

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

**GAUCHER HASTALARINDA DNA HASARININ KANSERLE
İLİŞKİLİ miRNA İFADELERİNİN VE İMMÜN SİSTEM
PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ramazan ÜZEN**

1. Danışman

Prof. Dr. Nurhan CÜCER

2. Danışman

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ

Doktora Tezi

Ocak 2022

KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAUCHER HASTALARINDA DNA HASARININ KANSERLE
İLİŞKİLİ miRNA İFADELERİNİN VE İMMÜN SİSTEM
PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan
Ramazan ÜZEN**

1. Danışman

Prof. Dr. Nurhan CÜCER

2. Danışman

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2020-10134 kodlu proje ile
desteklenmiştir.**

(YÖK 100/2000 Moleküler Onkoloji Doktora Programı kapsamında burs almıştır)

Ocak 2022

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Ramazan ÜZEN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK YAZISI

“Gaucher Hastalarında DNA Hasarının Kanslerle İlişkili miRNA İfadelerinin ve İmmün Sistem Parametrelerinin Araştırılması” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

1. Danışman: Prof. Dr. Nurhan CÜCER

Ramazan ÜZEN

2. Danışman: Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Prof. Dr. Nurhan CÜCER danışmanlığında **Ramazan ÜZEN** tarafından hazırlanan “**Gaucher Hastalarında DNA Hasarının Kanslerle İlişkili miRNA İfadelerinin ve İmmün Sistem Parametrelerinin Araştırılması**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

--/--/2020

JÜRİ

İmza

Danışman: Prof. Dr. Nurhan CÜCER

Üye: Prof. Dr. Munis DÜNDAR

Üye: Doç. Dr. Ahmet EKEN

Üye: Prof. Dr. A. Gaye TOMATIR

Üye: Doç. Dr. Selda ŞİMŞEK

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Başta tez konumun belirlenmesinden çalışmalarımın yürütülmesi ve sonlanmasına kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeye katkıda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurhan CÜCER ve Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ'a,

Tez konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve hasta örneklerinin toplanmasında sonsuz desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Fahri BAYRAM'a,

Hasta örneklerinin toplanmasında desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Fatih KARDAŞ'a,

Çalışmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Doç. Dr. Ahmet EKEN, Doç. Dr. Mahmodul Hasan SOHEL'a,

Değerli jüri hocalarım Prof. Dr. Munis DÜNDAR, Prof. Dr. A. Gaye TOMATIR ve Doç. Dr. Selda ŞİMŞEK'e

Her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÇAKIR'a, Uzm. Dr. Hüseyin DURSUN'a,

Desteğini gördüğüm değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Muazzez Derya ANDEDEN, Nursultan NURDİNOV ve Pınar ALTIN-ÇELİK'e,

Deneyselimi gerçekleştirmeme izin veren GENKÖK yönetimine ve Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a,

YÖK 100/2000 Doktora Programı Moleküler Onkoloji alanında doktora eğitimi almama vesile olan ve burs veren YÖK 100/2000 proje yetkilileri ve kurumuna, ve TDK-2020-10134 nolu proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyerek her an yanımda olan aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Ramazan ÜZEN
Kayseri, Ocak 2022

GAUCHER HASTALARINDA DNA HASARININ KANSERLE İLİŞKİLİ miRNA İFADELERİNİN VE İMMÜN SİSTEM PARAMETRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ramazan ÜZEN

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ocak 2022

1. Danışman: Prof. Dr. Nurhan CÜCER

2. Danışman: Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

ÖZET

Gaucher hastalığı (GH), otozomal resesif özellik gösteren, en yaygın lipid depo hastalığıdır. Bu çalışmada, Gaucher hastalarında kanserle ilişkili olarak miRNA ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi ile oksidatif DNA hasarının (8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin; 8-OHdG) ve mikronükleusun (MN)'un biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı ve ayrıca MAIT, TFH, ILC hücreleri ve IL-4, IL21, TNF- α ve IFN- γ sitokinlerinin hastalıktaki değişimleri ve patogenezendeki rolü araştırılmıştır. Tedavi gören 20 Gaucher hastası, 6 heterozigot taşıyıcı gönüllü ve kontrol grubu olarak dahastalarla aynı yaş-cinsiyette 27 sağlıklı gönüllü kişilerden alınan kan örnekleri üzerinde çalışma yapıldı.

Gaucher hasta grubunun hem de GH taşıyıcı grubunun lenfositlerindeki MN, nükleoplazmik köprü (NPB), nükleer tomurcuk (NBUD), Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) ve metafaz değerleri kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. GH hasta ve GH taşıyıcı grubunda plazma 8-OHdG seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. GH hasta grubunda tümör süpressör etkili miRNA-125b seviyelerinin ($p < 0.001$) ve GH taşıyıcı grubunda ise miRNA-15a ve miRNA-181b seviyelerinin ($p < 0.05$) arttığı bulunmuştur. Ayrıca, bu çalışmada GH ile ILC, TFH ve MAIT hücreleri, IL21, IL4, IFN- γ ve TNF- α sitokinlerinin etkilendiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, MN hem tedavi sonrası GH hastalarında hem de GH taşıyıcı grupta erken tanı için bir biyobelirteç olarak değerlendirilmemiştir. GH'da oksidatif hasar belirteci olarak plazma 8-OHdG seviyelerinin artmasının hastalığın gelişiminde etkili olabileceğini gösterebilir. miRNA ekspresyon sonuçlarımıza göre, GH'da kanser riski

için tümör süpressör etkili miRNA-125b bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Ayrıca bu çalışmada, enzim replasman tedavisi alan GH'da doğal lenfoid hücre alt tiplerinden ILC1 ve ILC3'ün azaldığı, foliküler helper T hücre (TFH) hücrelerinin IL-4, IL-21 üretimlerinin azaldığı, son olarak mukoza ilişkili değişmez T hücrelerinin (MAIT) TNF- α , IFN- γ , sitokin üretimlerinin azaldığı ve de hastalık patogenezi ve şiddetine yönelik önemli göstergeler olabileceği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, ileri çalışmalar ile desteklenmeli ve daha fazla tedavi öncesi GH hastaları üzerinde araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: DNA Hasarı; Enzim Replasman Tedavisi; Gaucher Hastalığı; İmmün Sistem; miRNA

**INVESTIGATION OF DNA DAMAGE CANCER-RELATED miRNA
EXPRESSIONS AND IMMUNE SYSTEM PARAMETERS IN GAUCHER
PATIENTS**

Ramazan UZEN

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Medical Faculty, Department of Medical Biology**

Doctorate Thesis, January 2022

1. Supervisor: Prof. Dr. Nurhan CUCER


2. Supervisor: Prof. Dr. Hamiyet DONMEZ ALTUNTAS

ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is the most common lipid storage disease with an autosomal recessive feature. Our aim in this study were to determine miRNA expression changes associated with cancer and oxidative DNA damage (8-OHdG) and whether micronucleus (MN) can be used as a biomarker in Gaucher patients, also the changes in MAIT, TFH, ILC cells and IL-4, IL21, TNF- α and IFN- γ cytokines in the disease and their role in the pathogenesis. The study was carried out on blood samples taken from a total of 20 patients diagnosed with GD, 6 heterozygous carrier volunteers, and 27 healthy volunteers of the same age-sex as the control group. When the MN, nucleoplasmic bridge (NPB), nuclear bud (NBUD), metaphase frequencies and Nuclear Division Index (NDI) values in the lymphocytes of both the Gaucher patient group and the GD carrier group were compared with the controls, no statistically significant difference was observed. Plasma 8-OHdG levels were found to be statistically significantly higher in the GD patient and GD carrier groups when compared to the control group. It was found that tumor suppressor effective miRNA-125b levels ($p < 0.001$) were increased in the GD patient group and miRNA-15a and miRNA-181b levels ($p < 0.05$) were increased in the GD carrier group. In this study, it was shown that ILC, TFH and MAIT cells, IL21, IL4, IFN- γ and TNF- α cytokines were affected in GD. In conclusion, MN has not been evaluated as a biomarker for early diagnosis in both GD patients and GD carriers. It may show that increased plasma 8-OHdG levels as a marker of oxidative damage in GD may be effective in the development of the disease. According to our miRNA expression results, tumor suppressor miRNA-125b can be

used as a biomarker for cancer risk in GD. Also in this study, it has been reported that decreased of ILC1 and ILC3, which are natural lymphoid cell subtypes, IL-4, IL-21 production of follicular helper T cell (TFH) cells, finally the production of TNF- α , IFN- γ cytokines of mucosa-associated invariant T cells (MAIT) may be important indicators of disease pathogenesis and severity in GD receiving enzyme replacement therapy. These results should be supported by further studies and further investigated in pre-treatment GD patients.

Keywords: DNA Damage; Enzyme Replacement Therapy; Gaucher Disease; Immune System; miRNA



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lizozomal Depo Hastalıkları	3
2.2. Gaucher Hastalığı.....	4
2.2.1. Gaucher Hastalığı ve Epidemiyoloji	5
2.2.2. Gaucher Hastalığının Sınıflandırılması.....	6
2.2.3. Gaucher Hastalığı Tedavisi	7
2.2.4. Gaucher Hastalığı Etolojisi	7
2.2.5. Gaucher Hastalığı ve Kanser İlişkisi.....	8
2.3. DNA Hasarı	11
2.3.1. Sitokinez Bloke Mikronükleus (CBMN) Yöntemi	12
2.3.2. CBMN-Cyt Yöntemi ile Hücreleri Tanımlama Kriterleri.....	13
2.4. Oksidatif Hasar	13
2.5. MikroRNA'lar.....	14
2.6. MiRNA ve Kanser	14
2.7. İmmün Sistem Hücreleri	18
2.7.1. İnnate Lenfoid Hücreleri (ILC).....	18
2.7.2. T Foliküler Helper (TFH) Hücreleri	20
2.7.3. Mukozal İlişkili İnvariant T (MAIT) Hücreleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. GEREÇLER.....	26
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	26

3.1.2. Kullanılan Kitler	26
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	27
3.2. YÖNTEM	30
3.2.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri	30
3.2.2. Hasta Grubu	30
3.2.3. Mikronükleus Yöntemi	32
3.2.4. 8-OHdG seviyelerinin Belirlenmesi.....	34
3.2.5. miRNA'ların Belirlenmesi	36
3.2.5.1. miRNA'ların İzolasyonu.....	37
3.2.5.2. cDNA (kalıp DNA) Elde Edilmesi	38
3.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar	38
3.2.5.4. Agaroz Jelin Hazırlanması	38
3.2.5.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi.....	39
3.2.5.6. RT-PCR Yöntemi.....	39
3.2.6. Akım Sitometri ile İmmün Sistem Hücrelerin Tespiti	40
3.2.6.1. Lenfosit Hücrelerinin İzolasyonu.....	40
3.2.6.2. ILC Hücrelerinin Boyanması	41
3.2.6.3. TFH Hücrelerinin Boyanması.....	41
3.2.6.4. MAIT Hücrelerinin Boyanması	43
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	45
4. BULGULAR.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	81
6. KAYNAKLAR	88
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER

GH	: Gaucher Hastalığı
GBA	: Glukoserebrosidaz
Ig	: İmmünoglobulin
MI	: Mililitre
SPSS	: Statistical Package For Social Sciences
BN	: Binükleer
CBMN	: Sitokinez Blok Mikronükleus (Cytokinesis-Block Micronucleus)
CBMN-Cyt	: CBMN Sitom (CBMN Cytome)
Cyt-B	: Sitokalazin B
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Testi
MN	: Mikronükleus
NPB	: Nükleoplazmik Köprü (Nucleoplasmic Bridge)
NBUD	: Nükleer Tomurcuk (Nuclear Bud)
NBI	: Nükleer Bölünme İndeksi (Nuclear Division Index)
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
LDH	: Lipid Depo Hastalıkları
miRNA	: MikroRNA
MM	: Multipl Miyelom
HCC	: Hepatoselüler Karsinom
TFH	: T Foliküler Helper
ILC	: İnnate Lenfoid Hücreler
IL	: İnterlökin
MAIT	: Mukozal İlişkili İnvariant T Hüresi
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör- α
IFN- γ	: İnterferon- γ
ERT	: Enzim Replasman Tedavisi
SRT	: Substrat İndirgeme Terapisi

Kb	: Kilobaz
ALL	: Akut Lenfoid Lösemi
KLL	: Kronik Lenfoid Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ncRNA	: Kodlanmayan RNA (non-coding RNA)
CXCR5	: Kemokin Reseptörü Tip 5 (Chemokine receptor type 5)
APC	: Antijen Sunan Hücreler
MR1	: MHC-İlişkili Protein 1
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler kalıpları (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
MFI	: Median Fluorescence Intensity
SCE	: Kardeş Kromatid Değişimi

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Tümör süpressör olarak görev yapan miRNA'lar.....	16
Tablo 2.2. Onkogen olarak görev yapan miRNA'lar	17
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	28
Tablo 3.2. Antikor listesi	29
Tablo 3.3. Hasta ve Taşıyıcı bireylere ait GBA gen mutasyonu.....	31
Tablo 3.4. ELİSA standartlarının hazırlanması.....	34
Tablo 3.5. miRBase'den alınan primerlere ait sekans bilgileri.....	36
Tablo 3.6. cDNA reaksiyon bileşenleri.....	38
Tablo 3.7. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri	39
Tablo 3.8. qRT-PCR koşulları	40
Tablo 3.9. ILC boya karışımı	41
Tablo 3.10. TFH yüzey boya karışımı	42
Tablo 3.11. TFH nükleer boya karışımı	43
Tablo 3.12. MAIT hücreleri yüzey boya karışımı.....	44
Tablo 3.13. MAIT hücreleri nükleer boya karışımı	45
Tablo 4.1. 8-OHdG seviyeleri ve CBMN-cyt yöntemi parametrelerinin median (min-max) değerleri	48
Tablo 4.2. miRNA gen ekspresyon düzeyleri	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Gaucher hücresi.....	5
Şekil 2.2. Lizozomal depo bozukluklarının göreceli sıklığı.....	6
Şekil 2.3. MAIT hücrelerinin aktivasyon şeması.....	24
Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması.....	31
Şekil 3.2. 8-OHdG standart kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 3.3. cDNA örnekleri.....	39
Şekil 4.1. a. Bir çekirdekli hücre; b. İki çekirdekli (BN) hücre; c. Üç çekirdekli (M3) hücre; d. Dört çekirdekli (M4) hücre; e. Bir MN'lu BN hücre; f. NPB'lü BN hücre; g. NBUD'lü BN hücre; h. Metafaz hücresi (40X).....	48
Şekil 4.2. GH hasta grubu ve GH taşıyıcı grubunun kontrol grubuna göre plazma 8-OHdG seviyelerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.3. Tedavi gören GH hastalarının ve GH taşıyıcı gruplarının miRNA gen ekspresyon düzeyleri ve Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkan miRNA'lar.....	50
Şekil 4.4. ILC, ILC1, ILC2, ILC3'lerin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	52
Şekil 4.5. Total ILC, ILC1, ILC2, ILC3 absolute hücre sayısı ve yüzdelerinin analizleri.....	53
Şekil 4.6. TFH hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	54
Şekil 4.7. Total TFH, TFH-PD1, TFH-ICOS, TFH PD1 MFI, TFH ICOS MFI absolute hücre sayıları ve yüzdelerinin Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı gruplarının karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.8. TFH hücreleri içindeki Total Th1 benzeri-TFH PD1, Th1 benzeri-TFH ICOS, Th2-Th17 benzeri-TFH PD1 ve Th2-Th17 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	56
Şekil 4.9. Th1 benzeri-TFH, TFH hücreleri içindeki Total Th1 benzeri-TFH PD1, Th1 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin analizleri.....	57

Şekil 4.10. TFH hücreleri içindeki Th17-Th2 benzeri-TFH, Th17-Th2 benzeri-TFH PD1, Th17-Th2 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin analizleri.....	58
Şekil 4.11. Total TFH hücreleri içindeki CD4+IL4 ve CD4+IL21'in akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	59
Şekil 4.12. TFH hücreleri içindeki CD4+ IL4+ ve CD4+ IL21+ analizleri.....	59
Şekil 4.13. Total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL21+ ve CXCR5+IL4+'in akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	60
Şekil 4.14. Total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL21+ ve CXCR5+IL4+ analizleri.....	61
Şekil 4.15. MAIT V α -7.2, CD8+, CD8+CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	62
Şekil 4.16. MAIT $\gamma\delta$ +, $\gamma\delta$ +CD8+, $\gamma\delta$ +CD8+CD4+, $\gamma\delta$ +CD8-CD4-, $\gamma\delta$ +CD8-CD4+ hücrelerinin analizleri.....	63
Şekil 4.17. Non-MAIT V α -7.2, $\gamma\delta$ +CD8+, $\gamma\delta$ +CD8+CD4+, $\gamma\delta$ +CD8-CD4- hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	64
Şekil 4.18. Non-MAIT $\gamma\delta$ -, $\gamma\delta$ -CD8+, $\gamma\delta$ -CD8+CD4+, $\gamma\delta$ -CD8-CD4-, $\gamma\delta$ -CD8-CD4+ hücrelerinin analizleri.....	65
Şekil 4.19. MAIT V α -7.2 hücreleri içinden CD3, 5-OP-RU+CD8+ ve 5-OP-RU+CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	66
Şekil 4.20. MAIT CD3, MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU+CD8+, MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU+CD4+ hücrelerinin analizleri.....	67
Şekil 4.21. MAIT V α -7.2 hücreleri içinden 5-OP-RU-CD8+ ve 5-OP-RU-CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.....	68
Şekil 4.22. MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8+, V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD4+ hücrelerinin analizleri.....	69
Şekil 4.23. Total MAIT ve MAIT hücreleri içindeki IFN- γ ve TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	70
Şekil 4.24. Total MAIT, Total MAIT hücreleri içindeki IFN γ -TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α -, IFN γ +TNF- α + hücrelerinin analizleri.	71

Şekil 4.25. Total MAIT, MAIT CD8+ hücreleri içindeki IFN- γ + TNF- α , MAIT CD8- içindeki IFN- γ + TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	72
Şekil 4.26. Total MAIT CD8+, MAIT CD8+ içindeki IFN γ -TNF- α -, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α + hücrelerinin analizleri.....	73
Şekil 4.27. Total MAIT CD8-, MAIT CD8- içindeki IFN γ -TNF- α -, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α + hücrelerinin analizleri.....	74
Şekil 4.28. Total Non-MAIT, Non-MAIT hücreleri içindeki IFN- γ ve TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	75
Şekil 4.29. Total Non-MAIT, Total Non-MAIT içindeki IFN γ -TNF- α +, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α - hücrelerinin analizleri	76
Şekil 4.30. Total Non-MAIT, Non-MAIT CD8+ içindeki IFN- γ + TNF- α , CD8- içindeki IFN γ +TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi.	77
Şekil 4.31. Total Non-MAIT CD8+, Total Non-MAIT CD8+ içindeki IFN γ -TNF- α +, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, CD8+ IFN γ -TNF- α - hücrelerinin analizleri.	78
Şekil 4.32. Total Non-MAIT CD8-, Total Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ -TNF- α +, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α - hücrelerinin analizleri.	79

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lipid depo hastalıkları (LDH), yaygın olarak lizozomal homeostaziyi bozan kalıtsal gen mutasyonlarından kaynaklanan multisistemik nadir bir hastalıktır. En sık görülen kalıtsal lipid depo hastalıkları Gaucher hastalığı (GH) ve Fabry hastalığıdır (Squillaro ve ark., 2017). GH, doğuştan gelen metabolik bir bozukluk sonucu ortaya çıkan otozomal resesif özelliğe sahip olan en yaygın lipid depo hastalığıdır. GH, Glukoserebrozidaz (GBA) genindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve mononükleer fagositlerin lizozomlarında glukoserebrosit birikimine neden olur (Lo ve ark., 2012). GH nörolojik özelliklerin varlığına veya yokluğuna göre üç alt tipte sınıflandırılmıştır. Tip 1 GH (GH1) en yaygın olanıdır ve nörolojik belirtilerin yokluğu ile karakterizedir. Tip 2 ve tip 3 GH sırasıyla akut ve kronik nörolojik semptomlarla karakterize göstermekte ve daha nadir seyretmektedir (Zahran ve ark., 2017).

DNA sürekli olarak endojen ve eksojen hasar kaynaklarına maruz kalmaktadır ve normal hücresel koşullar altında genomik bütünlüğü korunması için birçok DNA tamir mekanizmasının koordineli aktivitesi gereklidir. DNA hasarının doğru ve zamanında onarılmaması sonucu, nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar ve kromozomal segmentlerin veya tüm kromozomların kazanılması veya kaybedilmesi gibi çeşitli genomik anormalliklere neden olabilir (Mouw ve ark., 2017). Hücrede DNA bütünlüğünün sağlanamaması sonucu, ortaya çıkan bu genomik değişiklikler hücre fizyolojisinde değişikliklere neden olabileceği gibi yaşlanma, otoimmün hastalıklar ve tümör oluşumuyla sonuçlanabilir. Kromozomal DNA hasarının belirlenmesinde Mikronükleus (MN), iyi bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Fenech 2007, Bankoglu ve ark., 2018). Gaucher hastalığının genomik hasar üzerindeki etkisi şu ana kadar araştırılmamıştır. Bu çalışmada Gaucher hastalığında Sitokinez-bloke mikronükleus sitom (CBMN-cyt) yöntemiyle MN'un biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı belirlenecektir. Ayrıca çalışmada nükleoplazmik köprü (Nucleoplasmic bridge; NPB), nükleer tomurcuk (Nuclear bud; NBUD), Nükleer

Bölünme İndeksi (Nuclear division index; NBI) ve metafaz sayıları değerlendirilecek ve plazma örneklerinde 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyeleri ölçülerek oksidatif DNA hasarı değerlendirilecektir.

MikroRNA'lar (miRNA), mRNA moleküllerini doğrudan hedefleyerek translasyon seviyesinde gen ekspresyonunu baskılayabilen yaklaşık 22 nükleotit içeren, kodlamayan küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar kanser teşhisi, prognostik öngörü, hastalığın izlenmesi ve tedaviye yanıtın tahmin edilmesine yardımcı olabilecek kanser tipine özgü biyobelirteçler olarak ortaya çıkmaktadır (Bidarra ve ark., 2019). miRNA'ların kanser biyobelirteçleri olarak potansiyelleri göz önüne alındığında, GH'lığıyla ilişkili olan multipl miyelom (MM), lösemi, lenfoma ve hepatoselüler karsinom (HCC) ile ilgili olan onkogen ve tümör süpressör gibi davranan bazı miRNA ekspresyon seviyelerinin araştırılması ile bu miRNA'ların Gaucher hastalarında kanser riski için biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı bu çalışma ile belirlenecektir.

GH, malignitelerde artış ile beraber hipergammaglobulinemia (monoklonal ya da poliklonal gammopatiler vs.) ve serum antikorlarının oluşumu gibi immün sistemde de önemli değişiklikler ortaya çıkar (Arends ve ark., 2013, Zhang ve ark., 2019). Ancak, GH'ın patogeneze katkıda bulunan immün sistemdeki değişikliklerin tam biyokimyasal ve hücrel mekanizmaları hala bilinmemektedir. İmmün sistem ile ilgili mukozal ilişkili invaryant T (MAIT), T foliküler helper (TFH), innate lenfoid (ILC) hücrelerinin ve interlekin-4 (IL-4), IL-21, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interferon- γ (IFN- γ) sitokinlerinin bu hastalıktaki değişimleri ve patogenezindeki rolü araştırılacaktır.

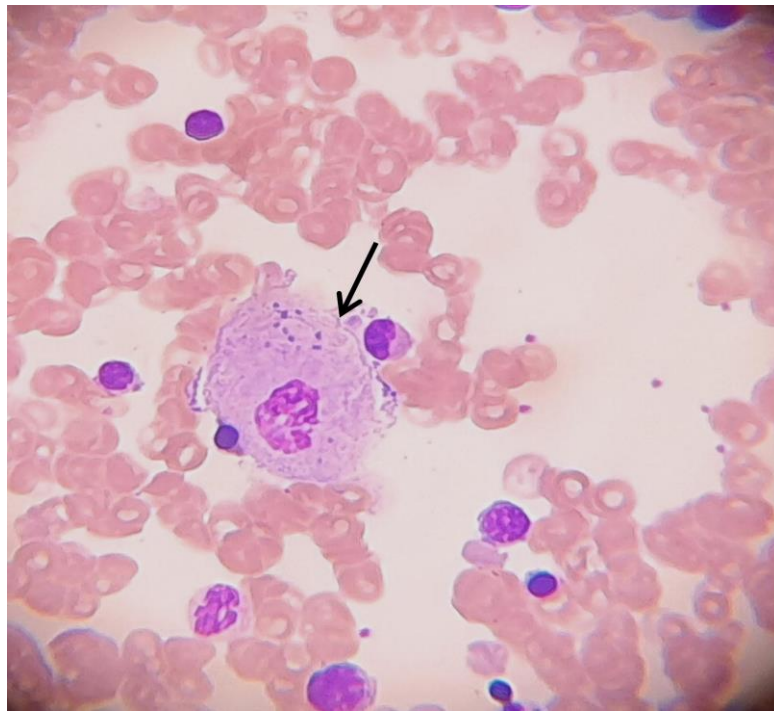
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Lizozomal Depo Hastalıkları

Lizozomlar ilk olarak 1950'lerin başında bu organellerin insan hastalıklarındaki önemini ilk fark eden de Duve tarafından tanımlandı. Lizozom, oligosakaritler, glikoz amino glikanlar, sfingolipitler ve diğer lipidler gibi çeşitli moleküllerin biyokimyasal parçalanması için gerekli olan hücre içi bir organeldir. Lizozomların işlevi, asidik pH ortamında aktive olan bir dizi enzimatik reaksiyon yoluyla makro molekülleri parçalamaktır. Bu süreç, hücreler tarafından endositoz yoluyla molekülleri veya normal hücre yapılarının bileşenleri olan endojen molekülleri (örn. Hücre zarları, hücre iskeleti, nükleik asitler) parçalamak için gereklidir. Lizozomlar, sfingolipidlerin parçalanması ve metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir hücresel bileşendir. Lizozomların işlevindeki kusurlar, bu lipidlerin düzensizliğine ve inflamasyon yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Lizozomlar çok sayıda biyolojik süreçte yer almakta ve lizozomal işlevdeki anormallikler çok çeşitli hastalıklarla sonuçlanabilmektedir (Simonaro 2016, Köse ve ark., 2019). LDH metabolizmadaki kusurların çoğu otozomal resesif özellik göstererek veya bazı tiplerde X'e bağlı bir şekilde kalıtsal olarak aktarılır. LDH ile ilişkili genler, lizozomal enzimler ve lizozomal membran proteinleri olmak üzere farklı lizozomal proteinleri kodlamaktadır. Lizozomal disfonksiyon ile karakterize 70'in üzerinde lizozomal depolama bozukluklarına bağlı olarak hastalık grubu bulunmaktadır. Nadir olarak gözlemlenen bu hastalıklar genel olarak 5-7 bin doğumda bir olarak ortaya çıkmaktadır. İlgili substrata bağlı olarak lipid depolama bozuklukları (sfingolipidozlar, gangliosidozlar, lökodistrofiler), mukopolisakkaridozlar, glikoprotein depolama bozuklukları, mukolipidozlar ve sistinoz olarak gruplandırılır. LDH'larında tipik klinik semptomlar olarak hepatosplenomegali, pulmoner ve kardiyak problemler, kemik anormallikleri, demans, sağırılık, körlük ve hareket problemlerini içermektedir. LDH'ların üçte ikisi nörolojik etkiler içermektedir (Platt ve ark., 2018, Marques ve Saftig 2019).

2.2. Gaucher Hastalığı

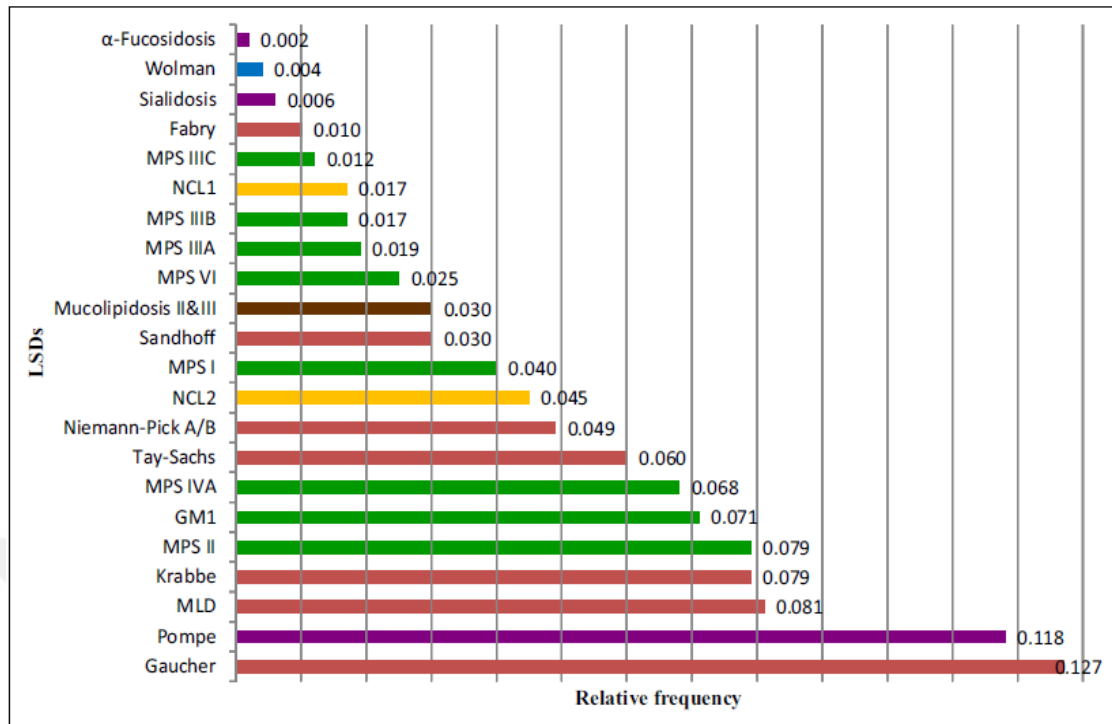
GH, lizozomal depo hastalıkları grubuna ait, temel olarak otozomal resesif özellik gösteren bir hastalıktır. GH, kromozom 1 (1q21) üzerinde bulunan GBA aktivitesini kodlayan gendeki mutasyonlarla ilişkili en yaygın lizozomal depo bozukluğudur. (Diaz-Font ve ark., 2003, Squillaro ve ark., 2017). Bir lizozomal enzim olan glukoserebrosidaz eksikliğinden kaynaklanan GH, doku makrofajlarının (Gaucher hücreleri (Şekil:1)) lizozomlarında belirgin bir şekilde glukosilseramid birikimine yol açar ve onları karakteristik Gaucher hücrelerine dönüştürmesine neden olur. GBA genindeki mutasyonlar sonucunda mononükleer fagositlerin ve makrofajların lizozomlarında glukoserebrosid birikimi ile büyük hücreler (Gaucher hücreleri) oluşur. GH'nın genel popülasyonda görülme sıklığı, yaklaşık olarak 50-60 bin canlı doğumda birdir (Dekker ve ark., 2011). GH, glukosilseramidinin karaciğerin retikülo-endotelial sistemindeki hücrelerde, dalakta ve kemik iliğinde (Gaucher hücreleri şeklinde) depolanması ile karakterize edilir (Astudillo ve ark., 2016). GH, nörolojik bulgulara göre üç tipe sınıflandırılmıştır: Nöropatik bulguları olmayan tip 1, akut infantil nöropatik belirtileri olan tip 2 ve kronik nöropatik form tip 3 (Alaei ve ark., 2019).



Şekil 2.1. Gaucher hücresi (Sgherza ve ark., 2020)

2.2.1. Gaucher Hastalığı Epidemiyolojisi

Coğrafi bölgelere göre dağılım farklılıkları gösteren GH, nadir hastalıklar arasında en sık görülen lizozomal depo hastalığını oluşturmaktadır (Şekil:2). Doku makrofajlarının lizozomlarında glukozilseramid birikimi ile sonuçlanan, glukoserebrosidaz eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır (Xu ve ark., 2005). Nörolojik tutulumun varlığı ve ilerleme hızı temelinde, GH genel olarak üç fenotipe bölünmüştür (Dimitriou ve ark., 2020). Üç sınıfa ayrılan GH, tip 1 GH en sık ortaya çıkmaktadır ve tüm GH vakalarının %94'ünü oluşturmaktadır. Tip 1 GH, batı dünyasındaki en yaygın alt tiptir. Yahudi popülasyonunda tip 1 GH prevalansı, Yahudi olmayan popülasyonlara göre çok daha yüksek seyretmektedir. Yahudi popülasyonundaki GH prevalansının 850'de 1 olduğu tahmin edilirken, Yahudi olmayan popülasyonlarda ise bu oran 50 bin'de 1 olduğu tahmin edilmektedir. Tip 2 ve tip 3 GH, tip 1 GH'dan daha az yaygındır ve 100-300000 doğumdan birinde meydana geldiği tahmin edilmektedir (Nalysnyk ve ark., 2017). Türkiye nüfusunda ise bu oranın, canlı doğumda 2,3/100.000 kadar olduğu tespit edilmiştir (Mağın ve ark., 2008, Kabaçam ve ark., 2010). Ulusal Nadir Hastalıklar Örgütü tarafından hazırlanan bir rapora göre, GH insidans oranı Aşkenazi Yahudi kökenli bireyler arasında 450 doğumda 1 kadar yüksek olabilir. GH, erkekleri ve kadınları eşit olarak etkilemektedir (Alaei ve ark., 2019).



Şekil 2.2. Lizozomal depo bozukluklarının göreceli sıklığı (Kadali ve ark., 2014)

2.2.2. Gaucher Hastalığının Sınıflandırılması

GH, nörolojik bulguların ve ilerleme hızına bağlı olarak bu bulguların olup olmasına göre klinik olarak belirtilerine göre üç farklı alt tipte sınıflandırılmıştır. Tip 1 GH, hastalık seyirinin çeşitli yaş değişikliğine bağlı olarak, farklı şiddette semptomları olan nörolojik bulguların gözlenmediği ve en sık görülen klinik tiptir. Akut nöronopatik olarak tanımlanan tip 2 GH, bir yaş civarında kaybedilir. Subakut nöronopatik olarak tanımlanan tip 3 GH, çocukluk çağına ortaya çıkan ve nörodejeneratif bozukluğu yavaş ilerleyen bir tiptir (Lo ve ark., 2012, Zahran ve ark., 2017).

Tip 1 hastaları asemptomatik olabilir ve genelde 30 yaş ve üstü ortaya çıkmaktadır. Tip 1 GH, hepatosplenomegali, anemi, trombositopeni ve kemik tutulumu ile kendini gösteren nöropatik olmayan form olarak tanımlanmaktadır. Tip 1 GH, en sık karşılaşılan tipi olup, tip 1 Gaucher hastalarına yönelik mevcut tedavi seçenekleri, enzim replasman tedavisi ve substrat azaltma tedavisidir. Tip 2 ve 3 ise merkezi sinir sistemi tutulumuna sahiptir ve genellikle nörolojik semptomların hızı ve ilerlemesi ile ayırt edilir. Tip 2 yaşamın ilk üç yılında hızlı nörolojik düşüş ve sonrasında ölüm ile sonuçlanırken, tip 3

ergenlik döneminde nörolojik düşüş ile ortaya çıkar. Genellikle, GH'nın her 3 tipi de hepatosplenomegali, anemi, trombositopeni ve kemik tutulumu ile karakterizedir. (Hassan ve ark., 2017, Siebert ve ark., 2014).

2.2.3. Gaucher Hastalığı Tedavisi

Enzim replasman tedavisi (ERT) Roscoe Brady tarafından ilk kez 1966'da önerildi. ERT 1974'te ilk kez saflaştırılmış plasental glukoserebrosidaz enjekte edilerek uygulandı. 1980'lerde makrofajları hedeflemek üzere modifiye edilen enzim, 1991'de tip 1 Gaucher hastalığında kullanıldı. ERT hastalara intravenöz olarak verilen rekombinant enzimin hücre dışı sıvıda bulunan lizozomal hidrolazları almasından sonra; bunları lizozomlarına taşınması şeklinde işlevini gerçekleştirmesini sağlar. Bu enzim hastalara haftalık veya iki haftada bir intravenöz infüzyonla uygulanır (Lachmann 2020). Gaucher hastalarında kullanılan ERT uygulanan temel tedavi şeklidir. Kurulan ERT formu makrofaj yönelimli ERT'dir. ERT'nin terapötik kullanım amacı karaciğer ve dalak büyüklüğünün azaltılması, hematolojik parametrelerin iyileştirilmesi ve kemik ağrısının azaltılmasına yönelik olarak kullanılmaktadır. Dalak ve karaciğer boyutunun azaldığı ve sitopeninin 6 aylık tedaviden sonra iyileştiği görülmektedir (Zahran ve ark., 2020).

Tip 1 GH, ERT ile plasental kaynaklı glukoserebrosidaz (Alglucerase, Ceredase) ve 1994'te rekombinant glukozerebrosidaz (İmiglucerase, Cerezyme) ile başarıyla tedavi edilen ilk hastalıktı. Cerezyme'ye ek olarak, şu anda ABD ve Avrupa'da GH'nın tedavisi için iki farklı ERT daha mevcuttur; Velaglucerasealfa (VPRIV) ve Elelyso (Taliglucerase alfa). Ayrıca günümüzde ERT'ne ek olarak iki küçük moleküllü olan substrat indirgeme terapisi (SRT) de uygulanmaktadır. SRT olarak, Cerdelga (Quallustat) ve Zavesca (Miglustat) olmak üzere iki farklı ilaç uygulaması bulunmaktadır (Drelichman ve ark., 2020).

2.2.4. Gaucher Hastalığı Etolojisi

GH ilk kez 1882'de Phillippe Gaucher tarafından tanımlanan en yaygın resesif kalıtılan lizozomal lipid depo hastalığıdır. İnsanlarda kromozom 1q21 üzerinde bulunan glukoserebrosidaz geni 7,5 kb (kilobaz) uzunluğunda, lizozomal bir enzim olan

glukoserebrosidazı kodlamaktadır. Bu enzim glukoserebrosidi glikoza ve seramide hidroliz eder. Glukoserebrosidaz genindeki mutasyonlar, GBA enzim eksikliğine neden olarak makrofajların lizozomlarında glukoserebrosid birikimine yol açar ve sonuçta çoklu organ tutulumu ile sonuçlanır (Lal ve Sidransky 2017). GH, GBA enzim eksikliğine bağlı olarak, endojen ve eksojen membranlardan kaynaklanan kompleks glikosfingolipidlerin dönüşümü nedeniyle mononükleer fagositlerin lizozomlarında bol miktarda glukoserebrosid birikmesine yol açar. Doku makrofajlarının lizozomlarında glukoserebrosid birikimi, makrofaj aktivasyonu ve sitokinlerin salgılanmasına neden olur. Bu sitokin salınımı, GH'da kronik B hücresi stimülasyonuna neden olmaktadır (Mistry ve ark., 2013).

Otozomal resesif bir şekilde aktarılan GH, Aşkenazi Yahudilerinde en sık görülen mutasyonlar N370S ve 84GG mutasyonlarıdır. N370S mutasyonu homozigot olup genellikle hastalığın çok hafif bir formuna sahiptir. N370S mutasyonunun heteroalelik varlığı, yalnızca nöronopatik olmayan hastalıkla ilişkilidir. 84GG mutasyonunu taşıyan alleller, herhangi bir proteinin sentezini yönetemezler ve bu nedenle, bu mutasyon hiçbir zaman homozigot durumda bulunamamıştır. N370S ve 84GG mutasyonunun kombinasyonu, nispeten şiddetli hastalığa neden olmaktadır. Kafkas hastalarında en yaygın mutasyonlar N370S ve L444P'dir. L444P mutasyonu için homozigotluk, hastalığın nöropatik formları ile ilişkilidir (De Fost ve ark., 2003). GH'deki genotip-fenotip korelasyonunu, aynı genotipi paylaşan bireylerde, kardeşlerde hastalık belirtileri, klinik seyir ve tedaviye yanıt açısından farklılık gösterebilmektedir (Lal ve Sidransky 2017).

2.2.5. Gaucher Hastalığı ve Kanser İlişkisi

Kanser türleri arasındaki çeşitli farklılıklara rağmen belirli özellikler paylaşmaktadır. Kanser anormal, kontrolsüz bir doku büyümesi olarak tanımlanır. Gelişmiş ülkelerde kanser tüm ölümlerin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır bu nedenle önemli bir sağlık sorunudur. Kanserın ayırteıcı özellikleri proliferatif sinyalleme, apoptozdan kaçış, kanser büyüme baskılayıcılardan kaçınma, sürekli anjiyogenez ve metastaz oluşturma, immün gözetimden kaçınma, genomik kararsızlık, düzensiz hücresel enerji ve tümör teşvik edici inflamasyonu içermektedir. Tümör oluşumunu teşvik eden genetik

düzensizlik spektrumu, gen aktivasyonunu veya inaktivasyonunu ve gen ekspresyonundaki değişiklikleri içermektedir (Jamieson ve ark., 2015, Macheret ve Halazonetis 2015, Taylor ve Lindsay 2016).

Patofizyolojik temeli bilinmemekle beraber tip 1 Gaucher hastalarında hematolojik ve hematolojik olmayan malignite ve tekrarlayan malignite riskinde artış olduğu üzerinde durulmaktadır. GH'daki malignitenin patogenezinde, aktive edilmiş makrofajlar, endoplazmik retikulum stresi, splenektomi, lizozomal fonksiyon bozukluğu gibi mekanizmalar bulunduğu öne sürülmektedir. Ayrıca, *in vitro* çalışmalar, glukoserebrosidin hücrel birikiminin, kanser ilerlemesine elverişli olduğunu göstermiştir (Lo ve ark., 2012). Böylece, GH'nın, başta MM olmak üzere lenfoma, lösemi, HCC, renal karsinom, glioblastom, ve akciğer kanseri gibi bazı kanserlerin gelişme riskini arttırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Arends ve ark., 2013, Barth ve ark., 2013, Costello ve ark., 2006, Lo ve ark., 2012, Mistry ve ark., 2013, Wątek ve ark., 2019). Ancak, Gaucher hastalarının tedavisi MM ve HCC riskini azaltmaktadır (Barth ve ark., 2013). Bununla birlikte, GH ile kanser ilişkisinde sfingolipitlerin birikimi ve immün cevabın azalması üzerinde durulsa da hala açıklığa kavuşturulmayı bekleyen bir çok soru vardır.

MM, plazma hücrelerinin malign proliferasyonu ile karakterize hematolojik malignitelerden biri olup ikinci en yaygın hematolojik malignansidir. Kemik iliğinde klonal büyüme ve malign plazma hücrelerinin birikmesi ve serumda ve/veya idrarda monoklonal immünoglobülin varlığı ile karakterize B-hücreli hastalıktır. MM hastalarında başlangıçta hiçbir semptom gözlenmez. Ancak, yaşla beraber hastalığın gelişmesiyle birlikte anemi, kemik ağrısı ve sık sık enfeksiyon ortaya çıkar. MM konusunda çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, MM etiyojisi hala tam olarak bilinmemektedir (Costello ve ark., 2006, Federico ve ark., 2019, Zhang ve ark., 2019). GH'da gözlenen hematolojik malignansiler arasında en sık rastlanılanı MM olmasına rağmen, daha az sıklıkla olsa da akut lenfoid lösemi (ALL), kronik lenfoid lösemi (KLL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML), Hodgkin's lenfoma ve non-Hodgkin's lenfoma da görülebilmektedir (Mistry ve ark. 2013, Wątek ve ark., 2019). Ayrıca GH ve kanser ilişkisinde, hematolojik maligniteler içinde MM riskinin genel popülasyona kıyasla yaklaşık 37 kat fazla olduğu tahmin edilmektedir (Mistry ve ark., 2013).

HCC, dünya çapında en sık görülen malignitelerden biridir. HCC ilişkili olarak her yıl dünya çapında 60.000'den fazla ölüm meydana gelmektedir. Ayrıca her yıl yaklaşık olarak 750.000 yeni tanı konulmaktadır. HCC gelişiminde, hem hepatit B hem de hepatit C gibi viral enfeksiyonlarını da içeren, çevresel ve genetik faktörler rol oynamaktadır. Bununla birlikte, belirsiz semptomlar ve hassas moleküler biyobelirteçlerin eksikliği nedeniyle, HCC'nin erken teşhisi zordur (Wang ve ark., 2019).

Lenfoma, bir milyondan fazla insanı etkileyen, dünyadaki en yaygın beşinci kanser türünü temsil eden B veya T hücrelerinden kaynaklanan lenfatik sistem kanseridir. Lenfomalar, sunum, prognoz ve patogenezi çeşitlenen heterojen bir grup kanserdir. Genel olarak Hodgkin lenfoma ve Hodgkin olmayan lenfoma olarak sınıflandırılan lenfomalar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasının en son versiyonunda, çoğu B-hücreli lenfoma olan, ancak çok farklı klinik özelliklere ve tedavi şekillerine sahip olabilen 100'den fazla lenfoma tipi olarak sınıflandırılmıştır. Kronik lenfositik lösemi dünya çapında en yaygın hematolojik malignitedir. Periferik kandaki ve kemik iliğindeki tümör hücrelerinin varlığı nedeniyle lösemi olarak adlandırılmasına rağmen, ayrıca düşük dereceli bir lenfoma olarak da sınıflandırılır. Foliküler lenfoma Avrupa ve ABD'de tüm lenfomaların %20'sinden fazla olup en yaygın olanı indolent B-hücre lenfoma tipidir (Solé ve ark., 2017, Solé ve ark., 2018). Ayrıca MM ve B hücreli lenfomaların sıklığı 50 kata kadar çıkmaktadır ve bu kanserler Gaucher hastalığında günümüzde en önemli ölüm nedenidir. B hücrelerinin klonal genişlemesini indükleyen ve bu hastalıkta eş zamanlı malignansiye indükleyen etmenler daha tam olarak anlaşılmalıdır (Pavlova ve ark., 2013).

Lösemi, hematopoetik kök hücrelerin anormal proliferasyonundan ve farklılaşmasından kaynaklanan önemli bir hematolojik malignansi grubudur (Zhang ve ark., 2018). Lösemi, özellikle çocuklarda, dünyada ana ölüm nedenlerinden biridir. AML, ALL, KML ve KLL dört yaygın lösemi türüdür. Ayrıca KLL insanlarda en sık görülen lösemi tipidir (Hajizamani ve ark., 2017, Pekarsky ve Croce 2019).

GH lizozom içinde anormal glukozilseramid birikimi ile sonuçlanmasıyla, miyelom, lösemi, glioblastoma, akciğer kanseri ve hepatoselüler karsinom vakaları ile ilişkilendirilmiştir, ancak güçlü bir korelasyon bildirilmesine rağmen korelasyonun

nedenleri hala tam olarak anlaşılmamıştır. Buna rağmen yüksek glukosilseramid ve seramidin kanserle ilişkilendirilmesi sağlanmıştır. GH'nın kanserle ilişkilendirilmesi kanser biyolojisinde seramid ve glukosilseramidin rolleri hücrel ve moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır (Barth ve ark., 2013, Wątek ve ark., 2019). Maligniteler ve GH tip 1 arasındaki temel ilişki, kansere yatkın olmasının altında çeşitli potansiyel mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar arasında kronik inflamasyon, kronik B-hücre stimülasyonu, T hücre fonksiyonunda görülen anormallikleri, splenektominin potansiyel rolü, lizozomal disfonksiyon ve endoplazmik retikulum stresi yer alır. GH1'de kansere yatkınlığın altında yatan dört potansiyel mekanizma dikkate alınmıştır; GH'da biyoaktif lipidlerin birikmesi, makrofajların aktive edilmesi, glukosilseramid birikimi ile tetiklenen immün düzensizlik ve GH1/kanser fenotipinin geliştirilmesinde genetik modifikasyonların rolü (Mistry ve ark., 2013).

2.3. DNA Hasarı

Canlı organizmalarda genomik dizi bilgilerinin korunması, yaşamın sürekliliği için önemlidir. Temel kalıtım birimi olan DNA'nın kendiliğinden reaktif bir molekül olduğu ve endojen ve ekzojen ajanların kimyasal değişikliklerine karşı oldukça hassas oldukları bilinmektedir. DNA hasarın oluşumu oksidatif stres, telomer erozyonu, onkogenik mutasyonlar, genotoksik stres ve metabolik stres gibi çeşitli endojen veya eksojen nedenlerden kaynaklanabilir. DNA hasarı sonucu, metabolik organ fonksiyonlarının bozulmasıyla kanser, yaşlanma ve diyabet gibi hastalıkların başlamasına neden olur (Shimizu ve ark., 2014, Chatterjee ve Walker 2017). DNA hasarı sonucu oluşan kromozomal hasarının belirlenmesi için en sık kullanılan in vitro tekniklerinden biri olan insan lenfositlerinde MN testi geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Mitoz esnasında bölünen lenfositler MN olarak bu hasarı metafaz-anafaz geçişinde mitotik iğ ile etkileşime girmeyen tüm kromozomlarda veya kromozom parçalarından oluşan kromozomal anormallikler içermektedir. (Rodrigues ve ark., 2018).

Ayrıca, günümüzde malignansilerin kromozom hasarı ve spontan MN oluşumundaki artışlar ile karakterize olduğu iyi bilinmektedir. Mutajenler, karsinojenler, çeşitli hastalıklar ve stres ile birlikte MN sayısı artar. Bu nedenle kontrol hücrelere göre incelenen hücrelerde gözlenen MN sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik

kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, kanser riskinin belirlenmesi, tarama ve takibinde de MN, iyi bir biyobelirteç olarak da kullanılmaktadır (Choy 2001, Fenech ve ark., 2002, Olaharski ve ark., 2006, Bonassi ve ark., 2007, Fenech 2007, Bonassi ve ark., 2011, El-Zein ve ark., 2014). Böylece, Sitokinez-bloke mikronukleus sitom (CBMN-cyt) yöntemi ile kromozom instabilitesi/genom hasarı, hücre çoğalması, hücre ölümü tespit edilebilmektedir. Kısaca CBMN-cyt yöntemi ile, kromozom/DNA hasarı için; MN'lu (kromozom kırıkları ve/veya kromozom kayıplarını temsil eder), Nükleoplazmik köprülü (NPB, hatalı DNA tamirleri ve/veya telomer uç birleşmelerini gösterir) ve Nükleer budlu (NBUD; gen amplifikasyonlarını gösterir) binükleer hücreler sayılmaktadır. Hücre çoğalması için de; mononükleer, binükleer ve multi nükleer hücreler skorlanarak hücre çoğalma oranları (Nükleer bölünme indeksi; NBI) hesaplanmaktadır. Hücre ölümü için de; apoptotik ve nekrotik hücreler skorlanarak hücre canlılık oranı belirlenmektedir (El-Zein ve ark., 2014, Gundoğan ve ark., 2018, Bayram ve ark., 2019).

2.3.1. Sitokinez Bloke Mikronükleus (CBMN) Yöntemi

MN, kimyasal veya biyolojik genotoksinlere maruz kalınması sonucu DNA hasarının miktarını ölçmeyi içerir. Bu ajanlardan kaynaklanan kromozomal hasarı tanımlamak ve ölçmek için en yaygın kullanılan in vitro tekniklerden biri, insan lenfositlerinde MN yöntemidir. Mitoz sırasında kromozomal anormallikler içeren lenfositler bu hasarı genellikle MN olarak ifade eder. MN, metafaz-anafaz geçişinde mitotik iğ iplikleri ile etkileşime girmeyen tüm kromozomlardan veya kromozom parçalarından oluşur. Sonuç olarak, kromozomlar veya kromozom fragmanları, mitozun tamamlanmasında ana yavru çekirdeklerden hiçbirine dahil olmaz ve hücreler nükleer bölünmeyi tamamladığında MN olarak ifade edilir. CBMN yönteminde bir kez bölünmüş hücreler, sitokinezin tamamlanması için gerekli bir mikrofilaman halkası inhibitörü olan sitokalin-B (Cyt-B) ile sitokinezi bloke ettikten sonra iki çekirdekli (BN) hücreler olarak ayırt edilir (Fenech ve ark., 2003, Rodrigues ve ark., 2018).

2.3.2. CBMN-Cyt Yöntemi ile Hücreleri Tanımlama Kriterleri

MN frekansı değerlendirilebilmesi için sitokinez ile bloke edilmiş MN, NPB ve NBUD ve metafaz evresi hücreleri Fenech ve ark. (2003) tarafından belirlenen özelliklere göre tanımlanmıştır.

2.4. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS), fizyolojik süreçlerde, metabolik ve diğer biyokimyasal reaksiyonların bir parçası olarak organizmaların canlı hücrelerinde sürekli bir oluşum içerinsindedirler. Endojen olarak üretilen ROS önemli fizyolojik işlevleri yanı sıra reaktif yapıları nedeniyle hücre zarlarının, proteinlerin ve DNA'nın lipidlerinde oksidatif hasara neden olabilir. Ayrıca, UV radyasyonu, tütün dumanı, asbest ve kanserojen maddeler gibi eksojen faktörler, çeşitli koşullar altında ROS üretebilir. Bir dengesizlik oluştuğunda, oksidanlar DNA'ya aşırı oksidatif hasar üretir ve bu da yaşlanmaya, kötü huylu tümörlere ve diğer dejeneratif hastalıklara katkıda bulunur (Valavanidis ve ark., 2009). Hidroksil radikalleri, DNA'da guanin molekülünün 8. pozisyondaki karbon atomu ile etkileşerek oksidasyona yol açar. Değişikliğe uğrayan DNA'nın oksidatif hasarı sonucunda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşmasına neden olur. 8-OHdG sitozin molekülü ile doğru eşleşme yaparken mutasyon sonucu adenin ile hidrojen bağı yaparak GC → AT (G → T) mutasyonuna neden olur. Mutasyon sonucu DNA replikasyonunun bloke edilmesiyle çeşitli T → C transisyon mutasyonuna yol açar (Burçak ve Andican 2004, Valavanidis ve ark., 2009).

Oksidatif DNA hasarı, şeker ve baz gruplarının serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından kaynaklanır. ROS canlı aerobik organizmalarda her yerde bulunur. Ya hücrelerin metabolizmasından ya da eksojen fiziksel kaynakların (örneğin iyonize radyasyon, UV-A) veya kimyasal bileşiklerin etkisinden kaynaklanırlar. ROS, DNA tek ve çift iplik kırılmalarına, baz modifikasyonlarına, abazik bölgelerinin oluşumuna ve DNA-protein çapraz bağlanmasına neden olarak DNA'da çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Ayrıca oksidatif DNA hasarının kanser ve yaşlanma gibi insan patolojilerinin etiyojilerinde rol oynadığını göstermektedir. Kanser durumunda, DNA'daki oksidatif hasarın, onkogenleri aktive eden veya tümör baskılayıcı genleri

inaktive eden mutasyonlara neden olduğu düşünülmektedir (Boiteux ve Radicella 1999, Pilger ve Rüdiger 2006). Biyolojik bileşenlerdeki oksidatif stres, çeşitli hastalıklara neden olan faktörlerden biri olarak kabul edilmiştir. Fizyolojik koşullarda, ROS konsantrasyonları dengelenemeyecek kadar yüksek olduğunda, proteinlerde, lipitlerde ve DNA'da oksidatif bir hasar oluşturmaktadır. DNA hasarları genellikle belirli bir sistem tarafından onarılır. 8-OHdG, ROS aracılı DNA hasarlarının onarımını takiben üretilir ve bu nedenle, DNA nükleobazları arasında en sık oksitlenen guanozin olduğu için, DNA'nın oksidatif hasarının en yaygın bilinen biyobelirteçlerinden biri olarak kabul edilir (Di Minno ve ark., 2017).

2.5. MikroRNA'lar

İnsan genomunun ~%70-80'inin proteinleri kodlamadığı ve bunların kodlanmayan RNA (ncRNA) molekülleri şeklinde kopyalamaktadır. miRNA'lar, 19-24 nükleotitden oluşan küçük kodlamayan RNA sınıfıdır. miRNA'lar, transkripsiyon sonrası seviyede mRNA moleküllerini doğrudan hedefleyerek gen ekspresyonunu baskılayabilen veya degrade edebilen kodlamayan küçük RNA molekülleridir. Tek bir miRNA birden fazla geni hedefleyebilir ve insan genlerinin üçte birinden fazlası korunmuş miRNA hedeflenmesi bu miRNA'ların hedef genlerini düzenleyerek neredeyse tüm hücrel süreçlere katıldığını göstermektedir. C. elegans'ta lin-4 ve let-7'nin ilk keşfinden bu yana, insanlarda 2500'den fazla miRNA bulundu ve tanımlandı. miRNA'ların anormal ekspresyonu veya işlevi çeşitli insan hastalıkları ile yakından ilişkisi bulunmaktadır. miRNA'lar böylece teşhis ve terapötik tedaviler için endojen kaynaklı biyobelirteç olarak ortaya çıkmaktadır. Hücre içi miRNA'lar ile ilgili hücrel süreçlerinin anlaşılması için miRNA'lar ile ilgili araştırmalar büyük önem taşımaktadır (Li ve Zhang 2019).

2.6. MiRNA ve Kanser

miRNA'lar plazma gibi vücut sıvılarında dolaşarak, kanser gelişimi de dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyokimyasal işlemlerle bağlantılıdır ve protein kodlayan genlerin ekspresyonunun %60'ının miRNA aktivitesi ile düzenlenebileceği tahmin

edilmektedir. Bu nedenle, miRNA'lar kanser teşhisi, prognostik, hastalığın izlemesi ve tedaviye yanıtın tahmin edilmesine yardımcı olabilecek kanser tipine özgü biyobelirteçler olarak ortaya çıkmaktadır (Bidarra ve ark., 2019). Onkogenler, hücre proliferasyonunu, apoptozu veya her ikisini kontrol eden proteinleri kodlar. Kromozomal yeniden düzenlemeler, mutasyonlar ve gen amplifikasyonu ile onkogenlerin aktivasyonu bu tür değişiklikleri taşıyan hücrelerin büyümesi ve hayatta kalmasının artırır. (Croce 2008). Onkogenez sırasında bazı miRNA'ların malign hücrelerde ekspresyonu azalır. Buna neden olan genlerin tümör süpressör genler olarak kabul edilir. Tümör baskılayıcı miRNA'lar genellikle hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden onkogenleri veya genleri negatif olarak sınırlandırarak tümör gelişimini engeller (Mardani ve ark., 2019). Onkogenik miRNA'lar kanser hücrelerinden aşırı eksprese edilirken, tümör baskılayıcı miRNA'lar daha az eksprese edilmektedir. Onkogenik miRNA'ların inhibe edilmesi ve tümör baskılayıcı miRNA'lar uyarılması durumunda, kanser tipine ve etkilenen spesifik miRNA'ya bağlı olarak kanser hücresinin proliferasyonu, metastazı ve/veya hayatta kalması önemli ölçüde azalabilmektedir (Svoronos ve ark., 2016). miRNA'lar, hücre döngüsü kontrol noktalarını, hücre proliferasyonunu ve apoptoz gibi birçok genetik yolu etkilediğinden; ekspresyonlarının kontrolü önemlidir. miRNA'ların ekspresyonunda oluşabilecek düzensizlikler, miRNA'ların tümör süpressör gen veya onkogenler gibi davranmasına neden olarak kanser patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Tümör süpressör gen veya onkogen miRNA'lar, tümör gelişimini ve ilerlemesini kontrol etmesinde rol alması, çeşitli kanser türlerini tanımlanması için etkin tanısal ve terapötik yaklaşım olabilmektedirler (Zhang ve ark., 2007, Mishra ve ark., 2016).

miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-34a, miRNA-125b ve miRNA-195 gibi miRNA'ların kan kanserlerinde (MM, HCC, Lösemi ve Lenfoma) tümör süpressör olarak görev aldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Tablo 2.1). miRNA-17, miRNA-21, miRNA-150, miRNA-155 ve miRNA-181b gibi miRNA'ların ise MM, HCC, lösemi ve lenfoma gibi kanserlerde onkogen olarak görev aldığı gösterilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.1. Tümör süpressör olarak görev yapan miRNA'lar

miRNA TSG	KANSER TİPİ	HEDEF GEN	HÜCRESEL SÜREÇ	REF
miR-15a	B hücre NHL DLBCL CLL	Siklin D1, MCL-1, BCL-2, BAI2A, RNF41, RASSF5, MKK3, RIG1, TP53,	Apoptoz	Zheng ve ark., 2018, Zheng ve ark., 2014, Musilova ve Mraz 2015
	Lösemi CLL	BCL2, CXCL10	Apoptoz	Mardani ve ark., 2010, Di Marco ve ark., 2018
	MM	FGFR1, PIK3 α , PI3KC2A, MDM4, VEGF, CCND2	Apoptoz, Proliferasyon, Migrasyon, Anjiyogenez	Zhu ve ark., 2018, Alzrigat ve ark., 2018, Glavey ve ark., 2016
miR-16	B hücre NHL CLL MCL	Siklin D1, MCL-1, BCL-2, BAI2A, RNF41, RASSF5, MKK3, LRIG1, CCND1, TP53	Proliferasyon, Apoptoz	Zheng ve ark., 2018, Zheng ve ark., 2014, Musilova ve Mraz 2015
	CLL, CML	BCL2	Proliferasyon, Apoptoz	Di Marco ve ark., 2018
	MM	FGFR1, PIK3 α , PI3KC2A, MDM4, VEGF	Proliferasyon, Apoptoz, Migrasyon, Hücre döngüsü, Anjiyogenez	Zhu ve ark., 2018, Alzrigat ve ark., 2018
	HCC	Bcl-2, Bcl-w	Apoptoz	Sartorius ve ark., 2018
miR-34a	Lenfoma	FOXP1, BCL2, BCL6, B-MYB, CDK6, ZAP-70, AXL	Pro-B \rightarrow Pre-B, Proliferasyon, Apoptoz, Hücre döngüsü, Progresyon	Zheng ve ark., 2018, Musilova ve Mraz 2015
	MM	NOTCH1, BCL2, CDK6	Proliferasyon, Apoptoz	Zhu ve ark., 2018, Alzrigat ve ark., 2018
miR-125	MM	P53, IRF4	Proliferasyon, Apoptoz	Zhu ve ark., 2018
	HCC	MMP11, SIRT7, EGF-A, LIN28B2, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w	Anjiyogenez, Metastaz, Proliferasyon, Apoptoz	Khare ve ark., 2013, Sartorius ve ark., 2018
miR-195	HCC	CDK6, Siklin D1, CBX4, Wnt3a, VEGF, VAV2, CDC42, E2F3, LATS2	Hücre döngüsü, Apoptoz, Anjiyogenez, Metastaz	Sartorius ve ark., 2018

Tablo 2.2. Onkogen olarak görev yapan miRNA'lar

miRNA Onkogen	KANSER TİPİ	HEDEF GEN	HÜCRESEL SÜREÇ	REF
miR-17	Lenfoma ALL	Bim, CYLD, p21, HOXA9, BIM, RUNX1, MYC, BIM, PTEN, E2F1, PHLPP2, CD22, FCGR2B, PTEN	pro-B→pre-B, Proliferasyon, Apoptoz	Tagawa ve ark., 2013 Musilova ve Mraz 2015, Zheng ve ark., 2018, Ultimo ve ark., 2018,
	MM	BIM, SOCS1, IL- 17RA, IL- 17RE, IL- 17RC c-MYC	Apoptoz, Proliferasyon	Glavey ve ark., 2016 Zhu ve ark., 2018, Alzrigat ve ark., 2018,
	HCC	C-Myc, E2F	Hücre Döngüsü, Apoptoz	Sartorius ve ark., 2018
miR-21	Lösemi Lenfoma NHL	PTEN/AKT, PI3K/Akt/mTOR-(PTEN), PDCD4	Apoptoz, Proliferasyon, İnvazyon	Mei ve Zhang 2019, Zheng ve ark., 2018, Ultimo ve ark., 2018, Zheng ve ark., 2014, Musilova ve Mraz 2015, Medina ve ark., 2010
	MM	IL-6, PTEN, OPG, PIAS3	Onkogen	Alzrigat ve ark., 2018
	HCC	PTEN, PHOB, MAPK2K3, PDCD4, HEPN1, hSulf-1, DCC6	Proliferasyon, Migrasyon, İlaç direnci, Metastaz	Toh ve ark., 2019, Khare ve ark., 2013, Tao ve ark., 2018, Sartorius ve ark., 2018
miR-150	Lenfoma ALL NK/T-hücre Lenfomaları	c-Myb, MYB, FOXP1, CXCR4, GAB1, DKC1, AKT2, PI3K-AKT	pro-B→pre-B, Telomeraz, Senesens, Apoptoz	Zheng ve ark., 2018, Ultimo ve ark., 2018, Musilova ve Mraz 2015, Tagawa ve ark., 2013 Watanabe ve ark., 2011
miR-155	Lösemi, Lenfoma, ALL	PTEN/AKT, p21, p27, IL-6, IL-13, TNF, C/EBPβ, HGAL, RTKN2, SMAD5, SOCS1, MAFB, SHANK2, SH3PXD2A, PU.1, AID, SHIP1,	Apoptoz, Th Tip 1 hücre farklılaşması, B-hücre proliferasyon	Mei ve Zhang 2019, Zheng ve ark., 2018, Ultimo ve ark., 2018, Musilova ve Mraz 2015, Tagawa ve ark., 2013
	HCC	E-caderin, c-Myc PhoA, TLR, APC, ATIR, AHIPI, C/EBP Beta, SOX6	İnvazyon Metastaz, Proliferasyon	Han ve ark., 2018, Khare ve ark., 2013, Tao ve ark., 2018, Sartorius ve ark., 2018
miR-181b	CLL	TCL1, BCL2, MCL1, AID	Apoptoz	Musilova ve Mraz 2015
	MM	PCAF	Apoptoz, Proliferasyon	Zhu ve ark., 2018
	HCC	TIMP3	Proliferasyon	Sartorius ve ark., 2018

2.7. İmmün Sistem Hücreleri

2.7.1. İnnate Lenfoid Hücreleri (ILC)

ILC hücreleri enflamasyonun başlatılması, düzenlenmesi ve çözülmesinde önemli rol oynayan immün sistem hücreleridir. ILC'ler lenfoid dokularda nadir bulunmasına karşın, epitelyal bariyerlerin bütünlüğünün korunmasını ve yenilenmesine katkıda buldukları mukoza zarlarında ve ciltte zengin bir şekilde bulunmaktadır. T ve B lenfositlerinden farklı olarak, ILC hücreleri antijen reseptörleri eksprese etmezken yabancı patojenlere yanıt vermezler. ILC hücreleri tarafından üretilen sitokinler, adaptif immün yanıt üzerinde etki gösteren miyeloid dendritik hücreleri aktive ederler (Zwirner ve ark., 2003, Eken ve Donmez-Altuntas 2016).

ILC hücreleri, adaptif bağışıklık sistemin T hücrelerinden ve B hücrelerinden, klonotipik antijen reseptörlerinin eksikliği ve DNA yeniden düzenleme mekanizmalarından rekombinasyon aktive edici gen 1 (Rag1) veya Rag2'yi bağımsız bir biçimde ayırt edebilen yeni bir lenfosit alt familyasıdır. Morfolojik olarak, ILC'ler CD127'yi (IL-7Ra olarak da bilinir) eksprese eden yaygın lenfoid progenitörlerinden (CLP) gelişirler. ILC'ler, immün savunması, inflamasyon ve doku yeniden şekillenmesinde önemli rolleri olan efektör lenfoid hücrelerdir. ILC'ler, ilişkili sitokinleri ve transkripsiyon faktörlerini temel alarak ILC1, ILC2 ve ILC3 olarak adlandırılan 3 ana alt grubu bulunmaktadır. Her biri ayrı transkripsiyon faktörleri tarafından yönlendirilen spesifik sitokin profillerine sahiptir. ILC1'lerin öncelikle IFN- γ sitokini, IL-12 ürettiği ve transkripsiyon faktörü T-bet'e bağlı olduğu gösterilmiştir; ILC2'ler IL-13, IL-5 ve bazı IL-4 üretir ve bunların farklılaşması GATA bağlayıcı protein 3'e (GATA3) transkripsiyon faktörü tarafından yapılmaktadır. ILC3'ler Ror γ t'i eksprese ederek IL-22 ve IL-17'yi üretir. Bununla birlikte, immün yanıt oluşturmada adaptif immün yanıtın tamamen farklılaşmasında aktivasyonu uzun sürmesine karşın, ILC'lerin aktivasyonu çok daha kısa bir sürede gerçekleşmektedir (Boyd ve ark., 2014, Serafini ve ark., 2015).

Ayrıca ILC hücreleri, T helper hücrelere fenotipik ve fonksiyonel olarak benzerlik göstermektedir. ILC1'ler TH1 tipi sitokinler (IFN- γ gibi) üretir ve NK (doğal öldürücü) hücreleri ve diğer IFN- γ üreten ILC'leri içerir. ILC2'ler TH2 tipi sitokinler (IL-5 ve IL-13 gibi) üretir. ILC2'ler doğal yardımcı hücreler, monositler ve doğal yardımcı 2

hücrelerini içerir. ILC3'ler, TH17 tipi sitokinleri üreten (IL - 17A ve IL - 22) lenfoid doku indükleyici (LTi) hücreleri ve mukozal doğal sitotoksik reseptörü (NCR) içeren bunların gelişimi ve işlevleri için transkripsiyon faktörü ROR γ t'a bağlı olan çeşitli fenotiplerde farklı alt subsetleri içerirler (Spits ve ark., 2013, Serafini ve ark., 2015).

ILC2'ler akciğer alerjisi ve iltihabı sırasında patojenik bir rol oynamaktadır. ILC2'lerin, aktif dendritik hücrelerin Th2 farklılaşmasına primer oldukları drenaj lenf düğümüne göç etmesini sağlayarak IL-13'ün salgılanması sonucu alerjik akciğer iltihabını başlattığı gösterilmiştir. Farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalar, akciğer yerleşik ILC2'lerin KOAH sırasında ILC1 fenotipi ile birlikte ve IFN- γ sitokinini salgıladığını gösterilmiştir (Kotas ve Locksley 2018). Astım hastalarında lenfoid hücrelerden olan ILC2 hücreleri önemli bir rol oynamaktadır. Akciğer dokusunda baskın bir şekilde bulunan ILC2 hücreleri epitelyal sitokinlerin (TSLP, IL-33 ve IL-25) salınmasına neden olarak hava yolu epitelinin hasar görmesine, antijenden bağımsız bir şekilde ILC2'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktive edilmiş ILC2, önemli miktarda tip 2 sitokin (IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13) üreterek hava yollarında tip 2 inflamasyonuna katkıda bulunur (Sadik ve ark., 2021). Başka bir çalışmada ILC3'lerin, üçüncül lenfoid yapıların oluşumunu sağlayarak koruyucu rol oynayabilecekleri insan küçük hücreli dışı akciğer karsinom dokularında toplandığı gösterilmiştir (Carrega ve ark., 2015). Kolorektal kanser hastalarında yapılan bir çalışmada ise kontrol bireylerde ILC1, ILC3 ve ILC3/NK hücreleri bulunurken ancak kanser hastalarında ILC2 hücreleri gözlemlenmemiştir (Qi ve ark., 2021). Sitokin kaynağı olan doğuştan gelen lenfoid hücreler, hastalığın erken evrelerinin ilerlemesinde ve hasar sırasında doku onarımında önemli rol alabilir. Bu nedenle, ILC aileleri immün aktivasyonda ve doku sürekliliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. ILC-1 hücreleri IL-2, IL-12, IL-18 ve IL-21 sitotoksik aktivitesi ve salgılanması ile tümör gelişimini azaltma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Poniewierska-Baran ve ark., 2021). Bu bilgiler ışığında, ILC ve ILC alt popülasyonlarının hastalıkların patogenezinde önemli katkıda bulunduğu ve hastalığın gelişiminde ve önlenmesinde koruyucu bir rol üstlendiği düşünülebilir.

2.7.2. T Foliküler Helper (TFH) Hücreleri

T lenfositleri, farklı T hücre reseptörlerinin aracılık ettiği moleküle özgü tanıma yoluyla bağışıklık sisteminde ayırt edici bir rol oynamaktadır. Adaptif immün sisteminin bir parçası olan CD4+ T helper hücreleri, koruyucu immüno regülasyonun düzenlenmesinde ve çeşitli patojenlere karşı bağışıklık savunmasında kritik bir role sahiptir. Th1, Th2 ve Th17 ve TFH hücreleri farklı T helper hücre alt gruplarını oluşturarak spesifik patojene göre immün yanıtın düzenlenmesini sağlar (Ichimiya ve ark., 2017, Maul ve ark., 2018). TFH hücreleri esas olarak lenf düğümleri ve dalaktaki B hücre foliküllerinde bulunur. TFH hücreleri, ikincil lenfoid organların germinal merkezlerinde B hücrelerine yardım eden bir CD4+ T hücresi alt kümesidir. TFH hücreleri, germinal merkezde meydana gelen hücrel reaksiyonları düzenleyerek humoral bağışıklığın geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Crotty 2011, Hetta ve ark., 2020, Zhu ve Zhu 2020, Law ve ark., 2021). TFH hücreleri, IL-21 sitokini, B hücresi lenfoma 6 (Bcl6) transkripsiyon faktörünün, CXCR5 kemokin reseptörü tip 5'in (CXCR5) ekspresyonu ile karakterize olan bir CD4+ T subsetidir (Serr ve Daniel 2018). Ayrıca Programlanmış ölüm-1 (PD-1), indüklenebilir T hücre kostimülatör (ICOS), SLAM adaptör proteini (SAP proteini) ve B ve T-lenfosit zayıflatıcı (BTLA) dahil olmak üzere birçok molekül, TFH hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve TFH hücrelerini karakterize etmek için kullanılmıştır (Liu ve ark., 2013). TFH hücreleri, germinal merkezlerinde antikor cevabının oluşturulması, B hücrelerinin germinal merkezdeki çoğalmasını, olgunlaşmasını ve plazma hücrelerine farklılaşmasını sağlamaktadırlar (Kuo ve ark., 2019, Hetta ve ark., 2020).

Farklı aşamalardan ve karmaşık bir süreç içeren TFH hücre farklılaşması genellikle iki antijen sunan hücreler (APC) tarafından sunulan dendritik hücreler ve B hücreleri ile sağlanır. Dendritik hücreler erken TFH farklılaşması için gereklidir, B hücreleri ise belirli koşullar altında TFH hücre yanıtlarını düzenler. TFH hücrelerinin yardımı, B hücrelerinin aktivasyonu, antikor afinite değişimi ve germinal merkez oluşumu için kritik bir öneme sahiptir (Crotty 2011, Schmitt ve ark., 2014). Naif CD4+ T hücrelerinin farklı hücre tiplerine farklılaşması, sitokin durumuna ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile belirlenir. TFH hücre farklılaşması için gerekli transkripsiyon faktörü olarak Bcl-6, B hücresi yardımı ve germinal merkez oluşumu için gereklidir. Bcl-6 eksikliği olan T hücreleri, TFH hücrelerine farklılaşmada başarısız olurken, Bcl-6'yı

eksprese eden T hücreleri, TFH hücrelerine farklılaşabilmektedir (Qiu ve ark., 2017). Bcl-6, IRF4, c-Maf, Batf ve STAT3/5 tarafından transkripsiyonel düzenleyiciler TFH farklılaşmasını sağlar (Liu ve ark., 2013). TFH hücrelerinin farklılaşmasının IL-21, IL-6 sitokinleri ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörüne (STAT3) bağlı olduğu rapor edilmiştir (Shao ve ark., 2020). TFH hücreleri, GC (germinal merkez) reaksiyonu yoluyla yüksek afiniteli bellek B hücrelerinin üretilmesini sağlar. TFH hücreleri, ikincil lenfoid organlardaki GC'lerde bulunur ve yardımcı işlevleriyle ilişkili birçok özellikler gösterir. TFH hücreleri, B hücre foliküllerine göçlerine rehberlik eden kemokin reseptörü CXCR5'i eksprese eder. TFH hücreleri ve onların öncülleri tarafından salgılanan IL-21, B hücrelerinde farklılaşmayı ve afinite değişimini sağlar. TFH hücrelerinin yüzeyindeki CD40 ligandı (CD40L), CD40 aracılığıyla B hücrelerine sinyaller sağlar ve B hücresi farklılaşmasını ve afinite geçişini indükler. Sinyal adaptörü SLAM ile ilişkili protein, TFH hücre farklılaşması için gerekli olan stabil T ve B hücre etkileşimleri için önemli bir rol oynar (Schmitt ve ark., 2014).

TFH hücrelerinin deregülasyonu patojenik bir otoantikor üretilmesine ve otoimmün hastalıkların oluşmasında önemli bir rol oynayabilir (Gensous ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda, TFH ile ilişkili genlerin daha yüksek ekspresyonu meme kanseri ve kolorektal kanserde daha iyi prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Evre II ve IV arasındaki kolorektal kanser hastalarında ve sağlıklı kontroller ile yapılan çalışmada CD4+CXCR5+ TFH hücrelerinin seviyesinin evre II kolorektal kanser hastalarında önemli ölçüde arttığını, evre III ve evre IV hastalarda giderek azaldığını gösterilmiştir. TFH CD4+CXCR5+PD-1+ hücrelerin sıklığı, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında daha artmış bulundu. IL-21'in ifadesi CD4+CXCR5+PD-1- TFH hücreleri, CD8+ T hücreleri tarafından CD107a ekspresyonunu ve IFN- γ ekspresyonunu desteklediği bulunmuştur. Bu veriler TFH hücrelerinin, IL-21'e bağlı olarak CD8+ T hücrelerinin efektör fonksiyonlarını güçlü bir şekilde geliştirdiğini göstermektedir (Shi ve ark., 2018). TFH hücrelerinin TH17-EAE'de (Deneysel otoimmün ensefalomyelit) rol oynamaktadır. TH17-EAE farelerinin merkezi sinir sistemi dokularında çok sayıda CXCR5+PD1+CD4+ TFH hücresi eksprese etmektedir. TFH hücreleri üzerinde CXCR5 için kemokin ligandı olan CXCL13'e karşı bir antagonistik antikor kullanılması, Anti-CXCL13 tedavisinin TH17-EAE hastalığını önemli ölçüde azaldığını sağlamıştır. Bu tedavi, CD4+ T hücrelerinin merkezi sinir sistemine girmesini

engellemektedir. Bu veriler, TFH hücrelerinin, TH17-EAE'de inflamatuvar bir B hücre yanıtına bulunmakta ve MS gibi nöro-otoimmün hastalıkların tedavisi olarak TFH hücrelerinin hedefyeleceğini göstermektedir (Quinn ve ark., 2018). Başka bir çalışmada Atopic dermatit'li çocuklarda, Atopic dermatit'li yetişkinlere ve kontrollere kıyasla ICOS TFH ve ICOS PD1 TFH hücrelerinin seviyesi artmış bulundu. IL-21 serum düzeylerinde bir fark olmamasına rağmen, IL-21 üreten TFH absolute hücre sayıları Atopic dermatit'li çocuklarda önemli ölçüde artmış ve hastalık aktivitesiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Szabó ve ark., 2017). Niu ve ark.'ları Sedef hastalığı olan hastalarda TFH hücrelerinin IL-21 düzeylerini yüksek bulmuştur. Sedef hastalığı hastaların periferik kanında TFH hücrelerinin ve aktive B hücrelerinin seviyeleri artması ve hastalık şiddeti ile pozitif korelasyon gösterildiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar, TFH hücrelerinin ve aktive B hücrelerinin Sedef hastalığı patogenezinde rol oynayabileceği göstermektedir (Niu ve ark., 2015). Fan ve arkadaşları tarafından MS hastalarının sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında dolaşımdaki CD3+CD4+CXCR5+CD45RA-, ICOS+, CCR7+ ve CCR7+ICOS+ bellek TFH hücreleri ve plazma IL-21 düzeyleri MS hastalarında önemli ölçüde artmış bulundu. Bu verilerin dolaşımdaki bellek TFH hücrelerinin, özellikle CCR7+ICOS+ bellek TFH hücrelerinin, MS ile ilişkili olabileceğini ve yeni bir terapötik hedef olabileceğini göstermiştir (Fan ve ark., 2015). Liu ve arkadaşları Romatoid artrit (RA) hastalarında IL-21 düzeylerinin sağlıklı kontrollerden önemli derecede yüksek buldu. Ayrıca periferik CXCR5+PD-1+CD4+ TFH benzeri hücrelerin sıklığı RA hastalarında belirgin şekilde artmış bulundu. Hem TFH benzeri hücrelerde hem de B hücrelerinde IL-21R ekspresyonu, RA hastalarında önemli ölçüde arttı. IL-21, B hücresinin farklılaşmasını ve RA hastalarında daha yüksek IgG ve IgM üretimini sağladığı bulunmuştur (Liu ve ark., 2012). Yukarıdaki literatür bilgisine göre, TFH hücrelerinin ve alt popülasyonlarının farklı hastalıkların patogenezinde önemli roller alabildiği anlaşılmaktadır.

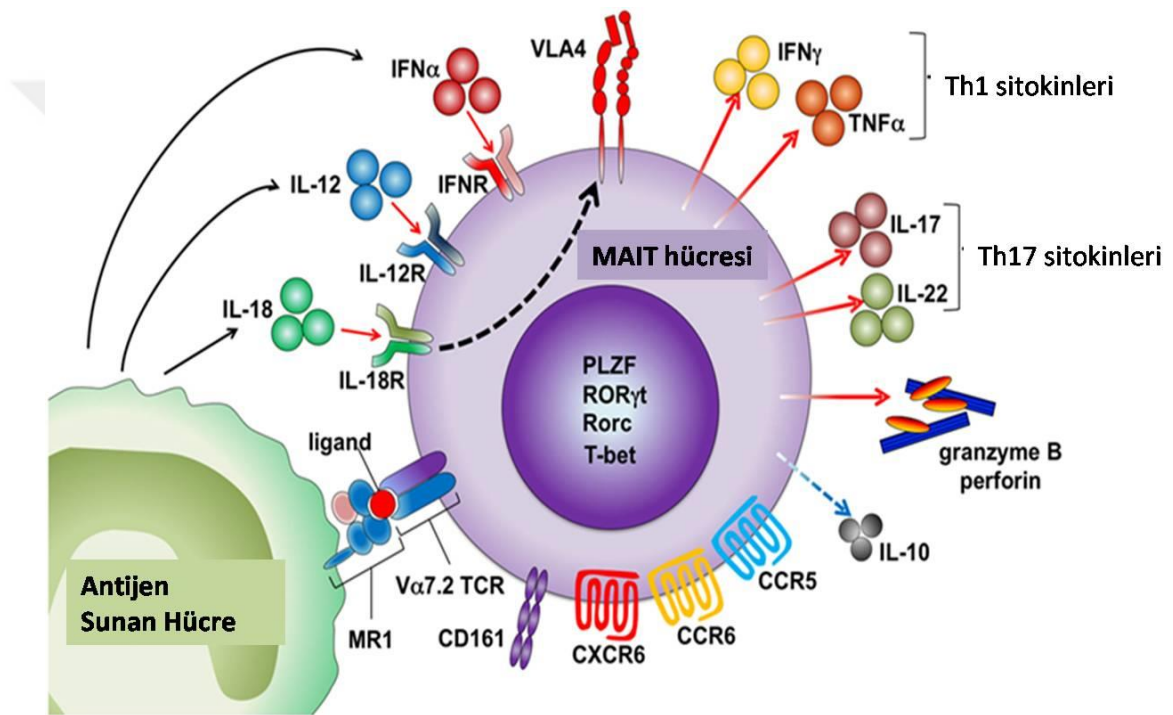
2.7.3. Mukozal İlişkili İnvariant T (MAIT) Hücreleri

MAIT hücreleri kan dolaşımında ve mukozal dokularda bulunan, çoğu memeli türünde yüksek oranda korunmuş bir $\alpha\beta$ T hücresi alt grubunu oluşturmaktadır. MAIT hücreleri, antijen sunum fonksiyonuna sahip MR1 (MHC-ilişkili protein 1) tarafından sunulan bakteriyel riboflavin (B2 vitamini) metabolitlerinin T hücre reseptörü (TCR) aracılığıyla tanınmasını sağlayan hücreleridir. MAIT hücreleri, MHC ile ilişkili protein MR1 (MR1 geni, insanlarda Kromozom 1 üzerindeki CD1 genlerinden ~23 Mb uzakta bulunan MHC lokusunun dışında kodlanmıştır) düşük çeşitliliğe sahip bir T hücresi reseptörünü ifade eder. MAIT hücrelerini tanımlayan TCR yeniden düzenlemeleri, invariant bir $V\alpha$ zincirini, insanlarda $V\alpha 7.2J\alpha 33$ 'ü ve bir $V\beta$ repertuarını içerir. MAIT hücreleri insanlarda oldukça fazla bulunur, bu da dolaşımda $CD3^+$ T hücrelerinin %1-10'unu oluşturur ve mukozal dokularda daha da fazla bulunmaktadır. MAIT hücreleri, PAMP'lara (pathogen-associated molecular patterns) maruz kalmış APC'ler tarafından üretilen enflamatuar sitokinler tarafından aktive edilir (Winter ve ark., 2019, Zumwalde ve ark., 2020).

T hücreleri, antijen sunan moleküller tarafından sunulan antijenleri tanımaktadırlar. Çoğu T hücreleri, MHC sınıf II veya MHC sınıf I tarafından sunulan peptit antijenlerini tanıyan konvansiyonel $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinde bulunmaktadır. Bununla birlikte, konvansiyonel olmayan T hücreleri olarak da adlandırılan birkaç önemli T hücre popülasyonu, özel MHC sınıf I benzeri moleküller tarafından sunulan peptit olmayan antijenleri de tanımaktadır. Farklı T hücre popülasyonuna antijen sunan yüksek polimorfik MHC sınıf I moleküllerinden farklı olarak, bu MHC sınıf I benzeri moleküller monomorfiktirler. Bu monomorfik moleküller, T hücrelerini tanıyan korunmuş TCR repertuarlarına sahiptir ve genellikle sınırlı bir şekilde TCR β -zincir repertuarıyla eşleştirilmiş TCR α -zincirinden oluşmaktadır. Çoğu MAIT hücresi, $CD4$ veya $CD8$ koreseptörlerinin ifadesinden yoksundur. TCR aracılı aktivasyondan sonra MAIT hücreleri aktive edilmekte, bu da sitokin üretimi, sitotoksik efektör fonksiyonu, yer değiştirme ve proliferatif genişlemeye yol açar (Godfrey ve ark., 2019, López-Sagaseta ve ark., 2013).

Uyarılmış insan MAIT hücreleri, hem proinflamatuvar sitokinleri ($IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ ve $IL-17$) hem de sitolitik efektörleri (granzyme B) eksprese edebilirler (Şekil 2.3). MAIT

hücreleri hem bakteriyel hem de fungal kökenli mikrobiyal patojenlere karşı savunmada ve mukozal bütünlüğün korunmasında kritik rolleri olan insanlarda innate-like T hücrelerinin önemli bir bölümünü oluştururlar. MAIT hücreleri, antimikrobiyal bağışıklıkta rol oynayan ve doğal ve adaptif immün yanıtı arasında bir köprü görevi görmektedir. MAIT hücreleri ayrıca hem böbrek hem de beyin tümörlerinde bulunmakla beraber otoreaktivite göstermekte ve çeşitli otoimmün bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (Godfrey ve ark., 2019, Winter ve ark., 2019, López-Sagaseta ve ark., 2013).



Şekil 2.3. MAIT hücrelerinin aktivasyon şeması (Chiba ve ark., 2018)

MAIT hücrelerinin inflamasyon ve metabolik hastalıklara yol açmakta ve diğer birçok inflamatuvar ve oto-immün patolojideki rol olarak çeşitli organları etkileyen metabolik hastalıkların başlatılmasına neden olmaktadır. MAIT hücreleri Tip 2 diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklarda sağlıklı bireylere kıyasla önemli bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Bertrand ve Lehuen 2019). Yapılan başka bir çalışmada, deneysel sepsis sırasında MAIT eksikliği olan fareler mortaliteyi ve bakteri yükünü önemli ölçüde arttırmakta ve dokuya özgü IFN- γ ve IL-17a sitokin düzeyleri azalmaktadır. MAIT hücrelerinin klinik sepsis sırasında yüksek oranda aktive olurken işlevi azalmıştır.

Deneysel sepsis sırasında mortaliteye karşı koruyucu olan dokuya özgü sitokin yanıtlarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Trivedi ve ark., 2020). Duan ve arkadaşları HCC’de tümör eğitilmiş MAIT hücrelerinin, PD-1, CTLA-4, TIM-3 gibi inhibitör molekülleri önemli ölçüde up-regüle ettiğini ve IFN- γ ve IL17 sitokin üretimlerini ise önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır (Duan ve ark., 2019). Li ve arkadaşları, özellikle serum γ -glutamil transferaz veya trigliserit düzeyleri daha yüksek olan hastalarda, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)'nda dolaşımdaki MAIT hücrelerinin azaldığını ortaya koymuşlardır. NAFLD hastalarında dolaşımdaki MAIT hücrelerindeki IL-4 üretimi artarken IFN- γ ve TNF- α üretimi azalmıştır (Li ve ark., 2018). Kolon tümörlerinde, MAIT hücrelerinin IFN- γ üretmeleri önemli ölçüde azalmıştır (Sundström ve ark., 2015). Serviks kanseri olan hastalarda ileri evrelerde MAIT'lerin yüzdesinin daha da azalmış olduğu bulunmuştur (Huang ve ark., 2019). Yukarıdaki literatür ışığında, farklı hastalık gruplarında MAIT hücrelerinin ve bu hücreler tarafından üretilen sitokin seviyelerinin genelde azaldığı sonucuna varılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Invert Mikroskop (Leica)
- Light Cycler 480 Real Time-PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Flow sitometri cihazı (BD FACS Canto II)
- Otoklav (Alp, CL-40M)
- NF 800 santrifüj (Nüve A.Ş. Ankara, Türkiye)
- Mikroskop (Nikon Labophot-2 ve Zeiss Primo-Star model)
- Pipet Tabancası (Gilson)
- Mikropipet Seti (Gilson)
- Laminar Akım Kabini (Clean Air)
- Vorteks (Janke & Kunkel VF2)
- +4 °C buzdolabı
- -20 °C dondurucu
- -80 °C derin dondurucu
- 33. 37° C %5-10 CO₂'li İnkübatör (Heto/ Cell Hause 200)
- ELISA Cihazı (Thermo Sciertific)

3.1.2. Kullanılan Kitleler

- 8-OHdG Eliza Kiti (FINE TEST, EU2548)
- miRNeasy Serum/Plazma Kit (50) (Qiagen, Kat. No. 217184)
- miScript II RT Kit (50) (Qiagen, Kat. No. 218161)
- miScript SYBR Green PCR Kit (200) (Qiagen, Kat. No. 218073)
- miScript Serum/Plazma Spike-In Control (Qiagen, Kat. No. 219610)

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Komple Kültür Medyum (Gibco PB-MAX Karyotyping Medium Thermo Fisher Scientific, 12557013)
- Sitokalazin-B (Sigma, C-6762)
- Dimetilsülfoksit, DMSO (Merck)
- Giemsa (Merck, 5400512)
- KH_2PO_4 (Merck, 9021622)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1690176)
- Glasial asetik asit (Merck, 500K25133256)
- Metanol (Merck, 502K05275408)
- Ksilol (Merck, 207K037553)
- Entellan® (Merck, 640171987)
- KCL (Merck, 340TA611835)
- İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)
- Steril PBS (Phosphate-buffered saline) (Argene NE, Verniolle, France)
- Tripkan mavisi (Sigma Trypan blue solution %0,4, St. Louis, USA)
- Neubauer lamı (0,0025 mm², Marinfeld, Germany)
- Heparinli tüp (Vacutest kimasrl-vacuum tubes)
- Filtre kâğıdı (Whatman Filter Papers 125 mm)
- Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
- Heparinli ve EDTA'lı 10 ml'lik kan tüpleri
- Steril falkon tüpü -15 ml-50 ml (isolab)
- Hücre yıkama solusyonu (BD, USA. Cat. No: 349524)
- Ficoll Paque Plus (GE, GE17-1440-02)
- Serolojik pipetler 5ml, 10ml, 25ml
- Lamel (isolab, 24x32 mm)
- PCR tüpü -200 µl (isolab)
- Çeşitli cam malzemeler
- Enjektör 0,2 ml (Hayat)
- Lam (isolab, 76x26 mm)
- Alkol (%96'lık Sigma)

- Pastör pipeti
- Distile su
- Falcon 5 ml (BD, 352235)
- Filtreli pipet uç 10-200-1000 µl (A.B.T.)
- Amicon ultra-0.5ml filtreli santrifüj tüpü (Kat. no: UFC501096)

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.1’de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primerler

miRNA Primerleri	Kod	Marka	KAT No.
hsa-miRNA-15a-5p	218300	Qiagen	MS00003178
hsa-miRNA-16-5p	218300	Qiagen	MS00031493
hsa-miRNA-17-5p	218300	Qiagen	MS00029274
hsa-miRNA-21-5p	218300	Qiagen	MS00009079
hsa-miRNA-34a-5p	218300	Qiagen	MS00003318
hsa-miRNA-125b-5p	218300	Qiagen	MS00006629
hsa-miRNA-150-5p	218300	Qiagen	MS00003577
hsa-miRNA-155-5p	218300	Qiagen	MS00031486
hsa-miRNA-181b-5p	218300	Qiagen	MS00006699
hsa-miRNA-195-5p	218300	Qiagen	MS00003703
SNORD61	218300	Qiagen	MS00033705

Çalışma kullanılan antikorlar Tablo 3.2’de yer almaktadır.

Tablo 3.2. Antikor listesi

Antikor Listesi	MARKA	KOD
BrilliantViolet 510™ anti-human CD3 Antibody	Biolegend	317332
PerCP/Cyanine5.5 anti-human TCR γ/δ Antibody	Biolegend	331224
APC anti-human TCR V α 7.2 Antibody	Biolegend	351708
APC/Cyanine7 anti-human CD161 Antibody	Biolegend	339928
PE/Cyanine7 anti-human CD8 Antibody	Biolegend	344712
FITC anti-human CD4 Antibody	Biolegend	317408
Human MR1 5-OP-RU BrilliantViolet 421™labeled tetramer	Creative Biolabs	MHC-YF799
Human MR1 6-FP PE labeled tetramer	Creative Biolabs	MHC-YF800
APC anti-human/mouse/rat CD278 (ICOS)	Biolegend	313510
Pacific Blue™ anti-human CD45RA Antibody	Biolegend	304123
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD183 (CXCR3) Antibody	Biolegend	353714
PE/Cyanine7 anti-human CD185 (CXCR5) Antibody	Biolegend	356924
PE anti-human IL-21 Antibody	Biolegend	516704
APC anti-human IL-4 Antibody	Biolegend	500812
APC anti-human IFN- γ Antibody	Biolegend	506510
FITC anti-humanLineageCocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) 50 tests	Biolegend	348801
PE anti-human CD161 Antibody	Biolegend	339904
APC/Cyanine7 anti-human CD127 (IL-7R α) Antibody	Biolegend	351348
PE/Cyanine7 anti-human CD294 (CRTH2) Antibody	Biolegend	350118
BrilliantViolet 421™ anti-human CD117 (c-kit) Antibody	Biolegend	313216
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	Biolegend	424401

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Etik Kurul ve Proje Destek Onayı Bilgileri

Çalışma Grubu olarak, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları ile Çocuk Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları polikliniklerine başvuran Gaucher hastalığı (GH) tanısı konulan toplam 20 hasta 6 heterozigot taşıyıcı gönüllü ve kontrol grubu olarak hastalarla aynı yaş-cinsiyette Dahiliye Bölümü Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları ile Çocuk Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları polikliniklerine rutin kontrol için başvuran 27 sağlıklı gönüllü kişilerden alınan kan örnekleri üzerinde çalışma yapıldı. Çalışmaya katılan hasta ve kontrol kişilere çalışmanın amacı anlatıldı ve yazılı onayları alındı. Çalışma öncesinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı (Etik kurul karar no: 2019/713, 2020/06). Bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 10134).

3.2.2. Hasta Grubu

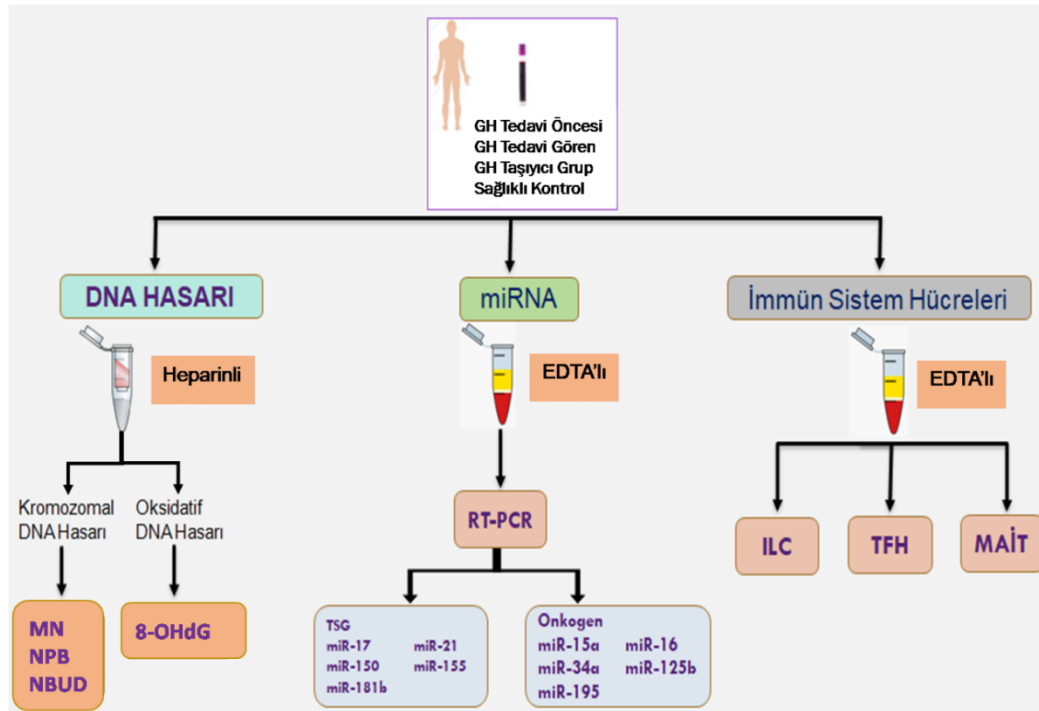
Çalışma Grubu olarak, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları ile Çocuk Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları polikliniklerine Ocak 2020 - Mayıs 2021 tarihleri arasında başvuran Gaucher hastalığı (GH) tanısı konulan toplam 22 hasta (2-60 yaş aralığı) 6 heterozigot taşıyıcı gönüllü (9-46 yaş aralığı) ve kontrol grubu olarak da Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları polikliniğine rutin kontrol için başvuran 27 sağlıklı gönüllü (3-61 yaş aralığı) kişiden yazılı onayları alındıktan sonra miRNA ekspresyonu ve immün sistem analizleri için EDTA'lı tüplere (~2 ml'lik 1 tüp) ve DNA hasarı için de heparinli tüpe (~2 ml'lik 1 tüp) kan örnekleri alındı. Kontrol kişilerden bir kez ve ilk kez tanısı konulan hastalardan tedavi öncesi ve tedaviden bir yıl sonra olmak üzere iki kez kan örneği alındı. Mevcut tedavi alan hastalardan bir kez kan alındı. Yeni tanılı tedavi görmemiş Gaucher hastası iki kişi olduğu için bu hastalara ait parametreler istatistiksel değerlendirmelere (immünolojik parametreler hariç) dahil edilmedi ve Gaucher hasta sayısı 20 olarak kabul edildi. Çalışma, hasta, taşıyıcı ve hastalarla benzer yaş ve cinsiyette kontrol bireylerden alınan kan örnekleri üzerinde yapıldı.

Çalışmamıza dahil edilen hasta bireylerin kullandığı enzim İmglyuseraz olup tedavi süreleri 12 ay -10 yıl arasında değişmektedir. GH Taşıyıcı bireyler ise herhangi bir enzim tedavisi almamaktadırlar. Hasta ve taşıyıcı bireylerde görülen GBA geni mutasyon tipleri aşağıda Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Hasta ve taşıyıcı bireylere ait GBA genindeki mutasyonlar

P.[N409S;N409S] Homozigot	Hasta (7)
c.[593C>A];[593C>A] Homozigot	Hasta (2)
P.[N409S;L483P] Heterozigot	Hasta (2)
P.[D448H;L483P] Heterozigot	Hasta (2)
c.1342 G>C (p.Asp448His), Homozigot	Hasta (1)
P.[L483P;L483P] p.) Homozigot	Hasta (1)
P.[N409S;D448H] Heterozigot	Hasta (2)
P.[N409S;D448H] Heterozigot	Hasta (1)
P.[N409S;-] Heterozigot	Taşıyıcı (2)
P.[L483P;-] Heterozigot	Taşıyıcı (2)
c.1342 G>C (p.Asp448His), Heterozigot	Taşıyıcı (2)

Çalışmanın akış şeması aşağıda Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması.

3.2.3. Mikronükleus Yöntemi

1. Kan Örneklerinin Alınması; 4 ml'lik steril heparin içeren tüplere (~2 ml'lik 1 tüp) periferel kan örnekleri alındı.
2. Kültür Ortamında (Besiyeri, FBS, L-Glutamin ve PHA içinde) ekiminin yapılması; hazır bir şekilde gelen medyum -20°C'den çıkartılarak 37 °C de etüvde çözdürüldü.
3. Medyum kültür steril vidalı kapaklı konik tabanlı kültür tüplerine 5'er ml olacak şekilde bölünüp dağıtıldı.
4. 5 ml medyum içeren tüplere enjektörle 12 damla (~0.4-0.5 ml) kan örnekleri bekletilmeden kültür ortamlarına ekimi yapıldı.
5. Her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe alt-üst edilip karıştırılarak 37 °C'lik etüve kaldırıldı.
6. Binükleer hücrelerin oluşması için 44. saatte her bir tüpe 80 µl (son konsantrasyonu: 3µg/ml) Cyt-B eklendikten sonra örnekler alt-üst edilerek tekrar etüve kaldırıldı. Toplam 72 saat kültüre edildikten sonra örnekler 1200 G'de 6 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası örneklerde dipte 0.6-0.8 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatant kısımları atıldı.
8. Daha sonra laboratuvar ısısında daha önce hazırlanıp bekletilmiş olan 0.1 M hipotonik çözeltisinden örneklere 6 ml eklenerek laboratuvar ısısında 4 dakika bekletildi.
9. Örnekler 1200 G'de 6 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası örneklerin süpernatant kısmı atıldı, tüpiçindeki örnek vorteks üzerinde karıştırılırken yavaş bir şekilde taze hazırlanmış soğuk fiksasyon buffer (Metanol, Glasial asetik asit; 3:1 oranında) eklendi sonra 1200 G'de 6 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda, her defasında santrifüjleme ve süpernatant kısmı atıldı. Bu işlem iki kez gerçekleştirildi.
11. Son santrifüjden sonra üstte süpernant kısmı atıldı dipte fiksatifli hücreden 1-2 ml bırakıldı. Daha sonra örnekler preparat hazırlanması için +4°C'ye kaldırıldı.

1 mg Cyt-B Hazırlanması; 1 mg cyt-B (Sigma, 6762), 1 ml dimetil sülfoksitte (DMSO) çözdürülerek total hacim 5 ml olacak şekilde medyumla sulandırılarak hazırlandı.

1 M Hipotonik Solusyonun Hazırlanması; 1,864 g KCl tartılıp saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Fiksatif Bufferın Hazırlanması; Metanol ve Glacial asetik asit 3:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

Sorensen boya tamponunun hazırlanması (pH=7.0); 5,26 g KH_2PO_4 ve 8,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

94 ml Sorensen boya tamponu üzerine 6 ml giemsa boyası eklenerek giemsa boyası hazırlandı.

Kültüre edilen kan örneklerinden preparat hazırlanması için;

1. Lamların temizlenmesi için daha önce hazırlanan %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilerek soğuyuncaya kadar -20°C 'de buzdolabında bekletildi.
2. Şaleden çıkarılan lamlar kurulandı. Pastör pipeti yardımıyla hücre süspansiyonu lamlara pipetaj yapılarak 9-10 damla damlatıldı.
3. Hücrelerin lam yüzeyine iyice dağılması sağlandı sonra kurumaya bırakıldı.
4. Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan %6'luk giemsa boyada 8 dk boyandıktan sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı.
5. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

Preparatların İncelenmesi;

Preparatlar hazırlandıktan sonra ışık mikroskobunda X40 büyütmede incelendi;

DNA hasarı için; 1000 tane binükleer hücre sayımı yapıldı ve bulunan MN, NPB ve NBUD sayıları kaydedildi.

Hücre çoğalması için; 1000 tane mononükleer hücre sayıldı ve bulunan binükleer, multi nükleer hücreler skorlandı ve nükleer bölünme indeksi hesaplanması için NBI formülü ($\text{NBI} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{N}$) kullanıldı.

Her bir birey için 1000 tane BN hücrede MN, NPB ve NBUD sayıları kaydedilirken görülen metafaz sayıları da kaydedildi.

3.2.4. 8-OHdG Seviyelerinin Belirlenmesi

Hasta ve kontrol kişilerden kan örnekleri alındıktan hemen sonra 1500 RPMI devirde 10 dk boyunca santrifüj edilerek plazma örnekleri ayırt edildi ve çalışma yapılmıyaya kadar örnekler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı. 8-OHdG seviyesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan Thermo Scientific Marka ELISA cihazında, Finetest ticari kit (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China) kullanılarak belirlendi.

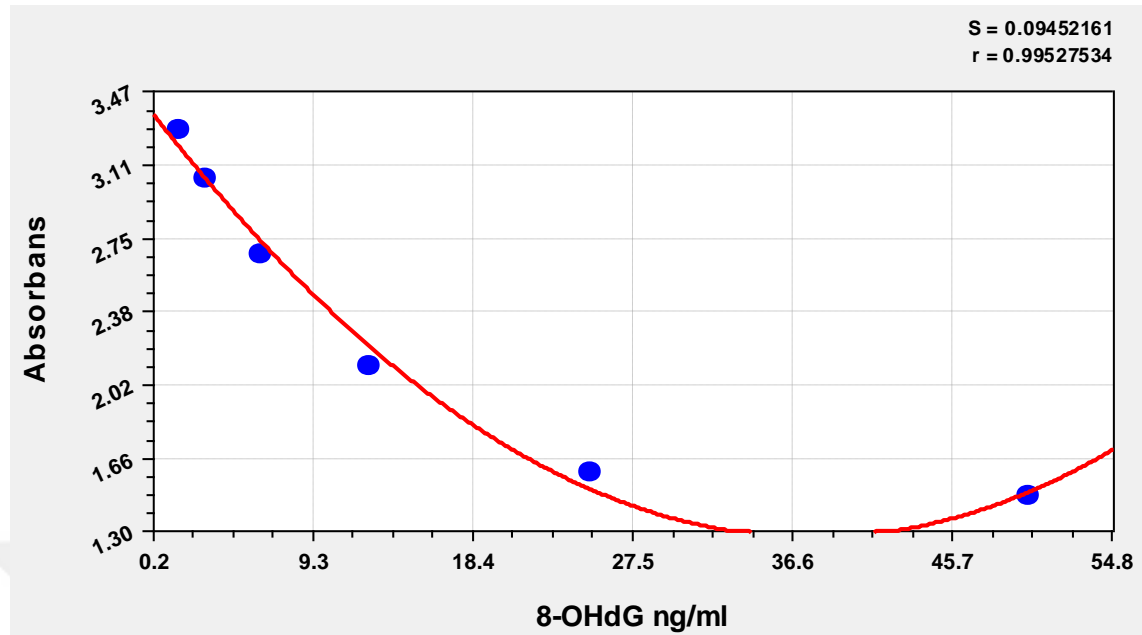
1. Örnekler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarıldı ve çözünmesi için $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Örnekler çözüldükten sonra 15.000 RPMI devirde 15 dk boyunca filtreli eppendorf tüplerde santrifüj edilerek partiküllerden arındırıldı.
2. Tüm reaktifler ve numuneler kullanılmadan 20 dakika öncesinde oda sıcaklığına getirildi. Plaka üzerinde standartların ve örneklerin konulacağı kuyucuklar belirlendi, 50 μL standartlardan ve 50 μL örneklerden kendileri için belirlenen kuyucuklara eklendi. Blank için ayrılan kuyucuğa da 50 μL Dilution buffer eklendi.

Tablo 3.4. ELİSA standartlarının hazırlanması

Standard No.6	300 μL Standard No.5 + 300 μL Dilution buffer
Standard No.5	300 μL Standard No.4 + 300 μL Dilution buffer
Standard No.4	300 μL Standard No.3 + 300 μL Dilution buffer
Standard No.3	300 μL Standard No.2 + 300 μL Dilution buffer
Standard No.2	300 μL Standard No.1 + 300 μL Dilution buffer
Standard No.1	300 μL Original Standard + 300 μL Dilution buffer

3. Standart, Numune ve Kontrol (Kör) kuyularına örnekler eklemeyen önce plaka 2 kez yıkanıp kurutuldu. Numuneler her bir reaksiyonda 50 μL kullanılacak şekilde hazırlandı. Tüm reaktifleri ve standartlar kitin içeriğinde kullanılmadan önce açıklandığı şekilde önceden hazırlandı. Plaka düzeneği herbir standart ve örnek iki kez çalışılacak şekilde planlandı (ilk kuyucuk Kör için boş bırakıldı).

- 4.** Her kuyucuğa 50µl Standart veya Numune eklendi. K r kontrol için Dilution bufer kullanıldı.
- 5.** Her kuyucuğa hemen 50µl Biotin-labeled Antikor eklendi, iyice karışmasını sağlamak için plakaya hafifçe vuruldu ve ardından plakanın üzeri plaka kapatıcısı ile kapatılarak 45 dakika 37  C'de inkübe edildi.
- 6.** Yıkama adımı: Her bir kuyuya 350 µl yıkama tamponu dolduruldu ve 2 dakika bekletildi. Sonra plaka emici filtre kağıtları üzerine çırpılarak kurutuldu. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Plakalarda su damlası veya kabarcık kalmamasına  zen gösterildi.
- 7.** Her kuyucuğa 100µl SABC (HRP-Streptavidin Conjugate) alışma solüsyonu eklendi ve ardından plakaların üzeri plaka kapatıcısı ile kapatılarak 37  C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 8.** Plaka'lar tekrar 5 kez yıkandı ve kurutuldu.
- 9.** 90µl TMB Substrat solüsyonu eklendi. 37  C'de karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- 10.** Sonra her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklendi.
- 11.** Stop solüsyonu eklendikten hemen sonra örneklerin absorbansını 450 nm'de ELISA cihazında okutuldu. Standart eğri ELISA kiti içinde mevcut olan standardize edilmiş örneklerden elde edildi (şekil 3.2.).



Şekil 3.2. 8-OHdG standart kalibrasyon eğrisi

3.2.5. miRNA'ların Belirlenmesi

Çalışmada kan kanserlerinde (lenfoma, HCC, MM ve lösemi) biyobelirteç olarak kullanılan 5 tümör süpressör gen ve 5 onkogen olacak şekilde 10 tane miRNA çalışıldı. Çalışılan miRNA'lar aşağıda listelenmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan miRNA'ların sekans bilgileri miRbase'den alınmıştır (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. miRBase'den alınan primerlere ait sekans bilgileri

miRNA	Erişim Numarası	Sekans Bilgileri	
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	TSG
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	TSG
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	Onk.
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	Onk.
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU	TSG
hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	TSG
hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	Onk.
hsa-miR-155-5p	MIMAT0000646	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU	Onk.
hsa-miR-181b-5p	MIMAT0000257	AACAUUC AUUGCUGUCGGUGGGU	Onk.
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAUAUUGGC	TSG

(TSG: Tümör süpressör gen, Onk: Onkogen)

3.2.5.1. miRNA'ların İzolasyonu

Hasta ve kontrol kişilerden EDTA'lı tüplere 2 ml kan örneği alınarak 2 saat içerisinde plazma izolasyonu için +4 °C 1900 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri 2 ml'lik steril eppendorf tüplere alındı. miRNA izolasyonu yapılmak üzere plazma örnekleri -80 °C de derin dondurucuya kaldırıldı.

1. Plazmalar -80 °C'den çıkarılarak +4 °C'de çözüldükten sonra soğutmalı santrifürüj de 16.000xg ve +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Plazma örneğinin en üst kısmından 220 µl alınarak 2 ml yeni bir eppendorf tüpe konuldu ve yaklaşık 5 katı kadar (1000 µl) Qiazol Lysis Reagent eklenerek vortekslendi.
3. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında (15-25 °C) bekletildi.
4. Örneklerin üzerine 3.5 µl miRNeasy Serum/Plazma Spike-In Kontrolü eklendi.
5. Daha sonra 200 µl kloroform eklenerek 15 saniye boyunca vortekslendi.
6. Örnekler 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
7. Örnekler 12.000xg ve +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi.
8. Oluşan en üst fazdan 600 µl alınarak yeni bir toplama tüpüne transfer edildi.
9. Üzerine 900 µl %100'lük saf etanol eklendi.
10. Oluşan karışımdan 700 µl örnek alınarak RNA easy minikolonun (2 ml toplama tüpü) içine konuldu, 8000xg ve oda sıcaklığında 15 saniye boyunca santrifüj edildi. Örneğin tamamı bitinceye kadar bu basamak tekrarlandı.
11. 700 µl RWT tampondan RNaz mini kolona eklenerek ve 15 saniye oda sıcaklığında 8000xg'de santrifüj edildi.
12. Toplama tüpünde kalan kısım atılarak 500 µl RPE tamponundan RNaz Mini kolonun üstüne eklendi ve 15 saniye oda sıcaklığında 8000xg'de santrifüj edildi.
13. Daha sonra toplama tüpünde kalan kısım atılarak 500 µl %80 etanol RNaz Mini kolona eklendi ve 2 dakika 8000xg'de santrifüj edildi.
14. RNaz Mini kolon, yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 1 dakika boyunca 16.000xg de santrifüj edildi.
15. RNaz Mini kolon, yeni bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne alındı. Daha sonra 14 µl RNaz içermeyen su spin kolonunun merkezine direkt olarak eklendi.
16. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra maksimum hızda (16.000xg) 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

17. Elde edilen tüm RNA örneği cDNA sentezi için kullanıldı.

3.2.5.2. cDNA (kalıp DNA) Elde Edilmesi

cDNA sentezi için Qiagen miScript II RT Kiti (Kat. No. 218161) kullanıldı. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. cDNA reaksiyon bileşenleri

5x miScript HiSpec Buffer	4 µl
10x miScript Nucleics Mix	2 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Template RNA	12 µl
RNase-free water	-
Toplam Hacim	20 µl

Tüm örnekler PCR cihazında 37 °C'de 60 dk, ve 95 °C'de 5 dk olan tepkime koşullarına göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örneklerin her birine 6 µl RNase-free water eklendi. Örnek hacmi az olduğundan ve çalışılacak miRNA primer sayımız fazla olduğundan dolayı elde edilen cDNA örneklerin bir kısmı agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 3.3).

3.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar

1x TAE Tamponu: 10x olarak stok TAE tamponu hazırlandı. 10x TAE hazırlamak için 108 gr Tris, 55 gr asetik asit 600 ml saf suda çözülerek HCL ile pH= 8.0'a titre edildi. Daha sonra, 4.65 gr EDTA eklendi. Toplam hacim saf su ile 1 lt'ye tamamlandı.

Etidyum Bromür Çözeltisi: Bir falkon tüpü içerisindeki 500 ml 0,5x TBE (Tris-borat-EDTA) tamponu üzerine 300 µl ethidium bromür eklenerek hazırlandı. Şişe içindeki ethidium bromür etrafı alüminyum folyo ile sarılarak +4 derece (bozulmasını önlemek için) de kullanılmak üzere saklandı.

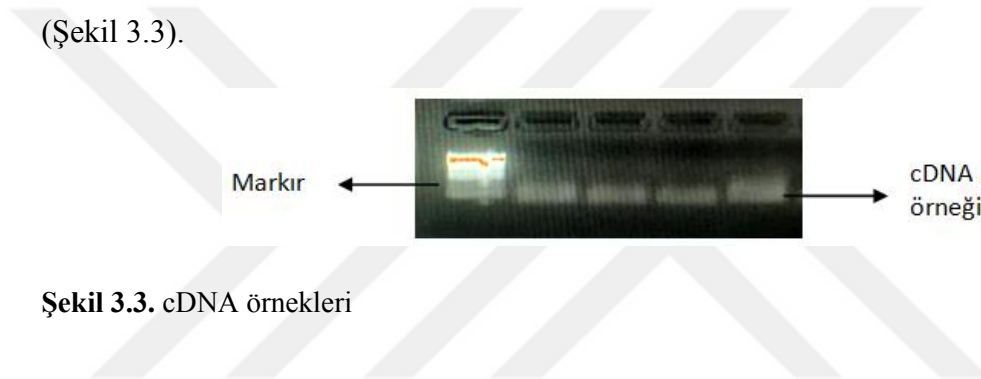
3.2.5.4. Agaroz Jelin Hazırlanması

Örneklerden cDNA elde edildikten sonra %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 2 gram agaroz hassas terazide tartıldıktan sonra 100 mililitre 1x TAE (Tris-asetat-EDTA Buffer) ile karıştırılarak mikrodalga fırında iyice ısıtıldı. Daha sonra jelin üzerine 10 µl

Ethidium Bromür (10mg/ml) eklendi ve homojen olacak şekilde dağıtıldı. Jel elektroforez küveti içerisine döküldü ve uygun taraklar yerleştirilerek soğumaya bırakıldı. Jel yeteri kadar soğuduktan sonra taraklar çıkartılarak içerisinde 1x TAE Buffer bulunan elektroforez tankına konuldu.

3.2.5.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi

Tüm örnekler Yükleme sırasında jele 3 µl cDNA örnekleri 2 µl 6x'lik loading buffer'la (yükleme çözeltisi) karıştırılarak sırayla jele yüklendi. Elektrik akımının gerçekleşmesi için, güç kaynağı 15 dakika süre ile 90 volta ayarlandı. PCR ürünleri yeterli süre yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazına alınarak UV ışık altında görüntülendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. cDNA örnekleri

3.2.5.6. RT-PCR Yöntemi

RT-PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.7'de, qRT-PCR tepkime koşulları ise Tablo 3.8'de verilmiştir. Çalışmada Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti kullanıldı. Referans gen olarak housekeeping RNA olan SNORD61 seçildi. cDNA ile ilgili genlerin ifadesi Light Cycler® 480 (Roche, İsviçre) cihazı kullanılarak yapılan Real-Time PCR ile incelendi.

Tablo 3.7. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri

2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	6 µl
10x miScript Primer Assay	1 µl
10x miScript Universal Primer	1 µl
Template cDNA	2 µl
RNase-free water	2
Toplam Hacim	12 µl

Tablo 3.8. qRT-PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	
95	15 dakika	
94	15 saniye	} 55 Döngü
55	30 saniye	
70	30 saniye	

3.2.6. Akım Sitometri ile İmmün Sistem Hücrelerinin Tespiti

Stain buffer solüsyonunun hazırlanması; Stain Bufferı hazırlamak için 50 ml'lik falkon tüpü içine 2 ml FBS eklendi ve üzerine 50 ml olacak şekilde 1X PBS eklendi. Stain buffer hücrelerin yıkanması ve süspansiyonu için kullanıldı.

3.2.6.1. Lenfosit Hücrelerinin İzolasyonu

1. EDTA'lı tüplere hastalardan 2 ml kan örnekleri alındı.
2. Kan örnekleri 1:1 oranında PBS ile dilue edildi. Örnekler birkaç kez yavaşça alt-üst edildi.
3. 15'lik falkon tüpüne 3 ml fikol eklenerek dilue edilen kan örnekleri fikol üzerine 45 derecelik açıyla yavaş bir şekilde falkon tüpüne aktarıldı.
4. Örnekler 30 dakika 400xg'de Y:0 H:4 (hızlanma ve yavaşlama ivmesi en az olacak şekilde) oda ısısında santrifüj edildi.
5. Ayrı bir tüpe 2 ml serum örnekleri alındı.
6. Temiz bir 15'lik falkon tüpüne lenfosit kısmı (beyaz bulutsu kısım) alındı.
7. Thoma lamında örneklerin sayımı yapıldı.
8. PBMC örneklerinin üzerine 3 ml PBS eklenerek 400xg'de 7 dakika santrifüj edildi.
9. Süpernatant kısmı atıldı.
10. Örneklerin pellet kısmı daha önce ayrılan serum ile karıştırıldı.
11. Örneklerin toplam hacminin %10'u kadar DMSO eklenerek daha sonra çalışılmak üzere -80'e kaldırıldı.

Thoma lamında Hücre Sayımında Kullanılan Formül;

$$\text{Hücre sayısı/ml} = (\text{Onaltı Karedeki Hücre Sayısı}) \times (\text{Dilusyon Oranı}) \times 10^4$$

3.2.6.2. ILC Hücrelerinin Boyanması

1. ILC hücrelerin boyanması için PBMC kısmından yaklaşık bir milyon hücre alındı.
2. Yıkama amaçlı olarak 1 ml olacak şekilde PBS eklendi.
3. Örnekler 400xg'de 7 dakika santrifüj edildi.
4. Örneklerin süpernatant kısmı atıldı. Altta kalan örnek üzerine 200 mikrolitre staining buffer eklenip 2 kez yıkama yapıldı.
5. Süpernatant kısmı atıldı kalan hücrelerin üzerine hazırlanan boya karışımından 5 mikrolitre boya karışım (Tablo 3.9) eklenip karanlıkta buzda yarım saat bekletildi.
6. Örneklerin üzerine yıkama için 200 µl staining buffer eklendi, sonra 400xg'de 5 dakika olacak şekilde santrifüj edildi. Bu işlem iki kez gerçekleştirildi.
7. Süpernatant kısmı atıldı üzerine 200 µl staining buffer eklendi.
8. Flow sitometri cihazında örnekler okutuldu.

Tablo 3.9. ILC boya karışımı

FITC	CD3, CD14, CD19, CD92	1 µl
PE	CD161	1 µl
APC Cy7	CD127	1 µl
PE Cy7	CRTH2	1 µl
BV-Ckit	CD117	1 µl

3.2.6.3. TFH Hücrelerinin Boyanması

TFH Hücrelerinde Yüzey Boyanması

Tüm örnekler çalışılmak üzere -80 °C'den çıkarıldı ve +37 °C'de su banyosunda çözdürüldü. 15 ml'lik falkon tüpüne 5 ml kültür besiyeri eklendi ve çözünen örnekler mediyuma aktarıldı. 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra örnekler yıkama amaçlı 200 µl PBS eklendi 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı, hücrelerin boyanması için yaklaşık 5×10^5 hücre olacak şekilde thoma lamında sayım yapıldı. Her örnekten 100 µl olacak şekilde 96'lık well plate eklendi.

Aşağıda yer alan boya karışımı hazırlandı (Tablo 3.10). Her örnekten 100 µl olacak şekilde 96'lık well plate kuyucuklarına dağıtılan örneklerin üzerine 7 µl boya karışımı eklendi. Sonra 30 dakika buz üzerinde karanlıkta bekletildi. 200 µl staining buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra her bir örneğin üzerine 200 µl staining buffer eklendi ve flow sitometri cihazında okutuldu.

Tablo 3.10. TFH yüzey boya karışımı

BV 510	CD3	1 µl
FITC	CD4	1 µl
Pac Blue	CD45RA	1 µl
PE Cy7	CXCR5	1 µl
APC	ICOS (CD278)	1 µl
Percp Cy5.5	CXCR3	1 µl
APC Cy7	PD-1	1 µl

TFH Hücrelerinde Nükleer Boyanması

Örnekler -80'den çıkarıldı ve +37 °C'de su banyosunda çözdürüldü. 15 ml'lik falkon tüpüne 5 ml kültür besiyeri eklendi ve çözünen örnekler mediyuma aktarıldı. 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra örneklere yıkama amaçlı 3ml PBS eklendi 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı. Supernatant kısmı atıldı, hücrelerin boyanması için yaklaşık 5×10^5 hücre olacak şekilde thoma lamında sayım yapıldı. Her örnekten 100 µl olacak şekilde 96'lık well plate eklendi. Daha sonra 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Örnekler buz üzerinde olacak şekilde PMA 50 ng/ml, İonomycin 1 µg/ml ve 1x Golgiplug içeren RMPI medium 200 µl/kuyu olacak şekilde eklendi sonra 4 saat boyunca +37 °C'de inkübasyon için etüvde bekletildi. Daha sonra 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. 200 µl staining buffer eklendi bir kere yıkama yapıldı ve süpernatant atıldı. Aşağıda yer alan boya karışımı hazırlandı (Tablo 3.11). Daha sonra yüzey boyanması için BV 510-CD3, FITC-CD4, Pac Blue-CD45RA ve PE Cy7-CXCR5 her boyadan 1 µl eklendi. Sonra 30 dakika buz üzerinde karanlıkta bekletildi. 200 µl staining buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra ICC boyanması için hücreler 100 µl true nuclear boyama kiti

içindeki fiksasyon buffer eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dk bekletildi. 200 µl permobilizasyon/wash buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra hürelere 50 µl permeabilizasyon/wash buffer içerisinde PE-IL-21 ve APC-IL-4 her bir antikordan 1 µl olacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dk bekletildi. 200 µl permeabilizasyon/wash buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra 200 µl staining bufferda hürelere çözülüp flow sitometride okutuldu.

Tablo 3.11. TFH nükleer boya karışımı

BV 510	CD3	1 µl
FITC	CD4	1 µl
Pac Blue	CD45RA	1 µl
PE Cy7	CXCR5	1 µl
PE	IL-21	1 µl
APC	IL-4	1 µl

3.2.6.4. MAIT Hücrelerinin Boyanması

MAIT Hücrelerinde Yüzey Boyanması

-80'den çıkarılan örnekler +37 °C'de su banyosunda çözündürüldü. 15 ml'lik falkon tüpüne 5 ml kültür besiyeri eklendi ve çözünen örnekler mediyuma aktarıldı. 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra örneklere yıkama amaçlı 3ml PBS eklendi 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı. Supernatant kısmı atıldı, hücrelerin boyanması için yaklaşık 5x10⁵ hücre olacak şekilde thoma lamında sayım yapıldı. Her örnekten 100 µl olacak şekilde 96'lık well plate eklendi. Aşağıda yer alan boya karışımı hazırlandı (Tablo 3.12). MAIT hücrelerinde yüzey boyamasından önce örneklerin tetramer boyanması yapıldı. Bunun için tetramer 5-OP-RU (BV 421) ve MR-6-FP (PE) antikoları mix yapılarak her bir örneğe 1 µl eklendi. Daha sonra örnekler 40 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Sonra yüzey boyanması aşamasına geçildi. Bunun için de aşağıda yer alan antikolar kullanıldı. Herbir örneğe 6 µl eklendi. 30 dk karanlıkta buz üzerinde +4 °C'de bekletildi. Sonra 200 µl staining buffer eklendi ve

400xg de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem yıkama amaçlı iki kez gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler 100 µl staining buffer eklendi ve flow sitometri cihazında örnekler okutuldu.

Tablo 3.12. MAIT hücrelerinin yüzey boya karışımı

BV 510	CD3	1 µl
Percp Cy5.5	TCR γ/δ	1 µl
APC	TCR V α 7.2	1 µl
APC Cy7	CD161	1 µl
PE Cy7	CD8	1 µl
FITC	CD4	1 µl

MAIT Hücrelerinde Nükleer Boyanması

Örnekler -80'den çıkarıldı ve +37 °C'de su banyosunda çözündürüldü. 15 ml'lik falkon tüpüne 5 ml kültür besiyeri eklendi ve çözünen örnekler mediyuma aktarıldı. 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra örnekler yıkama amaçlı 3 ml PBS eklendi 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı. Supernatant kısmı atıldı, hücrelerin boyanması için yaklaşık 5×10^5 hücre olacak şekilde thoma lamında sayım yapıldı. Her örnekten 100 µl olacak şekilde 96'lık well plate eklendi. Örnekler buz üzerinde olacak şekilde PMA 50 ng/ml, İonomycin 1 µg/ml ve 1x Golgiplug içeren RMPI medium 200 µl/kuyu olacak şekilde eklendi sonra 4 saat boyunca +37 °C'de inkübasyon için etüvde bekletildi. Daha sonra 400xg de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. 200 µl staining buffer eklendi bir kere yıkama yapıldı ve süpernatant kısmı atıldı. Aşağıda yer alan boya karışımı hazırlandı (Tablo 3.13). Daha sonra yüzey boyaması için BV 510-CD3, FITC-TCR γ/δ , APC-TCR V α 7.2, APC-Cy7-CD161 ve PE Cy7-CD8 her boyadan 1 ul eklendi. Sonra 30 dakika buz üzerinde karanlıkta bekletildi. 200 µl staining buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra ICC boyaması için hücreler 100 µl true nuclear boyama kiti içindeki fiksasyon buffer eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 20 dk bekletildi. 200 µl permeabilizasyon/wash buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra hücrelere 50 µl permeabilizasyon/wash buffer içerisinde Percp Cy5.5-TNF- α ve BV 421-IFN- γ her bir antikordan 1 µl olacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 20

dk bekletildi. 200 µl permeabilizasyon/wash buffer eklendi, 7 dakika 400xg de santrifüj edildi. Bu işlem iki kez yapıldı. Daha sonra 200 µl staining bufferda hücreler çözülüp flow sitometride okutuldu.

Tablo 3.13. MAIT hücreleri nükleer boya karışımı

BV 510	CD3	1 µl
FITC	TCR γ/δ	1 µl
APC	TCR V α 7.2	1 µl
APC Cy7	CD161	1 µl
PE Cy7	CD8	1 µl
Percp Cy5.5	TNF- α	1 µl
BV 421	IFN γ	1 µl

3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Gaucher hastalarına ait plazma 8-OHdG seviyeleri ve CBMN-cyt yöntemi parametreleri İstatistiksel hesaplamalar Windows için SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 22.0 versiyon paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Veriler, median (min-max) olarak verildi. P değeri <0.05 olduğunda anlamlı kabul edildi.

Çalışmada tüm örnekler tekli çalışıldı. miRNA gen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler için Ct (threshold cycle) eşik değeri kullanıldı. Elde edilen Ct eşik değerleri Excel programı yardımıyla tüm miRNA'ların $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizleri yapıldı. miRNA örneklerinin istatistiksel analizleri Graphpad Prism 6.0 versiyon paket programı kullanılarak anlamlılıkları değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler nonparametrik testlerden One-way ANOVA testi ile karşılaştırıldı. P değeri <0.05 olduğunda anlamlı kabul edildi.

Gruplar arasındaki farklar $2^{-\Delta\Delta Ct} = ((\Delta Ct (\text{hasta}) - \Delta Ct (\text{SNORD61}) - (\Delta Ct (\text{kontrol}) - \Delta Ct (\text{SNORD61})))$ formülü ile hesaplandı.

Tüm örneklerle ait immün sistem parametrelerinin istatistiksel analizleri Graphpad Prism 8.0.2 versiyon paket programı kullanılarak anlamlılıkları değerlendirildi. Gruplar arası

İstatistiksel değerlendirmeler non-parametrik testlerden One-way ANOVA testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ ve $p<0.001$ değerinden küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Akım sitometri verilerinin analizi Flowjo programı yardımıyla değerlendirildi.



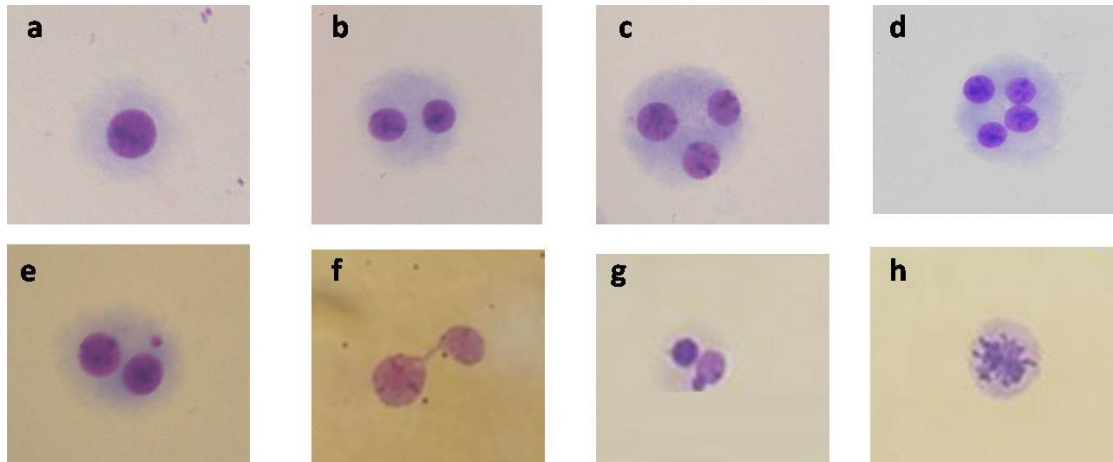
4. BULGULAR

Gaucher Hastalarına Ait DNA Hasarı Analiz Sonuçları

Tedavi gören 20 Gaucher hastası, yeni tanıli tedavi görmemiş 2 Gaucher hastası, 6 taşıyıcı birey ve toplam 27 kontrol birey olmak üzere toplam 55 kişiden alınan kan örnekleri materyal ve metotta belirtilen yöntemlere göre kültüre edildi ve kültür sonunda hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu yardımıyla CBMN-cyt yöntemi ile parametreler değerlendirildi. Ancak iki kişi olduğu için yeni tanıli tedavi görmemiş Gaucher hastalarına ait veriler immün hücre verileri hariç istatistiksel değerlendirmelerde kullanılmadı. Hazırlanan tüm preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. DNA hasarını belirlenmesi için, 1000 kadar BN hücreler sayıldı ve MN'lu, NPB'lu ve NBUD'lu BN hücreler kaydedildi. Sitostatik etkileri belirlemek için, 1000 tane bir çekirdekli hücre sayılırken aynı zamanda iki çekirdekli (M2), üç çekirdekli (M3), dört çekirdekli (M4) her bir hücrenin skorlanması yapıldı ve NBI oranları da hesaplandı (Şekil 4.1). Ayrıca, hasta ve kontrol kişilere ait plazma örneklerinde 8-OHdG seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Tedavi gören 20 GH hastası, 6 GH taşıyıcı birey ve hastalarla benzer yaş ve cinsiyette seçilmiş 27 sağlıklı kontrol kişilere ait yaş, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN-cyt yöntemi parametrelerinin median değerleri, min ve max değerleri ile birlikte Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Veriler, median (min-max) olarak verildi. P değeri 0.05'ten küçük olduğunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Yaş değişkeni için ise median değerleri verilmiştir. Tablo 4.1'e bakıldığında Gaucher hasta grubunda yaş ortanca değeri 33.0 iken, taşıyıcı grubunda ortanca değeri 21.50 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş ortanca değeri 32.0 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. a. Bir çekirdekli hücre; b. İki çekirdekli (BN) hücre; c. Üç çekirdekli (M3) hücre; d. Dört çekirdekli (M4) hücre; e. Bir MN'lu BN hücre; f. NPB'li BN hücre; g. NBUD'lu BN hücre; h. Metafaz hücresi (40X).

Tablo 4.1. 8-OHdG seviyeleri ve CBMN-cyt yöntemi parametrelerinin median (min-max) değerleri (*p < 0.05-**p < 0.001).

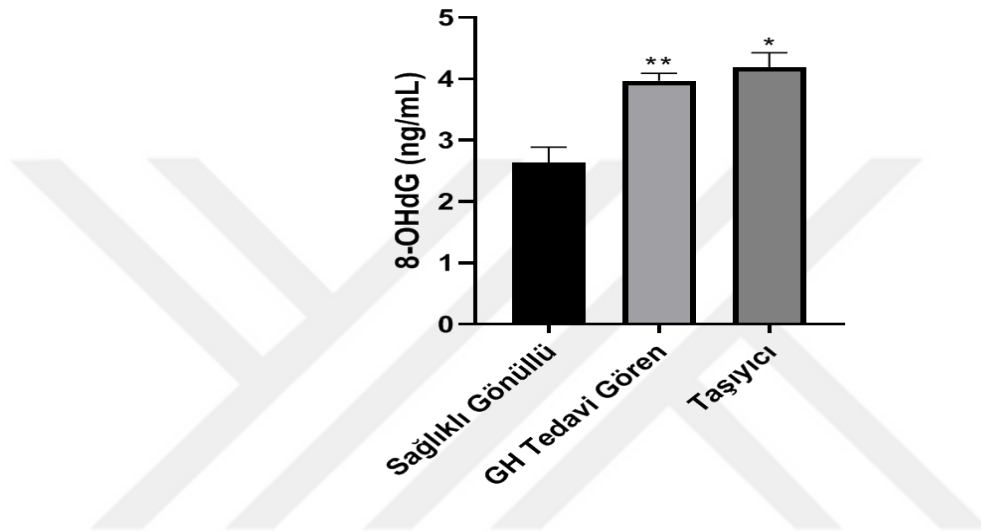
	Gaucher (n=20)	Kontrol (n=27)	Taşıyıcı (n=6)
Yaş (yıl)	33,0 (2,0-60,0)	32,0 (3,0-61,0)	21,50 (9,0-46,0)
MN frekansı	0,75 (0,10-2,50)	0,40 (0,10-2,90)	1,10 (0,60-1,40)
NPB'li BN hücre frekansı	2,0 (0,60-10,30)	1,70 (0,20-7,10)	1,0 (0,10-2,40)
NBUD'lu BN hücre frekansı	0,75 (0,10-3,50)	0,50 (0,10-1,60)	0,90 (0,30-2,10)
Metafaz	53,0 (15-260)	33,0 (2,0-96,0)	27,0 (8,0-46,0)
BN %	10,05 (2,80-23,30)	11,20(4,50-28,10)	12,80(6,50-21,90)
Nükleer bölünme indeksi (NBI)	1,09 (1,03-1,19)	1,10 (1,04-1,23)	1,11 (1,07-1,18)
8-OHdG seviyesi (ng/mL)	3,98 (2,87-4,91)**	2,37 (0,33-4,50)	4,30 (3,22-4,74)*

BN: Binükleer hücreler; MN: Mikronükleus; NBUD: Nükleer bud, NPB: Nükleoplazmik köprü, NBI: Nükleer bölünme indeksi, 8-OHdG; 8-hydroxy 2 deoxyguanosine.

Gaucher Hastalarında DNA Hasarı Sonuçları; Tedavi gören Gaucher hasta grubunun hem de GH taşıyıcı grubunun lenfositlerindeki MN, NPB, NBUD ve metafaz frekansları kontrollerle karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p>0.05; Tablo 4.1).

Gaucher Hastalarında Sitostazi Sonuçları; Gaucher hastalarına ve GH taşıyıcı grubuna ait NBI değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$; Tablo 4.1).

Gaucher Hastalarında 8-OHdG Sonuçları; Hem tedavi gören Gaucher hastalarındaki hem de GH taşıyıcı grubundaki plazma 8-OHdG (ng/ml) seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği bulundu ($p<0.05$, $p<0.001$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.2).



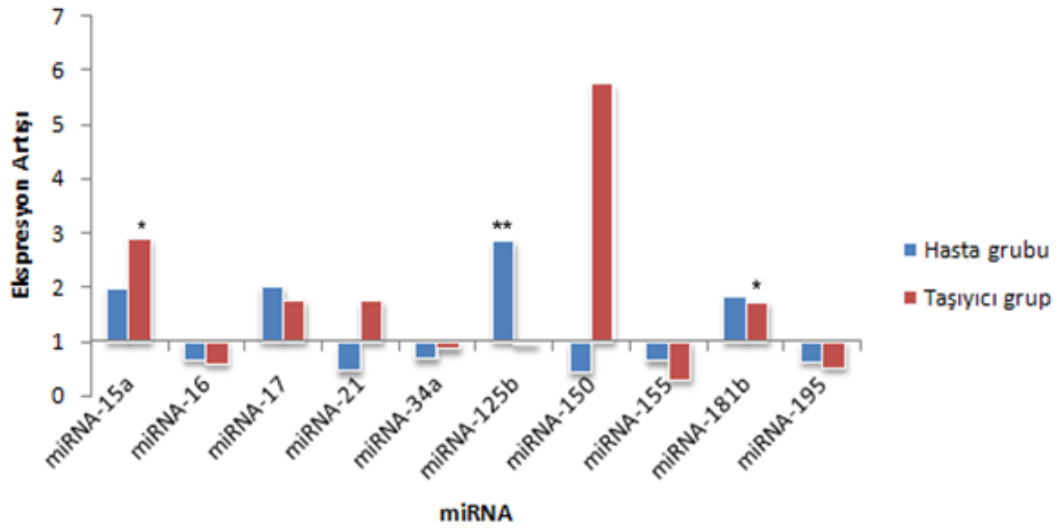
Şekil 4.2. GH hasta grubu ve GH taşıyıcı grubunun kontrol grubuna göre plazma 8-OHdG seviyelerinin karşılaştırılması (* $p<0.05$, ** $p<0.001$).

Gaucher Hastalarına Ait qRT-PCR Analiz Sonuçları

Tedavi olan 20 Gaucher hastası, 6 taşıyıcı bireyin ve kontrol grubu olarak 27 sağlıklı gönüllüye ait miRNA gen ekspresyon seviyeleri belirlendi. Tedavi gören Gaucher hasta grubunun miRNA-15a, miRNA-17, miRNA-125b, miRNA-181b gen ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenirken, miRNA-16, miRNA-21, miRNA-34a, miRNA-150, miRNA-155, miRNA-195 gen ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlemlendi. GH taşıyıcı grubu bireylerde ise miRNA-15a, miRNA-17, miRNA-21, miRNA-150, miRNA-181b gen ekspresyonlarının arttığı, miRNA-16, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-155 ve miRNA-195 gen ekspresyonlarının azaldığı görüldü (Tablo 4.2, Şekil 4.2). Ayrıca tedavi öncesi iki Gaucher hastasına ait miRNA-21 haricinde tüm miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.2. miRNA gen ekspresyon düzeyleri

	miRNA	Hasta Grubu (n=20) Ortalama (Kat Değişimi)	Taşıyıcı (n=6) (Kat Değişimi)	
1.	miRNA-15a	1,98 ↑	2,91 ↑	TSG
2.	miRNA-16	0,67 ↓	0,59 ↓	TSG
3.	miRNA-17	2,01 ↑	1,76 ↑	Onkogen
4.	miRNA-21	0,45 ↓	1,76 ↑	Onkogen
5.	miRNA-34a	0,68 ↓	0,86 ↓	TSG
6.	miRNA-125b	2,85 ↑	0,93 ↓	TSG
7.	miRNA-150	0,43 ↓	5,76 ↑	Onkogen
8.	miRNA-155	0,64 ↓	0,29 ↓	Onkogen
9.	miRNA-181b	1,82 ↑	1,73 ↑	Onkogen
10.	miRNA-195	0,63 ↓	0,52 ↓	TSG



Şekil 4.3. Tedavi gören GH hastalarının ve GH taşıyıcı gruplarının miRNA gen ekspresyon düzeyleri ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkan miRNA'lar (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)

Ancak, tedavi gören Gaucher hasta grubuna ait miRNA'lardan sadece miRNA-125b seviyelerindeki artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (Şekil 4.3, $p < 0.001$). Diğer tedavi gören Gaucher hasta bireylerine ait miRNA-15a, miRNA-17, miRNA-181b, miRNA-16, miRNA-21, miRNA-34a, miRNA-150, miRNA-155, miRNA-195 seviyelerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak

anlamli olmadigi bulundu ($p>0.05$). Tedavi öncesi iki Gaucher hastasına ait miRNA seviyeleri kontroller ile karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Taşıyıcı grubunda ise sadece miRNA-15a ve miRNA-181b seviyelerindeki artışın kontrol grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (Şekil 4.3, $p<0.05$).

Gaucher Hastalarına Ait İmmün Hücrelerinin Analiz Sonuçları

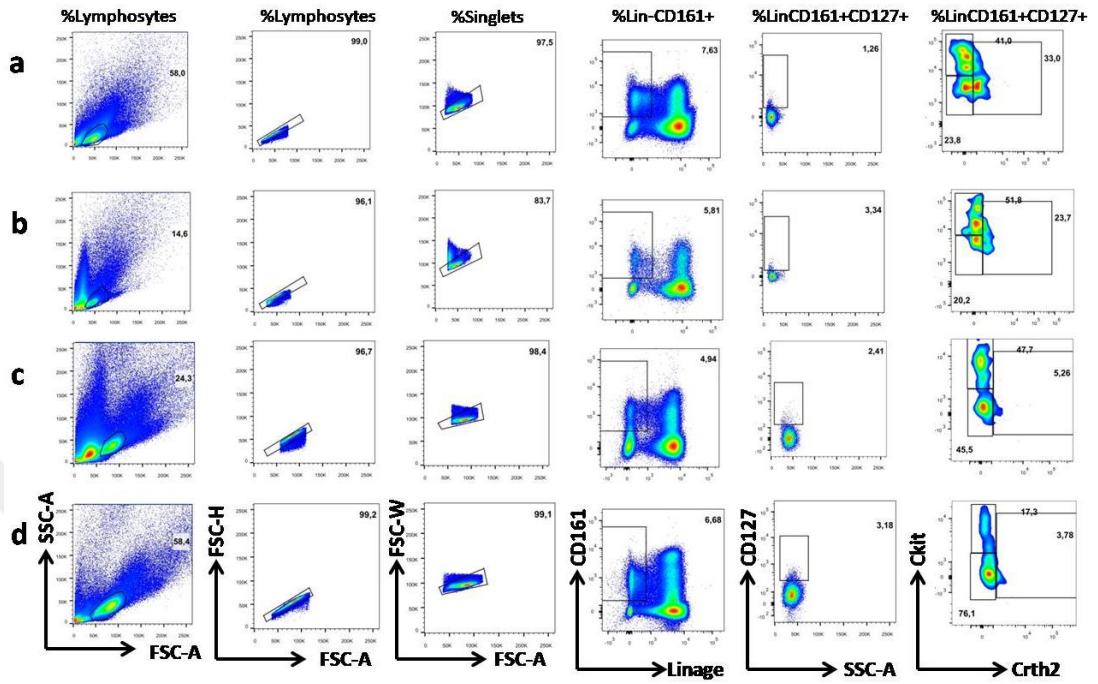
Çalışmamızda enzim replasman tedavisi alan 20 hasta, 2 yeni tanı alan hasta, 6 taşıyıcı birey ve 27 kontrol bireylerden alınan kan örneklerinden alınarak gradient santrifüj yöntemi ile lökositler elde edildi. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ ve $p<0.001$ değerinden küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

ILC Hücrelerinin Analizi

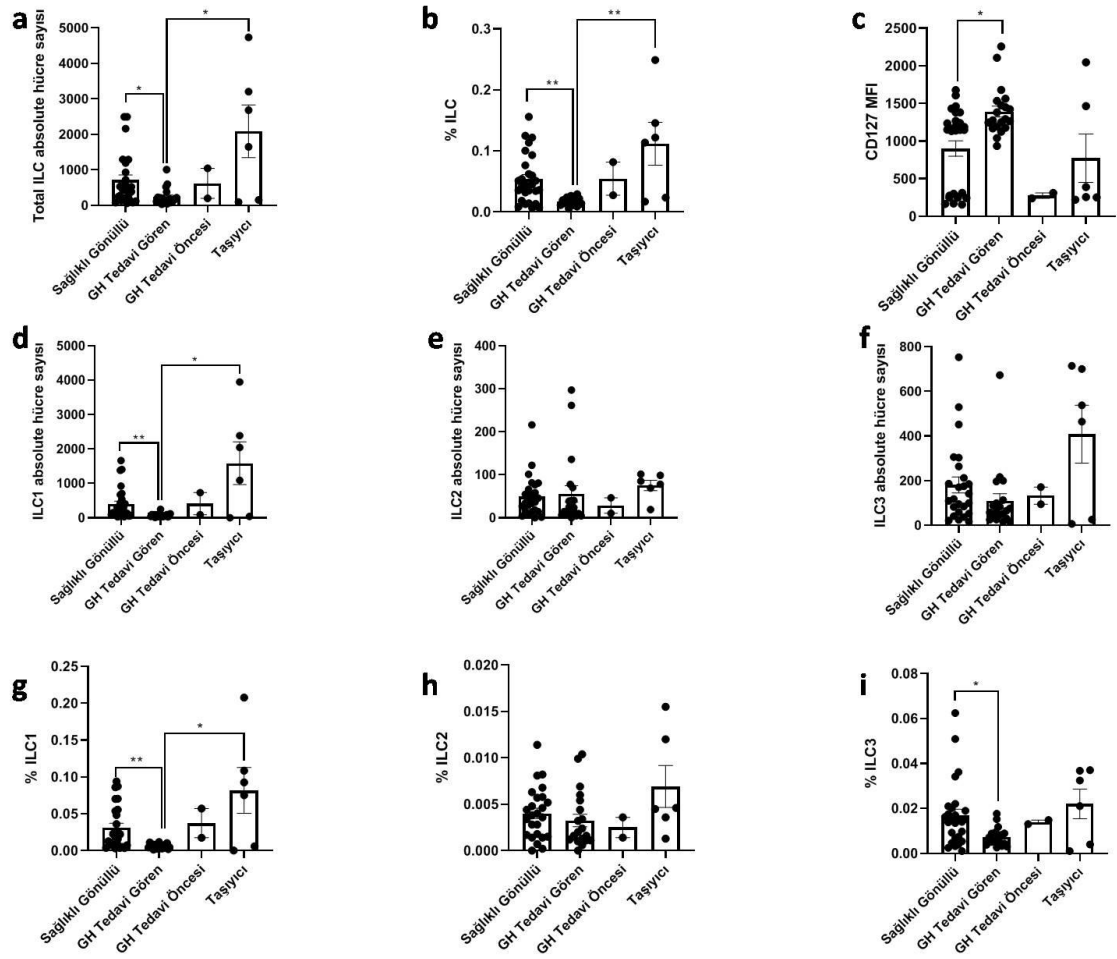
Materyal metotta belirtildiği gibi kan örneklerinden lenfositlerin izolasyonu yapıldı. Tüm örneklerin ILC yüzey boyamaları floresan işaretli antikolar kullanılarak boyama işlemi gerçekleştirildi. Şekil 4.5'te gösterildiği gibi kapılama stratejileri yapıldı. Sağlıklı kontrol grubu, tedavi öncesi ve tedavi gören Gaucher hasta grupları ve taşıyıcı gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırmalar yapıldı.

Total ILC ve total ILC1 absolute hücre sayısı ve ILC ve ILC1 yüzdelerinin tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol (sağlıklı gönüllü) grubuna göre anlamlı derecede azaldığını gözlemledik ($p<0.05$ - $p<0.001$). ILC3 yüzdeleri, tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$). Total ILC MFI sıklığının tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Total ILC ve Total ILC1 absolute hücre sayısı ve ILC ve ILC1 yüzdelerinin tedavi gören Gaucher hasta grubuna göre GH taşıyıcı grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$ - $p<0.001$). Tedavi gören Gaucher hasta grubu, GH taşıyıcı grubu ve tedavi öncesi Gaucher hastalarında ILC2 absolute hücre sayısı ve yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). GH tedavi öncesi gruptaki ILC, ILC1, ILC2 ve ILC3 absolute hücre sayısı ve yüzdeleri diğer gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.6) ($p>0.05$).

ILC, ILC1, ILC2 ve ILC3'lere ait kapılama stratejileri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



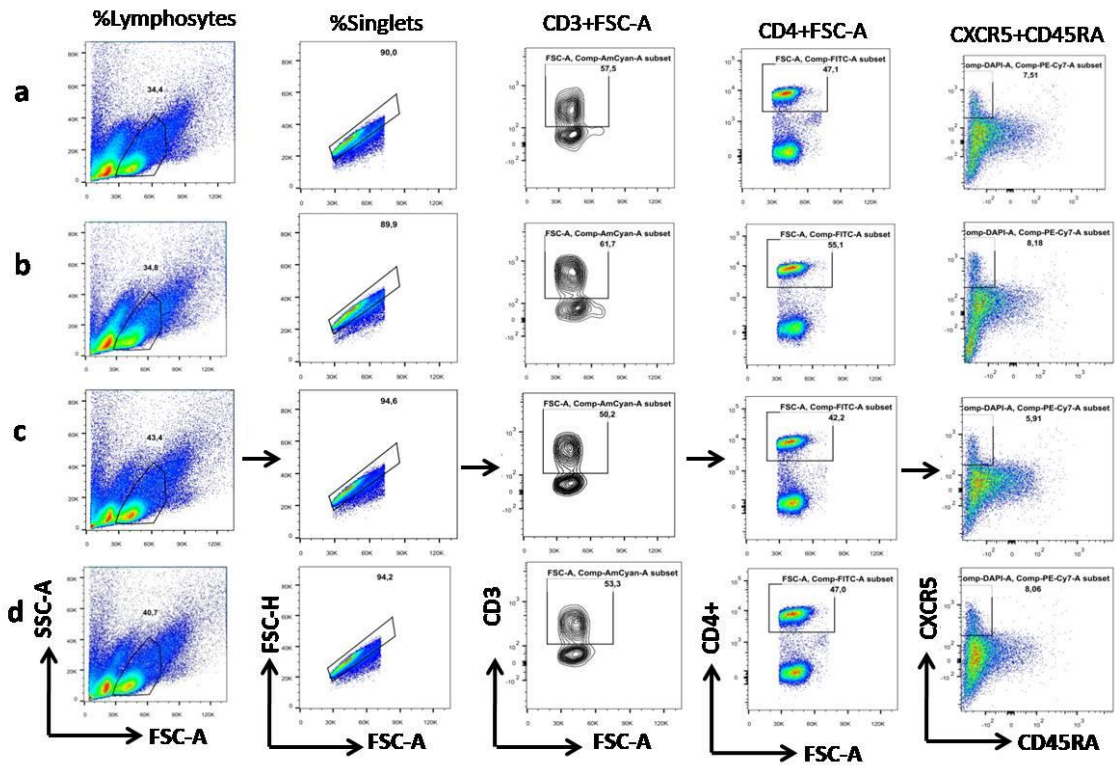
Şekil 4.4. ILC, ILC1, ILC2, ILC3'lerin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta, (d) GH taşıyıcı grubu.



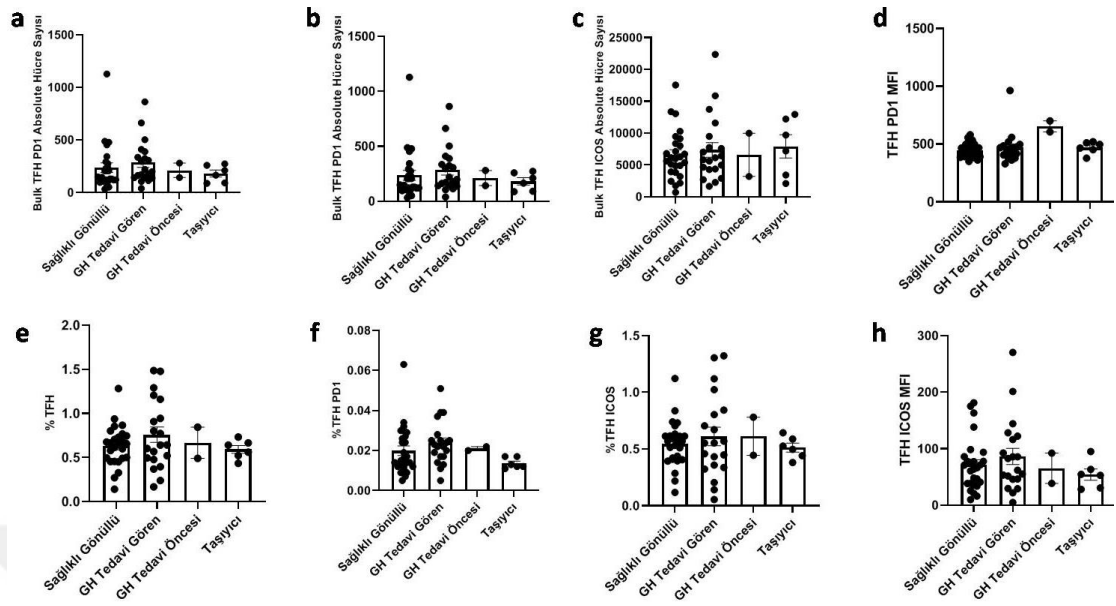
Şekil 4.5. Total ILC, ILC1, ILC2, ILC3 absolute hücre sayısı ve yüzdelерinin analizleri; (a) Total ILC absolute hücre sayısı (b) ILC yüzdeleri (c) CD127 MFI (d) ILC1 absolute hücre sayısı (e) ILC2 absolute hücre sayısı (f) ILC3 absolute hücre sayısı (g) ILC1 yüzdeleri (h) ILC2 yüzdeleri (i) ILC3 yüzdeleri; Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta, GH taşıyıcı grubunun karşılaştırmaları. (*p<0.05, **p<0.001).

TFH hücrelerinin Analizi

TFH hücre analizi için çalışmamızda metaryal metotta belirtilen şekilde tüm örneklerinden izole edilen lökositlerin hücre yüzeyi ve nükleer boyaması antikorlar ile yapıldı. Ayrıca Tüm örnekler akım sitometri cihazında okuldu. Flowjo programı yardımıyla kapılama stratejileri belirlendi. TFH, TFH PD1 ve TFH ICOS kapılama stratejileri Şekil 4.6'de gösterilmiştir.



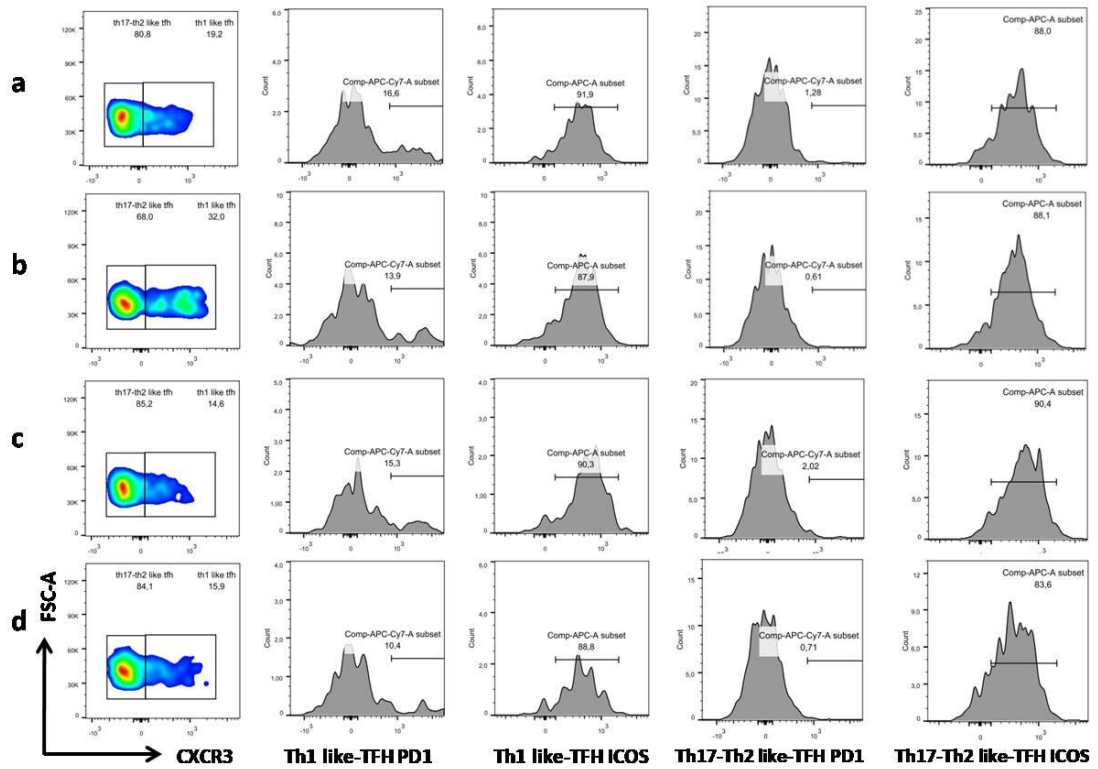
Şekil 4.6. TFH hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta, (d) GH taşıyıcı grubu.



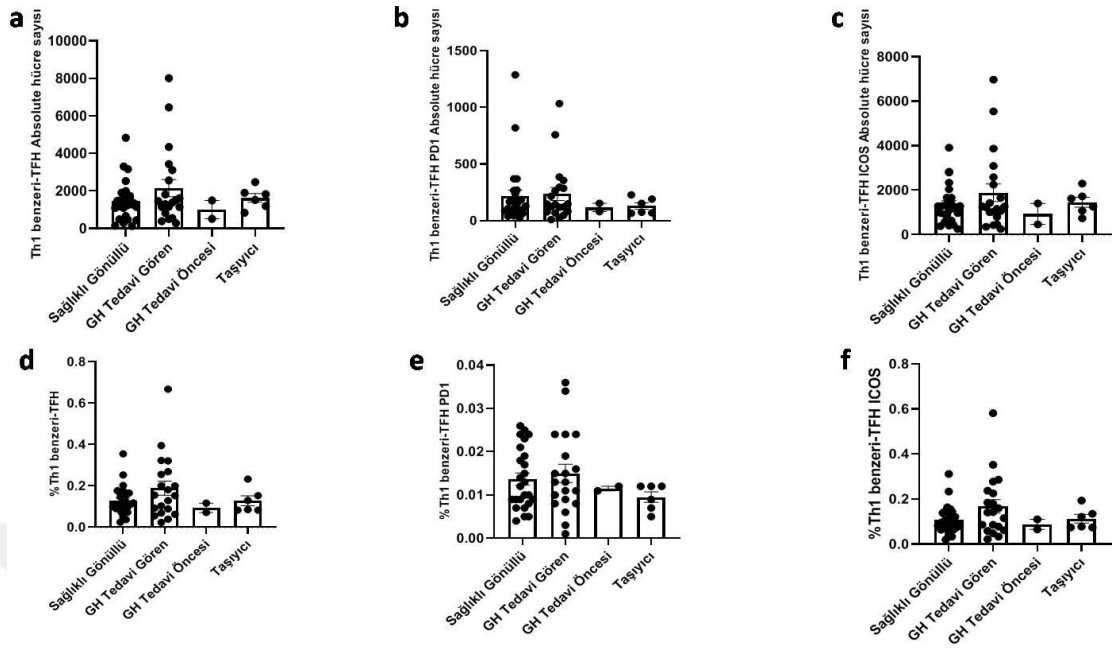
Şekil 4.7. Total TFH, TFH-PD1, TFH-ICOS, TFH PD1 MFI, TFH ICOS MFI absolute hücre sayıları ve yüzdelerinin Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher Hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH Taşıyıcı gruplarının karşılaştırılması. (a) Bulk Total TFH absolute hücre sayısı (b) TFH hücreleri içindeki TFH-PD1 absolute hücre sayısı (c) TFH hücreleri içindeki TFH-ICOS absolute hücre sayısı (d) TFH PD1 MFI (e) Bulk TFH yüzdesi (f) TFH hücreleri içindeki TFH-PD1 yüzdesi (g) TFH hücreleri içindeki TFH-ICOS yüzdesi (h) TFH ICOS MFI ($p < 0.05$).

Bulk Total TFH absolute hücre sayısı ve yüzdeleri, TFH hücreleri içindeki seçilen Bulk TFH PD1 ve ICOS absolute hücre sayısı ve yüzdeleri, TFH PD1 MFI ve TFH ICOS MFI hücre sayıları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.7, $p > 0.05$).

TFH hücreleri içindeki Total Th1 benzeri-TFH PD1, Th1 benzeri-TFH ICOS, Th2-Th17 benzeri-TFH PD1 ve Th2-Th17 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH Taşıyıcı grubunun akım sitometri ile elde edilen kapılama stratejilerinin Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

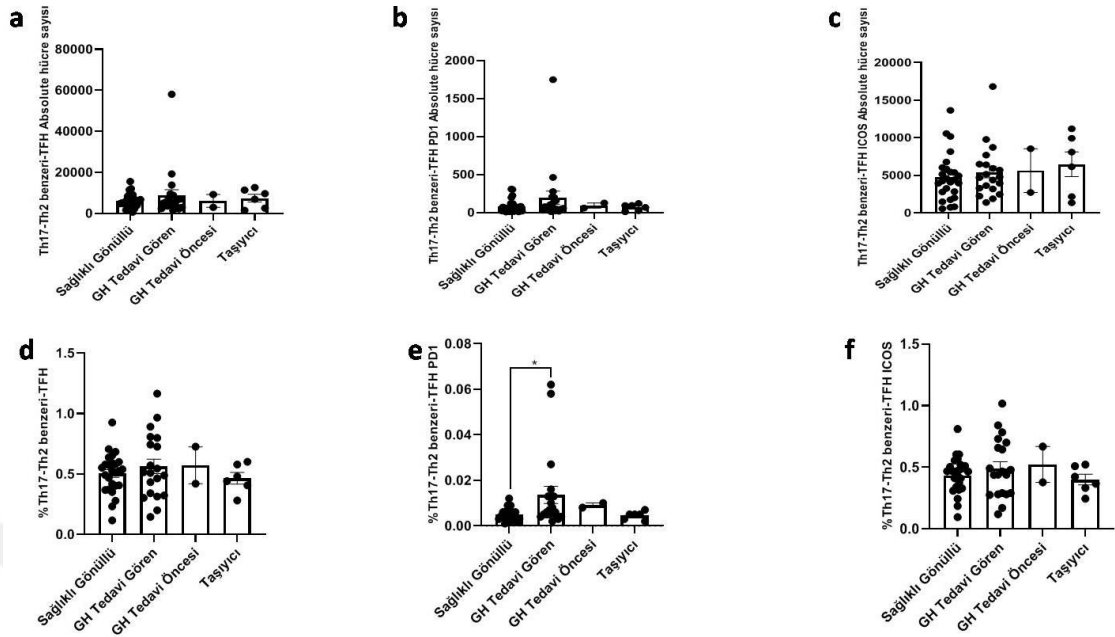


Şekil 4.8. TFH hücreleri içindeki Total Th1 benzeri-TFH PD1, Th1 benzeri-TFH ICOS, Th2-Th17 benzeri-TFH PD1 ve Th2-Th17 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta (d) GH taşıyıcı grubu.



Şekil 4.9. Th1 benzeri-TFH, TFH hücreleri içindeki Total Th1 benzeri-TFH PD1, Th1 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin analizleri (a) TFH hücreleri içindeki Th1 benzeri-TFH absolute hücre sayısının (b) Th1 benzeri-TFH PD1 absolute hücre sayısının (c) Th1 benzeri-TFH ICOS absolute hücre sayısının (d) Th1 benzeri-TFH yüzdelerinin (e) Th1 benzeri-TFH PD1 yüzdelerinin (f) Th1 benzeri-TFH ICOS yüzdelerinin Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı gruplarının karşılaştırılması.

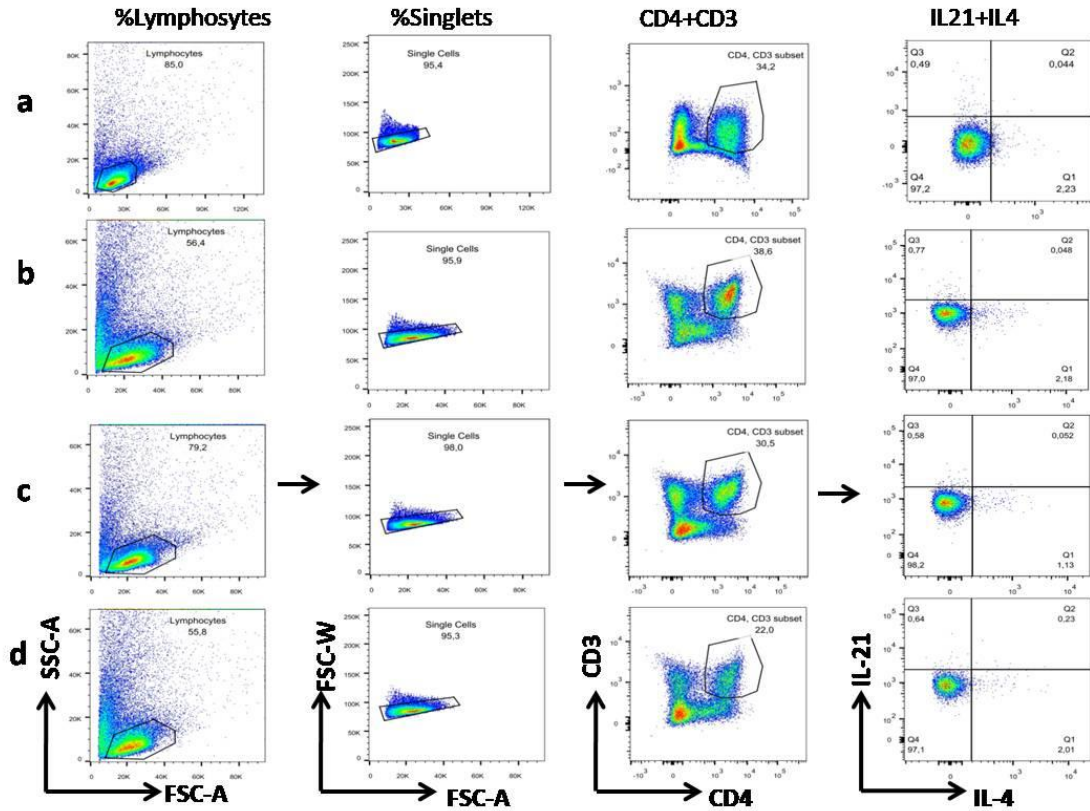
TFH hücreleri içindeki Th1 benzeri-TFH absolute hücre sayısının ve yüzdeleri, Th1 benzeri-TFH PD1 absolute hücre sayısı ve yüzdeleri, Th1 benzeri-TFH ICOS absolute hücre sayısı ve yüzdeleri sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 4.9; $p > 0.05$).



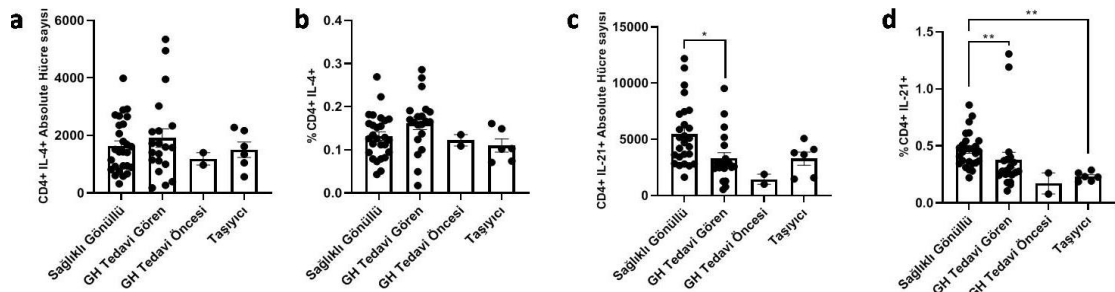
Şekil 4.10. TFH hücreleri içindeki Th17-Th2 benzeri-TFH, Th17-Th2 benzeri-TFH PD1, Th17-Th2 benzeri-TFH ICOS hücrelerinin analizleri (a) TFH hücreleri içindeki Th17-Th2 benzeri-TFH absolute hücre sayısının (b) Th17-Th2 benzeri-TFH PD1 absolute hücre sayısının (c) Th17-Th2 benzeri-TFH ICOS absolute hücre sayısının (d) Th17-Th2 benzeri-TFH yüzdelerinin (e) Th17-Th2 benzeri-TFH PD1 yüzdelerinin (f) Th17-Th2 benzeri-TFH ICOS yüzdelerinin Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı gruplarının karşılaştırılması (* $p < 0.05$).

TFH hücreleri içindeki Th17-Th2 benzeri-TFH absolute hücre sayısı ve yüzdeleri, Th17-Th2 benzeri-TFH PD1 absolute hücre sayısı, Th17-Th2 benzeri-TFH ICOS absolute hücre sayısı ve yüzdeleri sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.10) ($p > 0.05$). TFH hücreleri içindeki Th17-Th2 benzeri-TFH PD1 yüzdelerinin tedavi gören Gaucher hastalarında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10) ($p < 0.05$).

TFH hücreleri içindeki TFH hücreleri arasından seçilen TFH CD4+IL4+, TFH CD4+IL21+ flow sitometri sonucu elde edilen kapılama stratejileri şekil 4.11'de gösterilmiştir.



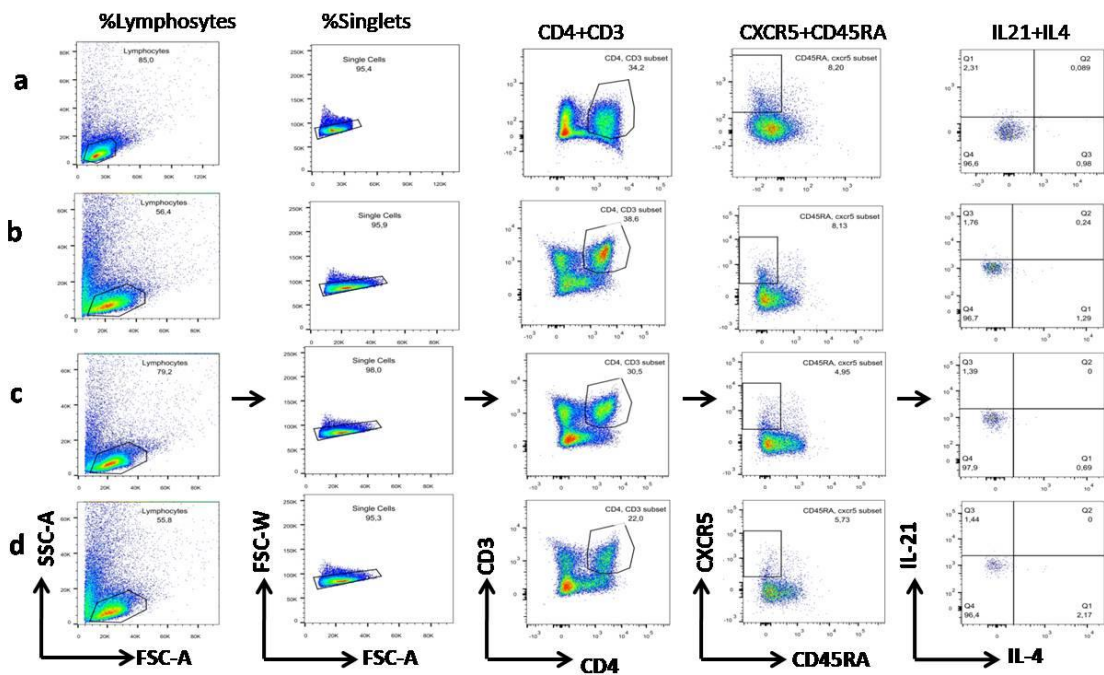
Şekil 4.11. Total TFH hücreleri içindeki CD4+IL4 ve CD4+IL21'in akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu



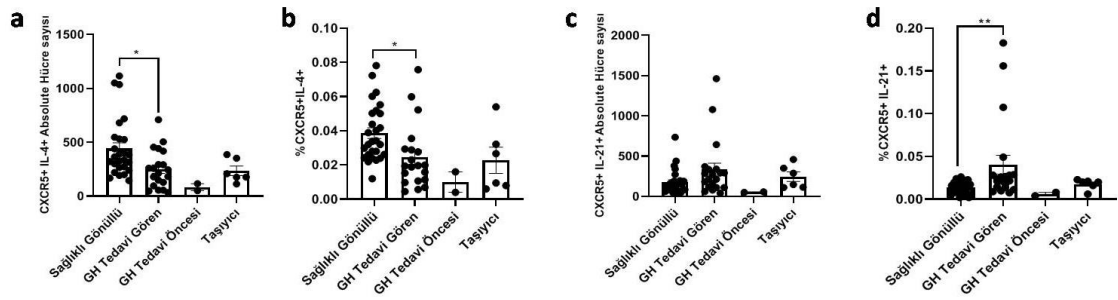
Şekil 4.12. TFH hücreleri içindeki CD4+IL4+ ve CD4+IL21+ analizleri (a) TFH hücreleri içindeki CD4+ IL4+ absolute hücre sayısının (b) CD4+ IL4+ yüzdelерinin (c) CD4+IL21+ absolute hücre sayısının (d) CD4+IL21+ yüzdelерinin Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı gruplarının karşılaştırılması. (* p<0.05, ** p<0.001)

İstatistiksel olarak, grupların Total TFH hücreleri içindeki CD4+IL4+ absolute hücre sayıları ve yüzdeleri için gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$). Total TFH hücreleri içindeki CD4+IL21+ absolute hücre sayısı tedavi gören Gaucher hastalarının sağlıklı kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12) ($p<0.05$). Total TFH hücreleri içindeki CD4+IL21+ yüzdelerinin hem tedavi gören GH hastalarında hem de taşıyıcı grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil 4.12).

TFH hücreleri içinden seçilen CXCR5+IL4+ ve CXCR5+IL21+ akım sitometri sonucu elde edilen kapılama stratejileri şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL21+ ve CXCR5+IL4+'in akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu

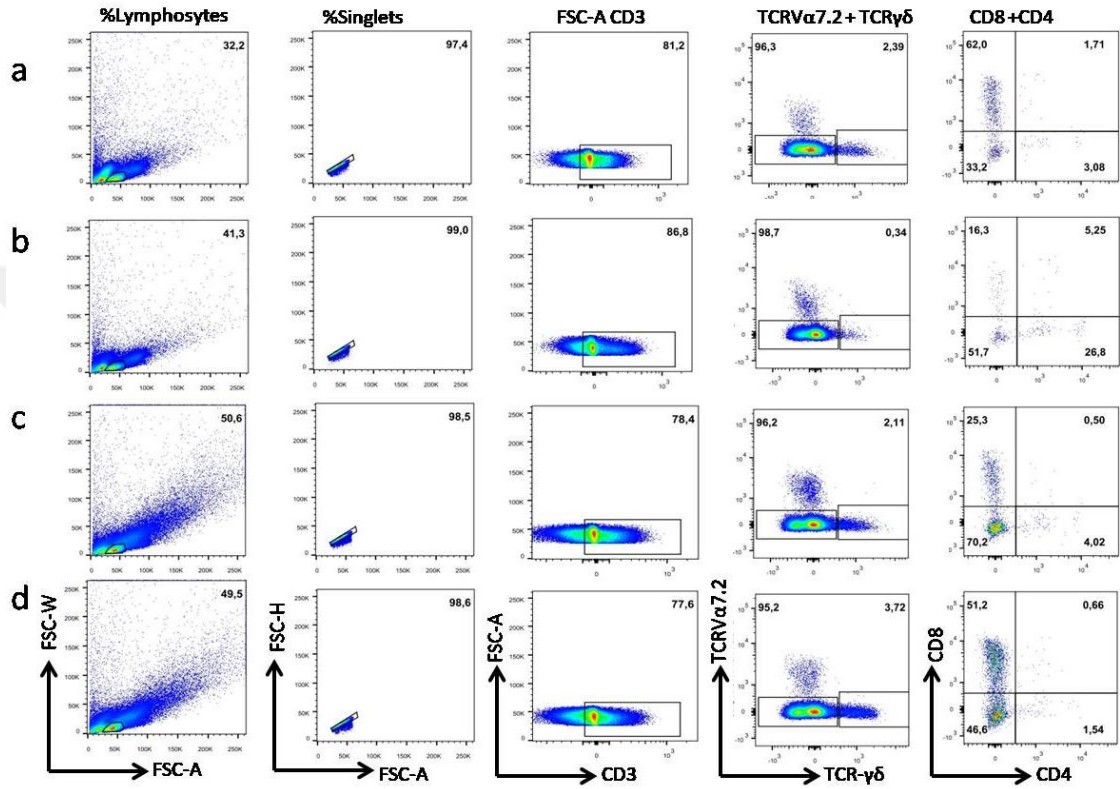


Şekil 4.14. Total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL21+ ve CXCR5+IL4+ analizleri (a) TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL4+ absolute hücre sayısının (b) CXCR5+IL4+ yüzdelерinin (c) CXCR5+IL21+ absolute hücre sayısının (d) CXCR5+IL21+ yüzdelерinin Sağlıklı gönüllü, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher ve GH taşıyıcı gruplarının karşılaştırılması (* p<0.05, ** p<0.001).

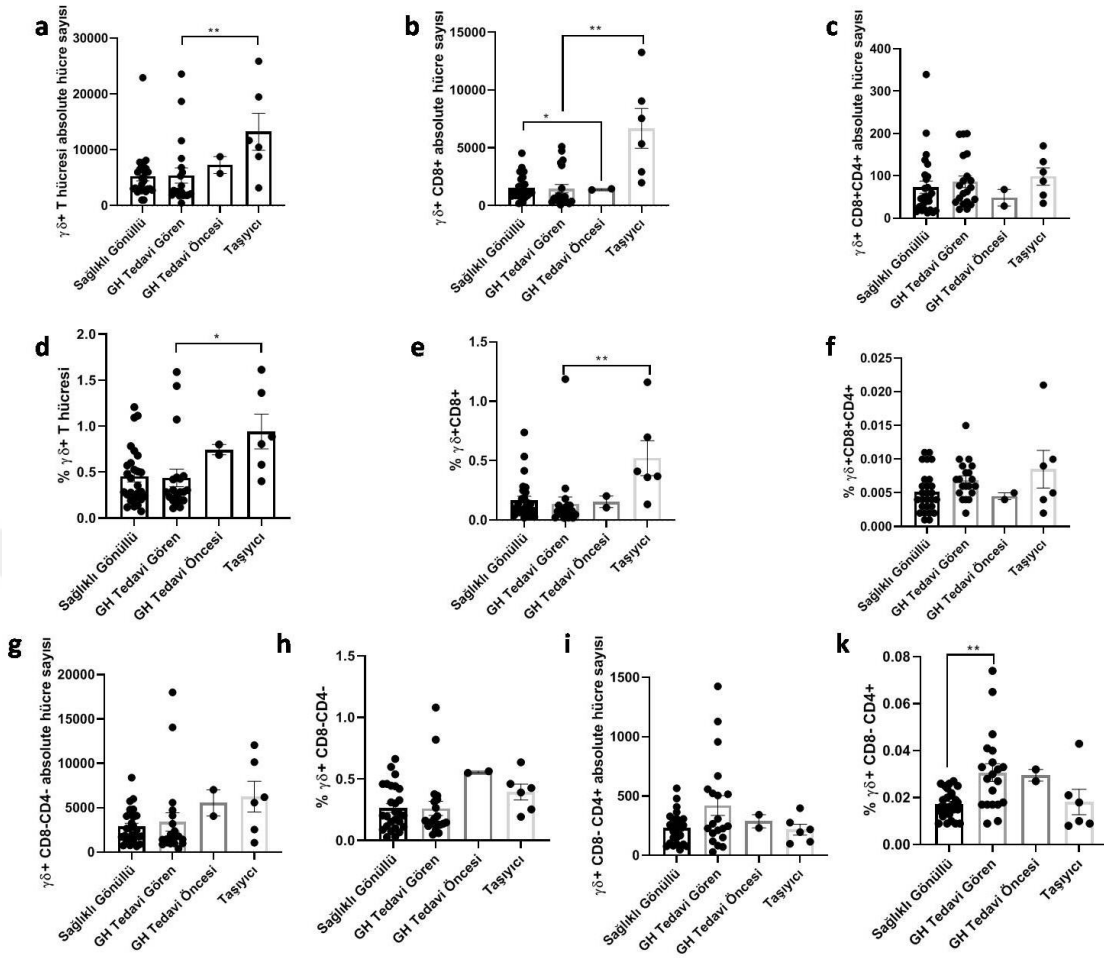
Tedavi gören Gaucher hastalarında total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL4+ absolute hücre sayıları ve CXCR5+IL4+ yüzdelерinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.14). Total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL21+ absolute hücre sayıları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil 4.14). Total TFH hücreleri içindeki CXCR5+IL21+ yüzdelерinin tedavi gören Gaucher hastalarında sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak artmış olduğu bulundu (Şekil 4.14) ($p<0.001$).

MAIT Hücrelerin Analizi

Boyaması yapılan lökositlerden elde edilen MAIT $V\alpha$ -7.2, $\gamma\delta$ +CD8+, $\gamma\delta$ +CD8+CD4+, $\gamma\delta$ +CD8-CD4-, $\gamma\delta$ +CD8-CD4+ hücrelerinin yüzey boyama sonrası akım sitometri de okutulan örneklerin kapılama stratejileri Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. MAIT $V\alpha$ -7.2- $\gamma\delta$ T hücresi, CD8+, CD8+CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu

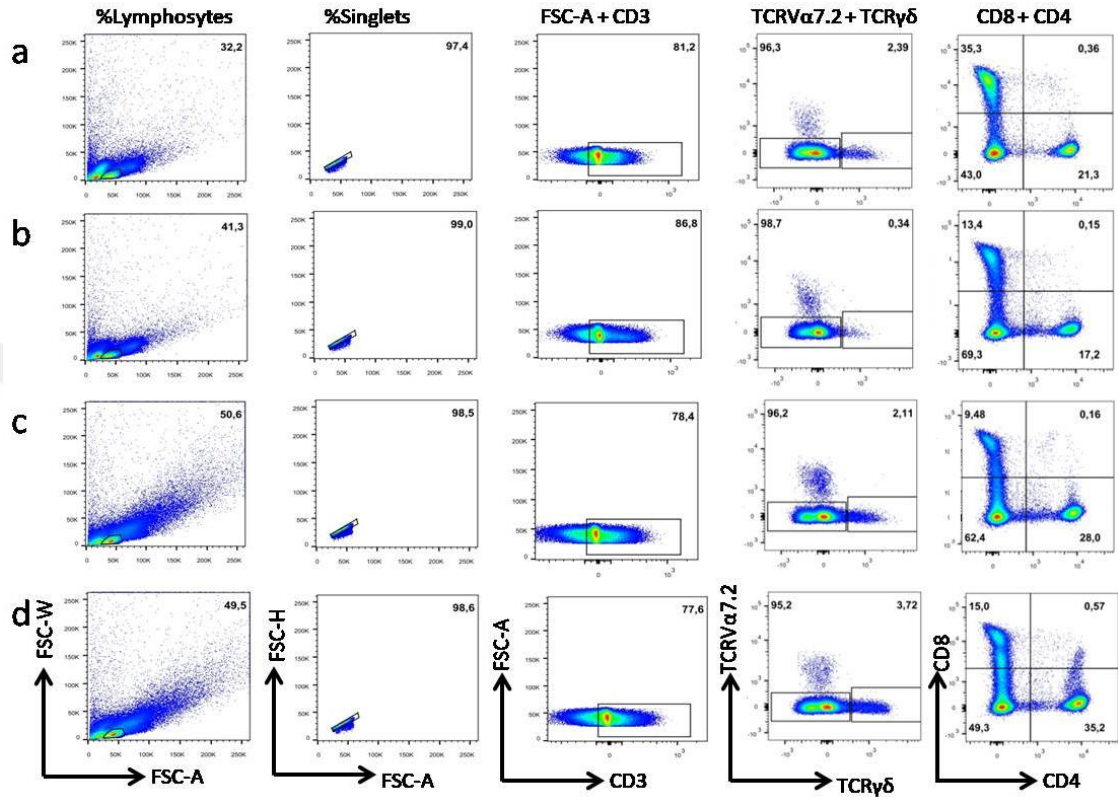


Şekil 4.16. MAIT $\gamma\delta$ T hücresi, $\gamma\delta$ +CD8+, $\gamma\delta$ +CD8+CD4+, $\gamma\delta$ +CD8-CD4-, $\gamma\delta$ +CD8-CD4+ hücrelerinin analizleri. (a) $\gamma\delta$ T hücresi absolute hücre sayısı (b) $\gamma\delta$ +CD8+ absolute hücre sayısı (c) $\gamma\delta$ + CD8+CD4+ absolute hücre sayısı (d) $\gamma\delta$ + yüzdesi (e) $\gamma\delta$ +CD8+ yüzdesi (f) $\gamma\delta$ +CD8+CD4+ yüzdesi (g) $\gamma\delta$ + CD8-CD4- absolute hücre sayısı (h) $\gamma\delta$ + CD8-CD4- yüzdesi (i) $\gamma\delta$ + CD8-CD4+ absolute hücre sayısı (k) $\gamma\delta$ + CD8-CD4+ yüzdesi (* p<0.05, ** p<0.001).

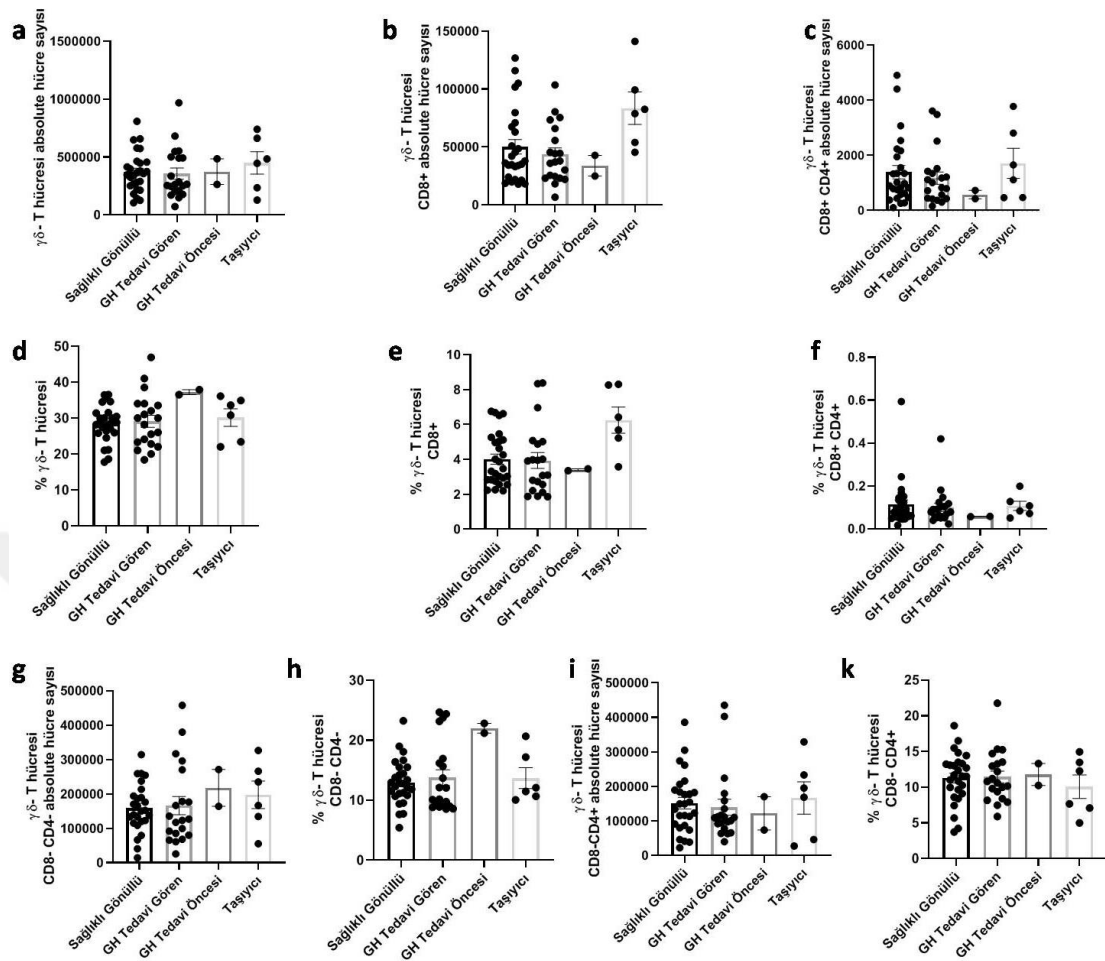
GH taşıyıcı grubunun $\gamma\delta$ T hücresi, $\gamma\delta$ +CD8+absolute hücre sayısı ve yüzdeleri tedavi gören Gaucher hastalarına göre kıyaslandığında anlamlı bir artış olduğu görüldü (p<0.05-p<0.001) (Şekil 4.16).

GH tedavi öncesi hastalarda $\gamma\delta$ +CD8+ absolute hücre sayısının sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.16) (p<0.05). $\gamma\delta$ +CD8-CD4+ yüzdesinin tedavi gören Gaucher hastalarının sağlıklı kontrollere göre arttığı bulundu (Şekil 4.16) (p<0.001).

Boyaması yapılan lökositlerden elde edilen Non-MAIT $V\alpha$ -7.2, $\gamma\delta$ +CD8+, $\gamma\delta$ +CD8+CD4+, $\gamma\delta$ +CD8-CD4-, $\gamma\delta$ +CD8-CD4+ hücrelerinin yüzey boyama sonrası akım sitometri de okutulan örneklerin kapılama stratejileri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



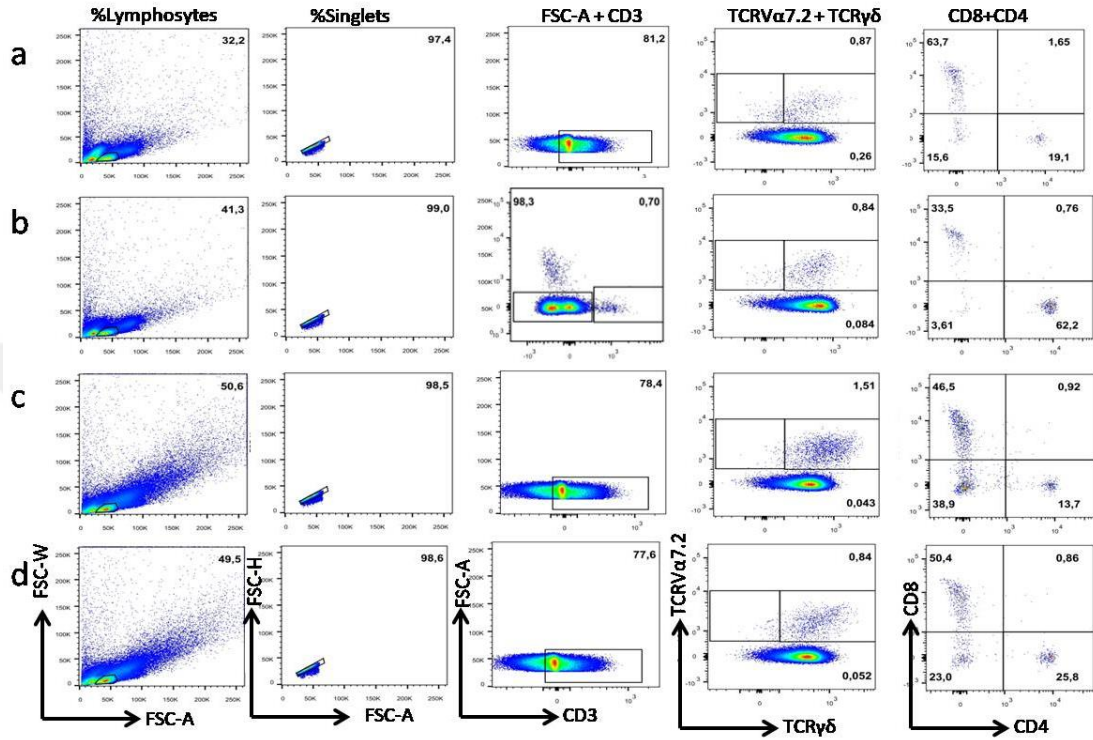
Şekil 4.17. Non-MAIT $V\alpha$ -7.2, $\gamma\delta$ +CD8+, $\gamma\delta$ +CD8+CD4+, $\gamma\delta$ +CD8-CD4- T hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu



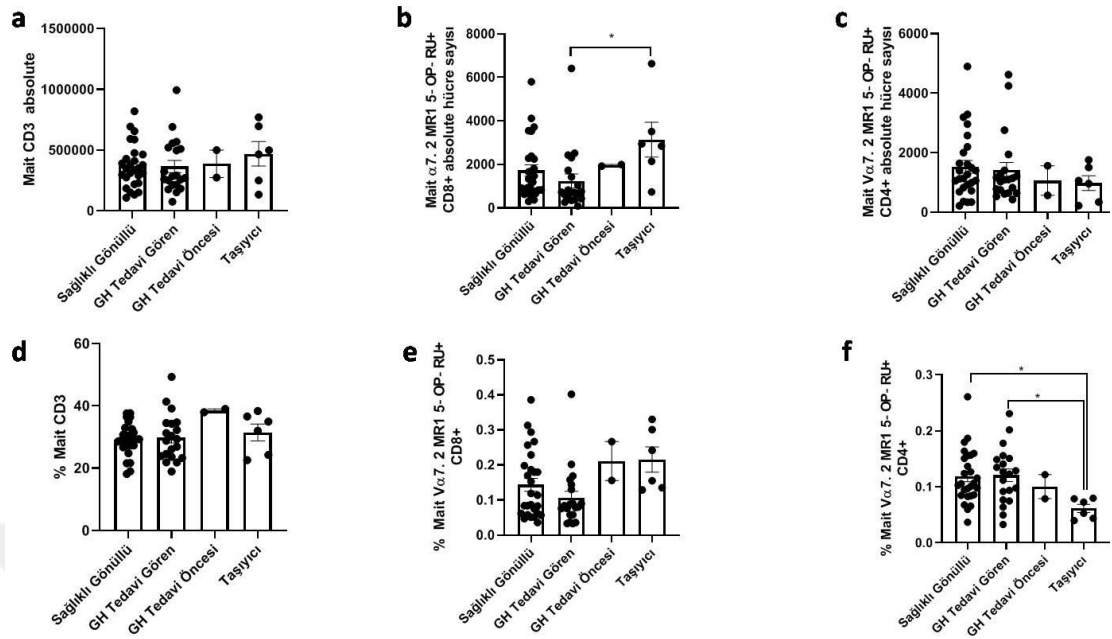
Şekil 4.18. Non-MAIT $\gamma\delta^-$, $\gamma\delta^-$ CD8+, $\gamma\delta^-$ CD8+CD4+, $\gamma\delta^-$ CD8-CD4-, $\gamma\delta^-$ CD8-CD4+ hücrelerinin analizleri. (a) $\gamma\delta^-$ T hücresi absolute hücre sayısı (b) $\gamma\delta^-$ CD8+ absolute hücre sayısı (c) $\gamma\delta^-$ CD8+CD4+ absolute hücre sayısı (d) $\gamma\delta^-$ yüzdesi (e) $\gamma\delta^-$ CD8+ yüzdesi (f) $\gamma\delta^-$ CD8+CD4+ yüzdesi (g) $\gamma\delta^-$ CD8-CD4- absolute hücre sayısı (h) $\gamma\delta^-$ CD8-CD4- yüzdesi (i) $\gamma\delta^-$ CD8-CD4+ absolute hücre sayısı (k) $\gamma\delta^-$ CD8-CD4+ yüzdesi (* p<0.05, ** p<0.001).

$\gamma\delta^-$ T hücresi absolute hücre sayısı ve yüzdesi, $\gamma\delta^-$ CD8+ absolute hücre sayısı ve yüzdesi, $\gamma\delta^-$ CD8+CD4+ absolute hücre sayısı ve yüzdesi, $\gamma\delta^-$ CD8-CD4- absolute hücre sayısı ve yüzdesi ve $\gamma\delta^-$ CD8-CD4+ absolute hücre sayısı ve yüzdesi sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.18; p>0.05).

Gruplar arası MAIT CD3, MAIT $V\alpha$ -7.2 MR1 5-OP-RU+CD8+, MAIT $V\alpha$ -7.2 MR1 5-OP-RU+CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile yapılan kapılama stratejileri Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. MAIT $V\alpha$ -7.2 hücreleri içinden CD3, 5-OP-RU+CD8+ ve 5-OP-RU+CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu.

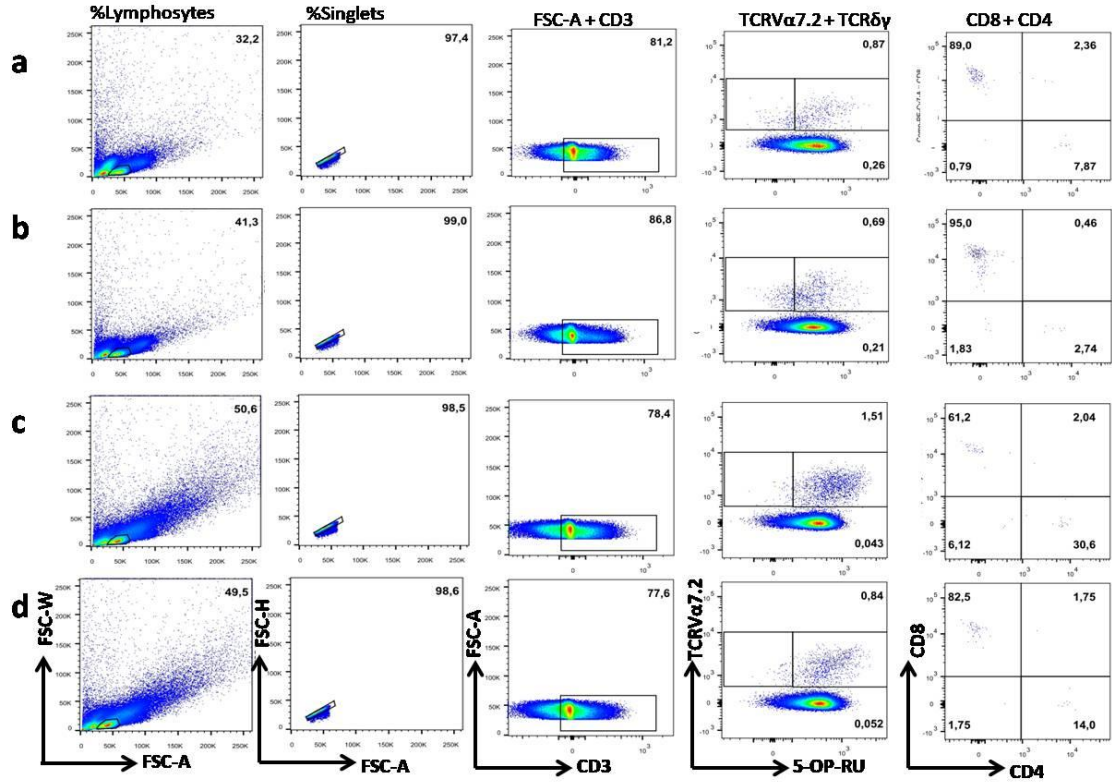


Şekil 4.20. MAIT CD3, MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD8+, MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD4+ hücrelerinin analizleri. **(a)** MAIT CD3 absolute hücre sayısı **(b)** MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD8+ absolute hücre sayısı **(c)** MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD4+ absolute hücre sayısı **(d)** MAIT CD3 hücre yüzdesi **(e)** MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD8+ hücre yüzdesi **(f)** MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD4+ hücre yüzdesi (* $p < 0.05$).

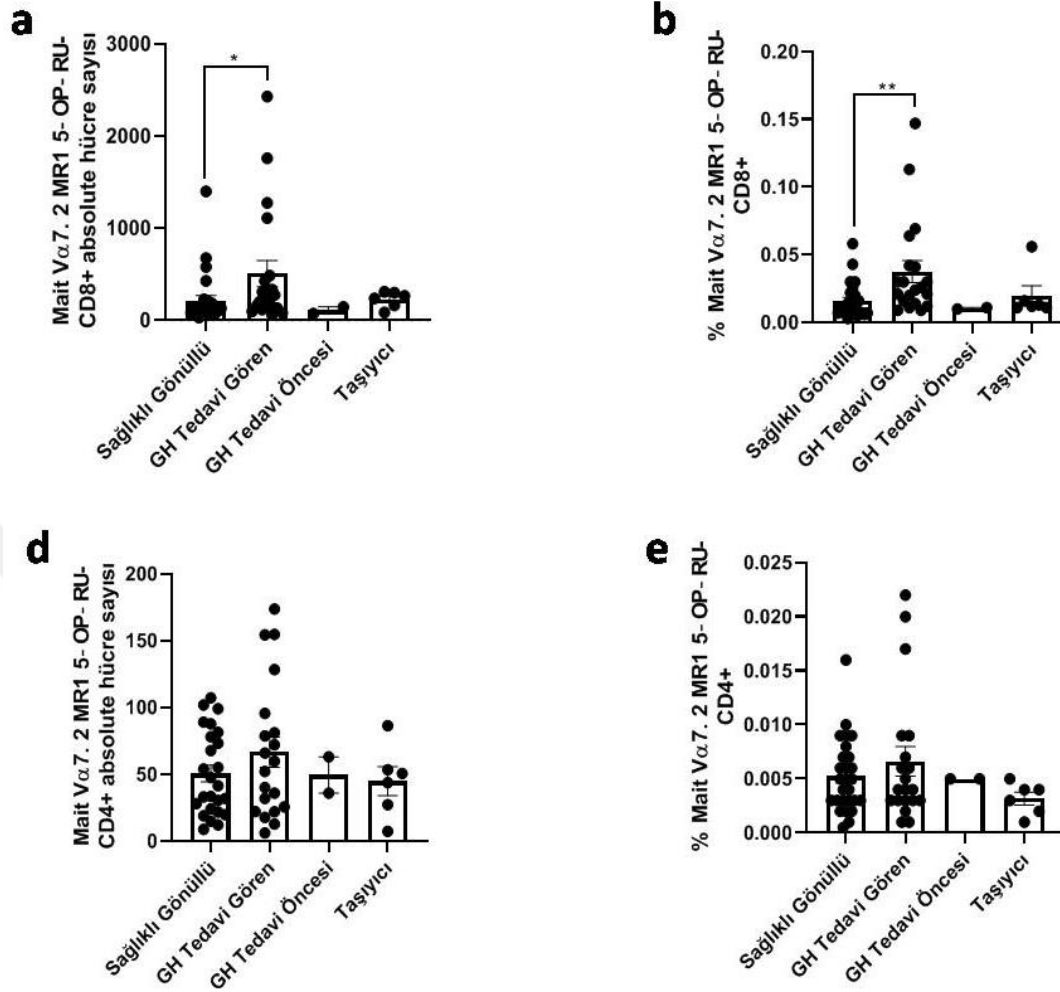
MAIT CD3 absolute hücre sayısı ve yüzdesinde, MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD8+ yüzdesinde, MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+CD4+ absolute hücre sayıları sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hastave GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.20; $p > 0.05$).

MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+ CD8+ absolute hücre sayısı GH taşıyıcı grubunun tedavi gören GH hastalarına göre istatistiksel olarak artmış olduğu görüldü (Şekil 4.20) ($p < 0.05$). MAIT Va.7.2 MR1 5-OP-RU+ CD4+ yüzdesi GH taşıyıcı grubunun hem kontrol grubuna göre hem de tedavi gören GH hastalarına göre azaldığı görüldü (Şekil 4.20) ($p < 0.05$).

Tüm örneklerde MAIT $V\alpha$ -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8- ve MAIT $V\alpha$ -7.2 MR1 5-OP-RU-CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile yapılan kapılama stratejileri Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



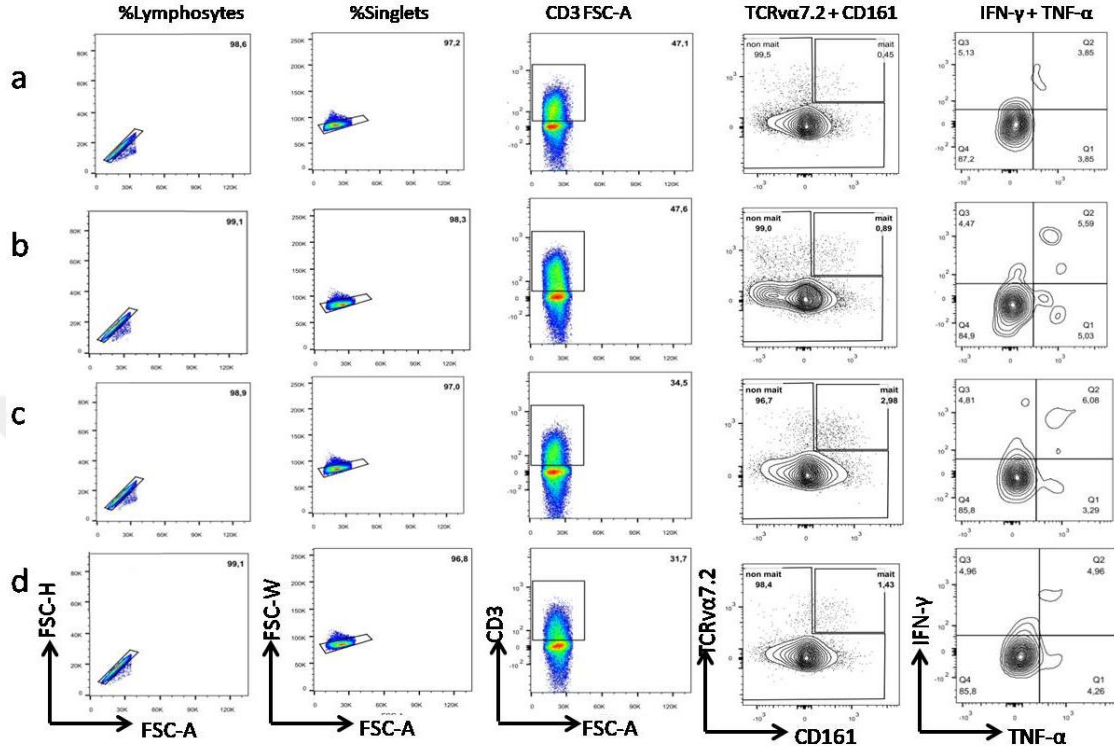
Şekil 4.21. MAIT $V\alpha$ -7.2 hücreleri içinden 5-OP-RU-CD8+ ve 5-OP-RU-CD4+ hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH Taşıyıcı grubu



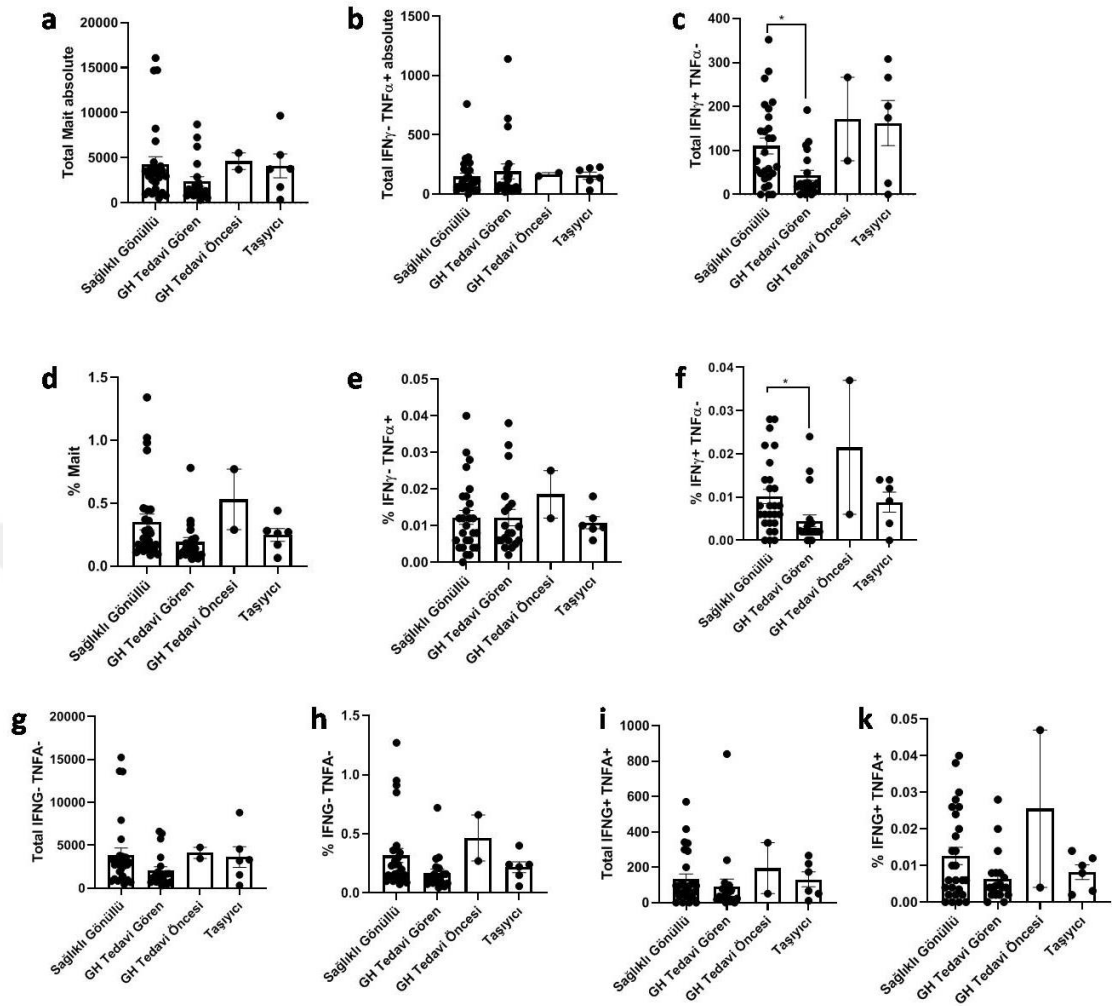
Şekil 4.22. MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8+, TCRV α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD4+ hücrelerinin analizleri (a) MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8+ absolute hücre sayısı (b) MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8+ hücre yüzdesi (c) MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD4+ absolute hücre sayısı (d) MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD4+ hücre yüzdesi (* p<0.05, ** p<0.001).

MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8+ absolute hücre sayısı ve yüzdesi tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmış olduğu görüldü (Şekil4.22) (p<0.05-p<0.001). MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD4+ absolute hücre sayısı ve yüzdeleri sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.22; p>0.05).

MAIT hücrelerde ve MAIT hücrelerin içindeki IFN- γ + TNF- α nükleer boyama sonucu elde edilen kapılama stratejileri Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



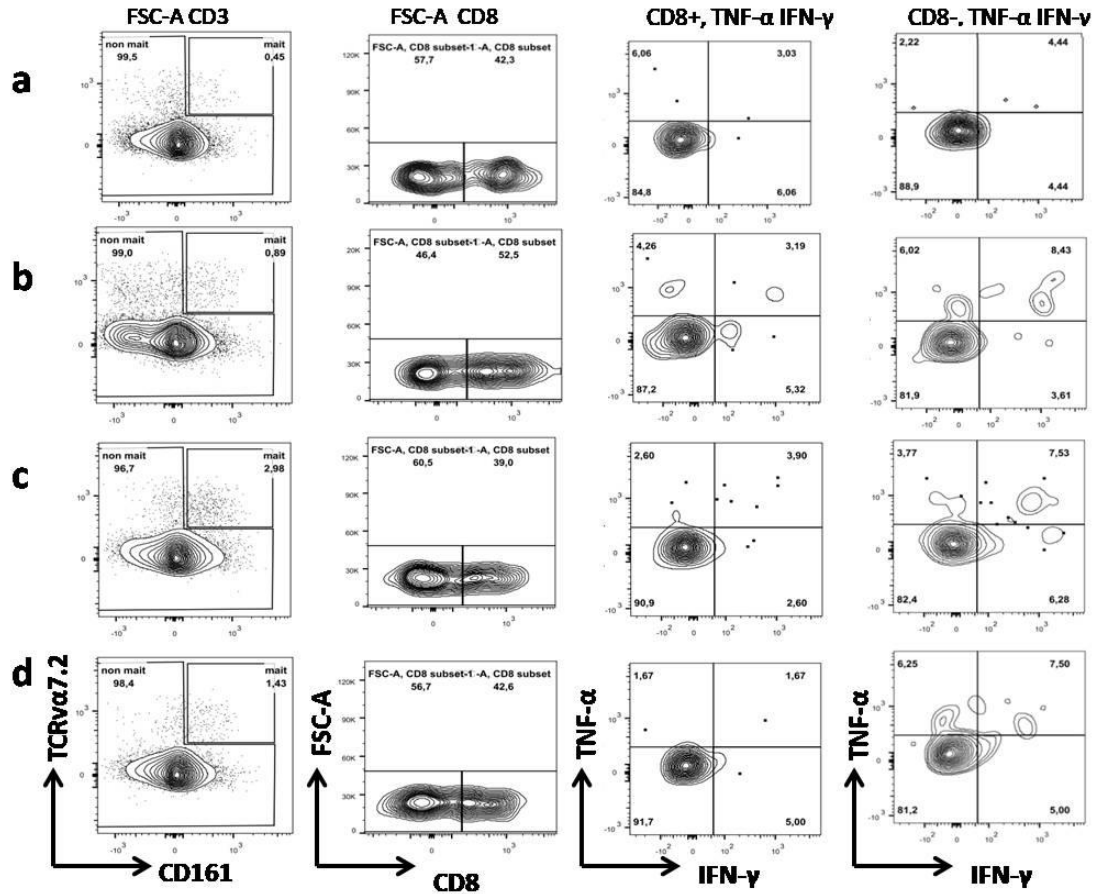
Şekil 4.23. Total MAIT ve MAIT hücreleri içindeki IFN- γ ve TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu



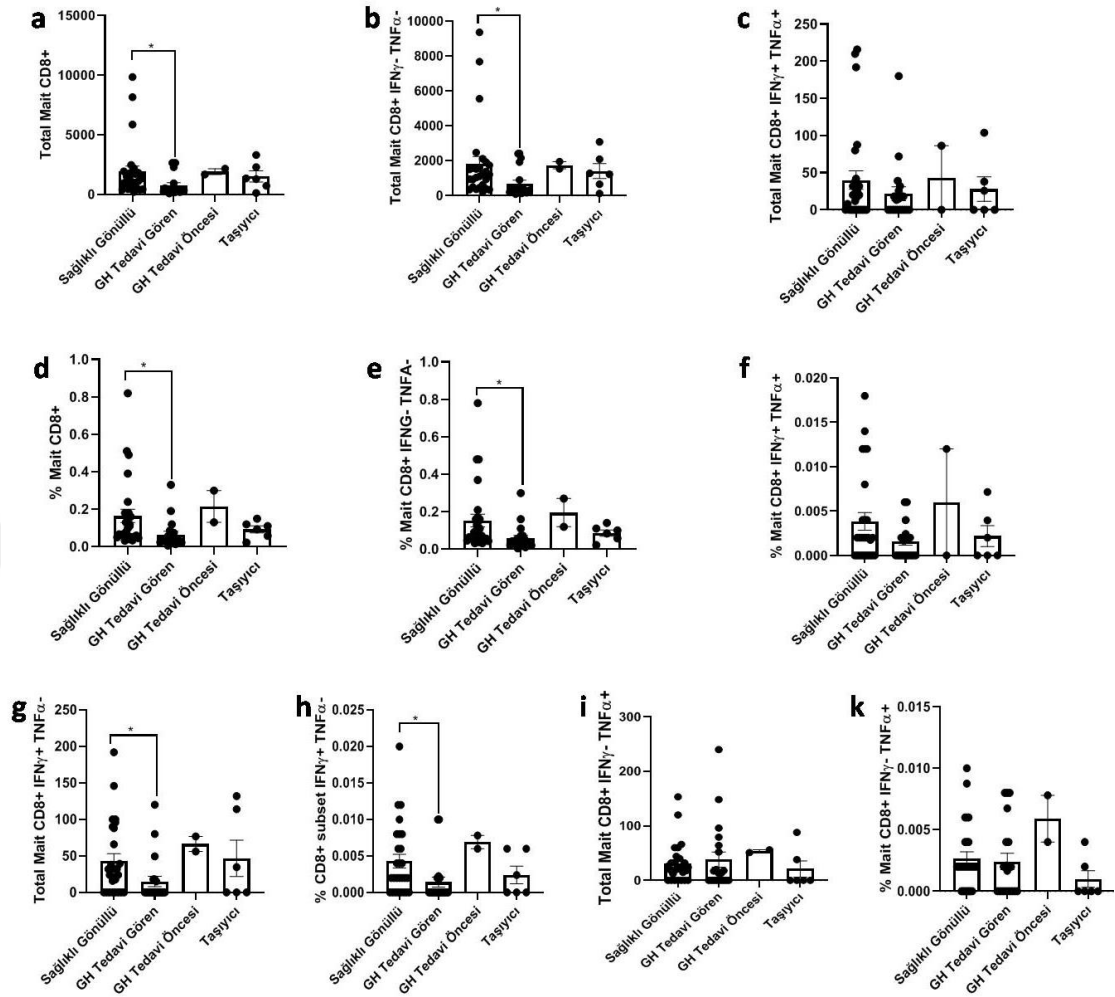
Şekil 4.24. Total MAIT, Total MAIT hücreleri içindeki $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^+$, $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^-$, $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^-$, $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^+$ hücrelerinin analizleri. **(a)** Total MAIT absolute hücre sayısı **(b)** Total MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^+$ absolute hücre sayısı **(c)** Total MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^-$ absolute hücre sayısı **(d)** MAIT yüzdesi **(e)** MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^+$ yüzdesi **(f)** MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^-$ yüzdesi **(g)** Total MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^-$ absolute hücre sayısı **(h)** $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^-$ yüzdesi **(i)** Total MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^+$ absolute hücre sayısı **(k)** MAIT hücrelerin içindeki $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^+$ yüzdesi (* $p < 0.05$).

Total MAIT, total $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^+$, $\text{IFN}\gamma\text{-TNF-}\alpha^-$, $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^+$ absolute hücre sayısı ve yüzdesinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı bulundu (Şekil 4.24) ($p > 0.05$). Total $\text{IFN}\gamma\text{+TNF-}\alpha^-$ absolute hücre sayısı ve yüzdesi tedavi gören Gaucher hastalarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmış olduğu görüldü (Şekil 4.24) ($p < 0.05$).

Total MAIT CD8+, MAIT CD8+ hücreleri içindeki IFN- γ ve TNF- α ve CD8- içindeki IFN γ + TNF- α nükleer boyama sonucu elde edilen kapılama stratejileri Şekil 4.25'te gösterilmiştir.



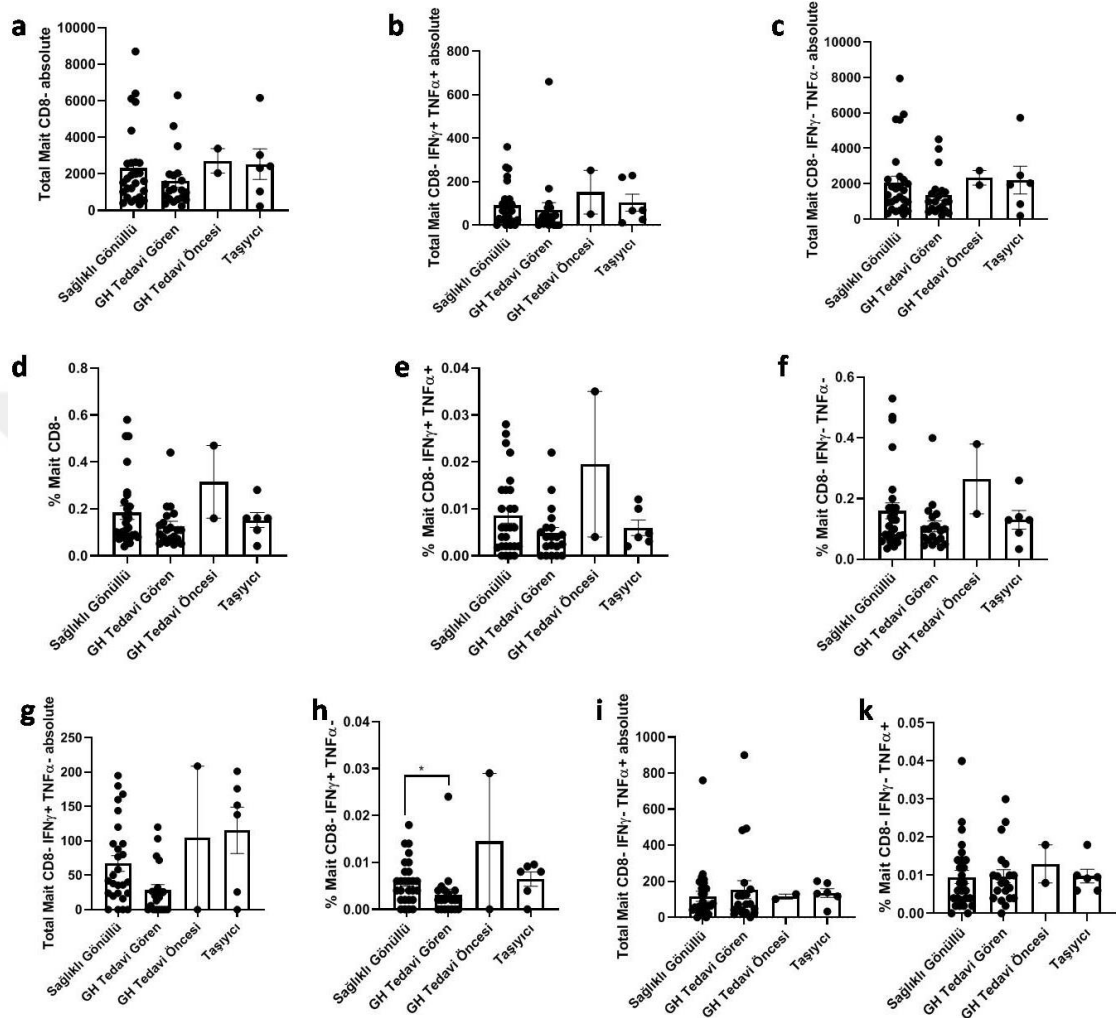
Şekil 4.25. Total MAIT, MAIT CD8+hücreleri içindeki IFN- γ + TNF- α , MAIT CD8- içindeki IFN γ + TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu.



Şekil 4.26. Total MAIT CD8+, MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α -, $IFN\gamma$ +TNF- α +, $IFN\gamma$ +TNF- α -, $IFN\gamma$ -TNF- α + hücrelerinin analizleri. (a) Total MAIT CD8+ absolute hücre sayısı (b) Total MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α - absolute hücre sayısı (c) Total MAIT içindeki CD8+ $IFN\gamma$ +TNF- α + absolute hücre sayısı (d) MAIT CD8+ yüzdesi (e) MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α - yüzdesi (f) MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α + yüzdesi (g) Total MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α - absolute hücre sayısı (h) MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α - yüzdesi (i) Total MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α + absolute hücre sayısı (k) MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α + yüzdesi (* p<0.05).

MAIT CD8+, MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α - ve $IFN\gamma$ +TNF- α - absolute total hücre sayısı ve yüzdelerinin tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmış olduğu bulundu (Şekil 4.26) (p<0.05). MAIT CD8+ içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α + ve $IFN\gamma$ -TNF- α + absolute hücre sayısı ve yüzdeleri sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları

karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 4.26; $p>0.05$).

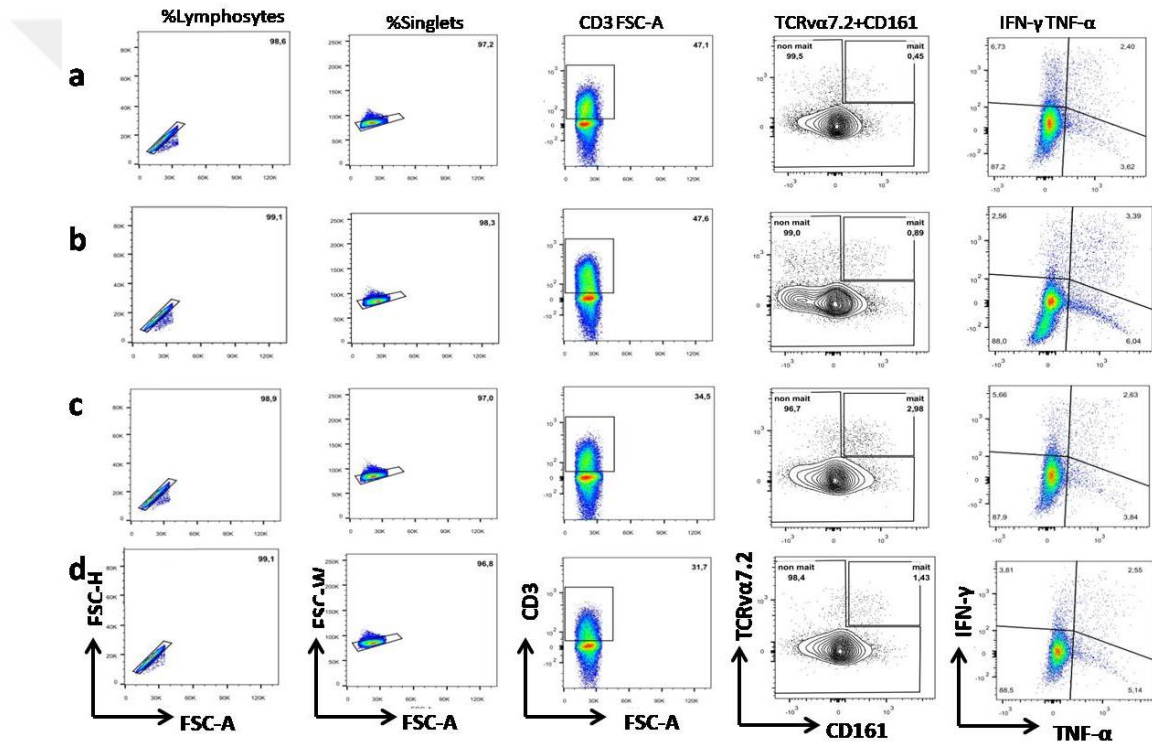


Şekil 4.27. Total MAIT CD8-, MAIT CD8- içindeki IFN γ -TNF- α -, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α + hücrelerinin analizleri. (a) Total MAIT CD8- absolute hücre sayısı (b) Total MAIT CD8- IFN γ +TNF- α + absolute hücre sayısı (c) Total MAIT CD8- IFN γ -TNF- α - absolute hücre sayısı (d) MAIT CD8- yüzdesi (e) MAIT CD8- IFN γ +TNF- α + yüzdesi (f) MAIT CD8- IFN γ -TNF- α - yüzdesi (g) Total MAIT CD8- IFN γ +TNF- α - absolute hücre sayısı (h) MAIT CD8- IFN γ +TNF- α - yüzdesi (i) Total MAIT CD8- IFN γ -TNF- α + absolute hücre sayısı (k) MAIT CD8- IFN γ -TNF- α + yüzdesi (* $p<0.05$).

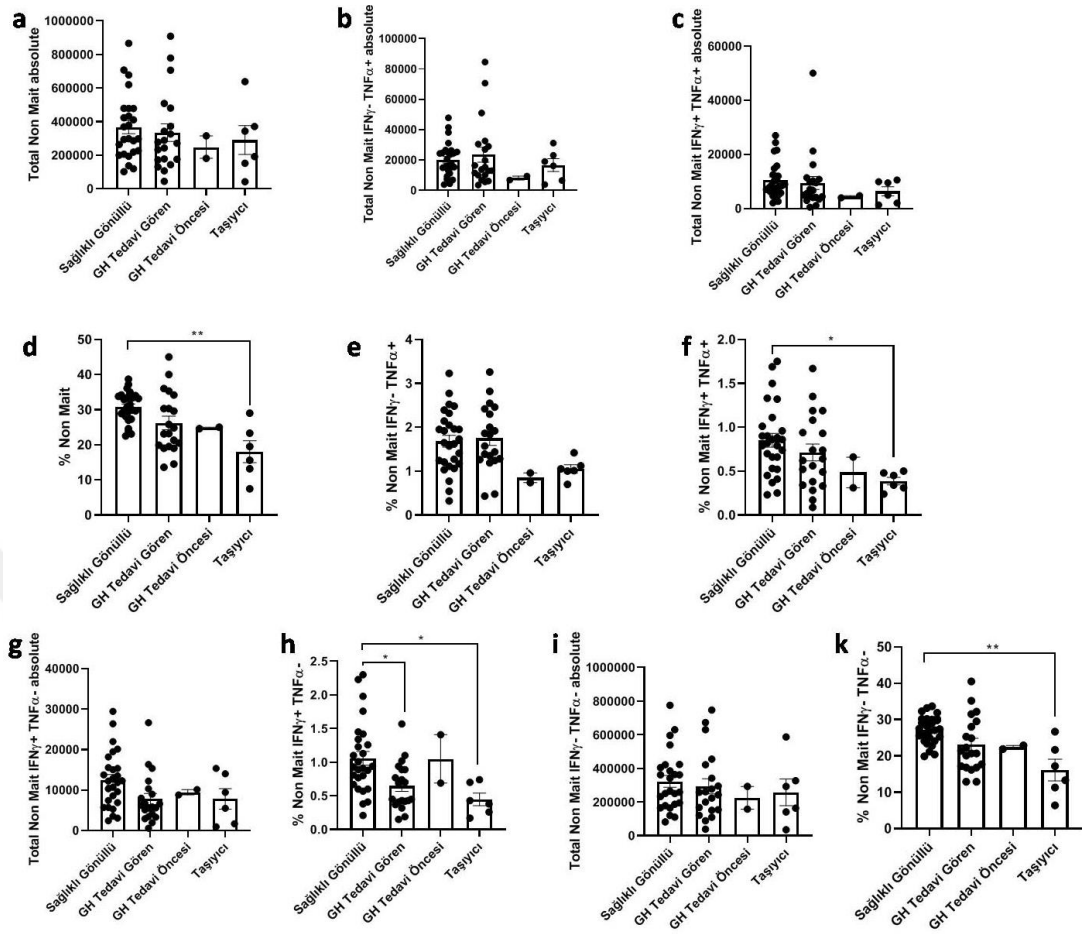
MAIT CD8-, MAIT CD8- IFN γ +TNF- α +, MAIT CD8- IFN γ -TNF- α -, MAIT CD8- IFN γ -TNF- α + absolute total hücre sayısı ve yüzdeleri sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil

4.27; $p>0.05$). MAIT CD8- IFN γ +TNF- α - absolute total hücre sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), MAIT CD8- IFN γ +TNF- α - yüzdelерinde tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.27).

Non-MAIT hücrelerde ve Non-MAIT içindeki IFN- γ + TNF- α nükleer boyama sonucu elde edilen kapılama stratejileri Şekil 4.28’de gösterilmiştir.



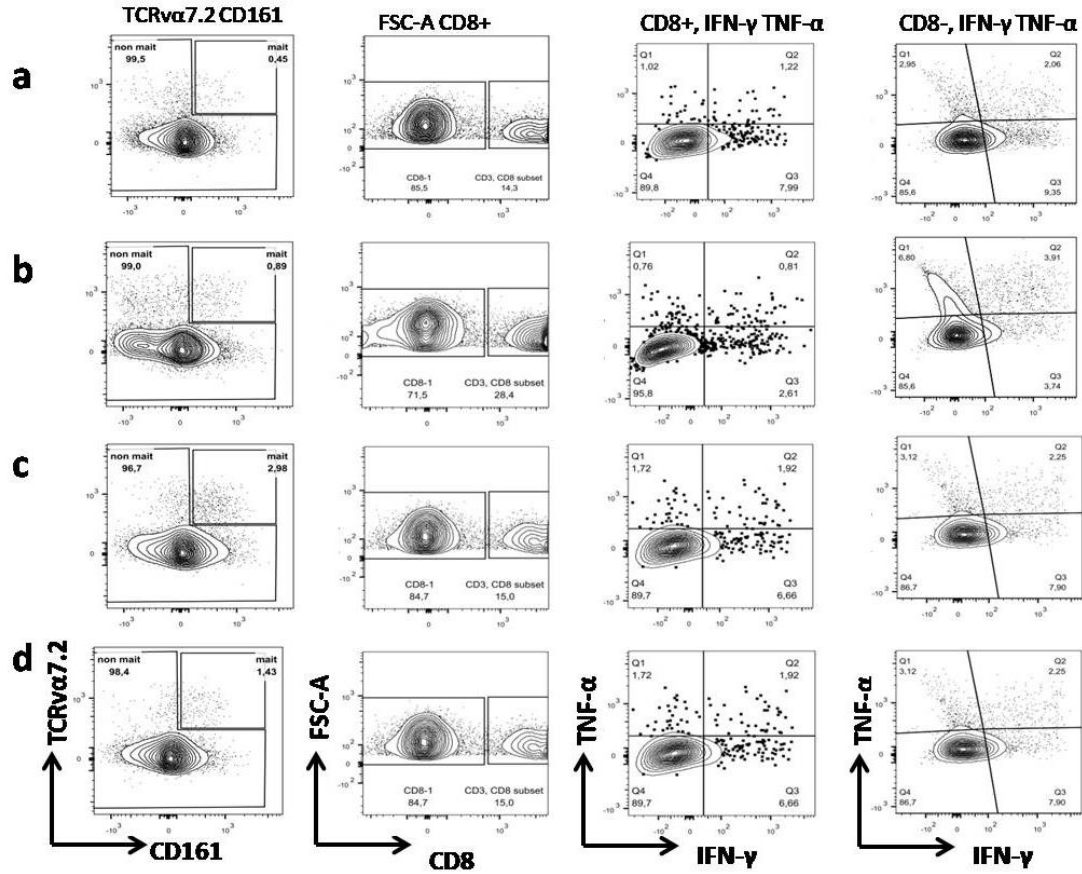
Şekil 4.28. Total Non-MAIT, Non-MAIT hücreleri içindeki IFN- γ ve TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu



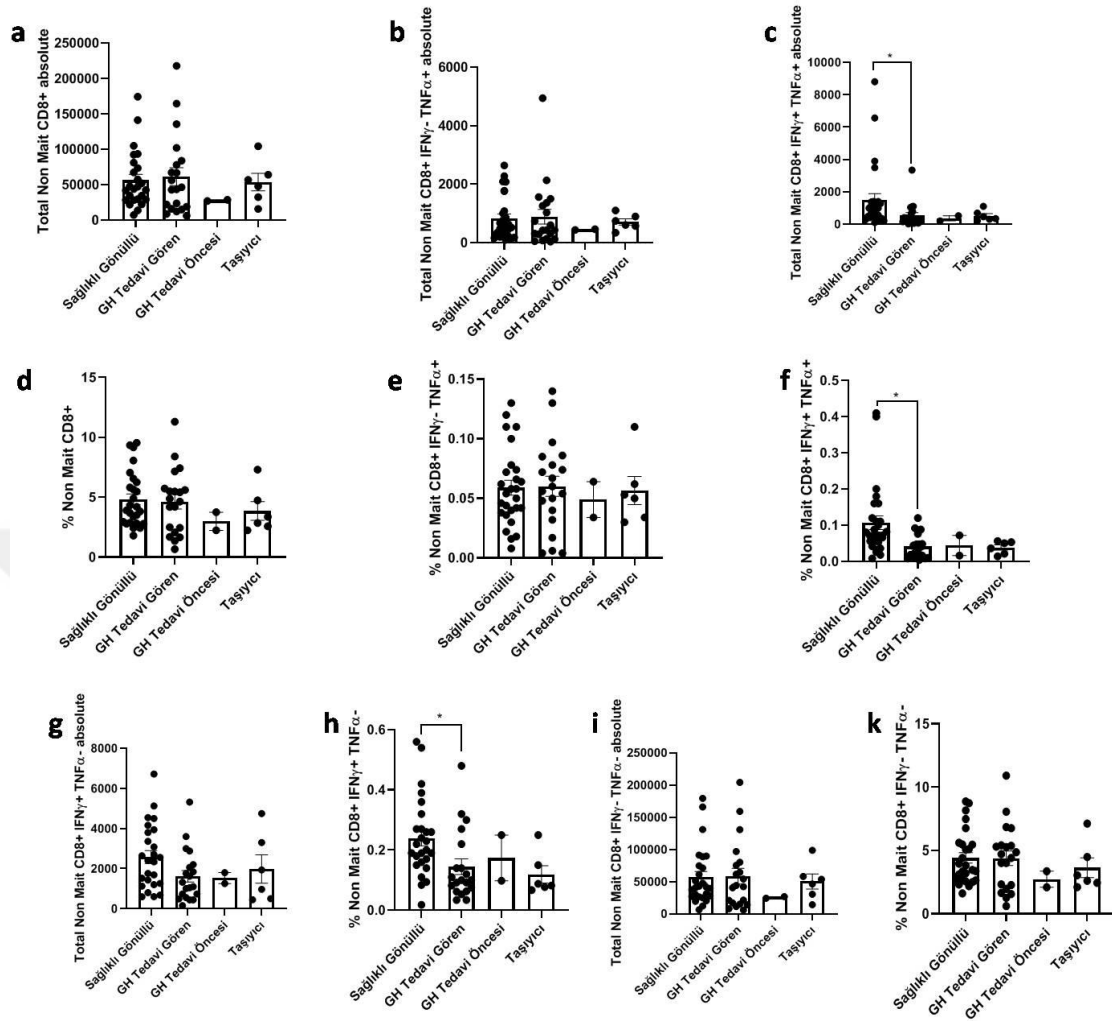
Şekil 4.29. Total Non-MAIT, Total Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α +, $IFN\gamma$ +TNF- α +, $IFN\gamma$ +TNF- α -, $IFN\gamma$ -TNF- α - hücrelerinin analizleri. **(a)** Total Non-MAIT absolute hücre sayısı **(b)** Total Non-MAIT $IFN\gamma$ -TNF- α + absolute hücre sayısı **(c)** Total Non-MAIT $IFN\gamma$ +TNF- α + absolute hücre sayısı **(d)** Non-MAIT yüzdesi **(e)** Non-MAIT $IFN\gamma$ -TNF- α + yüzdesi **(f)** Non-MAIT $IFN\gamma$ +TNF- α + yüzdesi **(g)** Total Non-MAIT $IFN\gamma$ +TNF- α - absolute hücre sayısı **(h)** Non-MAIT $IFN\gamma$ +TNF- α - yüzdesi **(i)** Total Non-MAIT $IFN\gamma$ -TNF- α - absolute hücre sayısı **(k)** Non-MAIT $IFN\gamma$ -TNF- α - yüzdesi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$).

Total Non-MAIT, Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α +, Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α +, Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α -, Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ -TNF- α - absolute hücre sayılarında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı bulundu (Şekil 4.29; $p>0.05$). Non-MAIT'lerde, Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α +, Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α - ve Non-MAIT $IFN\gamma$ -TNF- α - yüzdelерinin GH taşıyıcı grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü ($p<0.05$ - $p<0.001$) (Şekil 4.29). Non-MAIT içindeki $IFN\gamma$ +TNF- α - yüzdesinin tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.29).

Total Non-MAIT CD8+, Non-MAIT CD8+ hücreleri içindeki IFN- γ ve TNF- α ve Non-MAIT CD8- içindeki IFN- γ + TNF- α nükleer boyama sonucu elde edilen kapılama stratejileri Şekil 4.30’da gösterilmiştir.



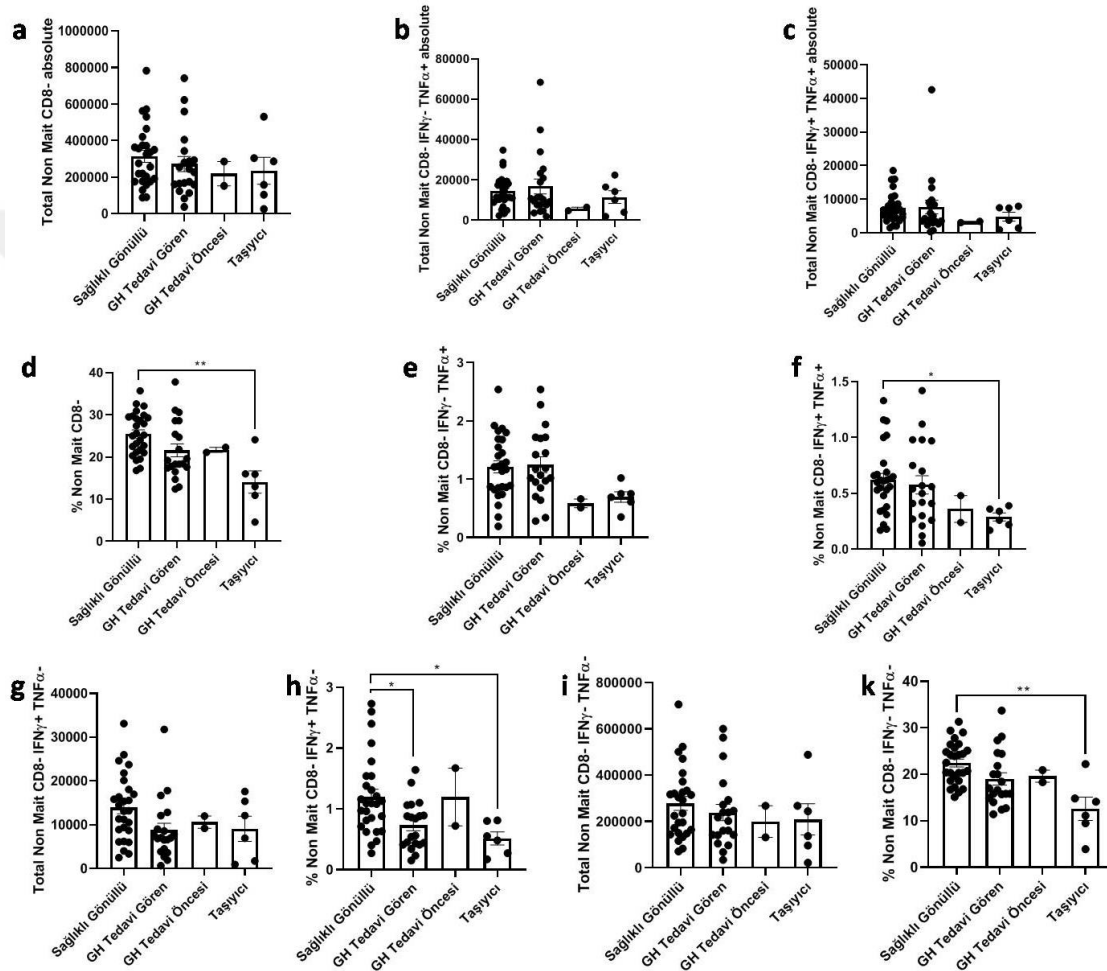
Şekil 4.30. Total Non-MAIT, Non-MAIT CD8+ içindeki IFN- γ + TNF- α , CD8- içindeki IFN- γ + TNF- α hücrelerinin akım sitometri ile kapılama stratejilerinin gösterilmesi. (a) Sağlıklı gönüllü, (b) Tedavi gören Gaucher hasta, (c) Tedavi öncesi Gaucher hasta ve (d) GH taşıyıcı grubu.



Şekil 4.31. Total Non-MAIT CD8+, Total Non-MAIT CD8+ içindeki IFN γ -TNF- α +, IFN γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α -, IFN γ -TNF- α - hücrelerinin analizleri. **(a)** Total Non-MAIT CD8+ absolute hücre sayısı **(b)** Total Non-MAIT CD8+ IFN γ -TNF- α + absolute hücre sayısı **(c)** Total Non-MAIT CD8+ IFN γ +TNF- α + absolute hücre sayısı **(d)** Non-MAIT CD8+ yüzdesi **(e)** MAIT CD8+ IFN γ -TNF- α + yüzdesi **(f)** Non-MAIT CD8+ IFN γ +TNF- α + yüzdesi **(g)** Total Non-MAIT CD8+ IFN γ +TNF- α - absolute hücre sayısı **(h)** Non-MAIT CD8+ IFN γ +TNF- α - yüzdesi **(i)** Total Non-MAIT CD8+ IFN γ -TNF- α - absolute hücre sayısı **(k)** Non-MAIT CD8+ IFN γ -TNF- α - yüzdesi (* p<0.05).

Total Non-MAIT CD8+, Total Non-MAIT CD8+ içindeki IFN γ -TNF- α +, IFN γ +TNF- α - ve IFN γ -TNF- α - absolute hücre sayıları ve Total Non-MAIT CD8+, Total Non-MAIT CD8+ içindeki IFN γ -TNF- α ve IFN γ -TNF- α - yüzdeleri sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.31; p>0.05).

Total Non-MAIT CD8⁺ içindeki IFN γ +TNF- α ⁺ absolute hücre sayısı ve yüzdesinin ve total Non-MAIT CD8⁺ içindeki IFN γ +TNF- α ⁻ yüzdesinin tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmış olduğu görüldü (Şekil 4.31) ($p<0.05$).



Şekil 4.32. Total Non-MAIT CD8⁻, Total Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ -TNF- α ⁺, IFN γ +TNF- α ⁺, IFN γ +TNF- α ⁻, IFN γ -TNF- α ⁻ hücrelerinin analizleri. (a) Total Non-MAIT CD8⁻ absolute hücre sayısı (b) Total Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ -TNF- α ⁺ absolute hücre sayısı (c) Total Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ +TNF- α ⁺ absolute hücre sayısı (d) MAIT CD8⁻ yüzdesi (e) Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ -TNF- α ⁺ yüzdesi (f) Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ +TNF- α ⁺ yüzdesi (g) Total Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ +TNF- α ⁻ absolute hücre sayısı (h) Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ +TNF- α ⁻ yüzdesi (i) Total Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ -TNF- α ⁻ absolute hücre sayısı (k) Non-MAIT CD8⁻ içindeki IFN γ -TNF- α ⁻ yüzdesi (* $p<0.05$, ** $p<0.001$).

Non-MAIT CD8-, Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ -TNF- α -, IFN γ +TNF- α -, IFN γ +TNF- α +, IFN γ -TNF- α + absolute total hücre sayıları ve Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ -TNF- α + yüzdesinin sağlıklı gönüllü grubu, tedavi gören Gaucher hasta, tedavi öncesi Gaucher hasta ve GH taşıyıcı grupları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.11; $p>0.05$).

GH Taşıyıcı grubunda, Non-MAIT CD8-, Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ +TNF- α + yüzdesi, Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ +TNF- α - yüzdesi ve Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ -TNF- α - yüzdelерinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulundu (Şekil 4.32) ($p<0.05$ - $p<0.001$). Ayrıca Non-MAIT CD8- içindeki IFN γ +TNF- α - yüzdesinin de tedavi gören Gaucher hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmış olduğu görüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.32).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

GH, popülasyonda yaklaşık 40-50.000 canlı doğumda bir görülen nadir bir lizozomal depo hastalığıdır. GH'larında GBA genindeki mutasyonlara bağlı olarak glukoserebrosidaz enzim eksikliği bulunur. Bu enzimin eksikliği nedeniyle yağlar, dalak, karaciğer, akciğer ve böbrek gibi iç organlarda birikir. GH'nin yaygın semptomları arasında büyüme geriliği, hepatosplenomegali, anemi, trombositopeni, kas ve iskelet sistemi bozuklukları görülür. Son yıllarda GH'nin erken teşhisi için biyobelirteç tabanlı çalışmalar önem kazanmıştır (Lo ve ark. 2012, Zahran ve ark. 2017). Bu çalışmamızda, Gaucher hasta grubu, taşıyıcı ve kontrol bireylerine ait kan örneklerinde CBMN-cyt yöntemi ile MN sıklığının ve plazma örneklerinde oksidatif DNA hasarı belirteci olarak 8-OHdG seviyelerinin, GH'da biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Çalışmamızda GH'lığıyla ilişkili olan MM, lenfoma, lösemi ve HCC kanserlerinde biyomarkır olarak yer alan onkogen ve tümör süpressör olarak görev yapan bazı miRNA'ların GH'deki ekspresyon değişimleri de değerlendirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada MAIT, TFH ve ILC immün sistem hücrelerinin ve IL-4, IL21, TNF- α ve IFN- γ sitokinlerinin hastalığıdaki değişimleri ve patogeneziindeki olası rolleri de araştırılmıştır.

Kromozomal ve Oksidatif DNA Hasarı

Günümüzde, periferik kan lenfositlerinde kromozomal aberasyon veya MN sıklığı genotoksik karsinojenlerin biyobelirteçleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Dong ve ark., 2019). Maffei ve ark. MN testinin kolorektal kanserli hastaların erken teşhisi için bir biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir (Maffei ve ark., 2014). Andreassi ve arkadaşlarında obezite ve metabolik sendrom, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklarda MN sıklığındaki artış ile, MN'un öngörülebilir bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Andreassi ve ark., 2011). Ayrıca, kardiyovasküler hastalıklarda kadınlar arasında 8-OHdG seviyelerinin yüksek düzeyde olduğu da bulunmuştur (Nagao ve ark., 2020). Literatür taramasına göre GH'da

CBMN-cyt yöntemi parametrelerine ve plazma 8-OHdG düzeylerine ilişkin bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Çalışmamızda hem tedavi alan Gaucher hastalarında hem de taşıyıcı grupta kontrollere göre MN, NPB, NBUD, NBI ve metafaz sayıları açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu sonuçlarımız, kromozomal DNA hasarı parametrelerinin ve özellikle MN'un Gaucher hastalarında bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesinin mümkün olamayacağını düşündürür. Ancak kromozomal DNA hasarının hastaların tedavisi ile değişiklik gösterip göstermediğini anlayabilmek için yeni tanı almış (tedavi öncesi) Gaucher hastalarında bu parametreleri değerlendirmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Nadir hastalık olması nedeniyle bizim örnek toplama süresince sadece iki tane yeni tanı almış Gaucher hastası bulunabilmiş ve bu hastalarda da tedavi sonrasında metafaz sayılarının azalması dışında diğer CBMN-cyt parametrelerinde belirgin bir farklılık göze çarpmamıştır.

Diğer taraftan, oksidatif DNA hasarı belirteci olarak plazma 8-OHdG seviyeleri hem tedavi gören GH hastalarında hem de taşıyıcı GH grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlarımıza benzer şekilde, diğer bir lizozomal depo hastalığı olan Fabry hastalarında kontrollere göre komet yöntemi kullanılarak oksidatif DNA hasarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Biancini ve ark., 2015). Gaucher hastalarındaki yüksek 8-OHdG seviyeleri, hastalarda tedaviden sonra bile lizozomal hasarın devam ettiğini gösterebilir ve bu sonuçların gerek başka çalışmalarla gerekse tedavi öncesidaha fazla GH hasta sayılarıyla desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda tedavi sonrası Gaucher hastalarında ve GH taşıyıcı grubunda hem CBMN-cyt yöntemi parametreleri hem de 8-OHdG seviyeleri araştırılarak literatürde ilk kez ele alınmıştır.

miRNA gen ifadeleri

miRNA'ların, 2002'den bu yana malign hastalıkların tanısında kanser biyobelirteçleri olarak büyük potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. miRNA'ların ekspresyon seviyeleri kanser ve normal dokular arasında ve ayrıca kanser alt tipleri arasında farklılık göstermektedir (Bidarra ve ark., 2019). miRNA'ların kanser biyobelirteçleri olarak potansiyelleri göz önüne alındığında, Gaucher hastalığıyla ilişkili olan MM, HCC, lenfoma ve lösemi gibi hastalıklara özgü bir miRNA ekspresyon profili

oluşturulması Gaucher hastalığı için kanserle ilişkili yer alan ilgili miRNA'ların belirlenmesinde katkıda bulunacaktır. Ancak, literatürde GH'da artan riske sahip bu kanserlere ilişkin miRNA'larla ilgili yeterli çalışma bulunamamıştır.

Pawliński ve ark. tarafından, tip 1 GH olan en az iki yıl boyunca enzim replasman tedavisi alan hastalarda miRNA ekspresyonlarının GH patofizyolojisindeki potansiyel rolleri analiz edilmiş ve miRNA-16, miRNA-17, miRNA-155 ve miRNA-195 miRNA'larında ekspresyonlarında artış olduğu bulunmuştur (Pawliński ve ark., 2020). Gaucher fibroblastları kullanılarak yapılan başka bir çalışmada miRNA-16 ve miRNA-195'nin glukoserebrosidaz aktivitesini %40'tan fazla up-regüle ettiği ve enzimin ekspresyonunu ve protein seviyelerini arttırdığı bulunmuştur (Siebert ve ark., 2014). GH'nın miRNA-155 ifadesinin ortadan kaldırıldığı memeli modellerinden mutant zebra balığında (GBA1^{-/-}), GCCase enzim eksikliğinde ne nöroinflamasyonun ne de hastalık ilerlemesinin miRNA-155'e bağlı olmadığı gösterilmiştir ve miRNA-155 inhibisyonunun Gaucher hastalığında bir terapötik hedef olmayacağı öne sürülmüştür (Watson ve ark., 2019). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda tümör süpressör miRNA'ların ve onkogen miRNA'ların MM, lenfoma, lösemi ve HCC gibi çeşitli kanserlerde yapılan çalışmalarda önemli roller üstlendiği belirtilmiştir (Braconi ve ark., 2015, Fang ve ark., 2012, Hershkovitz-Rokah ve ark., 2018, Mao ve Wang, 2015, Vasuri ve ark., 2018, Yan ve ark., 2017, Zhang ve ark., 2018, Zhang ve ark., 2020).

Çalışmamızda ise GH'a ilişkin olarak MM, lösemi, lenfoma ve HCC kanserleriyle ilgili olarak seçilen onkogen ve tümör süpressör gibi davranan bazı miRNA ekspresyonlarının tedavi gören Gaucher hastalarında ve taşıyıcı bireylerde arttığı veya azaldığı gözlemlenmiştir. Çalıştığımız miRNA ekspresyonlarından tedavi gören Gaucher hastalarında sadece miRNA-125b ekspresyon seviyelerinin kontrollerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bulundu. Taşıyıcı bireylerde ise sadece miRNA-15a ve miRNA-181b ekspresyon seviyelerinin kontrollerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bulundu. miRNA sonuçlarımıza göre, tümör süpressör özellikli miRNA-125b ve miRNA-15a ve onkogen özellikli miRNA-181b ekspresyon seviyelerinin, GH'a ilişkin MM, lösemi ve HCC kanserlerinin riski için bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi önerilebilir. Ancak literatürde bu miRNA'lar için tedavi gören ve taşıyıcı Gaucher hastalarla ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır. Çalışmamız bu yönüyle özgünlük göstermektedir.

İmmün Sistem Hücreleri

GH, Gaucher hastalarında lipit birikimi, inflamatuvar sitokinlerde artış, makrofajların aktivasyonu ve B hücre aktivasyonunun yanı sıra kronik progresif inflamatuvar bir durum ile ilişkilidir (Nair ve ark., 2015). GH'daki glukoserebrozidaz mutasyonu, lizozom fonksiyonlarını etkileyerek hücrel toksisiteye neden olduğundan IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 ve TNF- α gibi spesifik sitokinlerin seviyelerini arttırmaktadır (Kim ve ark., 2012).

ILC hücreleri

Son yapılan çalışmalarda inflamatuvar bağırsak hastalığında ILC'lerin antimikrobiyal savunmada önemli roller oynadığı ve antipatojen bağışıklık ile kommensal tolerans arasındaki dengeyi koruyarak organ gelişimine, doku korumasına ve yenilenmesine ve mukozal homeostazlara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Saez ve ark., 2021).

literatür incelemesi sonucu, GH hastalarında ILC ve ILC alt grupları ile ilgili daha önce bir çalışmaya rastlanamamıştır. Tedavi gören Gaucher hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre total ILC ve ILC1 sıklıklarında (yüzde/frekans) ve ILC, ILC1 ve ILC3 absolute sayılarında azalma bulunmuştur. Bu azalma enzim replasmanı sonrası serumda/dokularda azalan IL-7, IL-12 ve IL-23, seviyeleri ile ilişkili olabilir. Ayrıca IL-7 reseptör miktarının (CD127) artmış olması ILC aktivasyonuna işaret eder. ILC, ILC1 ve ILC3'ün enzim replasmanı ile azalması hastalığın patogenezinde rol alabileceğini düşündürür. Diğer taraftan, GH hastalığı taşıyıcı grubunda ise total ILC ve ILC1 absolute hücre sayısı ve yüzdelerinin tedavi gören Gaucher hastalarına göre yüksek olduğu bulunmuştur. Yapılan literatür taramasında GH taşıyıcıları ile ilgili çalışma bulunmadığından kıyaslama yapılamamıştır. ILC'lerin koruyucu mu yoksa hastalığı artırıcı mı şekilde rol aldığını anlamak için detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

TFH Hücreleri

Çalışmamızda tedavi gören ve tedavi öncesi Gaucher hasta grupları, GH taşıyıcı grubu ve sağlıklı kontrol grubundan alınan periferik kan örneklerinde dolaşımdaki total TFH hücreleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Çalışmamızda TFH hücre gruplarında anlamlı fark görülmemesinin nedenleri olarak; tedavi gören Gaucher hasta grubunun TFH verileri değerlendirildiğinde, tüm hastaların tedavi sürelerinin

farklı olması, yaş dağılımlarının farklı olması gibi nedenler sayılabilir. Ayrıca GH'nin myasthenia gravis, veya lupus gibi antikor aracılı bir patolojik durum olmaması da bunu açıklayabilir. Ancak, çalışmamızda tedavi gören Gaucher hastalarında TFH hücreleri içindeki Th17-Th2 benzeri-TFH PD1 yüzdelерinin ve CXCR5+IL21+ yüzdelерinin arttığı gözlenirken, CXCR5+IL4+ sıklığının ve yüzdelерinin azaldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Sotiropoulos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Gaucher hastalarında IL-4 hücre sayısının ve sıklığının azaldığı bulunmuştur (Sotiropoulos ve ark., 2014). GH taşıyıcı bireylerde ise total TFH hücreleri içindeki CD4+IL21+ yüzdelерinin azaldığı gösterilmiştir. Literatür taraması sonucu GH'da TFH hücrelerine ilişkin çalışmalara rastlanılamamıştır, bu çalışmayla Gaucher hastalarında TFH hücreleri seviyeleri ilk kez araştırılmıştır.

MAIT Hücreleri

MAIT hücreleri ile ilgili olarak yapılan çoğu çalışmalarda, farklı hastalık gruplarında MAIT hücrelerinin ve ürettikleri sitokin seviyelerinin genelde azaldığı gösterilmiştir (Bertrand ve Lehuen 2019; Trivedi ve ark., 2020; Duan ve ark., 2019; Li ve ark., 2018; Sundström ve ark., 2015; Huang ve ark., 2019). GH'da MAIT hücreleri ve ürettikleri sitokin seviyeleri açısından literatürde bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak, Gaucher hastalarına ait serum örnekleri ve lenfosit hücrelerindeki sitokinler üzerine yapılmış bazı çalışmalarda bulunabilmiştir. Matta ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, farklı ERT dozları ve süreleri içeren tip 1 Gaucher hastalarında, daha uzun süre ve daha yüksek dozlarda ERT uygulanan hastaların IL-6, TNF- α ve IFN- γ serum seviyelerinde azalma görüldüğünü rapor etmişlerdir (Matta ve ark., 2018). T hücre infiltrasyonunun artması, pro-inflamatuvar sitokinlerin (IFN- γ , TNF- α , IL6, IL12p40, IL12p70, IL23, and IL17A/F) üretimini artırarak Gaucher hastalarında doku hasarına neden olmaktadır (Magnusen ve ark., 2021). Başka bir çalışmada Gaucher hastalarının serumunda sitokin seviyelerinin yüksek olmasının, IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin osteopeniye, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin pıhtılaşma ve hipermetabolizmanın aktivasyonuna, IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin gammopatiler ve multipl miyelomaya neden olabileceğini ve bu değişikliklerin potansiyel olarak GH'daki bazı patolojik özelliklere açıklık getirdiği belirtilmiştir (Tantawy 2015). Diğer bir çalışmada da, Gaucher hastalarının T lenfosit subsetlerinde ve IFN- γ , IL-4, IL-10 ve IL-13 absolute hücre sayısında ve sıklığında azalma ve hem CD4+ hemde CD8+ T lenfositlerinde üretilen IFN- γ

sıklığında ise artma olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, T-helper lenfositlerde bozukluğunun olması, T-reg'lerde azalma ve hem CD4+ hem de CD8+ hücrelerinin yapısal bir TH1 yönünde aktivasyonu sonucu ortaya çıkan efektif olmayan T-hücre kontrolünün GH'da kronik inflamatuvar reaksiyonuna ve artan lenfoid malignite insidansına neden olduğu belirtilmiştir (Sotiropoulos ve ark., 2014). Bu çalışmalara göre, serum örnekleri ve lenfosit hücrelerindeki TNF- α ve IFN- γ 'nın GH'nın patogeneğinde etkili olduğu ve hastalığın gelişiminde önemli rol aldığı sonucuna varılabilir.

Bizim çalışmamızda ise yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak tedavi gören Gaucher hastaları ve taşıyıcı bireylerin lenfosit hücrelerindeki MAIT hücrelerinin salgıladıkları sitokinler değerlendirilmiştir. Tedavi öncesi Gaucher hastalarında $\gamma\delta$ +CD8+ absolute hücre sayısının sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak azaldığı, ve GH taşıyıcı grubunda $\gamma\delta$ + T hücresi, $\gamma\delta$ +CD8+ absolute hücre sayısı ve yüzdelerinin ve MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU+ CD8+ absolute hücre sayısı ve yüzdelerinin tedavi gören Gaucher hastalarına göre arttığı gösterilmiştir. GH taşıyıcı grubundaki MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU+ CD4+ yüzdesinin kontrol grubuna ve tedavi gören Gaucher hastalarına göre azaldığı, ve Non-MAIT içindeki IFN- γ +TNF- α +, IFN γ +TNF- α - ve IFN- γ -TNF- α - yüzdelerinin ve Non-MAIT CD8-, Non-MAIT CD8- içindeki IFN- γ +TNF- α +, IFN- γ +TNF- α - ve IFN- γ -TNF- α - yüzdelerinin de kontrol grubuna göre azaldığı bulunmuştur. Tedavi gören Gaucher hastalarındaki MAIT V α -7.2 MR1 5-OP-RU-CD8+ absolute hücre sayısı ve yüzdesi ve $\gamma\delta$ +CD8-CD4+ yüzdesinin sağlıklı kontrollere göre arttığı, ve Total IFN- γ +TNF- α -, MAIT CD8+, MAIT CD8+ içindeki IFN- γ -TNF- α - ve IFN- γ +TNF- α -, Total Non-MAIT CD8+ içindeki IFN- γ +TNF- α + absolute total hücre sayısı ve yüzdesinin ve MAIT CD8- IFN- γ +TNF- α -, Non-MAIT içindeki IFN- γ +TNF- α -, Total Non-MAIT CD8+ içindeki IFN- γ +TNF- α -, Non-MAIT CD8- içindeki IFN- γ +TNF- α - yüzdelerinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu gösterilmiştir. MAIT hücrelerine ilişkin sonuçlarımız, ERT tedavisinin Tip 1 GH'da TNF- α ve IFN- γ üreten MAIT veya konvansiyonel hücrelerdeki inflamatuvar yanıtı azalttığını düşündürür. GH'na ilişkin MAIT hücreleri daha önce hiç çalışılmadığı için çalışmamız özgünlük göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada ERT tedavisi almayan hastalarda, ERT tedavisi alan GH hastalarında ve taşıyıcı bireylerde, MN'un, plazma 8-OHdG seviyeleri, tümör süpressör ve onkogen özellikli miRNA'ların ekspresyon seviyeleri, farklı ILC (ILC1, ILC2, ILC3) hücreleri, TFH hücreleri, MAIT hücreleri ve TNF- α , IFN γ , IL-4, IL-21 sitokin seviyeleri değerlendirilmiştir. Kromozomal DNA hasarı belirteci olarak, MN frekansı hem Gaucher hastalarında hem de taşıyıcı bireylerde erken tanı için bir biyobelirteç olarak öngörülememiştir. Ancak yeni tanı almış ve tedavi görmemiş daha fazla hasta üzerinde çalışılarak MN, NPB ve NBUD sayılarının bir biyobelirteç olarak kabul edilip edilemeyeceği ileri çalışmalarla araştırılmalıdır. Oksidatif stres kaynaklı, Oksidatif DNA hasarı belirteci olarak plazma 8-OHdG seviyeleri hem tedavi gören Gaucher hastalarında hem de taşıyıcı GH grubunda bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği önerilebilir ve ancak daha fazla hasta sayılarını içeren çalışmalarla desteklenmelidir. Tümör süpressör gen olarak miRNA-125b ve miRNA-15a ve onkogen olarak miRNA-181b ekspresyon seviyelerinin, GH'a ilişkin MM, lösemi ve HCC kanserlerinin riski için bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği önerilebilir. Nadir bir hastalık olan GH'da miRNA ekspresyon düzeylerinin hastalık patogenezindeki değişimleri ve hastalığın erken teşhisinde önerilebilmesi için destekleyici daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Yapılan literatür incelemesine göre, GH hastalarında şimdiye kadar CBMN-cyt yöntemi parametreleri, plazma 8-OHdG seviyeleri, tümör süpressör ve onkogen özellikli miRNA'lar, ILC ve ILC popülasyonları, MAIT hücreleri ve TNF- α , IFN- γ sitokinlerine ilişkin bir çalışmaya rastlanılamamıştır ve sonuçlarımız özgün olup ileri çalışmalarla desteklenmelidir. Çalışmamızın sınırlaması, yeni tanı almış tedavi öncesi Gaucher hastalarının sayısının azlığıdır. GH patogenezindeki rolleri açısından tedavi öncesi ve sonrası Gaucher hastalarına ait MN, NPB, NBUD, 8-OHdG, miRNA'lar, ILC ve ILC popülasyonları, TFH hücreleri, MAIT hücreleri TNF- α , IFN- γ sitokin seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda elde edilecek bulgular daha değerli olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Alaei MR, Tabrizi A, Jafari N, et al. Gaucher Disease: New Expanded Classification Emphasizing Neurological Features. *Iran J Child Neurol.* 2019; 13(1): 7-24.
- Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H. Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. *Semin Cancer Biol.* 2018; 51: 101-115.
- Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, et al. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis.* 2011; 26(1): 77-83.
- Arends M, van Dussen L, Biegstraaten M, et al. Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. *Br J Haematol.* 2013; 161(6): 832-42.
- Astudillo L, Therville N, Colacios C, et al. Glucosylceramidases and malignancies in mammals. *Biochimie.* 2016; 125: 267-280.
- Bankoglu EE, Arnold C, Hering I, et al. Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery. *Sci Rep.* 2018; 8: 11195.
- Barth B, Shanmugavelandy SS, Tancelosky DM, et al. Gaucher's Disease and Cancer: A Sphingolipid Perspective. *Crit Rev Oncog.* 2013; 18(3): 221-234.
- Bayram F, Donmez-Altuntas H, Coskun-Demirkalp AN, et al. Therapeutic effects of statins on chromosomal DNA damage of dyslipidemic patients. *Experimental Biology and Medicine.* 2019; 0: 1-7.
- Bertrand L, Lehuen A. MAIT cells in metabolic diseases. *Mol Metab.* 2019 Sep; 27: S114-S121.
- Biancini GB, Moura DJ, Manini PR et al. DNA damage in Fabry patients: An investigation of oxidative damage and repair. *Mutation Research* 2015; 784-785: 31-36.
- Bidarra D, Constâncio V, Barros-Silva D, et al. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Metastasis Development Prediction. *Front Oncol.* 2019; 9: 900.

- Boiteux S, Radicella JP. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*. Jan-Feb 1999; 81(1-2): 59-67.
- Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*. 2011; 26: 93-100.
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 625-631.
- Boyd A, Ribeiro JM, Nutman TB. Human CD117 (cKit)+ Innate Lymphoid Cells Have a Discrete Transcriptional Profile at Homeostasis and Are Expanded during Filarial Infection. *PLoS One*. 2014; 25; 9(9): e108649.
- Braconi C, Henry JC, Kogure T, et al. The role of microRNAs in human liver cancers. *Semin Oncol*. 2011; 38(6): 752-63.
- Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35(4); 159-169.
- Carrega P, Loiacono F, Di Carlo E, Conte R, et al. NCR(+)ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat Commun*. 2015; 6: 8280.
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017; 58(5): 235-263.
- Chiba A, Murayama G, Miyake S. Mucosal-Associated Invariant T Cells in Autoimmune Diseases. *Front. Immunol*. 2018; Vol. 9: 1333.
- Choy WN. Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York: Marcel Dekker. 2001; 163-186.
- Costello R, O'Callaghan T, Sébahoun G. Gaucher disease and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47(7): 1365-1368.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(5): 502-11.
- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 621-63.
- De Fost M, Aerts JMFG, Hollak CEM. Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth J Med*. 2003; 61(1): 3-8.

- Dekker N, Van Dussen L, Hollak CEM, et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood*. 2011; Vol.118: 16.
- Di Marco M, Ramassone A, Pagotto S, et al. MicroRNAs in Autoimmunity and Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10): 3139.
- Di Minno A, Turnu L, Porro B, et al. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine levels and heart failure: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017; 27(3): 201-208.
- Diaz-Font A, Cormand B, Chabás A, et al. Unsuccessful chimeroplast strategy for the correction of a mutation causing Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2003; 31: 183-186.
- Dimitriou E, Moraitou M, Cozar M, et al. Gaucher disease: Biochemical and molecular findings in 141 patients diagnosed in Greece. *Mol Genet Metab Rep*. 2020; 24: 100614.
- Dong J, Wang JP, Qian Q, et al. Micronucleus assay for monitoring the genotoxic effects of arsenic in human populations: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2019; 780: 1-10.
- Drelichman G, Castañeda-Hernández G, Ar MC, et al. The road to biosimilars in rare diseases-ongoing lessons from Gaucher disease. *Am J Hematol*. 2020; 95: 233-237.
- Duan M, Goswami S, Shi JY, et al. Activated and Exhausted MAIT Cells Foster Disease Progression and Indicate Poor Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019; 25(11): 3304-3316.
- Eken A, Dönmez-Altuntaş H. Innate Lymphoid Cells (Non-NK ILCs). *Agric. Biol. Sci. Grain Legum*. 2016.
- El-Zein RA, Lopez MS, D'Amelio AM, et al. The Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Strong Predictor of Lung Cancer: Extension of a Lung Cancer Risk Prediction Model. *Cancer Epidem Biomar*. 2014; 23: 2462-2470.
- Fan X, Jin T, Zhao S, et al. Circulating CCR7+ICOS+ Memory T Follicular Helper Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0134523.
- Fang C, Zhu DX, Dong HJ, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2012; 91(4): 553-9.

- Federico C, Sacco A, Belotti A, et al. Circulating microRNAs and Their Role in Multiple Myeloma. *Non-coding RNA*. 2019; 5: 37.
- Fenech M, Changb WP, Kirsch-Volders M, et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 2003; 534: 65-75.
- Fenech M, Crott WJ. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*. 2002; 504: 131-136.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007; 2(5): 1084-1104.
- Gensous N, Charrier M, Duluc D, et al. T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. *Front Immunol*. 2018; 9: 1637.
- Glavey SV, Manier S, Sacco A, et al. Epigenetics in Multiple Myeloma. *Cancer Treat Res*. 2016; 169: 35-49.
- Godfrey DI, Koay HF, McCluskey J, et al. The biology and functional importance of MAIT cells. *Nat Immunol*. 2019; 20(9): 1110-1128.
- Gundogan K, Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, et al. Evaluation of chromosomal DNA damage, cytotoxicity, cytostasis, oxidative DNA damage and their relationship with endocrine hormones in patients with acute organophosphate poisoning. *Mutat Res. Gen. Tox. En*. 2018; 825: 1-7.
- Hajizamani S, Shahjahani M, Shahrabi S, et al. MicroRNAs as prognostic biomarker and relapse indicator in leukemia. *Clin Transl Oncol*. 2017; 19: 951-960.
- Han TS, Ban HS, Keun Hur, et al. The Epigenetic Regulation of HCC Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(12): 3978-3981.
- Hassan S, Sidransky E, Tayebi N. The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017; 122(3): 10-18.
- Hershkovitz-Rokah O, Geva P, Salmon-Divon M, et al. Network analysis of microRNAs, genes and their regulation in diffuse and follicular B-cell lymphomas. *Oncotarget*. 2018; 9(8): 7928-7941.
- Hetta HF, Elkady A, Yahia R, et al. T follicular helper and T follicular regulatory cells in colorectal cancer: A double-edged sword. *J Immunol Methods*. 2020; 480: 112753.

- Huang WC, Hsiao YC, Wu CC, et al. Less circulating mucosal-associated invariant T cells in patients with cervical cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2019; 58(1): 117-121.
- Ichimiya S, Kamekura R, Kawata K, et al. Functional RNAs control T follicular helper cells. *J Hum Genet.* 2017; 62(1): 81-86.
- Jamieson NB, Chang DK, Biankin AV. Cancer Genetics and Implications for Clinical Management. *Surg Clin North Am.* 2015; 95(5): 919-34.
- Kabaçam G, Kabaçam G, Topçuoğlu P, et al. Enzyme replacement therapy in type 1 Gaucher disease and a review of the literature. *Turk J Hematol.* 2010; 27: 190-5.
- Kadali S, Kolusu A, Gummadi MR, et al. The relative frequency of lysosomal storage disorders: a medical genetics referral laboratory's experience from India. *J. Child Neurol.* 2014; 29(10): 1377-1382.
- Khare S, Zhang Q, Ibdah JA. Epigenetics of hepatocellular carcinoma: Role of microRNA. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(33): 5439-5445.
- Kim MJ, Suh JT, Lee HJ, et al. Simultaneous detection of Gaucher's disease and renal involvement of non-Hodgkin's lymphoma: the first Asian case report and a review of literature. *Ann Clin Lab Sci.* 2012; 42(3): 293-301.
- Kotas ME, Locksley RM. Why Innate Lymphoid Cells?. *Immunity.* 2018; 48(6): 1081-1090.
- Köse E, Bülbül S, Arslan N. Knowledge of Primary Care Physicians on Lysosomal Storage Disorders. *J Pediatr Res.* 2019; 6(4): 292-8.
- Kuo G, Wu CY, Yang HY. MiR-17-92 cluster and immunity. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2019; 118:2-6.
- Lachmann RH. Treating Lysosomal Storage Disorders: What Have We Learnt?. *J Inherit Metab Dis.* 2020; 43(1): 125-132.
- Lal TR, Sidransky E. The Spectrum of Neurological Manifestations Associated with Gaucher Disease. *Diseases.* 2017; 5(1): 10.
- Law H, Venturi V, Kelleher A, et al. Tfh Cells in Health and Immunity: Potential Targets for Systems Biology Approaches to Vaccination. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(22): 8524.
- Li J, Zhang Y. Current experimental strategies for intracellular target identification of microRNA. *ExRNA.* 2019; 1: 6.

- Li Y, Huang B, Jiang X, et al. Mucosal-Associated Invariant T Cells Improve Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Regulating Macrophage Polarization *Front Immunol.* 2018; 9: 1994.
- Liu R, Wu Q, Su D, et al. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(6): R255.
- Liu X, Nurieva RI, Dong C. Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol Rev.* 2013; 252(1): 139-145.
- Lo SM, Choi M, Liu J, et al. Phenotypic diversity in type 1 Gaucher disease: discovering the genetic basis of Gaucher disease/hematologic malignancy phenotype by individual genome analysis. *Blood.* 2012; 119: 20.
- López-Sagasetta J, Dulberger CL, Crooks JE, et al. The molecular basis for Mucosal-Associated Invariant T cell recognition of MR1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(19): E1771-1778.
- Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol.* 2015; 10: 425-48.
- Maffei F, Zolezzi Moraga JM, Angelini S, et al. Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk. *Mutagenesis.* 2014; 29(3):221-225.
- Magnusen AF, Rani R, McKay MA, et al. C-X-C Motif Chemokine Ligand 9 and Its CXCR3 Receptor Are the Salt and Pepper for T Cells Trafficking in a Mouse Model of Gaucher Disease. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(23): 12712.
- Mağın H, Surerdamar A, Ersoy U, et al. Bir Olgu Nedeniyle Gaucher Hastalığının Gözden Geçirilmesi. *Marmara Medical Journal,* 2008; 21(2); 166-170.
- Mao B, Wang G. MicroRNAs involved with hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep.* 2015; 34(6): 2811-2820.
- Mardani R, Abadi MHJN, Motieian M, et al. MicroRNA in leukemia: Tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. *J Cell Physiol.* 2019; 234(6): 8465-8486.
- Marques ARA, Saftig P. Lysosomal storage disorders - challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases. *J Cell Sci.* 2019; 132: jcs221739.
- Matta MC, Vairo F, Torres LC, et al.. Could enzyme replacement therapy promote immune tolerance in Gaucher disease type 1?. *Blood Cells Mol Dis.* 2018; 68: 200-202.

- Maul J, Alterauge D, Baumjohann D. MicroRNA-mediated regulation of T follicular helper and T follicular regulatory cell identity. *Immunol Rev.* 2019; 288(1): 97-111.
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature.* 2010; 467(7311): 86-90.
- Mei M, Zhang M. Non-coding RNAs in Natural Killer/T-Cell Lymphoma. *Front Oncol.* 2019; 9: 515.
- Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016; 98: 12-23.
- Mistry PK, Taddei T, vom Dahl S, et al. Gaucher disease and malignancy: a model for cancer pathogenesis in an inborn error of metabolism. *Crit Rev Oncog.* 2013; 18(3): 235-246.
- Mouw KW, Goldberg MS, Konstantinopoulos PA, et al. DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer Discov.* 2017; 7(7): 675-693.
- Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia.* 2015; 29(5): 1004-17.
- Nagao M, Kobashi G, Umesawa M, et al. Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease Incidence in Japan. *J Atheroscler Thromb.* 2020; 27(10): 1086-1096.
- Nair S, Boddupalli CS, Verma R, et al. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood.* 2015; 125(8): 1256-1271.
- Nalysnyk L, Rotella P, Simeone JC, et al. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology.* 2017; 22(2): 65-73.
- Niu J, Song Z, Yang X, et al. Increased circulating follicular helper T cells and activated B cells correlate with disease severity in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015; 29(9): 1791-6.
- Olaharski A, Sotelo R, Solorza-Luna G, et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 3317-3343.
- Pavlova EV, Wang SZ, Archer J, et al. B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease. *J of Pathol.* 2013; 231: 88-97.
- Pawliński Ł, Polus A, Tobór E, et al. MiRNA Expression in Patients with Gaucher Disease Treated with Enzyme Replacement Therapy. *Life (Basel).* 2020; 11(1): 2.

- Pekarsky Y, Croce CM. Noncoding RNA genes in cancer pathogenesis. *Adv Biol Regul.* 2019; 71: 219-223.
- Pilger A, Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup.* 2006; 80(1): 1-15.
- Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, et al. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1): 27.
- Poniewierska-Baran A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. The role of innate lymphoid cells in selected disease states - cancer formation, metabolic disorder and inflammation. *Arch Med Sci.* 2021; 17(1): 196-206.
- Qi J, Crinier A, Escalière B, et al. Single-cell transcriptomic landscape reveals tumor specific innate lymphoid cells associated with colorectal cancer progression. *Cell Rep Med.* 2021; 2(8): 100353.
- Qiu H, Wu H, Chan V, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of follicular T-helper cells and their role in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2017; 50(2): 71-81.
- Quinn JL, Kumar G, Agasing A, et al. Role of TFH Cells in Promoting T Helper 17-Induced Neuroinflammation. *Front Immunol.* 2018; 9: 382.
- Rodrigues MA, Beaton-Green LA, Wilkins RC, et al. The potential for complete automated scoring of the cytokinesis block micronucleus cytome assay using imaging flow cytometry. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018; 836: 53-64.
- Sadik S, Lu Y, Zhu S, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s): The spotlight in asthma pathogenesis and lung tissue injury *Allergol Immunopathol (Madr).* 2021; 49(2): 208-216.
- Saez A, Gomez-Bris R, Herrero-Fernandez B, et al. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(14): 7618.
- Sartorius K, Sartorius B, Winkler C, et al. The biological and diagnostic role of miRNA's in hepatocellular carcinoma. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018; 23: 1701-1720.
- Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and Functions of Memory Tfh cells in Human Blood. *Trends Immunol.* 2014; 35(9): 436-442.
- Serafini N, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(7): 415-28.

- Serr I, Daniel C. Regulation of T Follicular Helper Cells in Islet Autoimmunity. *Front Immunol.* 2018; 9: 1729.
- Sgherza N, Quarta A, Rinaldi E, et al. Who seeks finds. Gaucher's disease: a rare case of thrombocytopenia. *International Journal of Hematology* (2020); 111: 327-328.
- Shao F, Zheng P, Yu D, et al. Follicular helper T cells in type 1 diabetes. *FASEB J.* 2020; 34(1): 30-40.
- Shi W, Dong L, Sun Q, et al. Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8 + T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. *Exp Cell Res.* 2018; 372(1): 35-42.
- Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, et al. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab.* 2014; 20(6): 967-77.
- Siebert M, Westbroek W, Chen YC, et al. Identification of miRNAs that modulate glucocerebrosidase activity in Gaucher disease cells. *RNA Biol.* 2014;11(10):1291-300.
- Simonaro CM. Lysosomes, Lysosomal Storage Diseases, and Inflammation. *J. Inborn Errors Metab Screen.* 2016; 4: 1-8.
- Solé C, Arnaiz E, Lawrie CH. MicroRNAs as Biomarkers of B-cell lymphoma. *Biomarker Insights.* 2018; 13: 1177271918806840.
- Solé C, Larrea E, DiPinto G, et al. miRNAs in B-cell lymphoma: Molecular mechanisms and biomarker potential. *Cancer Letters.* 2017; 405: 79-89.
- Sotiropoulos C, Theodorou G, Repa C, et al. Severe Impairment of Regulatory T-Cells and Th1-Lymphocyte Polarization in Patients with Gaucher Disease. *JIMD Rep.* 2015; 18: 107-115.
- Spits H, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 145-149.
- Squillaro T, Antonucci I, Alessio N, et al. Impact of lysosomal storage disorders on biology of mesenchymal stem cells: Evidences from in vitro silencing of glucocerebrosidase (GBA) and alpha-galactosidase A (GLA) enzymes. *J Cell Physiol.* 2017; 232: 3454-3467.
- Sundström P, Ahlmanner F, Akéus P, et al. Human Mucosa-Associated Invariant T Cells Accumulate in Colon Adenocarcinomas but Produce Reduced Amounts of IFN γ . *J Immunol.* 2015; 195(7): 3472-81.

- Svoronos AA, Engelman D, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* 2016; 76(13): 3666-3670.
- Szabó K, Gáspár K, Dajnoki Z, et al. Expansion of circulating follicular T helper cells associates with disease severity in childhood atopic dermatitis. *Immunol Lett.* 2017; 189: 101-108.
- Tagawa H, Ikeda S, Sawada K. Role of microRNA in the pathogenesis of malignant lymphoma. *Cancer Sci.* 2013; 104(7): 801-9.
- Tantawy AAG. Cytokines in Gaucher disease: Role in the pathogenesis of bone and pulmonary disease. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2015; 16: 207-213.
- Tao J, Jiang L, Chen X. Roles of microRNA in liver cancer. *Liver Research.* 2018; 2(2): 61-72.
- Taylor EM, Lindsay HD. DNA replication stress and cancer: cause or cure?. *Future Oncol.* 2016; 12(2): 221-37.
- Toh TB, Lim JJ, Chow EK-H. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clin Transl Med.* 2019; 8(1): 13.
- Trivedi S, Labuz D, Anderson CP, et al. Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells mediate protective host responses in sepsis. *Elife.* 2020; 9: e55615.
- Ultimo S, Martelli AM, Zauli G, et al. Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol.* 2018; 233(8): 5642-5654.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis, *Journal of Environmental Science and Health Part C.* 2009; 27(2): 120-139.
- Vasuri F, Visani M, Acquaviva G, et al. Role of microRNAs in the main molecular pathways of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2018; 24(25): 2647-2660.
- Wang X, Liao X, Huang K, et al. Clustered microRNAs hsa-miR-221-3p/hsa-miR-222-3p and their targeted genes might be prognostic predictors fo rhepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer.* 2019; 10(11): 2520-2533.
- Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia.* 2011; 25(8): 1324-1334.

- Wątek M, Piktel E, Wollny T, et al. Defective Sphingolipids Metabolism and Tumor Associated Macrophages as the Possible Links Between Gaucher Disease and Blood Cancer Development. *Int J MolSci*. 2019; 20(4): E843.
- Watson L, Keatinge M, Gegg M, et al. Ablation of the pro-inflammatory master regulator miR-155 does not mitigate neuroinflammation or neurodegeneration in a vertebrate model of Gaucher's disease. *Neurobiol Dis*. 2019; 127: 563-569.
- Winter SJ, Kunze-Schumacher H, Imelmann E, et al. MicroRNA miR-181a/b-1 controls MAIT cell development. *Immunology & Cell Biology*. 2019; 97: 190-202.
- Xu R, Mistry P, McKenna G, et al. Hepatocellular Carcinoma in Type 1 Gaucher Disease: A Case Report with Review of the Literature. *Diagnostic Problems In Hepatology. Seminars In Liver Disease*. 2005; 25: 2.
- Yan JJ, Chang Y, Zhang YN, et al. miR-195 inhibits cell proliferation via targeting AEG-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2017 May; 13(5): 3118-3126.
- Zahran AM, Eltayeb AA, Elsayh KI, et al. Activated and Memory T Lymphocytes in Children with Gaucher Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; 65(3): 263-269.
- Zahran AM, Youssef MAM, Shafik EA, et al. Downregulation of B Regulatory Cells and Upregulation of T Helper 1 Cells in Children With Gaucher Disease Undergoing Enzyme Replacement Therapy. *Immunol Res*. 2020; 68(2): 73-80.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007; 302(1): 1-12.
- Zhang H, Chen X, Yuan Y. Investigation of the miRNA and mRNA Coexpression Network and Their Prognostic Value in Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2020; 2020: 8726567.
- Zhang L, Zhou L, Shi M, et al. Downregulation of miRNA-15a and miRNA-16 promote tumor proliferation in multiple myeloma by increasing CABIN1 expression. *Oncol Lett*. 2018; 15(1): 1287-1296.
- Zhang W, Zhang Y, Yang Z, et al. High expression of UBE2T predicts poor prognosis and survival in multiple myeloma. *Cancer Gene Ther*. 2019; 26(11-12): 347-355.
- Zhang X, Wang Y, Guo Q, et al. Prognostic role of microRNA-155 in patients with leukemia: A meta-analysis. *Clinical Chimica Acta*. 2018; 483: 6-13.

- Zheng B, Xi Z, Liu R, et al. The Function of MicroRNAs in B-Cell Development, Lymphoma, and Their. Potential in Clinical Practice. *Front Immunol.* 2018; 9: 936.
- Zheng RL, Jiang YJ, Wang X. Role of microRNAs on therapy resistance in Non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014; 7(11): 3818-3832.
- Zhu B, Ju S, Chu H, et al. The potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in multiple myeloma. *Oncol Lett.* 2018; 15(5): 6094-6106.
- Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(21): 8011.
- Zumwalde NA, Gumperz JE. Mucosal-Associated Invariant T Cells in Tumors of Epithelial Origin. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1224: 63-77.
- Zwirner NW, Fuertes MB, Domaica CI. Innate lymphoid cells. New players in tissue homeostasis and inflammatory responses. *Medicina (B Aires).* 2019; 79 (Spec 6/1): 564-569.

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

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gaucher hastalarında DNA hasarının, kanserle ilişkili miRNA ifadelerinin ve immün sistem parametrelerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURULU 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	sukriye@erciyes.edu.tr

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

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Gaucher hastalarında DNA hasarının, kanserle ilişkili miRNA ifadelerinin ve immün sistem parametrelerinin araştırılması					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLEN DIRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi		Versiyon Numarası		Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ					Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU					Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU					Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ					Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SİGORTA						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ						
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU						
	İLAN						
	YILLIK BİLDİRİM						
	SONUÇ RAPORU						
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ						
DİĞER							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2020/06	Tarih : 15.01.2020					
	Daha önce Etik Kurulda görüşülmüş olan ve kabul edilen, çalışma ile ilgili olarak 03.01.2020 tarihli Prof.Dr.Nurhan Cücer'in dilekçede çalışmaya Doç.Dr. Fatih Kardaş, Dr Öğr.Üyesi Mahmodul Hasan Sohel'in dahil edilmesi ve Gaucher hastalığının ebeveynlerinin çocuklarında da görülme olasılığından dolayı 18 yaş ve altı hastalar ve kontrollerinin ilavesi, yeni nesil sekanslama yöntemi ve çocuk hasta ve kontrolleri için BGOF örnekleri hakkındaki değişiklik bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekeceği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmaya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu					
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Sema Kader KÖSE					

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma İle İlişki	
Prof. Dr. Sema Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Murat SİPAHIOĞLU	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Prof.Dr.Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Yusuf SEVİM	Genel Cerrahi	Kayseri Eğitim Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek.Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Mehmet DOLANBAY	Kadın Hast. ve Doğum	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç.Dr.Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Adnan BAYRAM	Anest ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Dr.Öğr.Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Av. Tuğba TANRIVERDİ	Avukat	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>
Sevrap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>

*: Toplantıda Bulunma

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

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gaucher hastalarında DNA hasarının, kanserle ilişkili miRNA ifadelerinin ve immün sistem parametrelerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

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

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

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI : Gaucher hastalarında DNA hasarının, kanserle ilişkili miRNA ifadelerinin ve immün sistem parametrelerinin araştırılması

VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU :

DEĞERLENEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe	İngilizce	Diğer
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	OLGU RAPÖR FORMU			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

DEĞERLENEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>
	İLAN	<input type="checkbox"/>
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
	DİĞER	<input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ

Karar No : 2019/713 Tarih : 09.10.2019

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 : Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Sema Kader KÖSE

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti		Araştırma ile İlişki		
Prof. Dr. Sema Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E	K <input checked="" type="checkbox"/>	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Prof. Dr. Murat SİPAHOĞLU	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Prof. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Yusuf SEVİM	Genel Cerrahi	Kayseri Eğitim Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Mehmet DOLANBAY	Kadın Hast. ve Doğum	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Fatih KARDAŞ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Serpil TAHERİ	Tıbbi Biyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	K <input checked="" type="checkbox"/>	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Dr. Öğr. Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E <input checked="" type="checkbox"/>	K	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E	K <input checked="" type="checkbox"/>	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E
Sevtap KOÇER	Sivil Üye	Serbest	E	K <input checked="" type="checkbox"/>	E	H <input checked="" type="checkbox"/>	E

* Toplantıda Bulunma

Gaucher Hastalarında DNA Hasarının Kanslerle İlişkili miRNA İfadelerinin ve İmmün Sistem Parametrelerinin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

% 11 BENZERLİK ENDEKSİ	% 10 İNTERNET KAYNAKLARI	% 4 YAYINLAR	% 4 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	% 1
3	tgkdc.dergisi.org İnternet Kaynağı	% 1
4	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
7	openaccess.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	uu245-211.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı:	Ramazan ÜZEN		
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)			
Lisans:	Adıyaman Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü	2013
Yük. Lisans:	Dicle Üniversitesi	Fen Bilimleri Enstitüsü-Biyoloji Bölümü	2017
Doktora:	Erciyes Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Tıbbi Biyoloji	2022

Uluslararası Makaleler (Yurt Dışında yayınlanan SCI, SCI-Expanded ve TÜBİTAK Yayın Teşvik Programı Kapsamı Dışında Hakemli Dergi)

Uzen R, Tomatir AG, Cucer N, Donmez-Altuntas H. (2019). Comet Assay and Applications. International Journal of Scientific and Technological Research: Vol.5, No.5. Review. (Indexing: CrossRef)

Yurtiçi (Ulusal) Hakemli Dergide Yayımlanan Makaleler

Yıldırım İH, **Uzen R**. Investigation of the Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms of TLR4 gene in Rheumatoid Arthritis. Dicle Med J. (2019); 46 (2): 255 - 268. (Indexing: TR Dizin)

Ramazan Uzen, Kemal Güven, Medeni Aykut, İbrahim Halil Yıldırım, Fatma Matpan Bekler. Bingöl ve Diyarbakır İllerinde Yayılış Gösteren Bazı Dalgıç Böcek (Coleoptera: Dytiscidae) Türlerinin Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Alt Ünite 1 Geni (COI) ile Filogenetik Analizi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi. (2021); 8(2): 511-518. (Indexing: TR Dizin)

Ulusal ve Uluslar Arası Konferans ve Sempozyum Bildirileri

Özen F, Yıldırım İH, **Üzen R**. Investigation The Effect Of Thr399Ile Converison On The Rheumatoid Arthritis, Erciyes Medikal Genetics Days 2017, Erciyes Medical Journal; pp:37. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).

İbrahim Halil Yıldırım and **Ramazan Üzen**. Investigation of the Asp299GLY polymorphism of TLR4 gene in Rheumatoid Arthritis, 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), June 26-30, 2018 Podgorica, Montenegro. Poster Presentation.

H. Altuntaş Dönmez; S. Sahin; P. Altın Çelik; K. Bulut; H. Eciroğlu; **R. Uzen**; G. Güneş Şahin; NT. Özer; S. Temel; BT. Arıkan; A. Esmoğlu; M. Sungur; K. Gundogan. Assessment of Gut Barrier Functions in Intensive Care Unit With Critical Trauma Patients: A pilot study. Intensive Care Medicine Experimental (2020) 8:73. (Page 441 of 612), Poster Presentation (000335).

H. Altuntaş Dönmez; S. Sahin; P. Altın Çelik; K. Bulut; H. Eciroğlu; **R. Uzen**; G. Güneş Şahin; NT. Özer; S. Temel; BT. Arıkan; A. Esmoğlu; M. Sungur; K. Gundogan. Assessment Of Gut Barrier Functions In Intensive Care Unit With Critical Trauma Patients: A Pilot Study. 17th National Congress Of The Turkish Society Of Medical And Surgical Intensive Care Medicine, November 2020. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).

Uluslar Arası Yayın Evlerinde Basılan Kitap Bölümleri

Uzen R, Donmez Altuntaş H, Cucer N. CELL ADHESION MOLECULES (CAMS) AS TARGETS IN CANCER THERAPY. MEDICAL AND HEALTH RESEARCH Research and Practice, Nizami Duran, Editör, Livre de Lyon, Lyon, ss.209-222, 2021.

