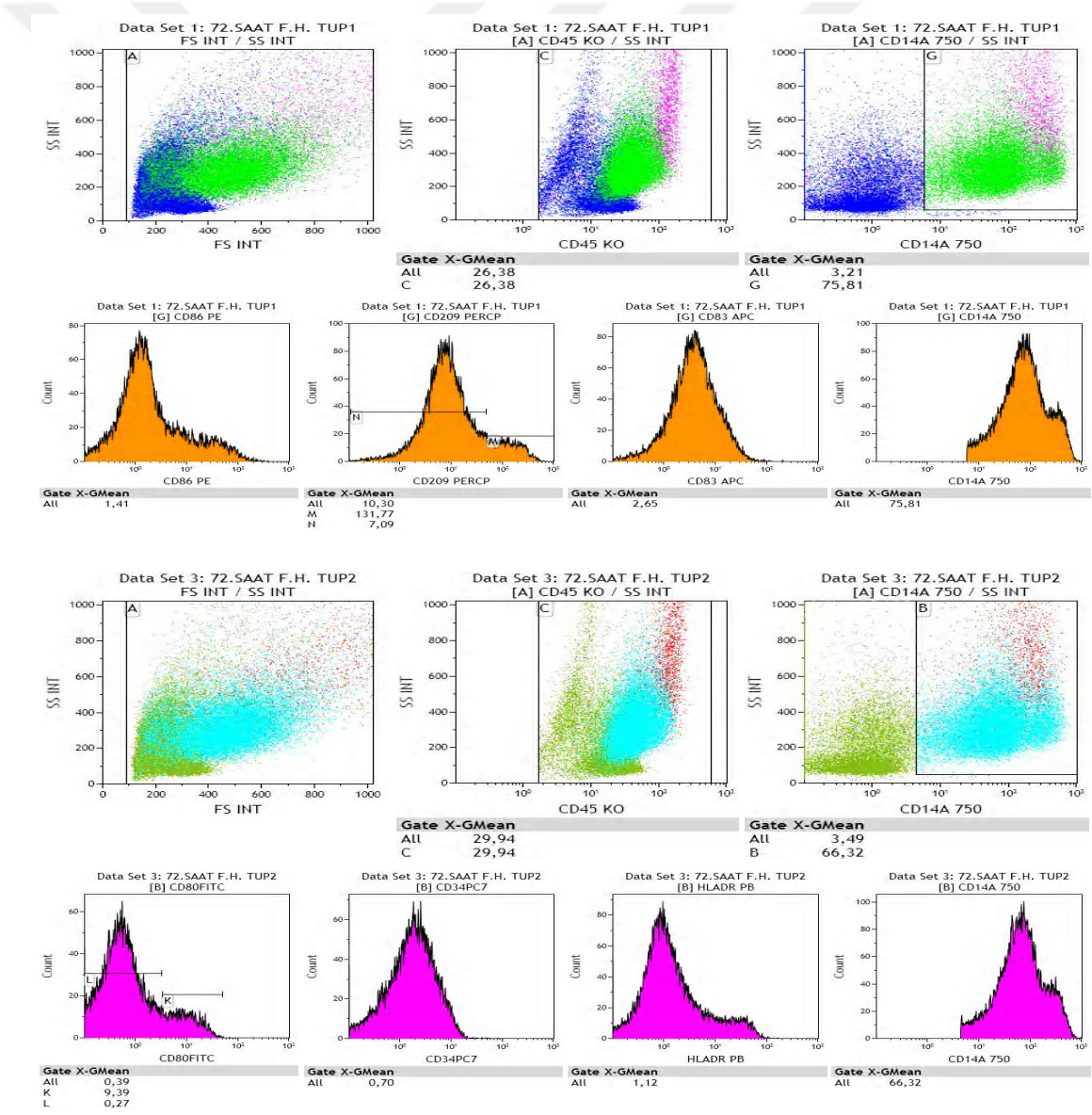


Şekil 4.66. 9. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

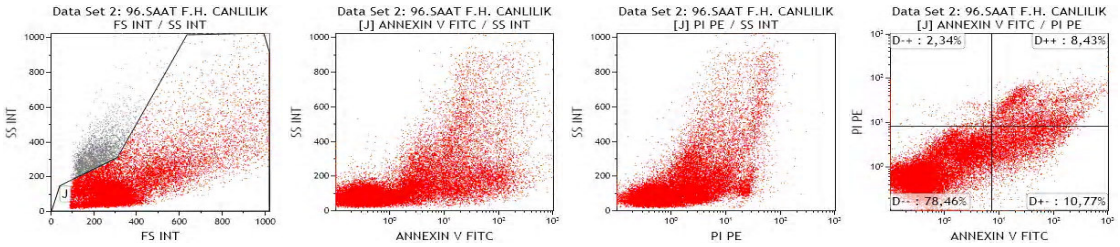


Şekil-4.67. 9. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %83,75 canlı, %8,29 pre-apoptoz döneminde, %7,35 apoptoz döneminde ve %0,61 ölü olarak tespit edildi.

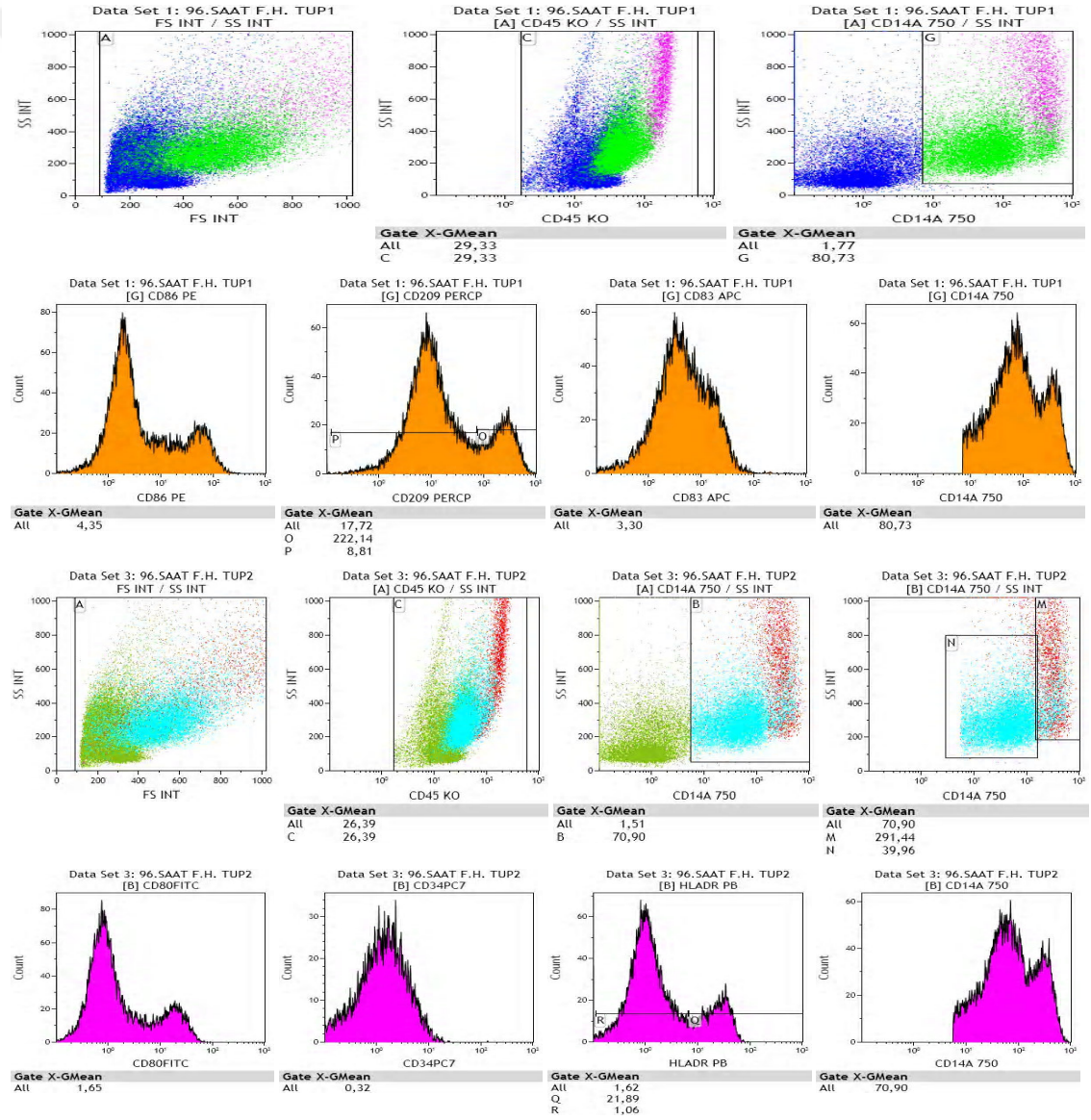


Şekil 4.68. 9. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.69. 9. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %78,46 canlı, %10,77 pre-apoptoz döneminde, %8,43 apoptoz döneminde ve %2,34 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.70. 9. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.9. 9. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	57,08	40,50	66,32	70,90
CD34	0,66	0,59	0,70	0,32
CD45	26,22	24,35	26,38	29,33
CD80	0,35	0,47	0,39	1,65
CB83	0,64	1,40	2,65	3,30
CD86	2,41	1,69	1,41	4,35
CD209	3,22	13,10	10,30	17,72
HLA-DR	0,89	1,36	1,12	1,62

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. 48, 72 ve 96. kültür saatlerinde de hücre sayımları ve canlılık yüzdeleri tespit edildi.

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi ve bu hücrelerin sayımı yapıldı. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 57,08, 48. saatinde 40,50, 72. saatinde 66,32 ve 96. saatinde 70,90 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda bir azalış beklenirken çok fazla miktarda artış görüldü. Buna göre kültür ortamdaki mononükleer hücrelerin dendritik hücreye dönüşmeyen çok fazla miktarda mononükleer hücre olduğu tespit edildi.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,66, 48. saatinde 0,59 , 72. saatinde 0,70 ve 96. saatinde 0,32 olarak tespit edildi ve bu antikorun ekspresyonda belirgin bir artış 96. Saatteki kültür ortamında gözlendi.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,69 (azalış görüldü) ve 1,41 (azalış görüldü) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 4,35 (1,80 kat artış) olarak tespit edildi.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. Saatinde 26,22 , 48. saatinde 24,35 , 72. saatinde 26,38 ve 96. saatinde 29,33 olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonda belirgin bir artış görülmedi. Ortamdaki mononükleer ve kök hücrelerin kültürün 48 ve 72. saatlerinde immatür dendritik hücreye dönüştüğü kesin olarak söylenemez, ancak bu hücrelerinde kültürün 96. saatinda çok az bir miktarda matür dendritik hücreye dönüştüğü söylenebilir.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,36 (1,5 kat artış) ve 1,12 (1,25 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı görüldü. Bu ekspresyon artışı, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 1,62 (1,8 kat artış) olarak devam ettiği gözlendi.

CD80+ ekspresyonu; Kültürün 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,35 olarak belirlendi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,47 ve 0,39 olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeylerinde beklenen artış görülmedi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 1,65 (4,7 kat artış) olarak tespit edildi. Buna göre ortamdaki mononükleer ve kök hücrelerin matür dendritik hücreye dönüştüğünü söylenebilir.

CD83+ ekspresyonu; Kültürün 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,64olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,40 (2 kat artış) ve 2,65 (4 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 3,30 (5 kat artış) olarak tespit edildi. Beklenen ekspresyon artışı düzenli ve belirginbir şekilde görüldü. Buna göre ortamdaki mononükleer ve kök hücrelerin matür dendritik hücreye dönüştüğünü söylenebilir.

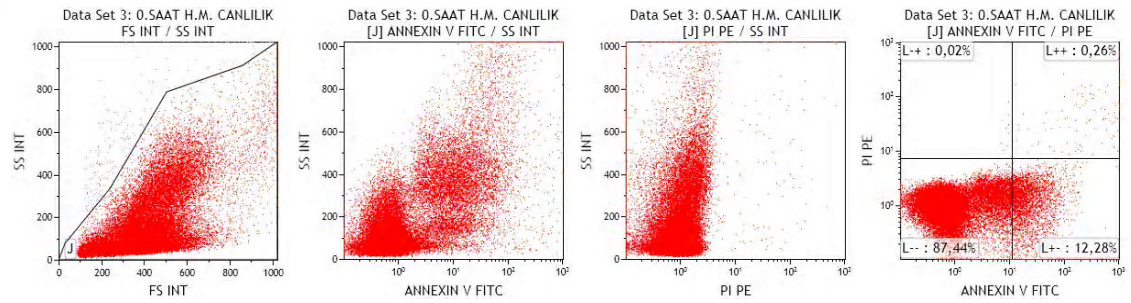
9. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün 96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.1.10. 10. UYGULAMA

Tümör hücre lizatı kullanılan hasta: Erkek/58

OKHN hastasından toplanmış hasta: Kadın/59

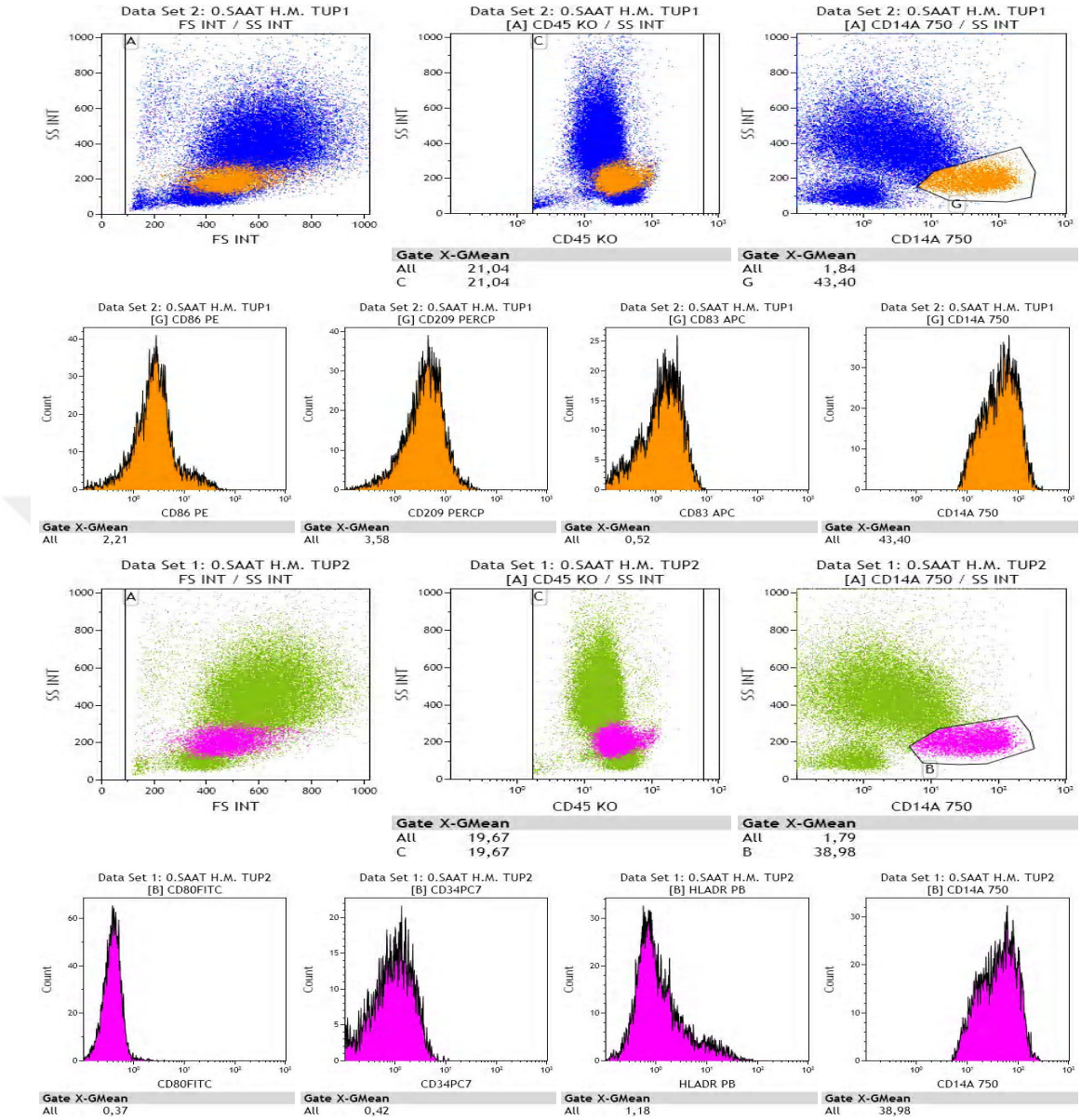
MM hastasından elde edilen tümör hücre lizatı ile OKHN olacak hasta için toplanmış aferez ürünü test tüpünün içinde. Bu karışımdan kontrol grubunun (0. saat) akım sitometrik analizi için numune alındı. 0. saatteki akım sitometrik analizinin verileri aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.71. 10. uygulamanın kültür öncesi numunenin canlılık oranı

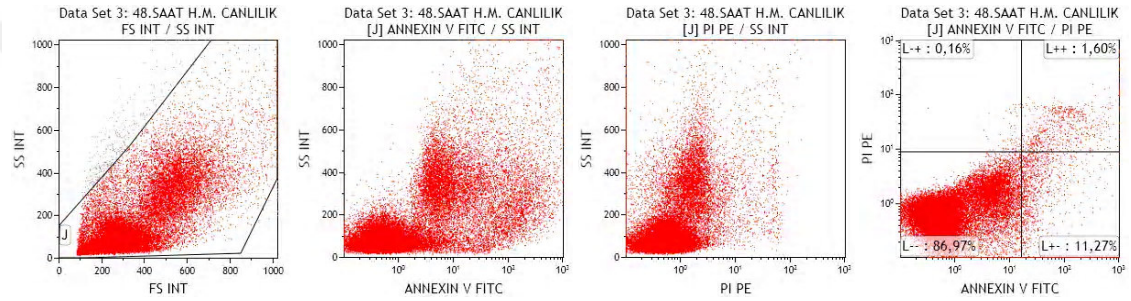
Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün öncesi numunende bulunan hücrelerin %87,44 canlı, %12,28 pre-apoptoz döneminde, %0,26 apoptoz döneminde ve %0,02 ölü olarak tespit edildi.

Akım sitometrik analiz işlemlerinde her antikor için CD14'e göre kapılama alınarak ekspresyon değerleri mean floresan değerleri tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre dendritik hücrelerin dönüşüm ve matürasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği gösterildi. Daha sonra kültür saatlere göre akım sitometrik analiz grafikleri oluşturuldu.



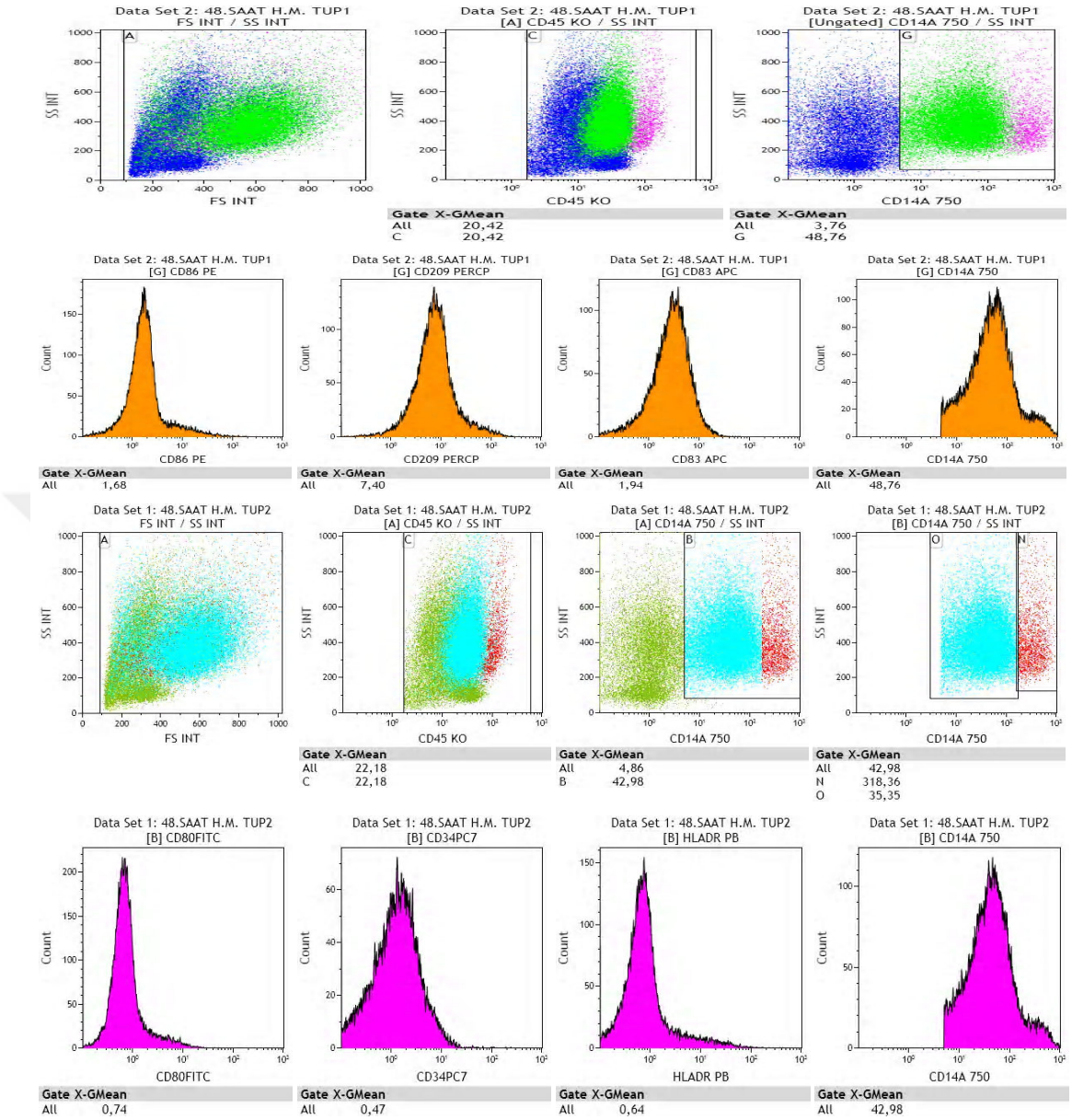
Şekil 4.72. 10. uygulamanın kültür öncesi numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tümör hücre lizatı- aferez ürünü karışımının üzerine IL-4 ve GM-CSF sitokinlerin ilave edilip, üç eşit miktara bölündü. Bu karışımın hücre kültürü için flasklar kullanıldı. Kültür ortamı olarak; $+37^0C$, %5 CO_2 ve nemli olan inkübatör tercih edildi. Kültür takip saatleri tamamlanan hücre kültür ürünlerinden elde edilen numune santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet PBS ile sulandırılarak analizde kullanılmak için hazırlandı. Akım sitometrik analizler, antikorların uygun formlarının bir arada olacak şekilde farklı iki antikor grubunu içeren tüpler ile çalışma yürütüldü. Böylece her kültür saati için iki farklı analiz tüpü hazırlandı.

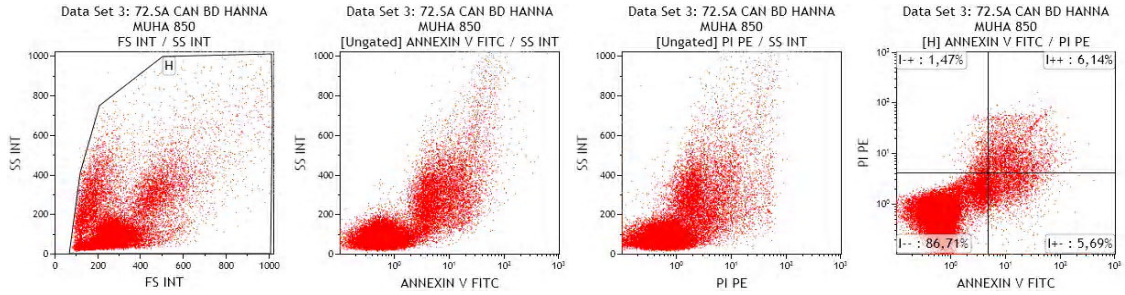


Şekil 4.73. 10. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 48. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %86,97 canlı, %11,27 pre-apoptoz döneminde, %1,60 apoptoz döneminde ve %0,16 ölü olarak tespit edildi.

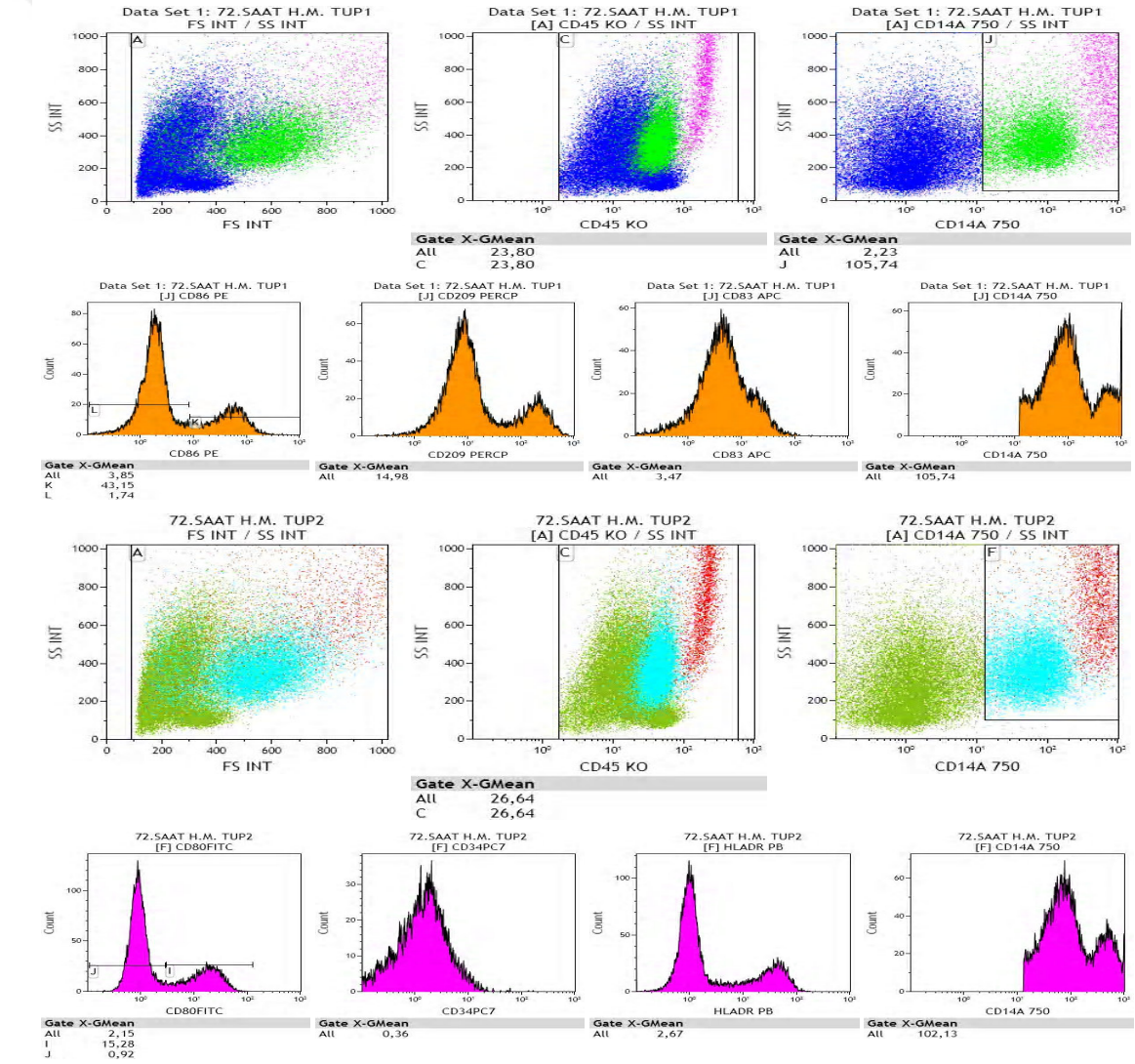


Şekil 4.74. 10. uygulamanın kültür takibinin 48. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

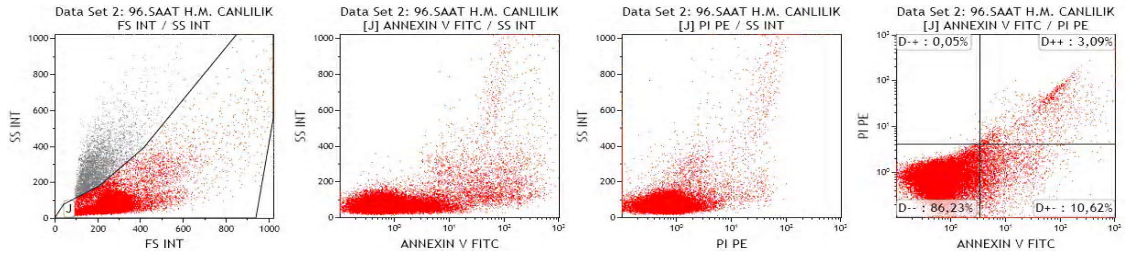


Şekil 4.75. 10. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 72. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %86,71 canlı, %5,69 pre-apoptoz döneminde, %6,14 apoptoz döneminde ve %1,47 ölü olarak tespit edildi.

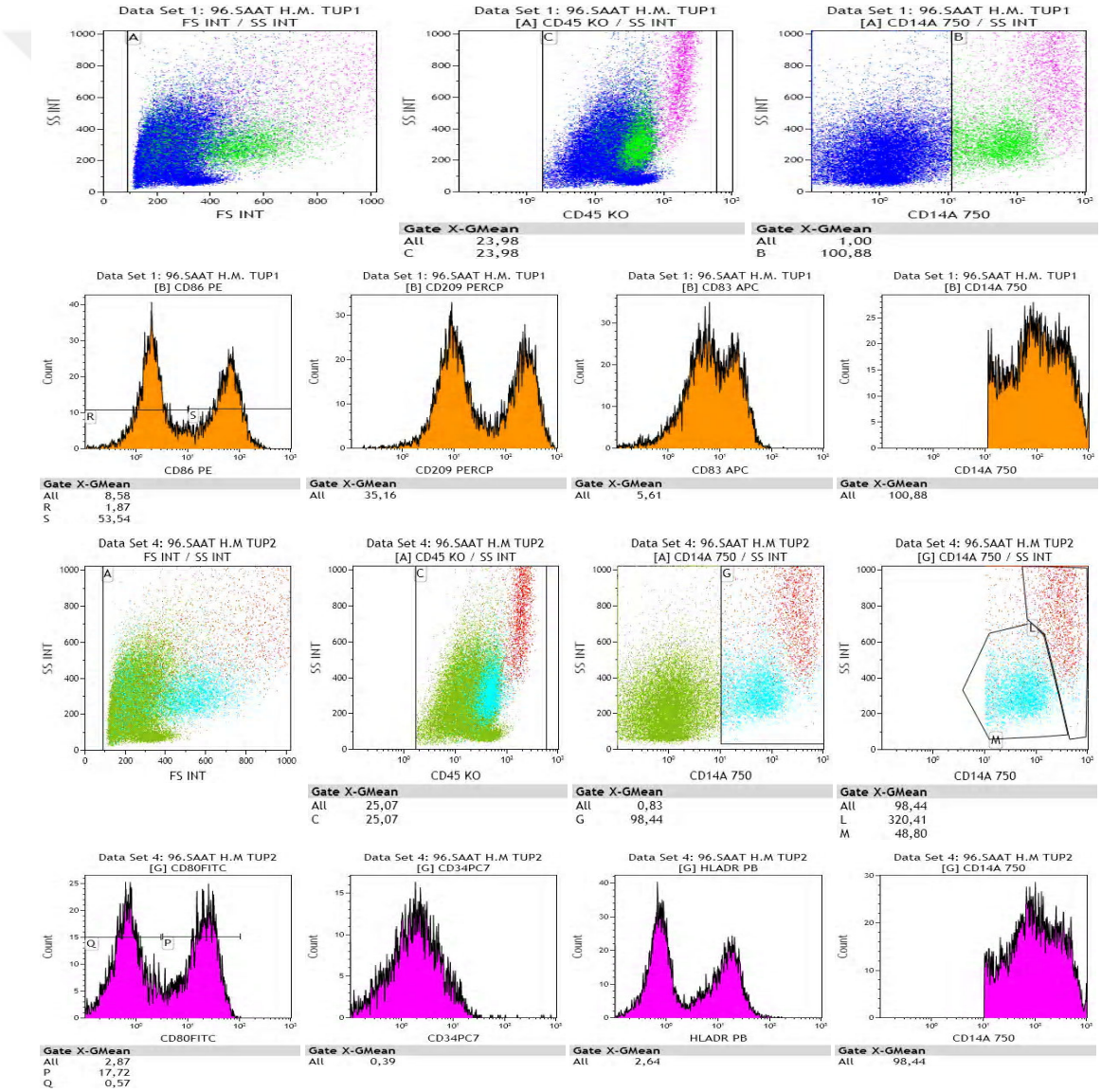


Şekil 4.76. 10. uygulamanın kültür takibinin 72. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi



Şekil 4.77. 10. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin canlılık oranı

Annexin-V kiti ile bakılan viabilite ve apoptoz testinin analiz sonucu kültürün 96. saatteki hücre kültür ürününde bulunan hücrelerin %86,23 canlı, %10,62 pre-apoptoz döneminde, %3,09 apoptoz döneminde ve %0,05 ölü olarak tespit edildi.



Şekil 4.78. 10. uygulamanın kültür takibinin 96. saatindeki numunenin 1-2. tüplerinin akım sitometrik analizi

Tablo 4.10. 10. uygulamanın kültür sonrası akım sitometrik analizine bağlı antikorların ekpresyon düzeyleri

	0. SAAT	**48. SAAT**	**72. SAAT**	**96. SAAT**
CD14	43,40	48,76	105,74	100,88
CD34	0,42	0,47	0,36	0,39
CD45	21,04	20,42	23,80	23,98
CD80	0,37	0,74	2,13	2,87
CB83	0,52	1,94	3,47	5,61
CD86	2,21	1,68	3,85	8,58
CD209	3,58	7,40	14,98	35,16
HLA-DR	1,18	0,64	2,67	2,64

0. saatte yapılan analizler ile çalışma da ihtiyaç duyulan hücreler olan kök hücre ve mononükleer hücrelerin sayımı ve canlılık yüzdesi tespit edildi ve bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu analiz kontrol grubu olarak kullanıldı. 48, 72 ve 96. kültür saatlerinde de hücre sayımları ve canlılık yüzdeleri tespit edildi.

CD14- ekspresyonu; Bu antikorun ekspresyon seviyesine göre ortamda bulunan mononükleer hücrelerin varlığı belirlendi ve bu hücrelerin sayımı yapıldı. Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 43,40, 48. saatinde 48,76 , 72. saatinde 105,74 ve 96. saatinde 100,88 olarak tespit edildi. Bu antikorun analizi sonucunda bir azalış beklenirken çok fazla miktarda artış görüldü. Buna göre kültür ortamdaki mononükleer hücrelerin dendritik hücreye dönüşmeyen çok fazla miktarda mononükleer hücre olduğu tespit edildi.

CD34 ekspresyonu; Kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan CD34+ antikorunun ekspresyonu düzeyleri kültürün 0. saatinde 0,42 , 48. saatinde 0,47 , 72. saatinde 0,36 ve 96. saatinde 0,39 olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon düzeyinde azalış görüldü.

CD86+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,68 (artış yok) ve 3,85 (1,7 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinde ekspresyon düzeyi 8,58 (3,9 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyon düzeyinde düzenli ve belirgin bir artış görüldü.

CD45+ ekspresyonu; Ekspresyon düzeyleri kültürün 0. saatinde 19,67, 48. saatinde 22,18 , 72. saatinde 26,64 ve 96. saatinde 25,07 olarak tespit edildi. Kültürün her saatinde bu antikorun ekspresyonda belirgin bir artış görülmedi, yani ekpresyon seviyesi hemen hemen sabit kaldı.

HLA-DR+ ekspresyonu; Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,64 (artış yok) ve 2,67 (2,24 kat artış) olarak tespit edildi ve beklenen ekspresyon artışı görüldü. Bu ekspresyon artışı, matür dendritik hücreye dönüşüm evresi olan 96. saatte 2,64 (2.23 kat artış) olarak tespit edildi. Diğer uygulamalarda genelde bu antikorun ekspresyon düzeyi belirgin bir artış gösterirken bu uygulama bu elde edilemedi.

CD80+ ekspresyonu; Kültürün 0. saatteki CD80 antikorun ekspresyon düzeyi 0,37 olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 0,74 (2 kat artış) ve 2,15 (5,8 kat artış) olarak tespit edildi. Kültür bu saatlerinde ekspresyon düzeylerinde beklenen artış görüldü. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan biri olan CD80+ ekspresyonun düzeyi 2,87 (7,75 kat artış) olarak tespit edildi. Buna göre ortamdaki mononükleer ve kök hücrelerin matür dendritik hücreye dönüştüğünü söylenebilir.

CD83+ ekspresyonu; Kültürün 0. saatteki CD83 antikorun ekspresyon düzeyi 0,52olarak belirlendi ve böylece negatifliği gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerinde ekspresyon düzeyleri sırasıyla 1,94 (3,7 kat artış) ve 3,47 (6,7 kat artış) olarak tespit edildi. Kültürün 96. saatinin analizinde ise artış görülmesi beklenen antikorlardan bir diğeri olan CD83+ ekspresyon düzeyi 5,61 (10,8 kat artış) olarak tespit edildi. Beklenen ekspresyon artışı düzenli ve belirgin bir şekilde görüldü. Buna göre ortamdaki mononükleer ve kök hücrelerin matür dendritik hücreye dönüştüğünü söylenebilir.

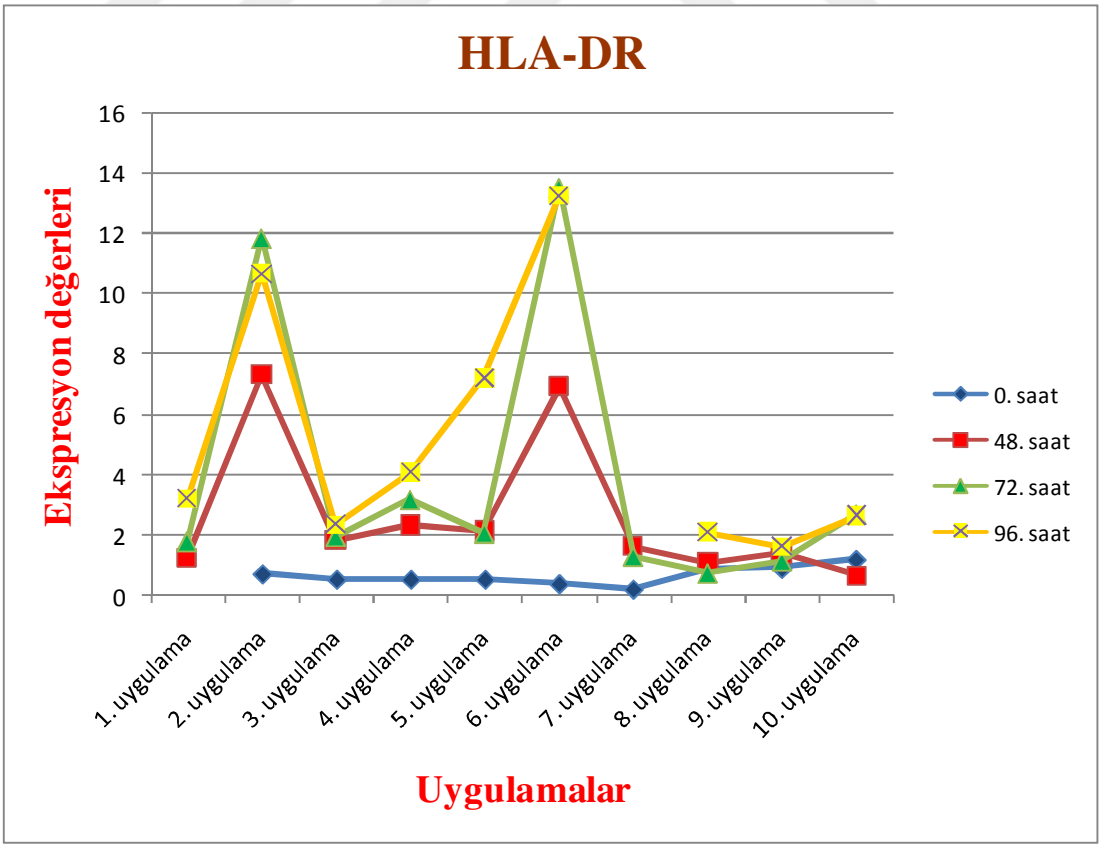
10. uygulamanın yapılan tüm antikorların tek tek incelenip elde edilen bilgiler sonucunda, hücre kültürü işlemi sonucu kültür ürünündeki kök hücreler ve mononükleer hücreler 48 ve 72. saatlerde immatür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Kültürün

96. saatinde de HLA-DR pozitifliğinin, CD80 veya CD83 pozitif olduğu kesin olarak tespit edilmesiyle immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücrelere dönüştüğü gösterildi. Ancak CD14 antikorunun ekspresyon düzeyinde beklenen azalış tespit edilmemesine rağmen dendritik hücre matürasyonun gerçekleştiği söylenebilir. Buna göre kültür ortamda dendritik hücreler ve dendritik hücreye dönüşmeyen mononükleer ve kök hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu söylenebilir.

4.2. AKIM SITOMETRIK ANALIZLERIN KÜLTÜR SAATLERİNE GÖRE YORUMU

Uygulamalarda hücre kültürü ile elde edilen dendritik hücrenin akım sitometri cihazında yapılan anazlizlerde tespit edilmesinde kullanılan yüzey markerları olan HLA-DR, CD80, CD83, CD86'nın eksperesyon değerlerinin mean floresan değerine göre değerlendirmeler yapılarak anlamlı sonuçlar elde edildi.

Grafik 4.1. HLA-DR ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu

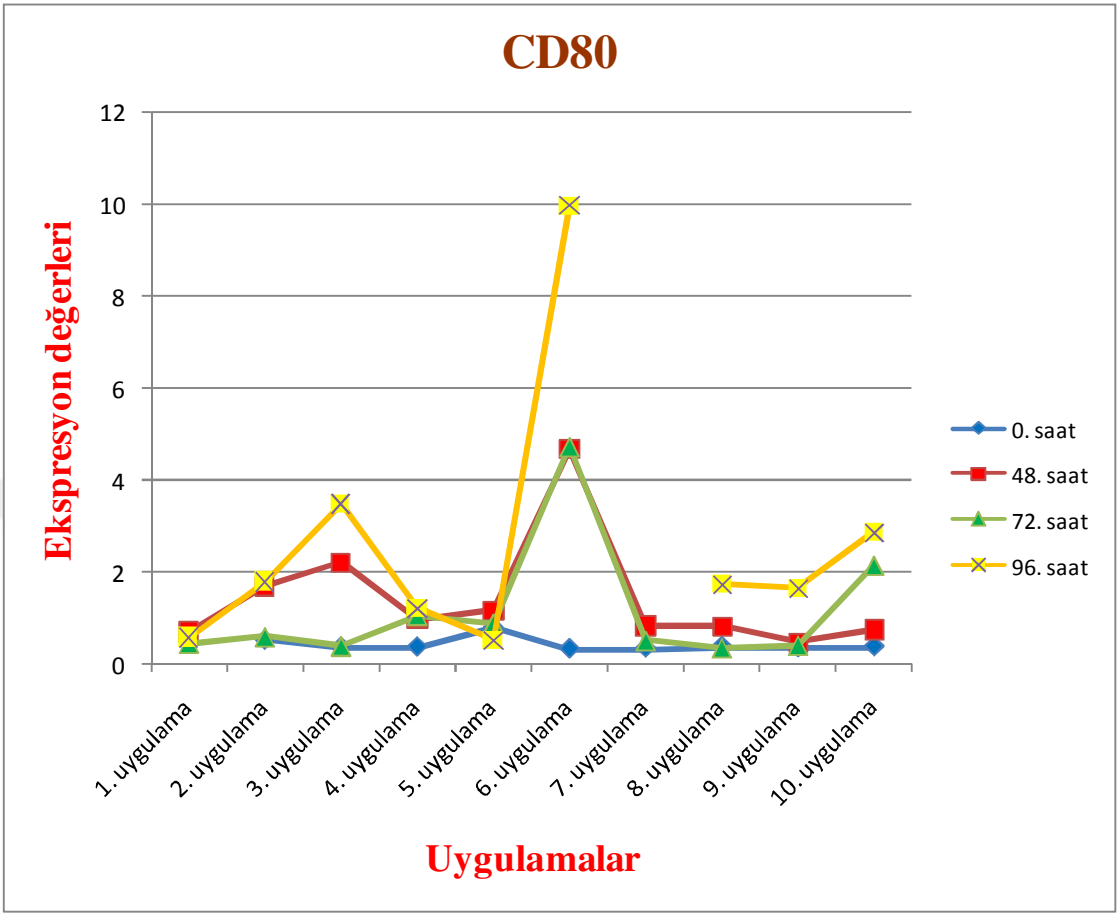


Tablo 4.11. HLA-DR antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri

Uygulama \ Kültür saati	0. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1. uygulama	-	1,23	1,77	3,22
2. uygulama	0,7	7,33	11,84	10,68
3. uygulama	0,52	1,81	1,94	2,34
4. uygulama	0,52	2,33	3,16	4,09
5. uygulama	0,52	2,12	2,05	7,21
6. uygulama	0,37	6,96	13,52	13,26
7. uygulama	0,19	1,61	1,28	-
8. uygulama	0,88	1,06	0,72	2,1
9. uygulama	0,89	1,36	1,12	1,62
10. uygulama	1,18	0,64	2,67	2,64

HLA-DR antikorunun ekspresyonundaki artışı kök hücre ve MNH'lerden immatür dendritik hücrelerin oluştuğu kültürün 48 ve 72. saatlerinde çok net bir şekilde tespit edildi. İmmatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücreye dönüştüğü kültürün 96. saatinde bu artış kültürn en yüksek düzeye ulatığı gözlendi. Buna göre yapılan uygulamalarda HLA-DR antikorunun dendritik hücre varlığının ve gelişiminin tespit edilmesinde belirleyici özelliği ispat edildi.

Grafik 4.2. CD80 ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu

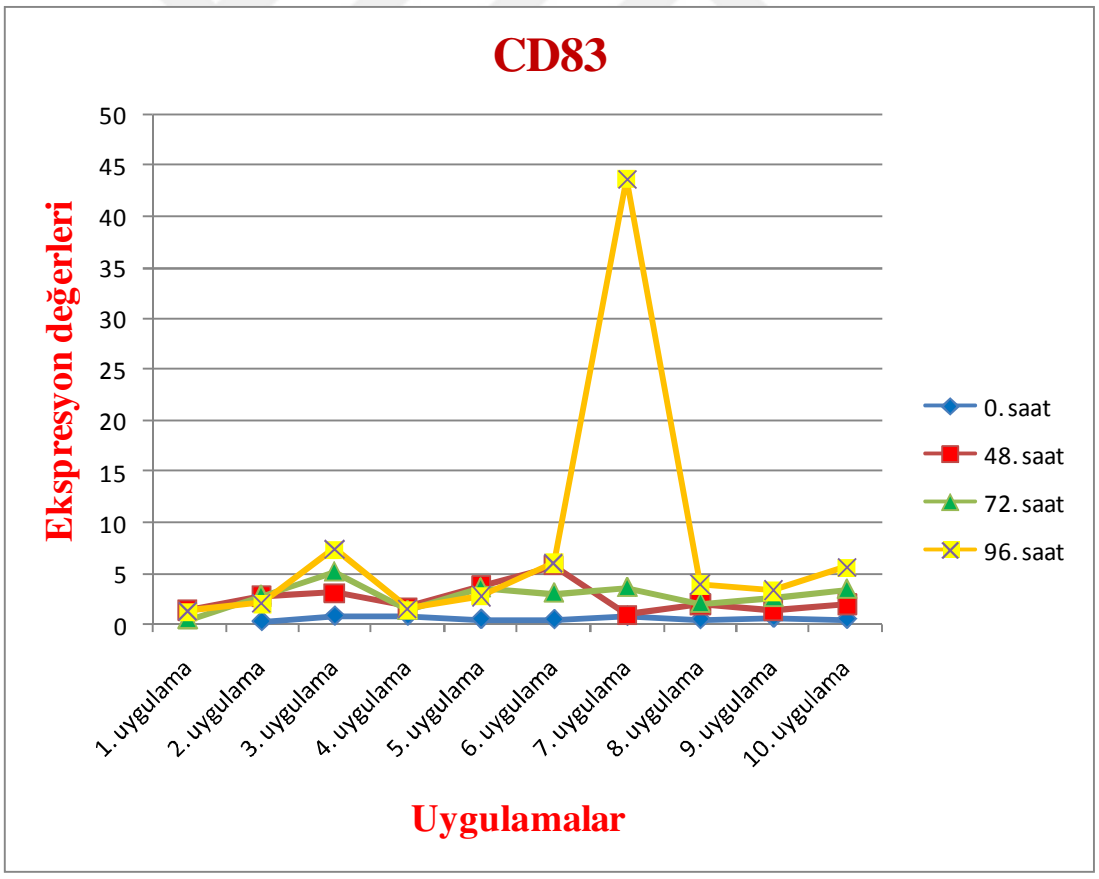


Tablo 4.12. CD80 antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri

Uygulama / Kültür saati	0. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1. uygulama	-	0,7	0,43	0,59
2. uygulama	0,51	1,67	0,57	1,8
3. uygulama	0,36	2,2	0,37	3,49
4. uygulama	0,36	0,97	1,04	1,22
5. uygulama	0,78	1,15	0,87	0,53
6. uygulama	0,32	4,65	4,72	9,95
7. uygulama	0,34	0,83	0,49	-
8. uygulama	0,37	0,82	0,33	1,73
9. uygulama	0,35	0,47	0,39	1,65
10. uygulama	0,37	0,74	2,13	2,87

CD80 antikorunun ekspresyonu genel olarak kültürün 48. saatinde bir artış gözlenirken, kültürün 72. saatinde bu artış dvam etmeyip çok fazla bir miktarda azalış göstermektedir. Matür dendritik hücre ürteiminin olduğunun söylenebilmesi için kültürün 96. saatinde CD80 antikorunun pozitifliği net bir şekilde gözlenmesi gerekmektedir. Buna göre kültürün 96. saatteki ekspresyon düzeyi kültürün 48. saatine göre gözle görülebilecek düzeyde çok daha fazla artış olduğu tespit edildi. Bu antikorun pozitifliği kültürün 3. gününde net bir şekilde görüldü. Eğer hücre kültürünün süresinin uzatılması durumunda bu antikorun ekspresyon düzeyinin çok daha fazla olabileceği ve bu da bize kültür ortamında daha fazla matür dendritik hücreye gelişim ve dönüşümün olduğu gösterebilir.

Grafik 4.3. CD83 ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu

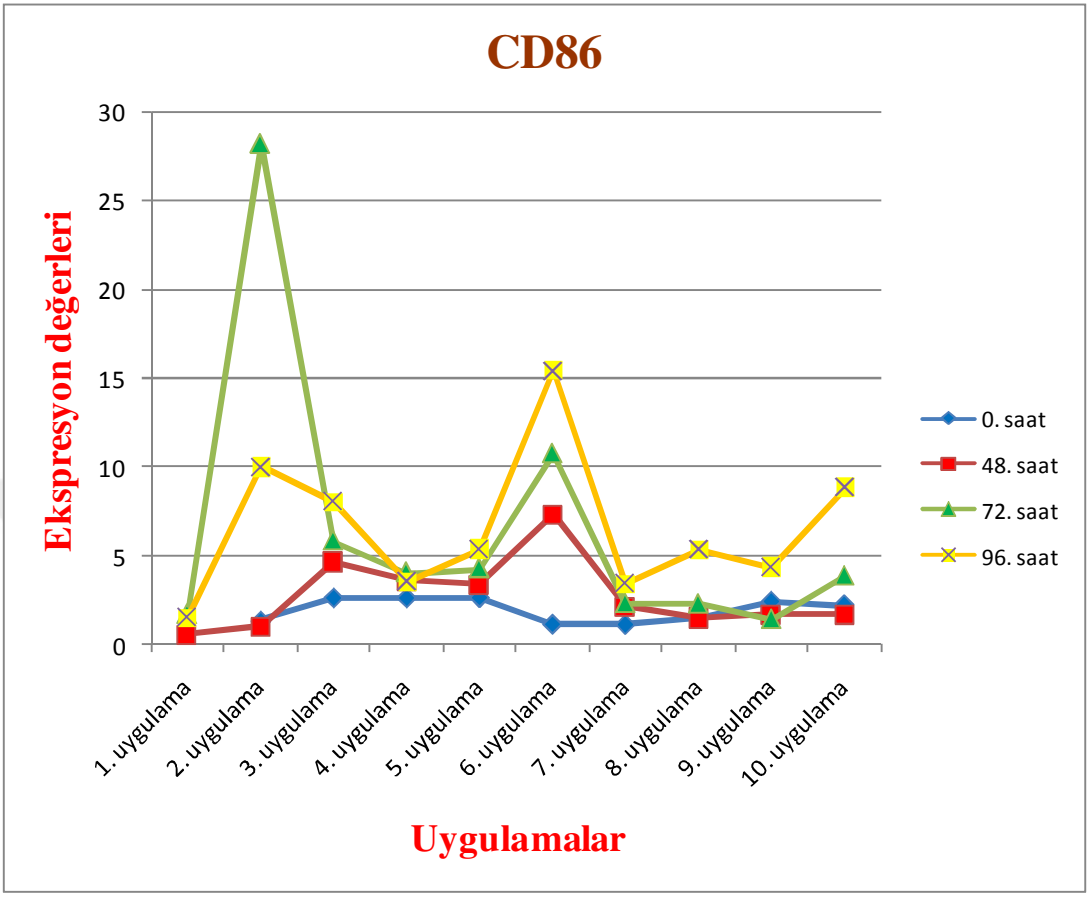


Tablo 4.13. CD83 antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri

Uygulama / Kültür saati	0. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1. uygulama	-	1,34	0,46	1,29
2. uygulama	0,29	2,71	2,89	2,07
3. uygulama	0,84	3,04	5,19	7,29
4. uygulama	0,84	1,66	1,36	1,39
5. uygulama	0,51	3,77	3,61	2,76
6. uygulama	0,48	5,68	3,1	6,02
7. uygulama	0,81	0,95	3,65	43,65
8. uygulama	0,49	1,92	2,1	3,91
9. uygulama	0,64	1,4	2,65	3,3
10. uygulama	0,52	1,94	3,47	5,61

CD83 antikorunun ekspresyonu; uygulamaların genelinde kültürün 96. saatinde beklenen ekspresyon artışı tespit edildi. Bu da hücre kültür sonucu dendritik hücre gelişim ve dönüşümünün gerçekleştiğini göstermektedir. Elde edilenverilere göre; CD80 veya CD83 antikorlarından herhangi birisinin kültürün 96. saatinin numunesinin analizlerinde antikorların ekspresyon düzeyindeki beklenen artışın saptanması ortamda dendritik hücreye dönüşüm ve matürasyon işleminin gerçekleştirildiğinin ispatıdır.

Grafik 4.4. CD86 ekspresyonu mean floresan değerinin kültür saatlerine göre durumu



Tablo 4.14. CD86 antikorunun ekspresyonunun mean floresans değerleri

Uygulama / Kültür saati	0. saat	48. saat	72. saat	96. saat
1. uygulama	-	0,59	1,68	1,5
2. uygulama	1,31	1,03	28,19	10
3. uygulama	2,59	4,67	5,83	8,05
4. uygulama	2,59	3,59	4,05	3,51
5. uygulama	2,62	3,35	4,27	5,35
6. uygulama	1,14	7,31	10,74	15,43
7. uygulama	1,13	2,17	2,29	3,4
8. uygulama	1,48	1,54	2,26	5,32
9. uygulama	2,41	1,69	1,41	4,35
10. uygulama	2,21	1,68	3,85	8,85

CD86 antikorunun ekspresyonu; kültür saatlerinin tümünde beklendiği gibi ekspresyon artışı tespit edildi. İmmatr dendritik hücrenin tespitinde kullanılan bu antikor kültürün 72. saatinde belirgin ekspresyon artışı gözle görülür şeilde tespit edildi.

Yapılan akım sitometrik analizler sonucunda 1. uygulama hariç yapılan tüm uygulamalarda dendritik hücre üretiminin gerçekleştiği gözlendi. Tüm uygulmalarında kontrol grunun analizleri sonucunda ortamda dendritik hücre bulunmadığı gösterildi. Kültürün 48 ve 72. saatlerdeki ekim numunesinin analizi sonucunda ortamda bulunan kök hücre ve mononükleer hücrelerin matür dendritik hücre dönüş aşaması için ara geçiş evresi olduğu ve ortamda kök hücre, mononükleer hücre ve immatür dendritik hücrelerin hepsinin bir arada bulunduğu saptandı. Kültürün 96. saatinde ise ortamdaki bulunan immatür dendritik hücrelerin matür dendritik hücreye dönüşümünün gerçekleştiği ancak yine ortamda dendritik hücreye dönüşmeyen monosit orjinli hücreler ve zaten ortamda başlangıçta da çok fazla bulunmayan kök hücrelerin sadece bir kısmının dendritik hücreye dönüşümünün geçirdiği tespit edildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Multipl Miyelom (MM) anemi, litik kemik lezyonları, böbrek fonksiyon bozukluğu, hiperkalsemi, hipogammaglobulinemi ve artmış enfeksiyon riski ile giden kemik iliğinde plazma hücrelerinin klonal çoğalması ile karakterize malign bir hastalıktır (1,2). MM tanısı için yukarıda bahsi geçen klinik bulguların yanı sıra kemik iliğinde en az %10 klonal plazma hücresi ve/veya dokuda plazmasitom varlığı ile serum ve/veya idrarda monoklonal (M) proteinin gösterilmesi gerekmektedir (3). MM hematolojik kanserlerin % 10'unu, tüm kanserlerin % 1'ini oluşturan en yaygın görülen malign hematolojik hastalıklar arasında yer almaktadır (4).

Kanserli hastalarda otolog tümör aşılar ile allojeneik tümör aşılar arasında bir değerlendirmede söz edilecek olursa otolog tümör aşısında hastanın kendi immün sitemine karşı immünosupresif ve tolerogenik mekanizmalar ekarte edilerek, allojeneik yolla elde edilecek tümör aşıları hastalar üzerinde daha etkili olabileceği birçok klinik uygulamalı immünoterapi tedavisinde gösterilmiştir (5,6).

Otolog DH bazlı tümör aşıları, bir hastanın kendinden tümör hücrelerinin izole edilmesi ve in vitro şartlar altında bir aşı haline getirilmesi ile üretilen bu aşı terapötik maddeler içermektedir. Daha sonra elde edilen otolog DH bazlı tümör aşı hastanın kendisine uygulanmaktadır. Otolog DH bazlı tümör aşı tüm bilinen tümör spesifik mutasyonları içerecek ve öldürülmüş tümör hücrelerinin biçimini alabilecektir. Ayrıca immünojenisiteni iyileştirmek için GM-CSF, IL-4 gibi bir sitokin ile işlenmiş tümör hücreleri; Adjuvanlar olsun veya olmasın tümör lizatları (veya dendritik hücreler gibi APC'ler ile tetiklenen bir tümör lizatı) eklemeleri ile sağlanabilmektedir.

Kanserli hastaların periferik kanından lökoferez yöntemiyle DH elde etmek için periferik kan mononükleer hücre (MNH), monosit ya da CD34+ hematopoietik

hücreler toplanır. Monositler GM-CSF, IL-4 ve IL-13 ile CD34+ hematopoietik hücreler ise GM-CSF, TNF, FLT3 ligand ve c-kit ligand ile kültüre edilir. Böylece olgunlaşmamış DH'ye dönüştürülür (53).

Tümörler ayrıca, devam eden bir bağışıklık cevabı ortamında sunulması durumunda, otoimmüniteyi artırabilir çoğunlukla normal kendi proteinlerini ifade eder. Tümör aşılama yaklaşımlarında kullanılabilecek tümör spesifik mutasyonların, test edilecek antitümör yanıtlardaki rolü için tanımlanması gerekli değildir. Hastaya özgü hedeflenebilir mutasyonları belirlemede kalan teknik zorluklara rağmen, birçok araştırmacı, güçlü ve hırslı bir bağışıklık cevabı indükleyebilen bu mutasyona uğramış antijenlerden yararlanmaya odaklanmaktadır.

Kültür öncesi kontrol grubunun akım sitometrik analizi;

- HLA-DR,CD14,CD34,CD45,CD80,CD83,CD86 yüzey ve kostimülan molekül belirleyicileri ile ortamda DH'lerin bulunmadığı, MNH ve CD34+ KH'lerin varlığı gösterildi.
- Tespit edilen yüzey ve kostimülan molekül belirleyicileri değerleri 2,3 ve 4. gün kültür ürünlerin analizi için kullanılmak üzere kaydedildi.

İnkübasyon günlerinde elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda;

- Genel olarak IL-4+GM-CSF sitokin kombinasyonu aracılığıyla morfolojik ve yüzey belirleyici moleküller olan HLA-DR, CD14, CD34, CD45, CD80, CD83 ve CD86 antikorlara bakılarak DH'lerin dönüşümü gösterildi.
- DH'lerin gelişimini gösterilmesinde kontrol grubunun değerleri ile 2,3 ve 4. günlerdeki akım sitometrik analizleri değerlendirildi.
- Analizler sonucu ilk uygulama hariç IL-4+GM-CSF sitokin kombinasyonunun kullanıldığı hücre kültüründe belirgin DH gelişimi tespit edildi.
- Bunun yanı sıra kültür ortamında DH'ler dışında; DH'e dönüşmeyen MNK ve kök hücrelerin bulunduğu saptandı. Tam olarak hangi hücre grubuna dönüştüğü tespit edilememiştir. Ancak bu hücrelerin monosit orjinli immatür hücre populasyonu olduğu ancak DH olmadığı tespit edildi. Bunların miyeloid türevli baskılayıcı hücreleri (MDSC) olabileceği düşünülmektedir. DH'lerin lenfositler üzerine olan proliferatif ve fonksiyonel yeteneklerinin tam olarak tespit

edilebilmesi için bu çalışma yeterli olmamaktadır ve ek sitokin kombinasyonları, bazı yüzey ve morfoloji yüzey moleküllerinin de çalışmaya eklenmesi gereklidir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda;

- IL-4+GM-CSF sitokin kombinasyonunun in vitro kültür ortamlarına eklenmesi DH matürasyon gelişimi olumlu etkilediği,
- Hücre kültür için 37^0C sıcaklığa, %5 CO_2'li ve nemli bir ortama sahip inkübatör kullanılması DH matürasyon gelişimi olumlu etkilediği,
- MM hastalarına uygulanabilir bir dendritik hücre bazlı otolog tümör aşısı eldesi için ilk basamakta gerekli DH'ler üretiminin sağlandığı,
- Tüm uygulamalar akım sitometrik analizler ile hücre sayımı ve canlılık testleri ile kontrolleri sağlandı.

Çalışmamızda, serum içeren kültür ortamda GM-CSF+IL-4 olarak düzenlediğimiz sitokin kombinasyonun morfolojik ve fonksiyonel olarak DH gelişimine etkilerini inceledik. Bu amaçla monositler 2,3 ve 4. günler boyunca bu sitokin karışımının serum içeren kültür ortamında inkübe edildi ve kültür işlemi öncesi hazırlanan kontrol grubu dâhil, 2,3 ve 4. günlerde hücrelerin yüzey ve kostimülan molekül belirleyicileri olan HLA-DR, CDl4, CD80, CD83, CD86 antikorları akım sitometrik analizle belirlendi. Buna göre kültür sonrası ortamda DH populasyonunun varlığı gösterilmiş oldu.

Ayrıca uygulama 6'da elde edilen dendiritik hücrlerin ekspresyon düzeyi diğerlerine nispetle daha iyi olduğu gözlendi. Bunun uyarıcı olarak kullanılan tümör hücre lizatı ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bazı lizatların DH oluşumunu provake ettiği bilinmektedir.

DH oluşumunu etkileyen en büyük etkelerden biri olan tümör hücre lizatının uygulamada eşit miktarlarda ancak farklı bireylerden elde edilmesinene ilişkin çalışmalarda değişkenlik gözledi. Bu değişenkenliğin sebebi bu farklı lizat kullnaılarak lizatın uyarım gücünün farklı olması ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca uygulamalardaki dendritik hücre miktarındaki bu değişkenlik kök hücre ve mononükleer hücreleri kullanılan MM hastasının kendi immün sistemin farklı uyarıcı lizata karşı değişen yanıtlar oluşturmasına sebebiyet vermiş olabilir. Bu nedenle dendritik hücre üretimi çalışmalarında ilk olarak yapılması gereken bireyin immünogenetik yapısınıa bağlı üretilen dendritik hücre miktarını etkileyen uyarıcı tümör hücre lizatının kullanımı ile

ilgili planlamayapılarak kontrollü ölçümler ile yeni araştırmalarda bunların kullanılması düşünülmektedir.

Akım sitometrik analizlerde CD80, CD83, CD86 ve HLA-DR'in ekspresyon düzeylenin mean floresan değerine göre değerlendirilmesi ile dendritik hücrelerin tespit edilmesi için kullanılması gereken yüzey belirteçleri olduğu tespit edildi. Ayrıca yapılan akım sitometrik analizlerle tüm uygulamaların her kültür saatinin viabilite ve apoptoz yüzdesinin belirlenmesi antikorlarla yapılanlar analizler için yorum yapılmasını kolaylaştırdı.

Mevcut bulguların başka araştırmalarla desteklenmesi ve üretilmiş olan hücrelerin morfolojik özelliklerinin ve sınıflandırmasının tam olarak belirlenmesi için ek sitokin ve moleküler yüzey belirteçleri çalışmaya dâhil edilmesi gerekmektedir. Kültür sürelerinin 7 güne kadar uzatılıp tümör hücre lizatının başlangıçta değil de 3-4 günlerde kültüre eklenmesi DH gelişimini olumlu yönde etkilediği yapılan diğer klinik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Ayrıca çalışmanın hücre kültür işlemlerinde flasklar yerine kan torbaların kullanılması maliyet açısından çok büyük avantaj sağlayabilir.

Bu çalışmaya sunulabilecek önerilerin başında kullanılan tümör hücre lizatı sabit olup kök hücre mononükleer hücreleritoplanan hastalar farklı seçilebilir ya da tek bir hastadan toplanan kök hücre ve mononükkleer hücreler kullanılıp farklı tümör hücre lizatları ile çalışmalar yürütülebilir. Ayrıca çalışmaya negatif kontrol grupları da eklenebilir. Bunun dâhilinde bir grup sabit bir tümör hücre lizatının olduğu sitokin kombinasyonunun olmadığı, diğer grup sitokinin olduğu tümör hücre lizatı içermeyen grupların dâhil edilmesi ile çalışma daha anlamlı sonuçların elde edilmesine imkân sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Rosenblatt J, Avigan D. Cellular immunotherapy for multıple myeloma. Best Pract ResClin Haematol 2008; 21(3): 559-577.
2. Fentress DS, Orrico LA, Kruspe M, Briscoe KS, Laber DA. Multipl myeloma. Hospital Physician 2006; 15–25.
3. Rajkumar SV. Multiple myeloma. 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2011; 86: 57-65.
4. Kyle RA, Rajkumar SV. Multipl myeloma. N Engl J Med 2004; 351: 1860–1873.
5. Zhou FL, Meng S, Zhang WG, et al. Peptide-based immunotherapy for multiple myeloma. Current approaches. Vaccine 2010; 28(37): 5939-5946.
6. Unal A, Eser B, Cetin M, et al. Abstract 4323-Dendritic Cell Immunotherapy Stimulated with Malign Mesithelioma (Preliminary Result). Blood, Journal of The American Society Of Hematology, November 2003; 102: 11.
7. Ünal A. Dendritic cell Immunotherapy (Cancer Vaccine). European Biotechnology Congress, İstanbul, Türkiye 28 Eylül-01 Ekim 2011; ss 22-24.
8. Ovali E, Dikmen T, Sonmez M, ve ark. Active immunotherapy for cancer patients using tümor lysate pulsed dendritic cell vaccine: a safety study. Karadeniz Technical University, Department of Haematology, Trabzon, Turkey 26 June 2007; ss 209-214.
9. Erkut N. Multipl Miyelomda Tümör Hücre Antijenleri ile Yüklenmiş Dendritik Hücre Aşılaması, Uzmanlık Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı. Trabzon 2012: ss 61.
10. Kariyawasan CC, Hughes DA, Jayatillake MM, Mehta AB. Multiple myeloma: causes and consequences of delay in diagnosis. Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR. Multiple Myeloma. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B (Eds). Wintrobe's Clinical Hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins 2004; pp 2583-2637.

11. Ekuklu Z. Multipl Myelom Olgularında Klinik, Histopatolojik, İmmünohistokimyasal Değerlendirme ve Prognoz, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne 1998; ss 38-42.
12. Schwartz GG. Multiple Myeloma: Clusters, Clues and Dixoins. Cancer Epdemiol Biomarkers Prev 1997; 6: 49–56.
14. Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 2005; 80: 1371-1382.
15. Anderson KC, Barlogie B, Harousseau JL, et al. Multiple Myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002; 7: 214– 240.
16. Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003; pp 248–278.
17. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, et al. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: Relationship to radiation dose absorbed by marrow. J Natl Cancer Inst 1982; 69: 323.
18. Riedel DA, Pottern LM. The epidemiology of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 1992; 6: 225-247.
19. Lynch HT, Sanger WG, Pirruccello S, et al. Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 1479.
20. Kaya K. İmmünoloji. Güneş ve Nobel Tıb Kitabevleri 1997; ss119-146.
21. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (Msmart) consensus guidelines. Mayo Clin Proc 2009; 84(12): 1095-1110.
22. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. Nat Rev Cancer 2002; 2: 175–187.
23. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma, t (4;14) (q13;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. Blood 2003; 101: 1520.
24. Neri A, Baldini L, Trecca D, et al. P53 Gene Mutations in Multiple Myeloma Are Associated With Advanced Forms of Malignancy. Blood 1993; 81: 128-135.
25. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillerm G, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta (2)-microglobulin produce a powerful

myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. Blood 2001; 97: 1566-1571.

26. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood 2003; 101: 4569-4575.
27. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. Blood 2012; 119: 2100.
28. Neri A, Murphy JP, Cro L, et al. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. J Exp Med 1989; 170: 1715-1725.
29. Hayashi T, Hideshima T, Anderson KC. Novel therapies for multiple myeloma, Br J Haematol 2003; 120: 10–17.
30. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, et al. Multiple myeloma. Lancet 2009; 374(9686): 324-339.
31. Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, et al. Transforming growth factor-β receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. Int Immunol 2007; 19: 117-126.
32. Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. Eur J Cancer 2006; 42: 1574–1580.
33. Ander KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor microenvironmental interactions. Exp Hematol 2007; 35(9): 155–162.
34. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1,027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc 2003; 78: 21– 33.
35. Durie BG, Kyle RA, Belch A, et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of International Myeloma Foundation. Hematol J 2003; 4: 379-398.
36. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia 2009; 23: 3-9.
37. National Comprehensive Cancer Network (2017). Clinical Practice Guidelines in Oncology version. Erişim: [https://www.nccn.org/patients/guidelines/quick_ guides/myeloma/2/] , Erişim tarihi:30 Temmuz 2017.
38. Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG, et al. International Staging System for multiple myeloma. J Clin Oncol 2005; 23(10): 3412-3420.

39. Richardson P, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase II multicenter study of the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade™, formally PS-341) in multiple myeloma patients with relapsed/ refractory disease [abstract]. Blood 2002; 100: 104.
40. Palumbo A, Rajkumar SV. Treatment of newly diagnosed myeloma. Leukemia 2009; 23(7): 449-456.
41. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 2007; 21: 1093-1113.
42. Harousseau JL. Induction therapy in multiple myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2008; pp 306-312.
43. Catley L, Anderson K. Autologous hematopietic cell transplantation for multiple myeloma. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3rd ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, England 2004; pp 1262-1282.
44. Bensinger W. Initial thrapy of multiple myeloma in patients who are candidates fors tem cell transplantation. Curr Treat Options Oncol 2007; 8(5): 135-143.
45. Harousseau JL, Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. N Engl J Med 2009; 360: 2645-2654.
46. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. N Engl J Med 2011; 364: 1046-1060.
47. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol 2006; 6(9): 93-106.
48. Roitt I. The recognition of antigens. Roittt's Essentials Immunology 1997; 9: 370-371.
49. Burness ML, Sipkins DA. The stem cell niche in health and malignancy. Semin Cancer Biol 2010; 20(12): 107-115.
50. Fisher VL, Abramovitz LZ. A brief overview of hemaotopoietic stem-cell transplantation. In: Kline RM, editor. Pediatric hematopoietic stem cell transplantation. Informa Healthcare, New York 2006; 2: 601–602.
51. Sargın D. Kök hücre ve kök hücre tedavisi. Türkiye XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, VII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. İstanbul, 12 Ekim 2003: ss 49-61

52. Copelan EA. Hematopoetic Stem-Cell Transplantation. N Engl J Med 2006; 354: 1813-1826.
53. Haining WN, Lehmann LE. Principles of bone marrow and stem cell transplantation. In: Orkin S.H NDG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE, editor.7 th ed. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Saunders Elsevier, Canada 2009; pp 355-367.
54. Ueno H, Klechevsky E, Schmitt N, et al. Targeting human dentritic cell subsets for improved vaccines. Semin Immunol 2011; 23(1): 21-27.
55. Goldman L, Schafer IA. Godman's Cecil Medicine. Çeviri: Serhat Ü. Bölüm: Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu. Kitap: Dâhiliye. Türkçe 24. Baskı. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara 2011; 367.
56. Gurman G, Çelebi H, Üstün C, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation as a second transplant for severe aplastic anemia. Bone Marrow Transplant 1995; 15: 485–486.
57. Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34+ cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. J Clin Oncol 1999; 17: 1227.
58. Patriarca F, Petrucci MT, Bringhen S, et al. Considerations in the tratment of multiple myeloma: a consensus statement from Italian experts. Eur J Haematol 2008; 82(20): 93-105.
59. Mehta J, Singhal S. Curent status of autologous hematopoietic stem cell transplantation in myeloma. Bone Marrow Transplant 2008; 42: 28-34.
60. Bird JM, Owen RG, Snowden JA, et al. Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum. Guidelines 155ort he diagnosis and management of multiple myeloma. Br J Haematol 2011; 154: 32-75.
61. Palumbo A, Rajkumar SV, San Miguel JF, et al. International Myeloma Working Group consensus statement 155ort he management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for 155ort he155 autologous stem-cell transplantation. J Clin Oncol 2014; 32: 587-600.
62. Arslan Ö. Lökoferez. Kan ve Kemik İliği Transplantasyonu Kurs Kitabı, Çeşme 2004; ss 54-59.

63. Arpacı F, Kömürcü B, Öztürk B, ve ark. A Successful and Simplified Filgrastim Primed Single Apheresis Method Without Large Volume Apheresis for Peripheral Blood Stem Cell Collection. J Clin Oncol 2000; 30: 159-164.
64. Blume KG, Amylon MD. The evaluation counseling of canditates for hematopoietic stem cell transplantation In: Thomas DE, Blume KG, Forman SJ Apelbaum FR eds. Thomas Hemotopoietic Cell Transplantation. 3nd ed. Blackwell Sience, Malden MA 2004; pp 449-464.
65. Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J, et al. Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue in autologous transplantation. Blood 2001; 98: 2059-2064.
66. Kim S, Kim HJ, Park JS, et al. Prospective randomized comparative observation of single- vs split-dose lenograstim to mobilize peripheral blood progenitor cells following chemotherapy in patients with multiple myeloma or non-Hodgkin's lymphoma. Ann Hematol Oct 2005; 84: 742-747.
67. Arat M, Arslan O, Ayyıldız E, ve ark. Peripheral blood stem cell apheresis for allogeneic tranplants: İbni Sina experience. Transfus Apher Sci Jun 2004; 30: 189-191.
68. Dugan MJ, Jansen J. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: CD34, colony-forming unit–granulocyte-macrophage or both Transfusion 2007; 47: 817-823.
69. Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, et al. Highdose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. Blood 1987; 70: 869-872.
70. Ernst E, Cassileth B. The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: A systematic review. Cancer 1998; 83: 777-782.
71. Brian F. Zamarron et al. Int J Biol Sci 2011; 7(5); 651-658.
72. Molassiotis A, Fernadez-Ortega P, Pud D, et al. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: A European survey. Ann Oncol 2005; 16: 655-663.
73. Aldrich JF, Lowe DB, Shearer MH, et al. Vaccines and immunotherapeutics 156ort he treatment of malignant disease. Clin Dev Immunol 2010: 697158.
74. Nguyen-Pham TN, Lee YK, Lee HJ,et al. Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma. Korean Jhematol 2012; 47(1): 17-27.

75. Unal A. Dendritic cell Immunotherapy (Cancer Vaccine). Current Opinion In Biotechnology, Suppl 1 2011; 22: 24.
76. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. Blood 2008; 111: 2516–2520.
77. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: Immunomodulation, cars and combination immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol 2016; 13: 273–290.
78. Van de Donk NW, Kamps S, Mutis T, Lokhorst HM. Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. Leukemia 2012; 26: 199–213.
79. Di Bernardo A, Macor P, Guarnotta C, et al. Humoral immunotherapy of multiple myeloma: Perspectives and perplexities. Expert Opin Biol Ther 2010; 10(3): 863–873.
80. Van De Velde AL, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. Immunotherapy of hematological malignancies using dendritic cells. Bull Cancer 2008; 95(3): 320-326.
81. Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. Nature Reviews Cancer 2006; 6(3): 204–216.
82. Aly HA. Cancer therapy and vaccination. J Immunol Methods 2012; 382(1-2): 1-23.
83. Dalgleish AG, Whelan MA. Cancer vaccines as a therapeutic modality, the long trek. Cancer Immuno –Immunother 2006; 55: 102532.
84. Oncotrust (2017). Multidisipliner Kanser Tedavisi- İmmunoterapiler ve Kanser Aşıları. Erişim: [https://www.drozdogan.com/immunoterapiler-ve-kanser-asilari/], Erişim tarihi:19 Aralık 2017.
85. Dermime S, Armstrong A, Hawkins RE, Stem PL. Cancer vaccines and immunotherapy. Br Med Bull 2002; 62(23): 149-62.
86. Chiang CL, Kandalaft LE, Coukos G. Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. Int Rev Immunol 2011; 30(2-3): 150-182.
87. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: Currrent status and moving forward. J Natl Cancer Inst 2012; 104: 599–613.

88. Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: precision tools of activating effective immunity against cancer. Nature Reviews Cancer 2008; 8(2): 108-120.
89. Fan Z, Huan XL, Borowski L, Mellors JW, Rinaldo CR. Restoration of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) responses in CD8+ T cells from late-stage patients on prolonged antiretroviral therapy by stimulation in vitro with HIV-1 protein-loaded dendritic cells. J Virol 2001; 75(9): 4413-4419.
90. Brown RD, Pope B, Murray A. et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numeralically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after CD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-β1 and interleukin-10. Blood 2001; 98(10): 2992-2998.
91. Alnaeeli M, Park J, Mahamed D, et al. Dendritic cells at the osteoimmune interface: Implications for inflammation-induced bone loss. J Bone Miner Res 2007; 22(6): 775-780.
92. Steinman RM, Cohn ZA. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Immunol 2007; 178(137): 5-25.
93. Chen LL, Frank AM, Adams JC, Steinman RM. Distribution of horseradish peroxidase (HRP)-antiHRP immune complexes in 158ort spleen with special reference to follicular dendritic cells. J Cell Biol 1978; 79: 184-199.
94. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. J Exp Med 1982; 155: 31-41.
95. Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J Exp Med 1985; 161: 526-546.
96. Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J, Schuler G, Steinman RM. Granulocyte/macrophage colonystimulating factor is essential 158ort he viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. J Exp Med 1987; 166: 1484-1498.
97. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood 1997; 90(9): 3245-3287.

98. Lehrer RI, Ganz T. Biochemistry and Fu nction of Monocytes and Macrophages. In: Beutler E, Lıchtman MA, Coller BS, Kıpps TJ, Seligsohn U, eds. Williams Hematology. 6th edn. Mc Graw Hill, New York 2001: pp 865-869.
99. Sönmez M. Dendritik Hücre İmmünobiyolojisi, Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, Türkiye 2005: ss 87-91.
100. Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. In: Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases. Ernst Schering Res Found Workshop 2006; 56: 61-80.
101. Banchereau J, Klechevsky E, Schmitt N, Morita R, Palucka K. Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. Ann N Y Acad Sci 2009; 1174: 24-32.
102. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. Curr Opin Immunol 2008; 20(11): 52-60.
103. Söker S. Dendritik hücreler. Dicle Tıp Dergisi 2005; 32(7): 158-160.
104. Théry C, Duban L, Segura E, et al. Indirect activation of naïve CD4+T cells by dendritic cell-derived exosomes. Nature Immunology 2002; 3(9): 12.
105. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogellic function of immature dendritic cells. Immunol Cell Bio 2002; 80(5): 477-483.
106. Lechmarm M, Berehtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic eeııs: more thanjust a marker for maturation. Trends Immuno 2002; 23(6): 273-275.
107. Clark GJ, Angel N, Kato M, et al. The role of dendritic cells in the innate immune system. Microbes Infect 2000; 2(3): 257-272.
108. Bhardwaj N, Friedman SM, Cole BC, Nisallian A. Dendritic cells are potent antigen-presenting ceııs for microbial superantigens. J Exp Med 1992; 175(1): 267-273.
109. Inaba K, Young JW, Steİnman RM. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. J Exp Med 1987; 166(1): 182-194.
110. Fujii S, Takayama T, Asakura M, et al. Dendritic cell-based cancer immunotherapies. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2009; 57(3): 189-198.

111. Lee YK, Lee HJ, Kim MH, et al. Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma. Korean J Hematol 2012; 47(1): 17-27.
112. Kanser Tedavisi (2017). Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi. Erişim: [http://www.kansertedavisi.web.tr/kemik-iligi-aspirasyonu-ve-biyopsisi/], ErişimTarihi:20 Aralık 2017.
113. Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity and mortality. Br J Haematol 2003; 121: 949-951.
114. Konda B, Pathak S, Edwin I, et al. Safe and successful bone marrow biopsy. An anatomical and CT-based cadaver study. Am J Hematol 2014; 89: 943-946.
115. Erciyes Transplant Merkezi, Otolog Mobilizasyon Standart Uygulama Kılavuzu Sop Numarası: Sop-Afz-208 Rev. No: 02 Revizyon Tarihi: 10.03.2016 Yayın Tarihi: 22.07.2010; ss 6 -7.
116. Erciyes Transplant Merkezi, Periferik Kan Hücre Toplama Standart Uygulama Kılavuzu Sop Numarası: Sop-Afz-233 Rev. No: 03 Revizyon Tarihi: 10.03.2016 Yayın Tarihi: 22.07.2010; ss 4 –19.

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onay Formu

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

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Multipl Myelom Kök Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ETİK KURULUN ADI	ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	0 352 437 49 10 - 11
FAKS	0 352 437 52 85
E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof.Dr. Ali Ünal
KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İç Hastalıkları
KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Kayseri
VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI	
DESTEKLEYİCİ	
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	

ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	
FAZ 1	☐
FAZ 2	☐
FAZ 3	☐
FAZ 4	☐
Gözlemsel ilaç çalışması	☐
Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐
İlaç dışı klinik araştırma	X
Diğer ise belirtiniz	Yüksek Lisans Tezi

ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER				
TEKMERKEZ X	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL X	ULUSLARARASI ☐

ASLI GİBİDİR

T.C. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI 1923

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

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

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Multipl Myelom Kök Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

	BELGE ADI		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

ASLI Gibidir

T.C.

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ		
Karar No :	2016/50	Tarih : 22.01.2016
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki		Katılım (*)		İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐	K X	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk. Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü.Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü.Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Yard.Doç.Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Av. Zafer Tuğrul SARIASLAN	Avukat	Hukuk Müşaviri	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐	K X	E ☐	H X	E X	H ☐	
Serkan KARACA	Sivil Üye	Öğretmen	E X	K ☐	E ☐	H X	E X	H ☐	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

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

EK-2. Hasta Bildirim Onam Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

BİLGİLENDİRME

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı Multipl Miyelom Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi (Tümör aşısı üretilmesi) dir. Bu deneysel araştırmanın amacı, kanser tedavisinde alternatif olabilecek tümör aşısı çalışmaları için ‘‘dendritik hücre elde edilmesi’’dir.

Bu araştırmada sizden tek sefere mahsus olmak üzere Erciyes üniversitesi Aferez ünitesinde toplanan kök hücrelerinizden gerekli numune alınacaktır. Alınan numuneler başka herhangi bir amaç için kullanılmayacaktır. Yukarıda da belirtildiği gibi gönüllülerden elde edilecek olan kök hücrelerin talep edilmesi dışında herhangi bir tedavi uygulanmayacak ve herhangi bir şekilde yurtdışı inceleme yapılmayacaktır. Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 3 yıl olup, araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı muhtemelen 20‘dır.

Fakültemiz Etik Kurulu bu çalışmanın ahlaki, vicdani ve tıbbi kurallara uygun olduğunu onaylamış olup çalışma denetime açıktır. Araştırma ile ilgili olarak araştırmacının önerilerine uyma ve kolaylık sağlama sizin sorumluluğunuzdur. Bu araştırmada sizin için herhangi bir risk ya da rahatsızlık söz konusu değildir. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorunuz, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için aşağıda belirtilen numaralardan ilgili doktorlara ya da araştırmacıya ulaşabilirsiniz. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmektedir. Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır; yer almayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezayi işleme yol açmayacak ve sizin için bir herhangi bir engel oluşturmayacaktır. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da

araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilecektir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

GÖNÜLLÜ OLURU

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama, aşağıda adı belirtilen hekim/hekimler tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ya da bilimsel amaçlarla kullanılması sırasında mahremiyetime saygı gösterileceğine inanıyorum. Bu şartlar altında söz konusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,	**Gönüllünün Yasal Temsilcisinin,**
Adı Soyadı:	**Adı Soyadı:**
Tarih :	**Tarih:**
İmzası:	**İmza:**

Açıklamaları Yapan Araştırmacının,

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Dr.Ayşe Birekul : 0505 598 54 03

Yüksek Lisans Öğrencisi Gülşen Buğday : 0 507 431 70 73

EK-2. Kurum İzni

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı
Sayı :95158125-103/34197 26/04/2016
Konu :Akademik Kurul Kararları hk.
(21.04.2016)

DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜM BAŞKANLIĞINA

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Akademik Kurulu 21.04.2016 tarihinde Prof. Dr. Şebnem GÜRSOY başkanlığında toplanmıştır.

Gereği bilgilerinize arz olunur.

Bu toplantıda;

1. Dönem IV öğrencilerinin öğleden sonra olan serviste klinik uygulama derslerinin öğleden önceye kaydırılması ve teorik derslerin de öğleden sonraya yayılması konusunda ortak karar alınmıştır. Dönem IV eğitim sorumlusu Prof.Dr.Fahri BAYRAM'ın kongrede olmasından dolayı akademik kurula katılamadığı için yapılan değişikliğin sözel olarak iletilmesine karar verilmiştir.
2. Dr.Emel MUTLU'nun "Böbrek Nakli Hastalarında Genetik Hasarın İncelenmesi " konulu tez savunmasını yapmasına karar verilmiş olup sınav jürisinde Doç.Dr.Murat SİPAHİOĞLU, Doç.Dr.Aydın ÜNAL, Doç.Dr.Muzaffer KEKLİK'in asil üye Doç.Dr.İsmail KOÇYİĞİT'inde yedek üye olmasına karar verilmiştir.
3. Dr.Emre YILMAZ'ın "Skleroderma Hastalarının Nütrisyonel Durumunun Değerlendirilmesi" konulu tez savunmasını yapmasına karar verilmiş olup sınav jürisinde Doç.Dr.Soner ŞENEL, Doç.Dr. Kürşat GÜNDOĞAN,Doç.Dr.Muzaffer KEKLİK'in olmasına karar verilmiştir.
4. "Multiple Miyelom Kök Hücrelerine Karşı Otolog Kök Hücre ve Mononükleer Hücrelerinden Dendritik Hücre Üretilmesi" isimli çalışmanın Prof.Dr.Ali ÜNAL ve Doç.Dr.Leylagül KAYNAR tarafından yapılmasına karar verilmiştir.
5. "Periodontal Tedavinin Diyabetik Olmayan Periton Diyalizi Hastalarının Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkisi: Rastgele Kontrollü Klinik Prospektif Çalışma" isimli çalışmanın Doç.Dr.İsmail KOÇYİĞİT tarafından yapılmasına karar verilmiştir.
6. "Ağır Cerrahi Hastalarında DAMP Proteinlerinin Hif-1 Alfa Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" isimli çalışmanın Doç.Dr.Ramazan COŞKUN,Doç.Dr.Metin AYTEKİN,Uzm.Dr.Gülseren ELAY, Uzm.Dr.İlhan BAHAR tarafından yapılmasına karar verilmiştir.
7. "High Flow Oksijen Tedavisinin Hematolojik Malignensili Akut Hipoksemik Solunum Yetmezliğindeki Hastalarda Etkinliği" isimli çalışmanın Prof.Dr.Murat SUNGUR yürütücülüğünde ve yardımcı araştırmacı Uzm.Dr.Nilgün Özlem ALPTEKİNOĞLU MENDİL tarafından yapılmasına karar verilmiştir.
8. "Kök Hücre Nakli Olan Hastalarda Nakil Öncesi Ferritin ve Biyokimyasal Değerlerin Prognostik Önemi" isimli çalışmanın Doç.Dr.Serdar ŞIVGIN yürütücülüğünde ve yardımcı araştırmacı Uzm.Dr.Neslihan MANDACI ŞANLI tarafından yapılmasına karar verilmiştir.
9. "Kök Hücre Nakli Olan Myelom ve Lenfoma Hastalarında Nakil

Köşk Mahallesi Dede Efendi Sokak 38030 Melikgazi KAYSERİ
Telefon: +90 352 437 49 10
E-Posta: tipdekanlik@erciyes.edu.tr
Ayrıntılı bilgi için irtibat: Hava Demir
Faks: +90 352 437 52 85
Elektronik Ağ: http://tip.erciyes.edu.tr

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Öncesi PET BT Sonuçlarının Prognostik Değerinin Belirlenmesi" isimli çalışmanın Doç.Dr.Serdar ŞIVGIN yürütücülüğünde ve yardımcı araştırmacı Dr.Ümmügülsüm YILMAZ tarafından yapılmasına karar verilmiştir.

10. "Kök Hücre Nakli Olan Hastalarda Karaciğer ve Kalpte Demir Birikimini Tesbitte T2 MR Tekniğinin Hassasiyeti ve Serum Demir Parametreleri ile Korelasyonunun Değerlendirilmesi" konulu tezin Doç.Dr.Serdar ŞIVGIN yönetiminde Dr.Beyza GÖKALP tarafından yapılmasına karar verilmiştir.

11. "Kronik Böbrek Yetmezliği Tanısı Olan Hemodiyaliz ve Peritondiyaliz Uygulanan 60 Yaş ve Üzeri Hastalarda Sarkopeni Görülme Sıklığı ve Sarkopeniyi Etkileyen Risk Faktörlerinin Tespiti " konulu tezin Doç.Dr.Sibel AKIN yönetiminde Dr.Zeynep Dilan ÖZÇELİK tafından yapılmasına karar verilmiştir.

12. "Prolaktinomalı Kadınlarda Hiperandrojeneminin Kardiyovasküler ve Metabolik Sistem Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ve Tedaviyle Değişimi" konulu tezin Doç.Dr.Züleyha Cihan ÖZDAMAR KARACA yönetiminde Dr.Mehmet Çağrı ÜNAL tafından yapılmasına karar verilmiştir.

Prof.Dr. Şebnem GÜRSOY
Anabilim Dalı Başkanı

26/04/2016 Bür.Pers. : H.DEMİR

Köşk Mahallesi Dede Efendi Sokak 38030 Melikgazi KAYSERİ
Telefon: +90 352 437 49 10
E-Posta: tipdekanlik@erciyes.edu.tr
Ayrıntılı bilgi için irtibat: Hava Demir
Faks: +90 352 437 52 85
Elektronik Ağ: http://tip.erciyes.edu.tr

MULTİPL MİYELOM HÜCRELERİNE KARŞI OTOLOG KÖK HÜCRE VE MONONÜKLEER HÜCRELERİNDEN DENDRİTİK HÜCRE ÜRETİLMESİ (TÜMÖR AŞISI ÜRETİLMESİ)

ORIJINALLIK RAPORU

%11	%11	%2	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	tmc.dergisi.org İnternet Kaynağı	%3
2	zootanic.blogspot.com İnternet Kaynağı	%2
3	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
5	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.drfahrisahin.com İnternet Kaynağı	%1
7	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
8	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı, Soyadı: Gülşen BUĞDAY

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 4 Şubat 1992, Seyitgazi

Medeni Durumu: Bekar

Tel: 0507 431 70 73

email: glsn_gb20@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Mehmet Dedeman Hematoloji ve Onkoloji Hastanesi TALAS/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Sağlık Bilimleri	2018
Lisans	AÜ Fen Fakültesi MBG	2014
Lise	Soma AÖL, Manisa	2010

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013	Ege Ü. Tıp Hastanesi MG Lab.	Stajer Öğrenci
2016	EÜ GENKÖK	Öğrenci Personel

YABANCI DİL

İngilizce