

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**EKTOPIK BİR ENZİM OLAN HÜCRE YÜZEY ANTİJENİ CD38
ANLATIMININ ÇEŞİTLİ HÜCRE MODELLERİNDE
İNCELENMESİ**

LEYLA TÜRKER ŞENER

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. İŞİL ALBENİZ**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**






İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programında Leyla Türker Şener tarafından hazırlanan Ektopik Bir Enzim Olan Hücre Yüzey Antijeni CD38 Anlatımının Çeşitli Hücre Modellerinde İncelenmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

16 / 12 / 2010

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.Rüstem Nurten (İ.Ü.İst. Tıp Fak.Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı)	
2.Prof.Dr.Beki Kan (Acıbadem Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı)	
3.Prof.Dr.Bora Barutçu (İ.Ü.Cerrahpşa.Tıp Fak.Biyofizik Anabilim Dalı Öğr.Üyesi)	
4.Doç.Dr.Işıl Albeniz (İ.Ü.İst.Tıp Fak.Biyofizik Anabilim Dalı Öğr.Üyesi)	
5.Doç.Dr.Muhammet Bektaş (İ.Ü.İst.Tıp Fak.Biyofizik Anabilim Dalı Öğr.Üyesi)	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Leyla Türker Şener (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda her türlü olanağı sağlayan Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Rüstem NURTEN'e,

Biyofizik doktora sürecimde bilgi ve deneyimleriyle eğitimime büyük emeği geçen ve tez danışmanım olarak çalışmalarımı yöneten ve yönlendiren sayın Doç.Dr. Işıl ALBENİZ'e saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum Biyofizik Anabilim Dalı çalışanlarına, DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan Dr.Suzan Adın-Çınar ve Abdullah Yılmaz'a, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Dr.İbrahim Kalelioğlu'na, Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Doç.Dr.Oktar Asoğlu'na;

Bana her zaman en büyük sevgi ve desteği veren eşim, kızım ve oğluma;

Bu çalışma dahil olmak üzere tüm hayatım boyunca her zaman benim yanımda olup desteklerini esirgemeyen ÇOK DEĞERLİ AILEM'e

Tesekkür ederim.

Leyla TÜRKER ŞENER

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3734

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kök Hücreler ve Özellikleri	3
2.2. Kök Hücrelerin Çeşitleri	9
2.2.1. Totipotent kök hücre:	9
2.2.2. Pluripotent kök hücre:	10
2.2.3. Multipotent kök hücre:	11
2.2.3.1. Embriyonik kök hücreler (EKH):.....	12
2.2.3.2. Embriyonik Olmayan Hücreler:.....	12
2.3. Farklılaşma (Plastisite).....	17
2.4. Kök Hücrelerin Bölünme Şekilleri	20
2.5. CD38.....	23
2.5.1. İnsan CD38'inin Biyolojisi.....	23
2.5.2. CD38'in İşlevsel Özellikleri	26
2.5.3. Bir Ektoenzim olarak CD38	27
2.5.4. CD38'in Hastalıklarla İlişkisi	27
2.5.5. cADPR'nin Biyokimyası ve Metabolizması	28
2.5.6. NAD ⁺ Glikohidrolaz Etkinliği	30
2.6. İnterlokın-10.....	32
2.7. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α).....	33

2.8. İnterlökin 6	34
2.9. Aldehid Dehidrogenaz (ALDH)	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. GEREÇLER	39
3.1.1. Kimyasal Maddeler	39
3.1.2. Kitler	40
3.1.3. Antikorlar	40
3.1.4. Radyoaktif Maddeler.....	40
3.1.5. Kromatografik Maddeler	40
3.1.6. Deney Hayvanları	40
3.1.7. Hasta ve Sağlıklı İnsan Serumları.....	41
3.2. Çalışmada Kullanılan Eriyikler	41
3.2.1. PAGE (Poliakrilamid Gel elektroforezi) İçin Kullanılan Eriyikler	41
3.2.2. Western (Bağışık) Emdirimi İçin Kullanılan Eriyikler	42
3.2.3. NAD ⁺ Glikohidrolaz Etkinliğini Belirlemek İçin Kullanılan Eriyikler	43
3.2.4. ELİSA İçin Kullanılan Eriyikler.....	44
3.2.5. Hücre Lizis Eriyiği.....	44
3.2.6. Kök Hücre Saflaştırılması İçin Kullanılan Medyum Ortamları	44
3.2.7. Kullanılan Aletler.....	45
3.3. YÖNTEMLER	46
3.3.1. Hücre Kültürü ve Çoğaltılması.....	46
3.3.2. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Tayini	46
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması	47
3.4. Hücrelerin manyetik esaslı sistemler ile ayrılması	47
3.5. Kök Hücre Tanımlama ve İzolasyonu	49
3.5.1. Akım Sitometrisi.....	49
3.5.2. Akım Sitometrinin Çalışma Prensipleri	50
3.5.3. Akım Sitometrisi Kullanım Alanları.....	51
3.5.4. Akım Sitometrinin Avantajları	52
3.5.5. Akım Sitometrisi ile İncelenilebilen Örnekler.....	53
3.5.6. Akım Sitometrisinde Sık Kullanılan Floresan Boyalar	53
3.5.7. Kordon Kanından CD34 ⁺ Hücre İzolasyonu	53
3.5.8. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ile Hücre İzolasyonu	54

3.5.9. Kordon Kanından CD34 ⁺ Hücre Seçiminden Sonra FACS ile Hücre Saflaştırma	55
3.5.10. ALDH ⁺ CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻ Hücrelerin Eritropoetinli ve Kök Hücre Faktörlü (SCF) Kültür Ortamlarındaki Çoğalma İndeksi	57
3.5.11. Farklılaştırma Fazı Sonrası Megacult c-Staining kit ile Eritroid Görüntülenmesi	57
3.5.12. Kordon Kanından Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	58
3.5.13. Kan örneklerinden Eritrosit Eldesi:.....	59
3.5.14. Eritrosit Membran Posası (“ghost”) Eldesi	59
3.5.15. Lenfosit İzolasyonu	59
3.5.16. T/B Lenfosit İzolasyonu	59
3.5.17. NAD ⁺ Glikohidrolaz Etkinliğinin Saptanması	60
3.5.18. Radyoaktivitenin Ölçülmesi	60
3.5.19. GDPR Siklaz Etkinliğinin Belirtimi.....	61
3.5.20. Poliakrilamid Gel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	61
3.5.21. Western Emdirim Yöntemi.....	61
3.5.22. Serumda IL-6 düzeyinin belirlenmesi	62
3.5.23. İnsan TNF- α düzeyinin belirlenmesi	63
3.5.24. Çalışma Materyalinin Seçimi ve Saklama Koşulları	63
3.5.25. İstatistiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. Çalışma Grupları.....	65
4.1.1. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Balb/c Türü Farelerde Kanser Modeli Oluşturulması	65
4.1.2. Ehrlich Asit Tümörü Hücrelerinin Işınlanarak Öldürülmesi	65
4.1.3. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Oluşturulan Kanser Modelinde Serumdaki NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği	65
4.1.4. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Oluşturulan Kanser Modelinde Lenfositlerdeki NAD glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği	67
4.1.5. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Oluşturulan Kanser Modelinde Eritrositlerdeki NAD glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği	69
4.1.6. Kanser Modeli Oluşturulan Balb/c’lerin Eritrosit Ghost ve Lenfosit Kesimlerinin Western Emdirim Analizleri	71

4.2. NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliğinin Yüksek CEA Değerine Sahip Hastalardaki Değişimi	72
4.2.1. Eritrosit kesimlerin NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği	72
4.2.2. Lenfosit kesimlerin NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği	72
4.2.3. Yüksek CEA Değerine Sahip Hasta Serumlarının Verildiği Balb/c'lerin CD38 Etkinliğinin Zamana Bağlı Western Emdirim Analizi	75
4.2.4. CEA Değeri Yüksek Hasta Serumlarının ELİSA Yöntemi ile IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 Değerleri ve NAD Glikohidrolaz Etkinliği	76
4.2.5. Çalışma Gruplarının Lenfosit Kesimlerinin Flow Sitometrik Analizi	79
4.2.6. CEA Değeri Yüksek Hastaların Lenfosit Alt Birimlerinin CD38 Etkinliğinin İncelenmesi	79
4.2.7. EAT Enjekte Edilen Balb/c'lerin Endoksan ile Muamele Sonrası NAD Glikohidrolaz Etkinliği Değişimi	82
4.3. Kordon Kanından Kök Hücre Saflaştırılması	84
4.3.1. Kordon Kanından Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	84
4.3.2. Kordon Kanından CD34 ⁺ Hücrelerin Saflaştırılması	84
4.3.3. Kordon Kanından CD34 ⁺ Hücrelerin Seçiminden Sonra (ALDH) ⁺ CD38 ⁻ Hücrelerin Seçilmesi	86
4.3.4. Kordon Kanı CD38 Etkinliği İle Sağlıklı Birey Periferik Kan CD38 Etkinlik Değerinin Karşılaştırılması	91
4.3.5. Kordon Kanından Saflaştırılan Hematopoetik Progenitör Hücre ve Önceki Aşamalarının Floresan Mikroskopunda Görüntülenmesi	94
4.3.6. Hematopoetik Progenitör Hücrelerin Kök Hücre Faktörlü Ve Eritropoetinli Kültür Ortamlarındaki Çoğalmaları	98
4.3.7. Sıvı Kültürde İlkel Hematopoetik Hücrelerden Eritroid Öncüllerinin Geliştirilmesi (Evre 1)	100
4.3.8. Sıvı kültürde eritroid farklılaşmasının son evreye dek sürdürülmesi (Evre 2)	100
4.3.9. Hematopoetik Progenitör Hücrelerin NAD Glikohidrolaz Etkinliğindeki Değişimi	103
4.3.10. İkinci Farklılaşma Fazı Western Emdirim Analizi	104
4.3.11. İkinci Farklılaşma Fazı Esnasında Hücrelerdeki CD34 Değişimi	104
4.3.12. İnterlökin 6'nın Lenfositler Üzerindeki Etkisi	105
4.3.13. Hematopoetik Kök Hücrelerin Çeşitli Sitokin ve Faktörler Varlığında NAD Glikohidrolaz Etkinlik Değişimi	106

5. TARTIŞMA	107
KAYNAKLAR	116
ETİK KURUL KARARI.....	129
ÖZGEÇMİŞ.....	131

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Mezenkimal progenitörlerin in vitro farklılaşma potansiyeli: Uyarı, moleküler ve hücresel belirteçler.....	19
Tablo 2-2: CD38'in anlatım bulduğu hücre ve dokular	26
Tablo 3-1: Kullanılan malzemeye bağlı olarak ekilen hücre sayısı.....	58
Tablo 4.1: CEA değeri yüksek hastalarla sağlıklı bireylerin B, T, yardımcı T (CD4) ve sitotoksik T lenfositlerinin (CD8) NAD Glikohidrolaz değerleri.....	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Telomer ve telomeraz yapısı.....	5
Şekil 2-2: Kök hücre çeşitleri.....	9
Şekil 2-3: Embriyonik kök hücre ve farklılaşmaları.....	10
Şekil 2-4: Blastosist aşaması.....	11
Şekil 2-5: Multipotent kök hücre ve farklılaşma.....	11
Şekil 2-6: Embriyonik kök hücre.....	12
Şekil 2-7: Hematopoetik kök hücre ve farklılaştığı hücre tipleri	14
Şekil 2-8: Hematopoetik Kök Hücre ve farklılaştığı olgun hücre tipleri	15
Şekil 2-9: Simetrik ve asimetrik bölünmeler.....	22
Şekil 2-10: CD38 Tip II membran protein.....	25
Şekil 2-11: Kalsiyum sinyal düzenlenmesi.....	29
Şekil 2-12: β -NAD ⁺ 'nin cADPR'ye ve ADPR'ye dönüşümü.....	30
Şekil 2-13: ADP-riboz ve cADP-ribozun enzimatik sentezi	31
Şekil 2-14: Ökaryotik hücrelerde NAD(P) biyosentezi ve NAD(P)sinyal yolağı.....	32
Şekil 2-15: BAAA-DA (Bodipy aminoasetaldehit dietilasetal), BAAA (Bodipy aminoasetaldehit) ve BAA(Bodipy aminoasetat)'nın yapısı.....	36
Şekil 3-1: Manyetik kompleks içeren ortamın manyetik ayırıcıdaki ayırımı.....	49
Şekil 3-2: Flow sitometride analiz	52
Şekil 3-3: CD34 ⁺ hücrelerin EasySep pozitif ayırma kiti ile immünomagnetik işaretleme ve ayırma	56
Şekil 4-1: A- Serum kesimleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz etkinliği. B- Serum kesiminin floresan şiddet-zaman grafiği.....	66
Şekil 4-2: A- Lenfosit kesimleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz etkinlik testi. B- Lenfosit kesimlerinin floresan şiddeti-zaman gafiği.....	68
Şekil 4-3: A- Eritrosit NAD Glikohidrolaz etkinlik testi B- Eritrosit kesimlerinin floresan şiddeti-zaman grafiği.....	70
Şekil 4-4: Serum kesimleriyle yapılan Western emdirim görüntüsü.....	71
Şekil 4-5: Lenfosit kesimleriyle yapılan Western emdirim görüntüsü.....	71
Şekil 4-6: A- Eritrosit NAD ⁺ glikohidrolaz etkinliği B- Eritrosit floresan şiddeti-zaman grafiği.....	73

Şekil 4-7: A- Lenfosit NAD ⁺ glikohidrolaz aktivitesi	
B- Lenfosit floresan şiddeti-zaman grafiği.....	74
Şekil 4-8: Eritrosit proteinlerinin Western emdirim analizi.....	75
Şekil 4-9: Lenfosit membran proteinlerinin Western emdirim ile analizi.....	75
Şekil 4-10: Serum interlökin 6 değerleri.....	76
Şekil 4-11: Serum IL-10 değerleri.....	77
Şekil 4-12: Serum TNF- α değerler.....	77
Şekil 4-13: Serum IL-12 Değerleri.....	78
Şekil 4-14: Serum NAD Glikohidrolaz Etkinlik Değerleri.....	78
Şekil 4-15: Lenfosit kesimlerinin CD38 etkinliğinin incelendiği flow sitometrik analiz sonuçları.....	80
Şekil 4-16: Lenfosit alt birimlerinin Western emdirim görüntüsü.....	81
Şekil 4-17: A- Lenfosit proteinleri NAD Glikohidrolaz etkinlik grafiği	
B- Serum NAD Glikohidrolaz etkinlik grafiği ve Western blot analizi.	
C- Eritrosit NAD Glikohidrolaz etkinlik grafiği ve Western blot analizi...	83
Şekil 4-18: Kordon kanından elde edilen mezenkimal kök hücre görüntüsü.....	85
Şekil 4-19: CD34+ hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü	85
Şekil 4-20: Negatif kontrol tüpü. İnsan CD34 pozitif ayırma kiti ile saflaştırılan CD34+ hücrelerin ALDH etkinliğini inhibe eden DEAB ile muamele sonrası analizi.....	87
Şekil 4-21: İnsan CD34 pozitif ayırma kiti ile saflaştırılan CD34+ hücrelerin ALDH etkinliğinin izlendiği BAAA- FITC işaretli tüpün analizi.....	88
Şekil 4-22: İnsan CD34 pozitif ayırma kiti ile saflaştırılan CD34+ hücrelerin CD38 etkinliğinin izlendiği CD38-PE işaretli tüpün analizi.....	89
Şekil 4-23: Kök hücrelerin seçildiği tüp. CD34+ hücrelerin FITC işaretli BAAA, PE işaretli CD38 antikorlarıyla muamele edildiği tüpün analizi ve toplanacak hücrelerin seçimi.....	90
Şekil 4-24: Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının negatif kontrol tüpünün flow sitometrik analizi.....	92
Şekil 4-25: Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD38-PE ile işaretlenmesi sonrası yapılan flow sitometrik analizi.....	92

- Şekil 4-26:** Sağlıklı birey kanınının histopak üzerine tabakalandırılıp santrifüj sonrası alınan ara fazının kontrol tüpünün flow sitometrik analizi.....93
- Şekil 4-27:** Sağlıklı birey kanınının histopak üzerine tabakalandırılıp santrifüj sonrası alınan ara fazının CD38-PE ile işaretlenmesi sonucu alınan flow sitometrik analizi.....93
- Şekil 4-28: a-** Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanınının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD34, CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenmesi sonucu alınan floresan mikroskop görüntüsü.....94
- Şekil 4-28: b-** Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanınının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD34, CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenmesi sonucu alınan floresan mikroskop görüntüsü.....95
- Şekil 4-28: c-** Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanınının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD34, CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenmesi sonucu alınan floresan mikroskop görüntüsü.....95
- Şekil 4-29: a-** CD34+ hücreler seçildikten sonra ALDH enzimatik etkinliğinin ve CD38 yüzey antijenine sahip hücrelerin incelendiği floresan mikroskop görüntüsü.....96
- Şekil 4-29: b-** CD34+ hücreler seçildikten sonra ALDH enzimatik etkinliğinin ve CD38 yüzey antijenine sahip hücrelerin incelendiği floresan mikroskop görüntüsü.....96
- Şekil 4-30:** CD34+ hücrelerin CD38-PE ile işaretlenmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.....97
- Şekil 4-31:** CD34+CD38-ALDH+ hücrelerin facs ile toplanması aşamasından sonra hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.....97
- Şekil 4-32:** CD34+CD38-ALDH+ hücrelerin SCF (stem cell factor) varlığında zaman-hücre sayısı grafiği.....99
- Şekil 4-33:** CD34+CD38-ALDH+ hücrelerin eritropoetin varlığında zaman-hücre sayısı grafiği.....99
- Şekil 4-34:** İkinci faz kültür ortamına alınan hücrelerin sıfır, dört, sekiz, oniki ve onaltıncı günlerde Megacult c-staining kit ile boyanma sonucu ışık mikroskopunda alınan görüntüleri.....101-102
- Şekil 4-35:** İkinci faza alınan progenitör hücrelerin zamana bağlı NAD Glikohidrolaz etkinliği değişimi.....103

Şekil 4-36: Farklılaşma ikinci fazın 0., 4., 8., 12. ve 16. gün SDS-PAGE sonrası yapılan Western emdirim analizi.....	104
Şekil 4-37: İkinci faz sırasında hücrelerin CD34 yüzdesi.....	104
Şekil 4-38: Lenfositlerin invitro koşullarda IL-6 varlığında NAD glikohidrolaz etkinliği değişimi.....	105
Şekil 4-39: Serum ve sitokinlerin hematopoetik kök hücrelerin NAD glikohidrolaz etkinliği üzerindeki etkisi.....	106

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADPR	Adenozin difosfat riboz
ALDH	Aldehid Dehidrogenaz
B cell enrichment cocktail	B hücresi zenginleştirici kokteyl
BAA	Bodipy-aminoasetat
BAAA	Bodipy-aminoasetaldehid
BAAA-DA	Bodipy-aminoasetaldehid Dietil Asetal
bd H ₂ O	Çift damıtık su
BSA	Sığır serum albumini
cADPR	Adenozin difosfat ribozil siklaz
CD	Lenfosit yüzey antijeni (cluster of differantiation)
CEA	Karsino embriyonik antijen
Ci	Curie
Cpm	Sayım/dakika (counts per minute)
DEAB	Dietil Amino Benzaldehit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EKH	Embriyonik kök hücre
Epo	Eritropoetin
FITC	Fluoresein İzotiosiyanat
HKH	Hematopoetik kök hücre
IL	İnterlökin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
kDa	kiloDalton
MET	Merkapto etanol
µg	Mikrogram
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NBT	Nitroblue tetrazolium
PAGE	Poliakrilamit gel elektroforezi
PE	Pikoeritrin
pmol	pikomol
POPOP	2-2'-p-fenil-bis[5-feniloksazol]
PPO	2,5-difenil oksazol

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SCF	Kök Hücre Faktörü
Temed	N,N,N',N' Tetrametil etilendiamin

ÖZET

Türker-Şener, L. Ektopik Bir Enzim Olan Hücre Yüzey Antijeni CD38 Anlatımının Çeşitli Hücre Modellerinde İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. Doktora tezi, İstanbul. 2010.

Kanser hücresi biyolojisi konusunda son zamanlarda dikkati çeken bir molekül lenfosit yüzey antijeni CD38'dir. CD38 lenfositlerin genç (blast) evrelerinin yüzeyinde gözlenen bir membran proteindir. Kanser hastalarındaki CD38'i indükleyici etkinin, bazı serum faktörlerinin varlığından kaynaklandığı düşüncesiyle oluşturduğumuz model sistemde CD38 ilişkili enzim etkinliklerinde anlamlı artışlar bulundu. Benzer artışlar, Ehrlich asit tümör hücrelerinin aktarılmasıyla tümör oluşturulan Balb/c farelerinden alınan serum ile kanserli hastalardan elde edilen serumların normal Balb/c'lere enjekte edilmesi sonrasında yapılan NAD Glikohidrolaz ve ADP-ribozil siklaz etkinliklerinde de kontrollere göre anlamlı artışlar gözlemlendi. Ehrlich hücreleri içeren fare serumu enjeksiyonu yapılmış olan Balb/c'lerin eritrositleriyle yapılan Western emdirim analizlerinde, 45 kDa'luk bölgede CD38 reaktif protein bantı saptandı. Bu farelerin EAT hücresi enjeksiyonlarından 8 gün sonra 45 kDa bandı görünür olup, 12. günün sonunda maksimum yoğunluk kazandı. Aynı grubun lenfosit membran proteinleriyle yapılan çalışma sonucunda benzer bulgular elde edildi. Kontrol grubunda anti-CD38 bandına rastlanmamışken, EAT enjekte edilmiş grupta yine sekizinci günde bant görülüp onikinci günde maksimum yoğunluk kazandı. Bu yoğunluk yirmibirinci günde de korundu.

CD38'in eritrosit farklılaşmasının hangi aşamasında etkinlik kazandığı hematopoetik kök hücre sistemi kurularak açıklandı. Eritroid gelişim yolağında CD38 anlatımının izlenmesi amacıyla kordon kanından elde edilen ilkel/öncül insan hematopoetik hücreleri, serumdan yoksun kültür ortamında uygun kök hücre faktörü ve eritropoetin katkıları varlığında eritroid gelişim süreci boyunca izlendi. Eritroid gelişimi sırasında ikinci fazda CD38 etkinliğinin sekizinci günden itibaren belirgin şekilde arttığı hem NAD glikohidrolaz etkinlik testiyle hem de SDS-PAGE elektroforezi sonrası yapılan Western emdirim tekniğiyle

tespit edildi. Ayrıca hücre kültür çalışmalarında co-kültür deneyleri, CD38 anlatımı üzerine olan uyarıcı etkinin bazı serum faktörlerinin varlığından kaynaklandığı görüşünü destekledi. Bu bulgular ayrıca CD38 indüksiyonunun çoğalma sürecinde bazı proinflamator sitokinler üzerinden muhtemelen tetiklenişi çoğalma veya apoptotik süreci birlikte içeren bir olay olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : Hematopoetik kök hücre, kordon kanı, kanser, CD38, poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAGE), Ehrlich asit tümörü.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3734

ABSTRACT

Türker-Şener, L. Investigation of CD38 expression, a surface antigen and ectopic enzyme, in various cell models. İstanbul University, Institute of Medical Sciences, Department of Biophysics. Doktora tezi, İstanbul. 2010.

A molecule recently become apparent on the cancer cell biology is the lymphocyte surface antigen CD38. CD38 is a membrane protein seen on the young (blast) phases surfaces of lymphocytes. In our model system, composed by the idea that the inducing effect of CD38 among the cancer patients has resulted due to some serum factors, meaningful increases have been found in the enzymatic activities related to CD38. The similar increases, meaningful increases have been found compared to controls in the NAD Glycohydrolase and ADP-ribosyl cyclase activities obtained after injecting serums taken from the cancer patients and from Balb/c mice tumor-formed by the transfer of Ehrlich acid tumor cells, into the normal Balb/c. In Western blot analyses performed by Ehrlich cells containing mouse serum injected Balb/c erythrocytes, within 45 kDa region a reactive CD38 protein band has been detected. After 8 days from these mice EAT cell injections, 45 kDa band has become visible, at the end of the 12th day a maximum density has appeared. Similar findings have been obtained as the result of the study conducted by the lymphocyte membrane proteins of the same group. While anti-CD38 band has not been seen on the control group, in the EAT injected group on day eight the band appeared and on day twelfth maximum density has appeared. This density has been maintained on day twenty first.

The fact in which phase of the erythrocyte differentiation CD38 became active has been explained by composing hematopoietic stem cell system. With the purpose of following CD38 expression within the erythroid progress network, primitive/ pioneer human hematopoietic cells obtained from cordon blood, has been monitored in cultivation deprived of serum with the participation of the erythropoetin and the appropriate stem cell factor during erythroid development process. During erythroid development within second

phase the finding that CD38 activity has increased prominently from day eight has been detected both by NAD glycohydrolase activity test and by Western blot technique performed after SDS-PAGE electrophoresis. Apart from these, co-culture experiments within the studies cell culture studies, have supported the idea that the stimulant effect of the CD38 expression has resulted from some serum factors. These findings also consider that through CD38 induction proliferation process, it is an event containing induction proliferation and apoptotic process together over some proinflammator cytokins.

Key Words: Hematopoietic stem cell, cord blood, cancer, CD38, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Ehrlich ascites tumor(EAT).

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.
Project No. 3734

1. GİRİŞ VE AMAÇ

CD38, lökosit yüzey proteini; çeşitli gelişim ve aktifleşmelerle hücrede anlatım bulur. CD38'in özellikle kan hücrelerinin, kemik iliğindeki öncüllerinden olgun biçimlerine dönüşme sürecinde anlatım bulan, hücre farklılaşması ve gelişmesinde önemli rol oynayan, bu sürecin belirli aşamalarının belirteci niteliğinde bir protein olduğu düşünülmektedir. Timusun plazma membranında, makrofajlarda, etkinleşmiş B lenfositlerinde ve T lenfositlerinde ve birçok kanser hücresinde görülmüştür (1). Başlangıçta aktifleşme onkogeni olarak tanımlanan CD38; ADP ribozil siklaz etkinliğinin yanı sıra, NAD glikohidrolaz ve ADP ribozil hidrolaz etkinliğine de sahip bir ekto-enzimdir (2).

CD38, B ve T lenfositlerinin aktifleşme ve farklılaşma süreçlerini yansıtan bir proteindir. Lenfoid ve miyeloid hücrelerin farklı tiplerinde CD38 anlatımı farklı ölçüde gerçekleşir (3). Doğal öldürücü (natural killer) hücrelerin ve monositlerin yaklaşık %80'inde CD38⁺ bulunmuştur. Kemik iliğinde CD38 öncül hücrelerde anlatım bulurken, kordon kanı mononükleer hücrelerin %50-80'inde CD38⁺ olduğu bilinmektedir (4). Bu bulgular CD38 anlatımının hematopoetik gelişimin değişik evrelerinde tetiklenip baskılandığını ima etmektedir. Bir genelleme yapılacak olursa kemik iliğinde bulunan ilkel öncül hematopoetik hücrelerde CD38 anlatımı gözlenmez iken miyeloid ve lenfoid gelişim yollarının öncüllerinde CD38 anlatımı yüksek düzeylere çıkmaktadır. Bu gelişim yollarının ileri evrelerindeki olgun hücrelerde ise CD38 anlatımı yeniden çok düşük düzeylere inmektedir (5). Ancak bu olgun hücrelerin özellikle lenfositlerin aktifleşmesine koşut olarak yeniden CD38 anlatımının yoğun bir artış gösterdiği gözlenmektedir.

CD38 anlatımının hematopoetik hücre farklılaşma sürecinin farklı evrelerinde tetiklenip baskılanması, CD38 geninin indüklenir bir gen olduğunu düşündürmekle birlikte; CD38 promotor bölgesi indüklenen genlerde gözlenen TATA ve CAAT gibi dizilerden yoksundur (5). CD38 anlatımının düzenlenme mekanizmaları ve CD38 anlatımının artması miyeloid ve lenfosit gelişim yollarının farklı evrelerinde ki rolüne ilişkin ayrıntılı bilgiler henüz mevcut değildir. Diğer yandan, bağışıklık sistemi ile tümör arasındaki etkileşim ve iletişimde CD38 proteininin bir tür artırılmalı geri besleme (positive feed back) mekanizması içinde rol alıyor olması olası gözükmektedir.

Bu nedenle, kanserli hasta serumlarında bulunan CD38 anlatımını indüklendiğini düşündüğümüz serum faktörleri, hayvan tümör modelinde (Ehrlich asit tümör hücrelerinin aktarıldığı Balb/c farelerinde) araştırılması amaçlanmıştır. Eritrosit gelişim yolağında CD38 anlatımının incelenmesi amacıyla, kordon kanı hücre kültürleri uygun yeni bir model sistem olarak düşünülmüştür. Kordon kanından elde edilen ilkel/öncül insan hematopoetik hücreleri [CD34⁺/CD38⁻] serumdan yoksun kültür ortamında uygun faktörlerin (kök hücre faktörü, eritropoetin gibi) katkıları varlığında eritroid gelişim sürecini çekirdek yitimi aşamasına dek sürdürmektedir (6). Öncül hematopoetik hücrelerin eritroid gelişim sürecinde CD38 anlatımı üzerine etkisi ve böyle bir sistemde eritroid CD38 anlatımının hangi evrede başladığı, ne düzeyde gerçekleştiği ve bu anlatıma hematopoetik öncül hücrelerin ortamına eklenen kanserli hasta serumu ile ilişkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler ve Özellikleri

Organizmayı oluşturan hücreler çoğalma, bölünme ve büyüme özellikleri açısından birbirlerinden farklılıklar göstermektedirler. İleri farklılaşma gösteren eritrositler ve sinir hücrelerinin bölünmedikleri kabul edilir ve bu hücreler post mitotik hücreler olarak tanımlanır. Bazı hücreler, uygun sinyaller ile uyarıldıklarında bölünmek üzere sessiz kalırlar. Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler ‘‘kök hücreler’’ olarak bilinmektedir (7,8).

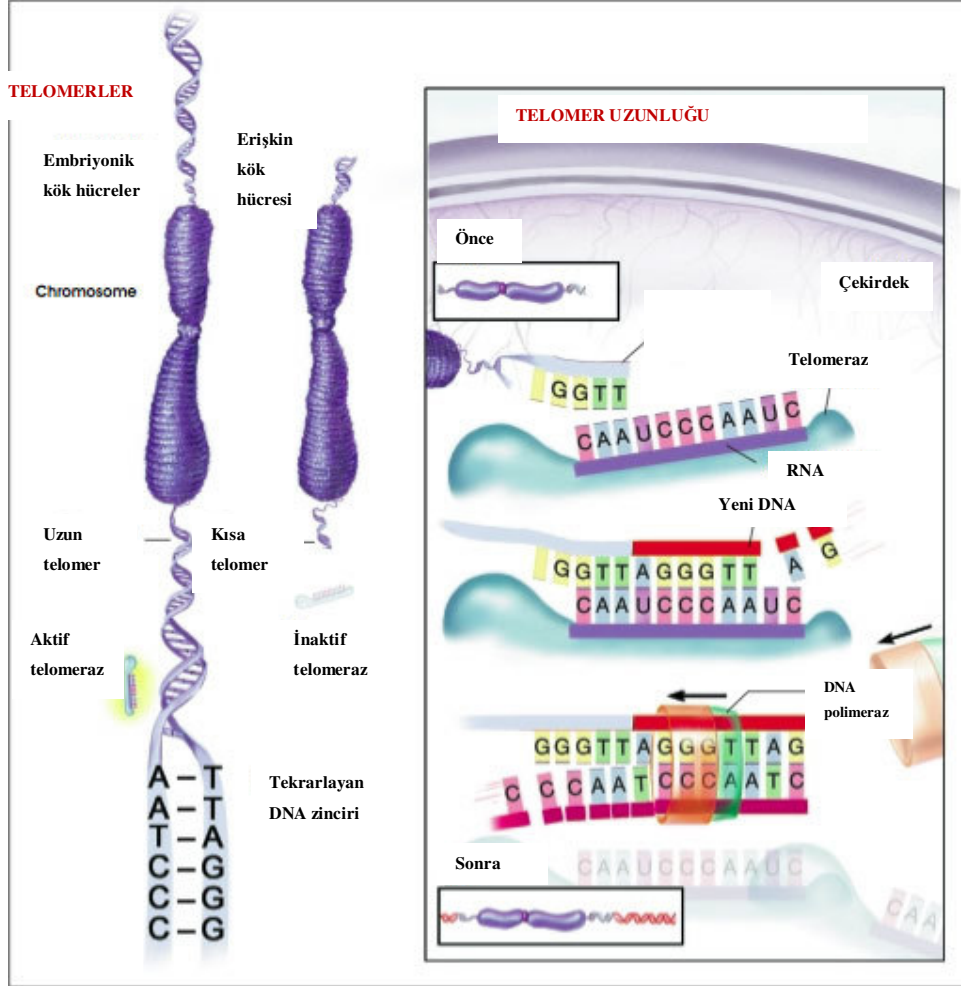
a) Kök hücreler uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler.

Normalde kendileri çoğalamayan kan, kas veya sinir hücrelerinden farklı olarak, kök hücreler çok sayıda bölünebilir ve çoğalabilirler. Laboratuvar şartlarında aylar boyunca çoğalabilen kök hücre popülasyonunda milyonlarca hücre ortaya çıkabilir. Thomas Okarma ve Ron Mckay'ın yapmış oldukları çalışmalarıyla da ortaya koydukları gibi tekli hücrelerden elde edilen embriyonik kök hücre serilerinin 300-400 döngü boyunca çoğalabildikleri gösterilmiştir (9, 10). Eğer, sonuçta ortaya çıkan hücreler de ebeveyn kök hücreleri gibi özelleşmemişse, bu hücrelerin uzun dönemde kendilerini yenileyebilme kabiliyetine sahip oldukları söylenebilir. Hücrelerin bölünme kapasitelerini kromozomların uç kısmında bulunan ve ‘‘telomer’’ denilen DNA zincirleri belirler. Telomerler ne kadar uzunsa hücreler o kadar çok bölünebilirler. Telomerlerin uzun kalmasını sağlayan da ‘‘telomeraz enzimi’’ dir. Bir hücrede telomeraz enzimi ne kadar aktif ise telomer uzunluğu da o kadar korunabilir. Kök hücreler çok yoğun telomeraz enzim etkinliğinden dolayı çok sayıda bölünebilirler (11).

Telomer Kontrol Noktası

Hücrelerin bölünme kapasitesini, yani bir bakıma ömrünü belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve "**telomer**" denilen DNA zincirleridir. Telomerler doğrusal kromozomların uçlarıdır ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileri (insanda TTAGGG) içerirler. Telomerler, kromozom uçlarının parçalanmasını ve dağılmasını ya da diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek; kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar. Telomerler aynı zamanda mayozda ve kromozomların çekirdek içerisinde organize olmalarında da rol oynar (12- 15).

Telomerik DNA, her bir çoğalma döngüsü esnasında ve oksidatif DNA hasarlanması gibi diğer nedenlerden dolayı kaybolur. Her tıpkı yapım sonrası kromozom kısalır. Çünkü, DNA polimeraz ana zincirde, 3'- ucunda yeni bir DNA sentezini başlatmaz ve sonuçta kromozom her bir replikasyonda giderek kısalır. Bu kaybı karşılamak için, telomerler bünyesinde ters transkriptaz telomeraz proteinini (**hTERT**) ve telomeraz RNA (**hTR**) taslağını taşıyan bir ribonükleoprotein olan **telomeraz** tarafından uzatılır (16). Enzim, her replikasyon sonrası telomerin kısılmasını önlemek için sayısız telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna takarak kromozomun kısılmasını engeller (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Telomer ve telomeraz yapısı (17)

Sonuç olarak, normal bir hücrenin her bölünüşünde, telomer boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. Telomer kısalması hücre bölünmesini sayan bir saat gibidir ve telomerler normal insan somatik hücrelerinin bölünme sayılarını düzenleyen önemli unsurlar olarak ortaya çıkmışlardır. Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz aslında etkin değildir ve bundan dolayı, her hücre bölünmesi sonucu kromozomların telomerleri kısalır. Birçok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar olur ve hücre daha fazla bölünme kapasitesini yitirir. Diğer yandan, insan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği bulunmuştur ve bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, telomeraz etkinliği kök hücrelerinin bir belirteçidir diyebiliriz.

Telomer uzunluğu sperm ve yumurta hücrelerinde 20 kb, yeni doğan hücrelerinde 10 kb'dir. Telomer boyutu 5 kb 'ye düştüğünde artık o hücre yaşlanmış bir hücredir (16).

İlginç olarak, mezenkimal kök hücreler gibi bazı nadir rastlanan kök hücrelerde de, telomerleri sabit bir uzunlukta tutmaya yetecek seviyelerde telomeraz üretimi olmaktadır. Ancak, hematopoetik kök hücrelerdeki telomeraz seviyeleri, tam olarak açıklanamayan bazı sebepler dolayısıyla telomer uzunluğunu korumaya yetmemektedir. Bununla birlikte, hematopoetik kök hücrelerdeki mevcut telomeraz seviyeleri işlevsel yönden önemlidir. Ayrıca, hematopoetik kök hücrelerinin normal hematopoez sırasında geri dönüşümsüz bir hücre döngü duraksamasıyla karşılaşmaları veya telomer kısalmasının bir sonucu olarak apoptoz geçirmeleri olasılığı az gibi görünmektedir. Büyük olasılıkla bir tek hematopoetik kök hücreden üretilen kan hücrelerinin toplamı öncelikli olarak kök ve öncül hücrelerin farklılaşmasıyla belirlenmektedir. Ayrıca, bireysel kök hücrelerin telomer kısalması yoluyla kaybedilmesinin, fazla miktarda ek hematopoetik kök hücrelerin varlığında bütün bir hematopoezi etkilemeleri beklenmemektedir. Bir kök hücredeki sınırlı sayıdaki kendini yenileme bölünmeleri bile hücre sayısını oldukça arttıracaktır. Neticede, bireysel kök hücreler oldukça fazla sayıda hücreye kaynaklık edebilmektedir (17,18,19).

Hematopoetik sistemdeki bütün hücreler, bir telomer kontrol noktasıyla karşılaşmak üzere programlanmamışlardır. B hücreleri, telomer uzunlukları yaşla birlikte giderek artan bir farklılık sergilediği için, bunun ilginç istisnalardan biri gibi görünmektedir. Açıkça, bazı B hücreleri telomerleri uzatmaya yetecek kadar telomeraz üretmektedirler (16).

Sonuç olarak, büyük olasılıkla insan gibi uzun yaşayan türlerdeki hücrelerin çoğalım hayat döngüsü iki önemli nedenden seçici bir baskı altındadır.

- Normal bir hayat döngüsü boyunca hücresel işlevlerin sürdürülmesi için yeterli bölünmelere imkan sağlamak,
- Aşırı hücre çoğalmasını ve tümör oluşumunu engellemek.

b) Kök hücreler özelleşmemişlerdir.

Bir kök hücreninin temel özelliklerinden biri de, bu hücrenin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip olmamasıdır. Bir kök hücresi, bir kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşularıyla beraber çalışmaz, kırmızı kan hücreleri gibi oksijeni dokulara taşıyamaz veya sinir hücreleri gibi doku ve organlara gerekli olan elektrokimyasal sinyalleri iletmez. Fakat, özelleşmemiş kök hücreler kalp kası hücreleri, kan hücreleri veya sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler.

Kök hücrelerinin özelleşmemiş olarak kalmalarını sağlayan unsurlar ve şartlar, bilim adamlarının ilgisini çekmektedir. Kök hücreleri, diğer özgün hücrelere dönüşmeden laboratuvar ortamında yetiştirmek, uzun yıllar boyu süren denemeleri gerektirmiştir. Bilim adamları, bundan yirmi yıl kadar önce erken dönemdeki fare embriyonlarından kök hücrelerini elde etmenin yolunu keşfettiler. Fare kök hücrelerinin biyolojisi üzerinde uzun yıllar boyunca yapılan ayrıntılı çalışmalar sonucunda, ancak 1998 yılında (ki bu çalışmalar 1981 yılı başlangıcına dayanmaktadır), insan embriyonik kök hücrelerinin laboratuvar ortamında nasıl izole edilebileceği ve çoğaltılabileceği anlaşılabilmiştir. Dolayısıyla, olgun bir organizmada kök hücre popülasyonunun çoğalmasını ve özgün bir dokunun tamirati gerekene kadar bu hücrelerin farklılaşmadan kalmalarını sağlayan sinyallerin anlaşılması, önemli bir araştırma sahasıdır. Bu bilgi, araştırmacıların çok fazla sayıda özelleşmemiş kök hücrelerini daha sonraki araştırmalarda kullanmak üzere laboratuvar ortamında elde edebilmeleri için son derece önemlidir (16).

c) Kök hücreler, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler, özelleşmemiş hücrelerin özelleşmiş hücrelere kaynaklık etmesi olayına farklılaşma denir.

Kök hücreleri birden fazla hücre tipine farklılaşırlar. Bunun örneklerini insan oluşturan hücre döllenen yumurta hücresi ya da zigottan itibaren görebiliyoruz. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan bu ilk embriyonel hücreye "**totipotent**" (her şeyi yapabilen anlamında) hücre denmektedir. Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar ki tüm blastömerler totipotenttirler.

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal dönemde), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler (20). Bu erişkin kök hücreler, tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Örneğin, kemik iliğindeki bir kök hücresi, kırmızı ve beyaz kan hücreleriyle plateletler gibi pek çok değişik kan hücresine kaynaklık eder. Bunun yanında, bütün sinir hücre türlerine kaynaklık eden sinir kök hücreleri ve fibroblastlara, osteoblastlara, kondroblastlara, tenositlere ve adipositlere farklılaşan mezenkimal kök hücreleri vardır. Aynı şekilde deri kök hücreleri de değişik deri hücrelerine dönüşebilirler.

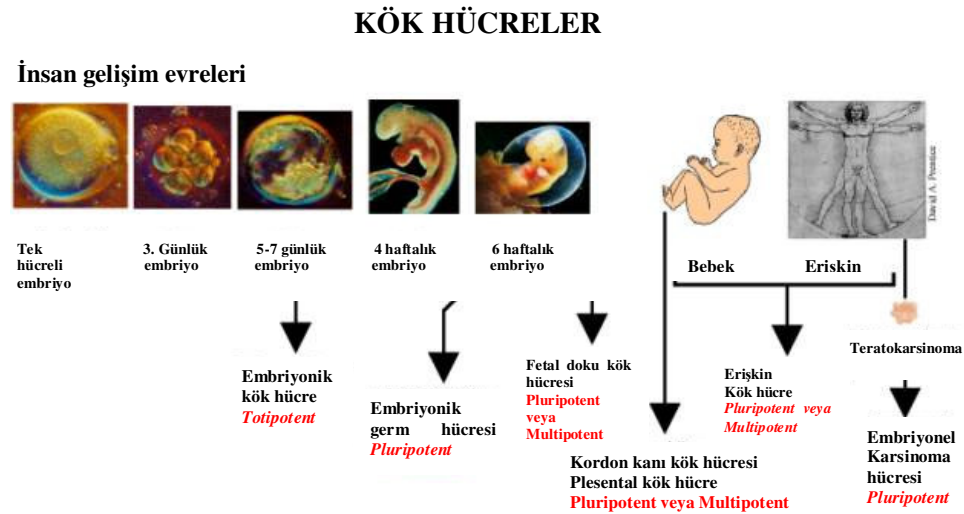
Yakın zamanlara kadar, kemik iliğinde kan oluşumundan sorumlu olan hematopoetik kök hücrelerin, beyindeki sinir hücreleri gibi çok daha farklı diğer hücrelere kaynaklık edemeyeceği düşünülüyordu. Fakat, son birkaç yılda yapılan bazı çalışmalar, bir dokudan elde edilen kök hücresinin tamamen farklı bir başka dokunun hücre tiplerine de kaynaklık etmesi anlamına gelen plastisite olasılığı gündeme getirmiştir. Bu tarz çoklu hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine **plastisite** veya **transdiferensiyasyon** denir. Yapılan çoğu çalışmada, hematopoetik kök hücrelerinin yanı sıra mezenkimal kök hücreleri ve nöral kök hücrelerinin plastisite özellikleri gösterilmiştir. Plastisitenin örnekleri arasında sinir hücrelerine dönüşen kan hücreleri, insülin üreten karaciğer oval hücreleri ve kalp hücrelerine dönüşebilen hematopoetik kök hücreleri yer almaktadır. Bu örnekleri çoğaltmamız mümkündür: Sindirim kanalındaki **epitelyal kök hücreler** (21), emilim hücreleri, goblet hücreleri, Paneth hücreleri (22) ve enteroendokrin hücreleri (23) gibi çeşitli hücrelere kaynaklık eder. Epidermisin bazal tabakasında ve kıl foliküllerinin diplerinde **deri kök hücreleri** bulunur. Sonuçta, hücre esaslı tedaviler için erişkin kök hücrelerini kullanma olasılığının araştırılması, en etkin çalışma alanlarından biri haline gelmiştir (24, 16).

d) Kök hücreler tekrar çoğaltabilirler. Hematopoetik kök hücrelerde yaygın şekilde ve daha yakın geçmişte karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde de gösterildiği üzere, kök hücrelerin hasar gören alıcıya naklinin sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrardan çoğaltabilmeleridir. Kemik iliği stromal hücrelerin hasarlı kalp dokusuna enjeksiyonu sonucu kardiyomyositlere dönüşmesi örnek olarak verilebilir.

e-)Kök hücreler farklılaşmış kuşaklara katkı sağlar. Embriyonik ya da yakın zamanda gösterildiği üzere erişkin kök hücrelerin (nöral ve mezenkimal kök hücre gibi) blastosiste enjekte edildikleri zaman (**kimerizm**) farklı hücre tiplerine kaynaklık etmelerinde olduğu gibi farklılaşmış kuşaklara katkı sağlamaktadır.

2.2. Kök Hücrelerin Çeşitleri

Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında tanımlanmaktadır (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Kök hücre çeşitleri (25)

2.2.1. Totipotent kök hücre:

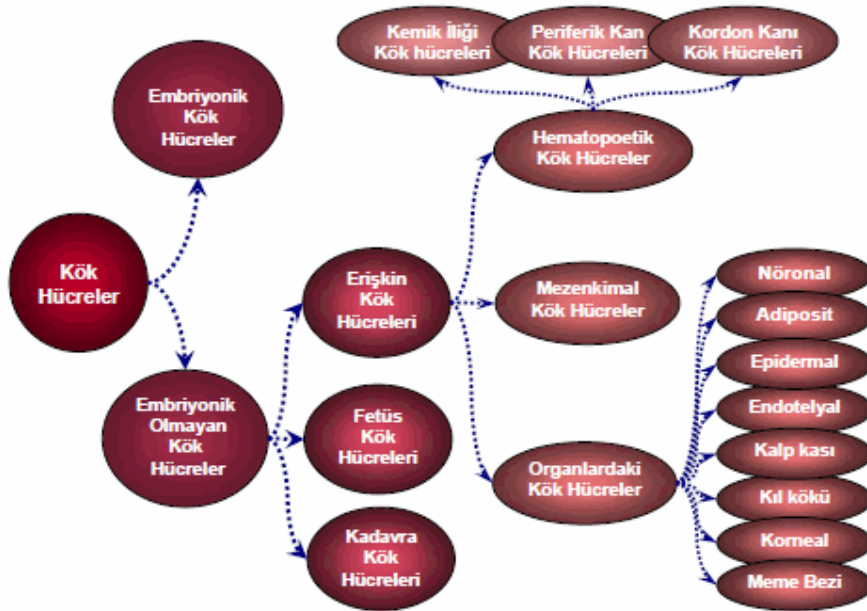
Memeliler için hayat zigot adı verilen tek hücreden başlar. Fertilizasyon ile spermium ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, yetişkin bir organizmanın meydana gelmesi için gereksinim duyulan bütün genleri taşımaktadır. Tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip bu ilk yani embriyonik hücreye her şeyi yapabilen anlamında “*totipotent hücre*” denir. Bu özelliğini 16 blastomerli evreye (döllenmeden sonraki 5.gün) kadar sürdürür (erken embriyonik dönem). Tam ve işlev gören bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilir (Şekil 2-3). Genlerin seçici aktivasyonu ve/veya inaktivasyonunun farklı gelişim potansiyelleri taşımalarına sebep olduğu bilinmektedir (26).



Şekil 2-4: Blastosist aşaması

2.2.3. Multipotent kök hücre:

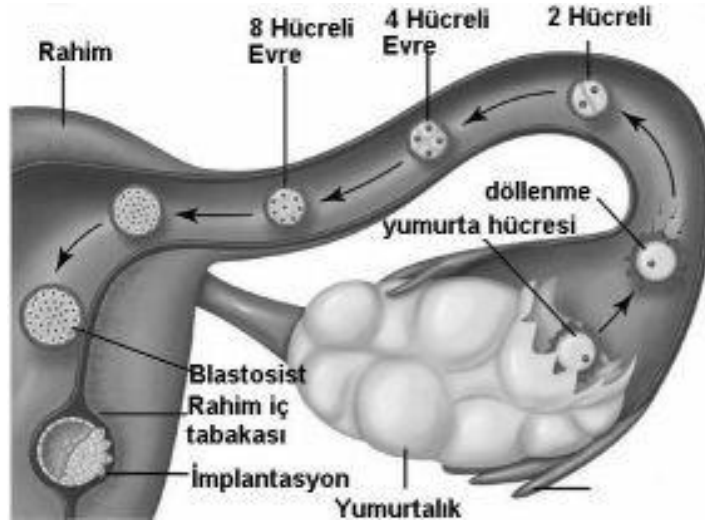
Bu hücreler, embriyonik gelişmenin daha ileri evresine ait hücreler olup, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler ve erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Erişkin kök hücreleri de, buldukları dokunun hücre tipini üretirler. Örneğin, multipotent bir kan hücresi, özelleşmiş kan hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Multipotent hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar (Şekil 2-5) (27).



Şekil 2-5: Multipotent kök hücre ve farklılaşma

2.2.3.1. Embriyonik kök hücreler (EKH):

Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir. Vücuttaki herhangi bir farklılaşmış hücreyi oluşturma yeteneğindedirler. EKH'ler, çekirdeği çıkartılmış bir ovumla kaynaştırılarak elde edilmiş olan (klonlanmış) bir embriyodan da elde edilebilir (28). Embriyonik kök hücreden elde edilen hücre kümeleri embriyoid cisimcikler olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2-6). Bunlar plasenta dışında, ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir (29).



Şekil 2-6: Embriyonik kök hücre

2.2.3.2. Embriyonik Olmayan Hücreler:

Erişkin kök hücreler: Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler (30). Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir. Bu hücrelerin, vücut dışında embriyonik kök hücreler kadar uzun süre özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri yoktur. Kişinin immun sistemine uyum gösterirler, ancak tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için kullanımları sınırlıdır, teratokarsinoma oluşturmazlar. Günümüzde, erişkin kök hücrelerin diğer organ ve dokulara farklılaşması yönünde çalışmalar yapılmaktadır (31). Organizmada ancak

belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen erişkin kök hücreleri, laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne dönüşebilmektedirler (32, 33, 34).

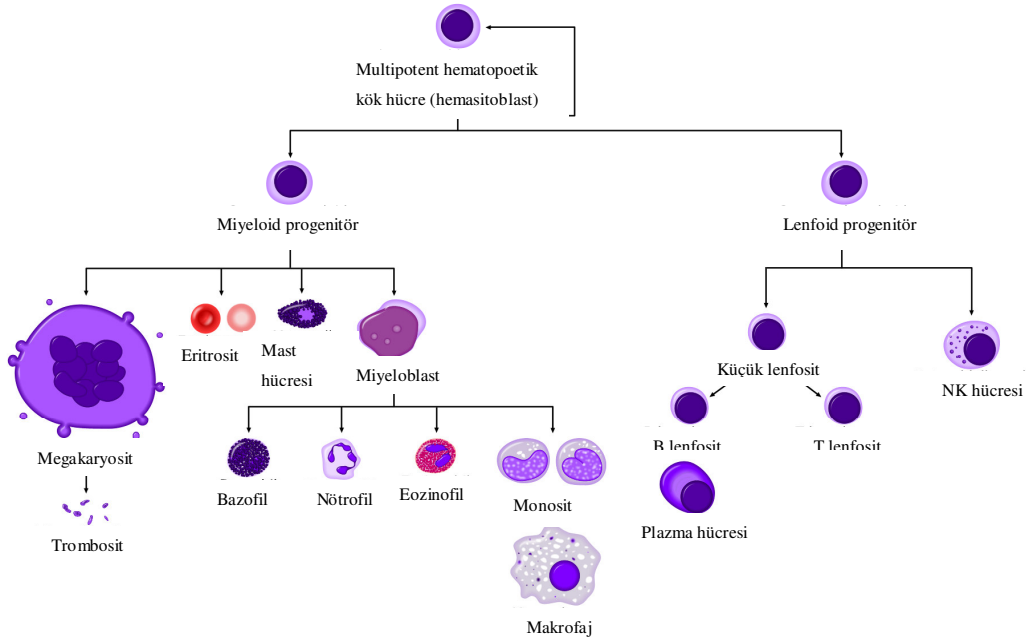
En iyi tanımlanmış embriyonik olmayan kök hücreler hematopoetik kök hücreler olmakla birlikte, erişkin kök hücrelerin beyin, barsak, kas, deri/kıl follikülü, kalp (35), akciğer ve son zamanlarda meme bezi gibi çeşitli doku ve organlarda varlığı gösterilmiştir, hücreSEL fenotipik yüzey belirteçleri ile ayırt edilebilmektedirler (36).

Hematopoetik kök hücreler (HKH): Hematopoetik kök hücreler kendi kendine yenileyebilme ve tüm kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri ile kan hücreleri öncüleridir (37) (Şekil 2-7, Şekil 2-8). Farklılaşabildikleri kan hücreleri: myeloid hücreler (monositler, makrofajlar, bazofiller, eosinofiller, eritrositler, megakaryositler/ plateletler ve bazı dendritik hücreler) ve lenfositler (T-hücreleri, B-hücreleri, NK-hücreler, bazı dendritik hücreler)'dir. Yüzey belirteçleri başlıca, CD34, CD14, CD38, CD45 ve CD133'dür. İntrensek ve ekstrinsek sinyaller ile farklılaşmaları düzenlenmektedir. Hematopoetik doku hücreleri kısa dönem ve uzun dönem rejenerasyon kapasitelerine göre multipotent, oligopotent ya da unipotent öncülerdir. Hematopoetik kök hücreler yetişkinlerde uyluk, kalça, göğüs, kaburga ve diğer kemiklerde kemik iliğinde bulunurlar. Klinik ya da araştırma amaçlı kullanım için kordon kanı, placentası, periferik kan diğer kaynaklardır. Hematopoetik kök hücreler insan vücudunda günde yaklaşık olarak 2×10^{11} yeni kırmızı hücre üretirler (38, 39)

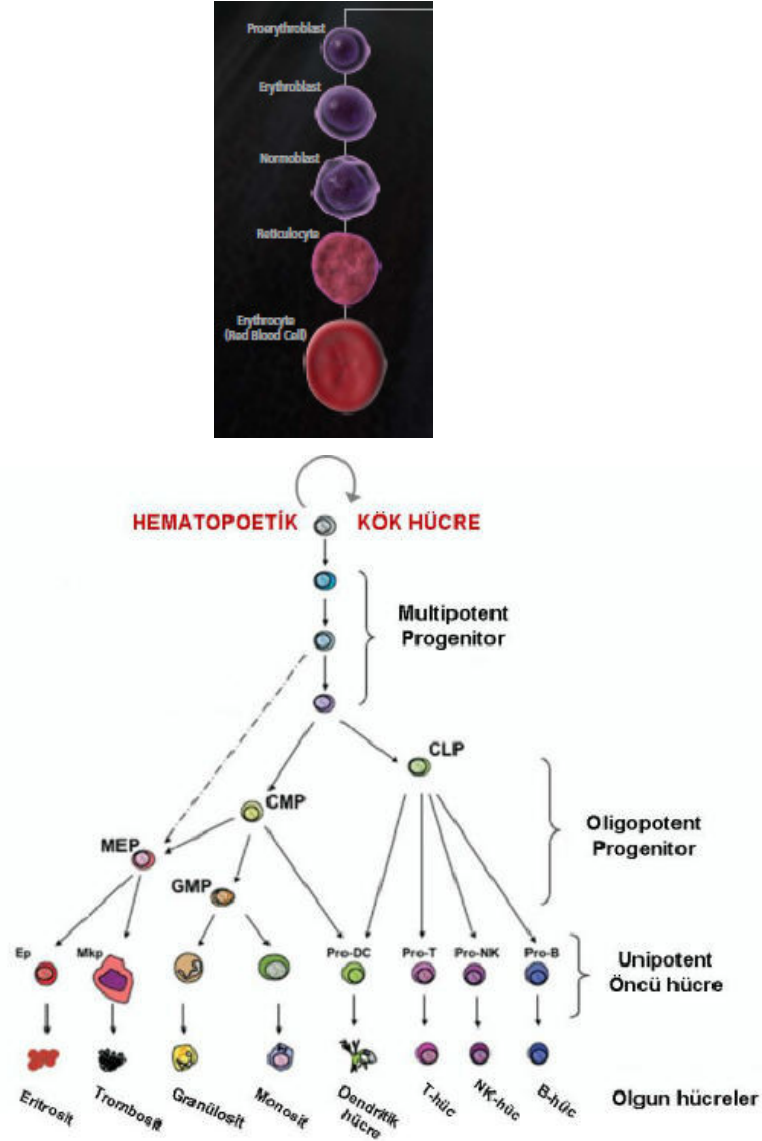
Üzerinde en çok çalışılan ve tedavide yaygın olarak kullanılan erişkin kök hücrelerdir. Deneysel amaçlar için, hayvanların fetal karaciğer, fetal dalak ve aorta-gonadmezofronu (AGM) hematopoetik kök hücreler için yararlı kaynaklardır. Hematopoetik kök hücreler morfolojik olarak lenfositlere benzerler; yapışık değildirler (non-adherent), yuvarlaktırlar ve yuvarlak bir çekirdeğe sahiptirler. Sitoplazmanın çekirdeğe oranı küçüktür (40, 41, 41).

Osteoblastik ve damarsal mikroçevre, HKH'nin çoğalma, farklılaşma ve buldukları yerdeki davranışlarının (homing) düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Dolaşımdaki kök hücreler kemik iliği mikroçevresi ile temasa

geçerek, endotel ve adezyon molekülleri aracılığı ile buraya yerleşirler. Kök hücre faktörü kemik iliğinde stromal hücreler tarafından salınır ve HKH üzerindeki c-kit antijenine bağlanır. Kök hücre faktörünün, Interlökin-1 (IL-1) IL-3 veya IL-6 ile kombinasyonları HKH'lerin eritroid yönde çoğalmalarını sağlar. Sessiz fazdan çoğalma fazına geçmesi için uyarılar gereklidir. Normal fizyolojik durumda, HKH ve erişkin kök hücreler, sessiz dönemde uzun süre kalabilirler. Hücre siklusu regülatörlerinden, p21 CIP1 ve p18 INK4C'in HKH'lerin sessiz kalmalarını düzenledikleri gösterilmiştir. Pozitif ve negatif regülatörler arasındaki çok hassas denge kök hücrenin kendini yenileme ve farklılaşma yolunda gelişmesi in vivo olarak problemlili olabilir. Örneğin, Wnt sinyalinin kök hücre yada progenitörlerde genetik değişikliğe uğraması lösemi ve diğer kanserlerin gelişmesine yol açmaktadır.



Şekil 2-7: Hematopoetik kök hücre ve farklılaştığı hücre tipleri (50)



Şekil 2-8: Hematopoetik Kök Hücre ve farklılaştığı olgun hücre tipleri

Kordon kanı kök hücreleri: Gebelik boyunca anneyle rahimdeki bebek (fötüs) arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonundaki kana kordon kanı denilir. İçerisinde erişkin kanında gördüğümüz eritrosit, lökosit, lenfosit ve trombosit gibi kan hücrelerine ilaveten erişkin kanından daha yüksek yoğunlukta kök hücreler de bulunur. Bu özellikleri

nedeniyle eskiden doğum eylemi sonrasında çöpe atılan kordon kanı, artık tedavi amacıyla kullanılan bir kök hücre kaynağı haline gelmiştir ve doğumu hemen takiben toplanarak ilerde kullanılmak üzere özel koşullarda saklanmaya alınabilmektedir. Bugün için tıbben kabul gören tek kullanım alanı, kan ve bağışıklık sistem hastalıklarının tedavisidir. Kordon kanı az hacimde (yaklaşık 100 ml) olduğu için içerdiği toplam hematopoetik kök hücre miktarı da kemik iliği veya büyüme faktörü ile uyarılmış periferik kandan elde edilebilenden daha azdır. Bu nedenle kordon kanı çoğunlukla çocuklarda kullanılmıştır. Ancak son dönemde birden fazla bebekten toplanan ürünlerin tek bir hastaya da başarıyla kullanılabilirdiğinin görülmesi sonucu giderek artan oranda erişkinlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Dünyada en çok kullanıldığı durum, kök hücre nakli tedavisi gereken ancak aile bireyleri arasında veya tüm dünyadaki 1 milyondan fazla verici arasında doku grupları uygun bir verici bulunamayan hastaların tedavisi amacıyla kullanımınıdır. Kök hücre araştırmalarında deneysel düzeydeki sonuçlar kordon kanının ilerde insanlarda doku tamiri konusunda da kullanabileceği işaretlerini vermektedir (43).

Bebeğin doğumunun ilk yarım saati içerisinde alınan plasenta ve göbek kordon kanı erişkin kök hücreler için önemli bir kaynaktır. Kordon kanı kök hücrelerinin avantajları: genç hücreler olmaları; yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması; fazla sayıda elde edilebilir olmaları ve alıcıya kolay uyum sağlamalarıdır. Kordon kanı elde edildikten sonra eritrositler uzaklaştırılarak, dondurularak, sıvı nitrojen içerisinde kordon kanı bankacılığı arşivinde saklanır. Göbek kordon kanı, kök hücre kaynağı olarak 1988 yılından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Kordon Kanının Özellikleri

Kordon kanı, kemik iliği ve çevre kanı gibi dokularla kıyaslandığında daha uzun telomere, daha yüksek proliferatif kapasiteye sahip kök hücre içeriği, immün yapılanma yönünden henüz timus olgunlaşması tamamlanmamış olması, başka bir insanda daha kolay uyum gösterme nitelikleri ile önemli avantajlara sahiptir (44).

Kordon Kanı Kök Hücrelerinin Özellikleri

- *Fenotip: CD34⁺ CD38⁻
- *Kök hücreleri her zaman sayısal olarak ölçmek kolay değildir.
- *Proliferatif kapasiteleri>kemik iliği kök hücreleri
- *Genellikle siklus dışında bulunurlar.
- *Sitokin olmaksızın terminal farklılaşmaya gidebilirler.
- *Sitokin uyarımına çok hızlı cevap verirler.
- *Uzun süreli kültür kapasiteleri büyüktür.
- *Telomerleri kemik iliğindeki kök hücrelerden daha uzundur.
- *GVHD (Graft Versus Host Disease)'ye sebep verme oranları daha düşük.
- *Yerleşme oranları yüksek (%85)
- *GVHD (Graft Versus Host Disease) oranı düşük olmasına karşın relaps oranı artmamakta.

Kanser kök hücresi: Kanser progenitor hücreleri kök hücre-benzeri özellikleri olan hücrelerdir ve kanser başlangıcında, ilerlemesinde, lokal invaziv kanserlerin yaygınlaşması ve tedavisi olmayan döneme girmesinde önemli rol oynarlar. Karsinogenezde, göç eden kanser progenitor hücreleri, tümör gelişimindeki kaskada rol oynayan hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve integrinlerden etkilenmektedir. Kanser progresyonunda, lokal kanser progresyonu ve mikrometastatik olaylar; onkojenik sinyal yollarını aktive etmekte ve tümör oluşumu kemik iliği gibi farklı alanlarda gelişmektedir. Tedavi olarak, kanser progenitor hücrelerin selektif moleküler olarak hedef alınması çoğu lokal ve metastatik kanserin teşhis ve tedavisinde önemli olduğu öne sürülmektedir (36).

2.3. Farklılaşma (Plastisite)

Farklılaşma, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklılaşma sitokinlerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin kombine etkisiyle başarılı karmaşık olaylar bütünüdür (Tablo 2-1). Farklılaşma aşamasına giren hücre, bir yandan bölünmeyi durdururken diğer yandan çevresinden gelen sinyallere yanıt vermeye hazırlanır. Bunun için genellikle enzim-bağımlı yüzey ve hücre içi reseptörler ve aktivasyon yolları ortaya çıkararak hücrede uzun erimli olayların başlamasını

tetikler. Laboratuvar ortamında kök hücrelerin belli bir çizgide farklılaşması belli kimyasal ve fiziksel koşulların yerine getirilmesi veya doğrudan hücrenin genetik programının değiştirilmesiyle başarılır. Embriyo kök hücrelerinde farklılaşmayı kontrol etmek daha zordur. Bunun için in vitro ortamda çoğaltılan embriyon kök hücrelerinde kendiliğinden farklılaşmasını engellemek gerektiğinden, IL- ailesi üyesi olan lösemiye engelleyen faktör (LIF) kullanılır. In vitro farklılaşmanın ikinci yolu, çeşitli vektörler kullanarak (viral, plasmid vb.) genetik yeniden programlama yapmaktır. Bunun en son örneklerinden biri, uyarılmış pluripotent kök hücreleridir, somatik hücrelerin çeşitli viral veya nonviral vektörler kullanarak Oct 4, Sox2, klf4, c-Myc ve benzeri embriyon kök hücrelerine özgü genleri aktif hale getirerek geriye farklılaşmanın (dediferansiyasyon) sağlanmasıdır. Kendini yenilemekte olan bir hücrede çok sayıda gen aktif iken az sayıda gen ifadesi görülür; buna karşın farklılaşmakta olan bir hücrede az sayıda gen aktif iken daha çok sayıda gen ifadesi görülür. Bir başka deyişle farklılaşmakta olan bir hücrede protein sentezi ileri derecede artmıştır. Hücre işlevsel bir hücre olma yolunda ilerlerken gerek yapısal, gerekse işlevsel bütün özelliklerini kazanmak üzere özgün proteinler sentezler ve salgılar (50, 51, 52).

Hematopoez, organizmanın embriyonik ve yetişkin düzeyde kan hücresi oluşturmasını tanımlayan bir terimdir. Hematopoez, yetişkin kök hücre tiplerinden biri olan ve bütün kan hücre serilerine dönüşme yeteneğindeki hematopoetik kök hücrenin (HKH, hematopoietic stem cell =HSC) gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini de kapsamaktadır. Fetal ve yetişkin memelilerde, HSCs ağırlıklı olarak sırasıyla fetal karaciğer (FL) ve kemik iliği (BM)nde bulunur. Ancak embriyonik gelişim sırasında diğer dokulara da göç olduğundan, sadece FL ya da BM kökenli değil, diğer dokulardan da elde edilebilmektedir.

Birçok dokunun bu tanımlamalara uyan kök hücresi vardır. Bu hücrelerden en bilinen ve tedavide en çok kullanılanı hematopoetik kök hücrelerdir. Hematopoetik kök hücre kemik iliği ve çevre kanının hücresel elemanlarını oluşturur (Şekil 2.8). Hematopoetik kök hücre, en fazla kemik iliği, daha az olarak çevre kanı veya kordon kanı hatta fetal döneme ait karaciğer, dalak gibi dokularda bulunmaktadır. Büyüme faktörleri ile uyarılmış bireylerde kemik iliğinde çoğalan hematopoetik kök hücreler çevre kanına geçmekte ve myeloablasyonu takiben yeniden hematopoezi oluşturabilecek miktarda kök hücre eldesi mümkün

olabilmektedir. Son yıllarda bu hücrelerin endotel oluşumu ve hematolojik olmayan başka dokulara dönüşme kapasitesi de gösterilmiştir. Kemik iliğinden daha erken aşamaya ait mezenkimal kök hücreler de elde edilmektedir (48-52).

Tablo 2-1: Mezenkimal Progenitörlerin İn Vitro Farklılaşma Potansiyeli: Uyarı, Moleküler Ve Hücresel Belirteçler

FARKLILAŞMA	UYARI	TERMİNAL FENOTİP İDENTİFİKASYON BELİRTEÇLERİ	
		MOLEKÜLER	HÜCRESEL
Adipositler	Deksametazon+ isobütilmetilksantin Deksametazon+ isobütilmetilksantin+indometasin+insülin Deksametazon+indometasin Deksametazon+insülin Deksametazon+insülin+eikosate+raynoikasit	PPAR γ 2 C/EBP β aP2 adiposin leptin lipoprotein lipaz	Sitoplazmik lipit damlacığı birikimi
Kondrositler	TGF β 3+askorbik asit TGF β 1+askorbik asit TGF β 1 ITS+Premiks+TGF β 1	Cbfa-1 Tip II ve IX kolagen Agrekan	Proteoglikanlar ve TipII ve IX kolagen yönünden zenginleştirilmiş matriks
Osteoblastlar	Deksametazon+ β -gliserofosfat+ Askorbik asit BMP-2	Cbfa-1 kemik/karaciğer/böbrek	Mineralize matriks formasyonu
Hematopoetik destekleyici stroma	Hidrokortizon + at serumu Hematopoetik kök hücre	-	CD34+ hücrelerin Hematopoetik farklılaşmasını destekler ve devam ettirir.
İskelet kas sistemi	5-azaktidin	MyoD, Myt 5 ve 6, MEF-2 miyogenin, MRF4,miyozin	Çok çekirdekli kasılabilir hücreler
Düz kas hücreleri	PDGF-BB	ASMA, Metavinkülin, Kalponin, h-Kaldesmon, düz kas aktin	-
Kalp kası hücreleri	bFGF	β -miyozin ağır zinciri, fosfolamban. GATA 4 ve 6 Kardiyak troponin I ve C Sarkomerik aktin	-
Sinir hücresi	Retinoik asit	-	-
Gliya hücreleri	Retinoik asit	-	-
Beta hücreleri	Retinoik asit	İnsülin	-
Endotel hücreleri	VEGF+HGF	CD31, FIK-1, Vwf	Endotelial fenotip

Hematopoetik progenitor hücreler (HPCs) çoğalmalarının yanı sıra kırmızı kan hücrelerine de dönüşürler. Bu gelişme, büyüme faktörü (SCF) ve eritropoetin (EPO) ile kontrol edilir. EPO, eritroid progenitor hücreleri apoptozdan antiapoptotik proteinlerin aktive edilmesiyle sağlar ve hemoglobin sentezini stimuli ederek hücreyi terminal farklılaşma yoluna sokar. SCF ise sinerjetik rol oynayarak eritroid progenitörlerin çoğalmasını sağlar. Panzenboeck ve arkadaşları kordon kanından elde edilmiş hematopoetik kök hücrelerin eritrosit farklılaşmasını 2 fazlı farklılaşma aşamasından geçirerek çekirdeklendiklerini ve retikülosit aşamasına geldiklerini göstermişlerdir. Neildez-Nguyen ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise kordon kanı hücrelerinin 3 fazlı farklılaşma aşamalarından sonra terminal farklılaşmaya gittiğini göstermişlerdir (53). Isabel Dorn ve arkadaşlarının “transplantation and cellular engineering” dergisindeki yaptıkları çalışmada 2 fazlı sıvı kültür fazının sonunda hücrelerin %43 retikülosit, %52 normoblasta farklılaştığını göstermişlerdir (54).

2.4. Kök Hücrelerin Bölünme Şekilleri

Kök hücreler, farklılaşmış hücreler oluşturmak için iki çeşit bölünme yaparlar (Şekil 2-9)(55):

- 1) Asimetrik bölünme (invariant ya da değişmez bölünme);
- 2) Simetrik bölünme (düzenleyici bölünme)

Kök hücre asimetrik bölünmede ikiye bölünme suretiyle, bir kök hücre bir de ilerde farklılaşacak olan progenitor hücre oluşturur. Bu bölünmeye bu nedenle simetrik olmayan bölünme denir. Çünkü simetrik bölünme:

Kök hücre → Kök hücre + Kök hücre

ya da

Kök hücre → Progenitör hücre + Progenitör hücre olacak şekilde bölünür.

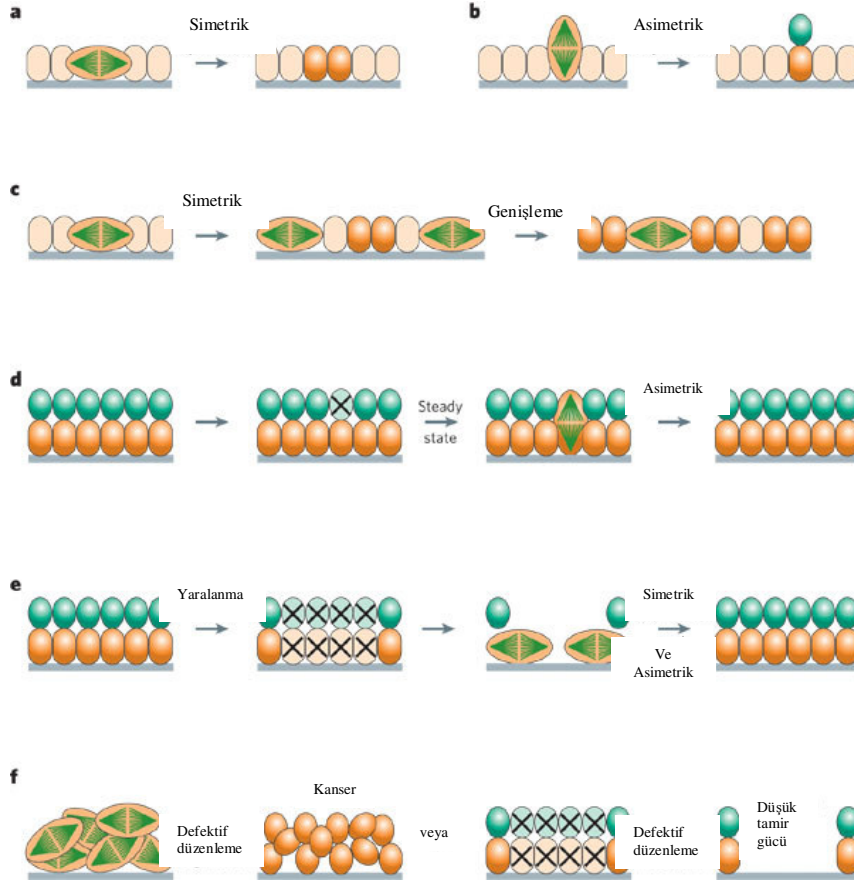
Asimetrik bölünmede:

Kök hücre → Kök hücre + Progenitör hücre

şeklinde gerçekleşir.

Progenitör hücreler ileride bölünerek farklılaşmış hücelere dönüşebilirler. Tek hücreli canlılarda ve omurgasızlarda, örneğin *Drosophila* yumurtalıklarında, asimetrik bölünme örnekleri görülmüştür (56).

Kök hücre + Kök hücre mi, Progenitör hücre + Progenitör hücre mi olacağını şans belirler; fakat uygun ortalama alınır, bölünmeler sonucunda eşit sayıda kök hücre ve progenitör hücre oluştuğu görülür. Buna rağmen bu ikinci tip bölünmelerin sonucunda dokuda kök hücre ve progenitör hücre sayıları eşit değildir; buna “popülasyon asimetrisi” denir. Ortalama olarak eşit sayıda kök hücre ve progenitör hücre oluşurken, dokuda kök hücre ve progenitör hücre sayılarının farklı oluşunun nedeni, doku gereksinimlerine göre kök hücre ve progenitör hücre bölünme hızlarının değişebilmesidir. Genellikle dokularda progenitör hücrelerin sayısı kök hücrelerden çok daha fazladır. Memelilerin kendini yenileyebilen dokularının çoğu ikinci tip bölünme yapar ve popülasyon asimetrisi gösterir. Çok farklı olsalarda, bu iki bölünmede de geri kontrol (feedback) ve hücreler arası etkileşim mekanizmaları söz konusudur. Hücre popülasyonlarının simetrik olmayışı çeşitli fizyolojik gereksinimlere yanıtı kolaylaştırır; bir yaralanmadan sonra kan ya da epidermis hücreleri gerektiğinde, daha çabuk oluşturulabilir (56,57).



Şekil 2-9: Simetrik ve asimetrik bölünmeler.

a, Epiteldeki hücrelerin bölünmesiyle oluşan yeni hücrelerin her ikisinde morfolojik olarak kök hücrelere benzerler(turuncu). Gri çizgi, membran çizgisidir. **b,** Epiteldeki hücrelerin bölünmesiyle oluşan yeni hücrelerin bir tanesi kök hücre, diğeri ise farklılaşmış hücredir (yeşil). Kök hücrelerin bu şekildeki asimetrik bölünmeleri, geç fetal gelişim sırasında ve erişkinlerde bazal epitel tabakasında ve beyin ventriküler bölgesindeki bölünmelerin bu şekilde olduğu düşünülmektedir. **c,** Gelişim sırasında, kök hücreler simetrik bölünme gerçekleştirir. **d,** Sağlıklı erişkinlerde, bazal epitel tabakasında ve beyin subventriküler bölgesindeki bölünmelerde kök hücre sayısı ve farklılaşmış hücre sayısı dengede kalır. **e,** Sağlıklı erişkinlerde, hasar sonucu hücre kaybı (X) oluşabilir. Simetrik bölünmeyle kök hücreler, asimetrik bölünmeyle de farklılaşmış hücreler yeniden bu kayıplar yok edilir. **f,** Soldaki resimde simetrik bölünmeyle oluşan tümör hücreleri görülmekte. Sağ resimde ise doku tamir kapasitesi azalmış hücre grubunda asimetrik bölünme olacak kısımda hücrelerin yok olduğu görülmekte.

2.5. CD38

Hücre yüzey antijeni CD38, farklılaşma boyunca *hematopoetik* hücrelerde eksprese edilen iki fonksiyonlu bir enzimdir (58). 45 kDa molekül ağırlığında tek polipeptit zincirinden oluşan çok fonksiyonlu tip II hücre zarı proteindir (Şekil 2-10). Molekül, tripsin sindirimine dirençli, *Staphylococcus aureus* ve proteazına duyarlıdır. Dört adet azota bağlı oligosakkarit zincirine sahip olup, izoelektrik noktası 6,5 ile 6,9 arasında değişir (59).

CD38'i kodlayan gen insanda dördüncü kromozomda konumlanmış (4p15) olup (60), CD38 cDNA'sı bir T hücre soyundan klonlanmıştır (61). Aminoasit dizisinin incelenmesi sonucunda; kısa bir N-ucu sitoplazmik kuyruğu ve uzun bir C-ucu motifi olan membran proteini olduğu anlaşılmıştır.

İnsan CD38 geni tek kopya halinde bulunur. 62 kb'm üzerinde bir bölgede sıralanmış sekiz ekson ve yedi introndan oluşur. 5' ucundaki kodlayan bölgeyi bölen intron çok büyüktür. Genin 5' ucunun öncesinde alışlagelen TATA ve CAAT kutularının yerine başlangıç kodununun hemen öncesinde GC'den zengin bir bölge, birçok transkripsiyon faktörü α , nükleer faktör IL-6 ve interferona duyarlı faktör-1 gibi immünolojik transkripsiyon faktörleri için olası bağlanma bölgeleri bulunur (62).

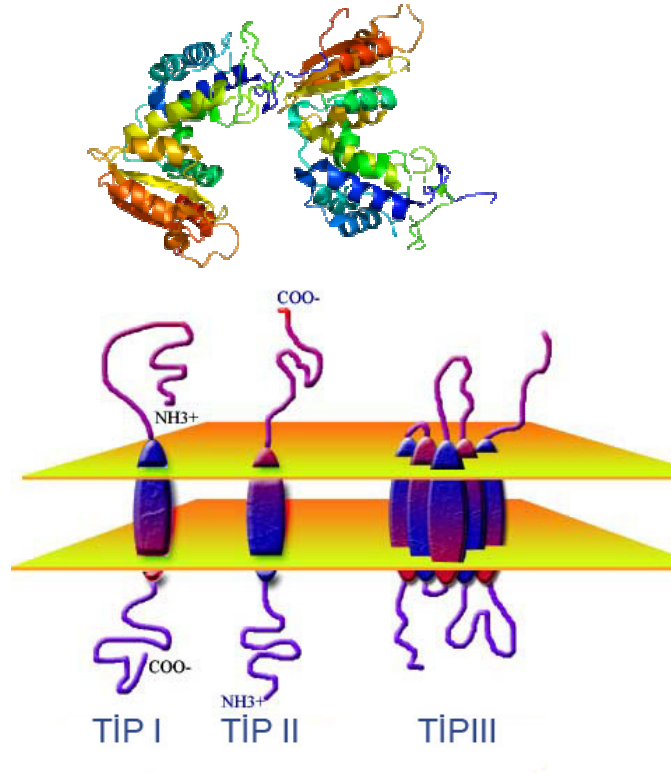
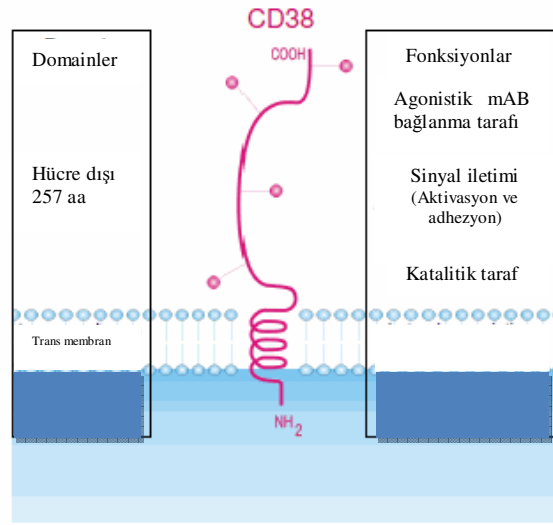
CD38'in membrana bağlı biçiminin yanı sıra sıvıda çözünmüş biçimi sCD38 da vardır. Çözünmüş molekül, aktiflenmiş T hücre kültürleri ve CD38⁺ tümör hücre soylarının üst sıvılarında saptanabilir. sCD38, serum, amniyon sıvısı gibi normal ve myeloma hastaların serum ve asit sıvıları, kanserli hasta serumları gibi patolojik sıvılarda da gösterilebilir (63).

2.5.1. İnsan CD38'inin Biyolojisi

İnsan CD38'i olgunlaşmamış hematopoetik hücreler tarafından ifade edilen, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler ve doğal katil hücreler gibi aktive edilmiş lenfositler tarafından yüksek seviyede yeniden düzenlenmiş bir tip II yüzey antijendir. Tam-uzunlukta bir insan CD38'inin kısa intraselüler bir domaini ve önemli derecede geniş bir ekstraselüler parça tarafından takip edilen tek transmembran heliks içeren 300 aminoasit kalıntısı vardır.

Günümüzde CD38 olarak bilinen bu protein; B ve T lenfositlerinin aktifleşme ve farklılaşma belirteci olarak da kullanılmaktadır. Lenfoit ve miyeloit hücrelerin CD38 anlatımı bu hücrelerin farklı tiplerinde farklı ölçüde gerçekleşir (64,65). Doğal öldürücü (“natural killer”) hücrelerin ve monositlerin yaklaşık %80’i CD38 pozitif bulunmuştur. Kemik iliğinde, CD38 öncül hücrelerde anlatım bulunurken, kordon kanındaki mononükleer hücrelerin % 50-80’inin CD38 pozitif olduğu bilinmektedir (Tablo 2-2) (69).

CD38 ayrıca eritrosit (66), karaciğer, pankreas (67), beyin (68) ve kas hücrelerinde (68) de saptanmıştır. CD38’in anlatım bulduğu hücre ve dokular Tablo 2’de sunulmuştur.



Şekil 2-10: CD38 Tip II membran proteini

Tip I → Tek bir membran geçiş bölgesine sahip olup; amino ucu membranın dışında, COOH ucu sitoplazmik taraftadır.

Tip II → Tek bir membran geçiş bölgesine sahip olup; amino ucu hücrenin sitoplazmik tarafında, COOH ucu hücrenin dışında yer alır.

Tip III → Tek bir polipeptid zinciri üzerinde çoklu membran geçiş bölgesine sahiptir.

Tablo 2-2: CD38'in anlatım bulduğu hücre ve dokular (68)

Medüller timositler
Aktiflenmiş T hücreleri
Gelişim odağında (germinel merkezde) bulunan B hücreleri
Plazma hücreleri
Monosit / makrofajlar
Doğal öldürücü hücreler
Eritrositler
Trombositler
Ortak hematopoietik kök hücreler
Barsak lamina propria lenfositleri
İskelet ve kalp kası hücreleri
Böbrek kıvrıntılı tübül hücreleri
Sinir hücreleri
Prostat epiteli
Birçok tümör hücrelerinde

2.5.2. CD38'in İşlevsel Özellikleri

Anti-CD38 monoklonal antikollarının agonistik özellikleri kullanılarak elde edilen sonuçlara dayanarak CD38'in T lenfositlerinin aktifleşmesi ve farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. İnterlökin-2 ve/veya yardımcı hücreler varlığında CD38; T lenfositlerinde, timositlerde ve doğal öldürücü hücrelerde aktifleşme ve farklılaşmayı tetiklemektedir (69). CD38 aracılığıyla olan aktifleşme, CD3 ve CD2 yollarıyla da uyumludur. Lenfositlerde CD38 ligandının bağlanması, interlökin-1, tümör nekrozlayıcı faktör- α (tumour necrosis factor- α), granülosit monosit koloni uyarıcı faktör, interferon- γ , interferon -6 ve interferon-12 gibi bir çok sitokinin anlatımını artırır (70).

CD38, B lenfositlerinin oluşum sürecinde, kemik iliğindeki mikro çevreyi düzenleyen bir moleküldür (71). Fare B lenfositlerinde CD38 ligandının bağlanması, protein tirozin kinaz etkinliğini artırmakta ve aktifleşme ve sinyal iletiminde rol alan proteinlerin tirozin üzerinden fosforillenmesini sağlamaktadır (72, 73). Agonist antikolların gelişim odağında (germinal merkezde) bulunan B hücrelerini *in vivo* spontan apoptozdan koruduğu gösterilmiştir (74, 75). Bu tür

CD38 karşıtı tek klon antikorlarının bağlanması sonrası gelişim odağında bulunan B hücrelerinin çoğunda çekirdek parçalanmasının olmadığı, bcl-2 anlatımının arttığı ve *in vitro* yaşam süresinin uzadığı gözlenmiştir (76,77,78).

2.5.3. Bir Ektoenzim olarak CD38

CD38, NAD Glikohidrolaz ADP ribozil siklaz ve ADP ribozil hidrolaz etkinliklerine sahip bir ekto enzimdir. Siklik ADP riboz (cADPR) sentezini sağlayan *Aplysia californica* ADP-ribozil siklazın insan CD38'i ile aminoasit dizi benzerliği saptandıktan sonra CD38'in enzimsel etkinliği üzerine bilgiler hızla artmıştır.

cADPR, NAD'nin güçlü Ca^{+2} salgılatıcı etkiye sahip metabolitidir. Ryanodin duyarlı kanalı etkileyen ikinci haberci niteliğindedir (Şekil 2-11) (79). NAD'den cADPR sentenleyen ADP-ribozil siklaz hem memelilerin hem de omurgasızların dokularında yaygın olarak bulunmaktadır.

İnsan, fare ve sıçan CD38 proteinleri *Aplysia californica* (deniz salyangozu) siklazı ile aynı enzimsel etkinliğe sahip olmakla birlikte (80, 81) bu etkinlik bu membran proteinlerinin hücre dışı bölümünde bulunmaktadır (66). CD38 proteininin ekto-enzim niteliği hücre dışında oluşan bir ürünün hücre içinde hangi mekanizmayla etkisini gösterdiği sorusunu gündeme getirmiştir. Bu konuya açıklık getirmek için hücre dışında açığa çıkan cADP' nin membranda iki CD38 molekülünün aralarında oluşturduğu bir kanal üzerinden hücre içine taşındığını; henüz tanımlanmamış bazı ligantların bağlanmasıyla CD38'in kendisinin hücre içine alındığını; ya da bu ligantların CD38 bağlanmasıyla bir sinyal iletim yolağını aktifleştirdiğini öngören modeller geliştirilmiştir (82).

2.5.4. CD38'in Hastalıklarla İlişkisi

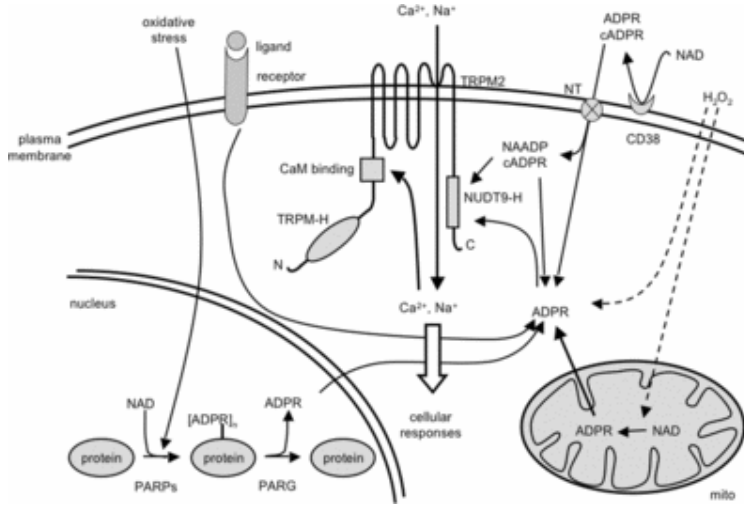
Yapılan birçok çalışma yüksek CD38 düzeyinin kötü prognoz belirtisi olduğuna işaret etmektedir. HIV-1 enfeksiyonunda CD38 anlatımı artmaktadır (68). İmmunokimyasal çalışmalar, Alzhemier hastalığının patolojik bulgusu olan ve sinir hücresinin perikaryonu ve proksimal dendritlerinde saptanan nörofibril yumaklarında CD38' in varlığını göstermiştir (83).

Miyeloma hücrelerinde özgün olarak CD38 anlatımı gözlenir (21). Böylece risin A' ya bağlanmış monoklonal antikorlarla myeloma hücrelerini hedef almak ve öldürmek mümkündür (84, 85). *In vivo* yapılan çalışmalarda bu yönde sonuçlar alınmıştır (86).

Pankreas β hücrelerinde glukoz düzeyine yanıt olarak insülin salgılanmasına yönelik Ca^{2+} serbestleşmesinin cADP-riboz yoluyla olduğuna dair bir model önerilmiştir (87, 88, 89). Bu modeli destekleyici klinik bir bulgu olarak tip II şeker hastalarının serumlarında anti-CD38 otoantikorlar bulunmuştur (95). Kültür ortamına alınmış sıçan pankreası β hücrelerinde ortamda şeker hastalarından alınan otoantikorlu serum varlığında gözlemlenen insülin salgılanmasındaki azalma, ortama CD38 konulduğu zaman ortadan kalkmaktadır (90). Aksi görüşlerin de bulunması bu konudaki çalışmaların devam etmesi gerektiğini düşündürmektedir (91).

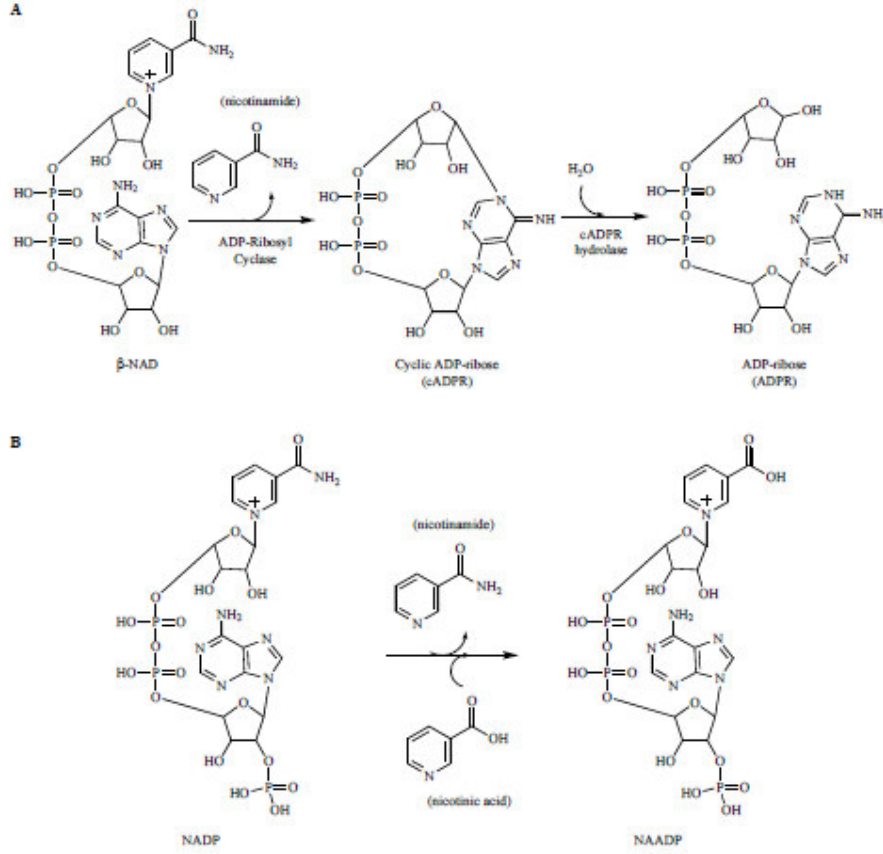
2.5.5. cADPR'nin Biyokimyası ve Metabolizması

İkincil mesajcı olan siklik-ADP-riboz intraselüler deposundan kalsiyum salınımını artırır (92,93). Siklik-ADPriboz, β -NAD⁺ tarafından sentezlenir. ADP-ribozil siklaz adı verilen enzimatik reaksiyonda cADPR, ADPR'ye dönüştürülür (Şekil 2-12). Birçok hücre tiplerinde, şimdiye kadar, enzim(ler) fizyolojik ADP-ribozil siklaz ve cADPR hidrolaz faaliyetlerinden sorumlu doğada başka bilinmeyen fakat kullanılan alanları vardır. Bununla birlikte, ADP-ribozil siklaz aktivitesi tek hücreli organizmalardan farklı türlerin geneline kadar tümünde bulunmuştur.



Şekil 2-11: Kalsiyum sinyal düzenlenmesi

Omurgasızlarda (deniz kestanesi yumurta, *Aplysia*) memeli hücrelerinde, bitki ve parazitlerde, tek hücreli canlıların çoğunda ADP-ribozil siklaz etkinliğinin görülmesi, cADPR metabolizmasının evrim boyunca her yerde ikinci haberci olarak korunduğunu işaret etmektedir (94, 95). ADP-ribozil siklazların hem membrana bağlı hem de çözünür formları bulunmuştur. ADP-ribozil siklazın ilk karakterizasyonu *Aplysia californica* ovotestisinden (96,97) yapılmıştır. Bu çözünür 30 kDa büyüklüğündeki enzim saflaştırılmış ve saf siklaz etkinliğinin olduğu belirlenmiş fakat hidrolaz aktivitesinin olmadığı görülmüştür. β -NAD⁺ (nikotinamid guanin dinükleotid) siklaz etkinliğinin ölçümü için substrat olarak kullanılabilir. Bu substratın floresan özelliği bulunmaktadır ve reaksiyon sonunda oluşan cGDPR miktarı bu özelliğinden faydalanılarak ölçülebilmektedir.



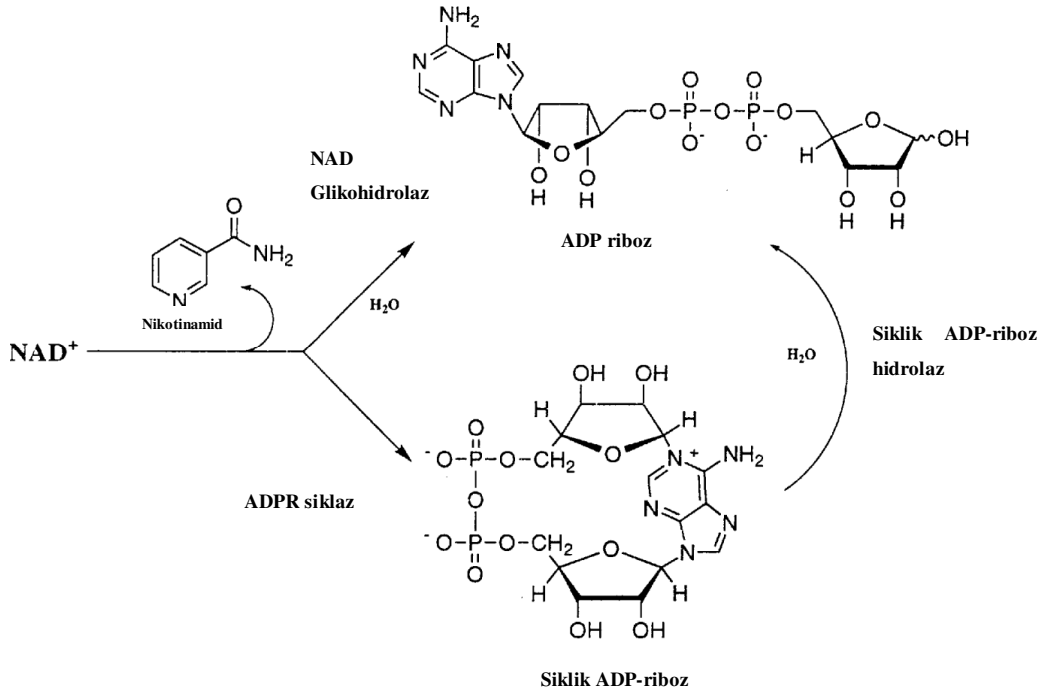
Şekil 2-12: β -NAD⁺'nin cADPR'ye ve ADPR'ye dönüşümü.

Bu floresan bileşik, ADP-ribozil siklaz aktivite çalışmaları için biyokimyasal araçlar olarak yararlıdırlar (33). *Aplysia* gelen ADP-ribozil siklazın keşfiyle insan lenfosit yüzey antijeni CD38'inde bu aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ve büyük ölçüde aynı homolojiye sahip olduğu gösterilmiştir (98). Ancak, *Aplysia* siklazın aksine, CD38'in bir transmembran protein olduğu araştırmalarda ortaya çıkmış ve hem ADP-ribozil siklaz hem de cADPR hidrolaz aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir (99).

2.5.6. NAD⁺ Glikohidrolaz Etkinliği

NAD⁺ glikohidrolaz enzimi, ADP-riboz alıcısı olarak suyu kullanma özelliğinden dolayı diğer ADP-ribozil transferaz enzim sınıfı temsilcilerinden ayrılmaktadır (Şekil 2-13). Enzim, serbest ADPR'ye hidroliz sürecinde substrat olarak NAD⁺ yada cADP-ribozu kullanabilir. NAD⁺ glikohidrolaz NAD⁺'yi

hidrolizleyerek ADP-ribozu ve nikotinamidi açığa çıkarır. Enzimin NAD^+ 'yi ADP-riboz ve nikotinamide dönüştürme yeteneği NAD^+ glikohidrolaz etkinliği olarak tanımlanır. NAD^+ glikohidrolaz; bakterilerden memeliye kadar birçok organizmada, bitkilerde yaygın olarak bulunan bir enzimdir (100).



Şekil 2-13: ADP-riboz ve cADP-ribozun enzimatik sentezi

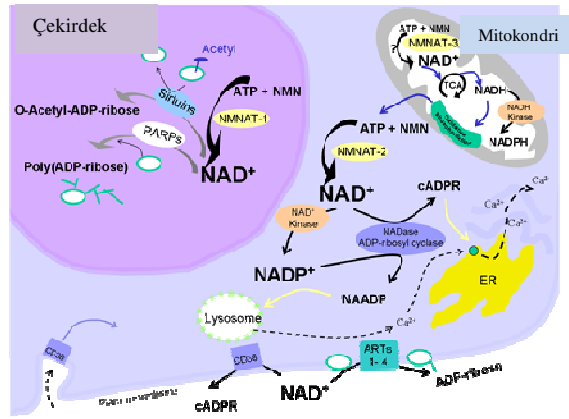
NAD^+ glikohidrolaz normalde partiküler şekilde hücrede, kısmen de çekirdekte bulunur. NAD^+ glikohidrolazın çekirdekte bulunan etkinliği poli(ADP-riboz) metabolizmasında rol oynamaktadır (Şekil 2-14) (100,101).

Ökaryotik NAD^+ glikohidrolaz enzimlerinin çoğu hücre membranının dış yüzeyinde yer alır. Membrana bağlı NAD^+ glikohidrolaz, fosfatidilinositole özgü fosfolipaz C(PI-PLC) ile işlem görek membrandan çözündürülmüştür (102).

NAD^+ glikohidrolaz enzimi sıçan karaciğeri mitokondri iç membranından saflaştırılmıştır. Enzim etkinliğinin, membran eldesi sırasında matriks kesimiyle birlikte iç membrandan ayrıldığı tespit edilmiştir. Hidroksiperoksit işlemiyle mitokondriden nikotinamidin açığa çıkmasının mitokondri içindeki NAD^+ glikohidrolazın varlığından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. ATP ve nikotinamidin

bu enzimin etkinliğini durdurduğu bulunmuştur. Enzimin SDS-PAGE analizi sonrasında molekül ağırlığı yaklaşık olarak 64 kDa olarak belirlenmiştir (103).

NAD^+ glikohidrolaz kas, timus, karaciğer dokularının çekirdek ve mikrozom kesimlerinde bulunmuştur (97). Yapılan çalışmalarda NAD^+ glikohidrolaz çeşitli dokulardan örneğin eritrosit stromasından, domuz beyninden, sığır dalak hücrelerinden ve fare Ehrlich asit hücrelerinden (izoamil ekstraksiyonu ile) çözüldürülmüştür (84). NGD, CD38'in siklaz etkinliğini gösterir. Ürün cGDPR hidrolizine dirençlidir. cADPR gibi hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımını aktive etmez.



Şekil 2-14: Ökaryotik hücrelerde NAD(P) biyosentezi ve NAD(P)sinyal yoluğu

2.6. İnterlökin-10

İnterlökin-10 insan immün yanıtında bulunan en önemli antiinflamatuvar sitokindir. Kromozom 1 üzerinde bir genden kodlanır. Primer olarak T lenfositleri, monositler, makrofajlar, B lenfositleri ve nötrofiller tarafından sentezlenen ve supressif bir sitokindir. IL -10 immun cevabın önemli bir regülatörüdür.

İnterlökin-10'un hematopoetik hücre dizileri üzerine çoklu biyolojik etkileri vardır. İnsanlarda B lenfositleri için büyüme ve farklılaştırma faktörü olarak fare modellerinde T lenfositleri için büyüme faktörü olarak etki gösterir. Çeşitli tümörlerde IL-10 seviyesi artmış olduğu belirlenmiştir. Yüksek IL-10 seviyesi kötü

prognozla ilişkilendirilmiştir ve hızlı tümör büyümesine neden olduğu düşünülmektedir (104).

2.7. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktör- α , 20-50 kDa ağırlığında polipeptid yapıda bir hormon olup tümör hücrelerinde hemorajik nekroz yaptığı için kendisine bu ad verilmiştir. İnsanda α ve β olmak üzere iki tipi vardır. İlk olarak serumda bazı tümörlerin üzerinde nekrotik etki gösteren ve kaşektin diye adlandırılan TNF- α bulunmuştur. TNF- α 'nın kaşektik etkisi, lipoprotein lipaz aktivitesini arttırmasına bağlı olarak yağ hücrelerinin azalması ile ilişkilidir. TNF- α , çoğunlukla aktive makrofajlar, antijenle stimüle edilmiş T hücreleri, aktive Natural Killer (NK) ve mast hücrelerinden, daha az olarak da diğer hücrelerden salınır. TNF- β , primer olarak aktif T lenfositleri tarafından salınır ve lenfotoksin olarak bilinir. TNF- α ve 16 TNF- β hücrede aynı reseptöre bağlanırlar (105, 106).

TNF' nin biyolojik etkilerinden bazıları şöyle sıralanabilir:

- TNF- α , damar endotelinde bazı adezyon moleküllerinin [“Intracellular adhesion molecule” (ICAM)-1, “vascular cell adhesion molecule” (VCAM)-1, “endothelial leukocyte adhesion molecule” (ELAM)-1] ortaya çıkmasına yol açar. Bu moleküller endotelin önce nötrofiller, sonra da mononükleer lökositler için yapışkan olmasını sağlayarak lökositlerin inflamasyon yüzeyine toplanmasına yol açar,
- TNF- α , başlıca nötrofiller, daha az eozinofiller ve mononükleer fagositler olmak üzere lökositlerin mikroorganizmaları öldürmesini aktive eder,
- TNF- α , IL-1, IL-6, kemokinler ve TNF- α 'nın kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyandır.
- Sınıf 1 “major histocompatibility complex” (MHC) molekül anlatımını arttırarak sitotoksik lenfositlerin virüsle enfekte olmuş hücreleri ortadan kaldırmasını güçlendirir.

2.8. İnterlökin 6

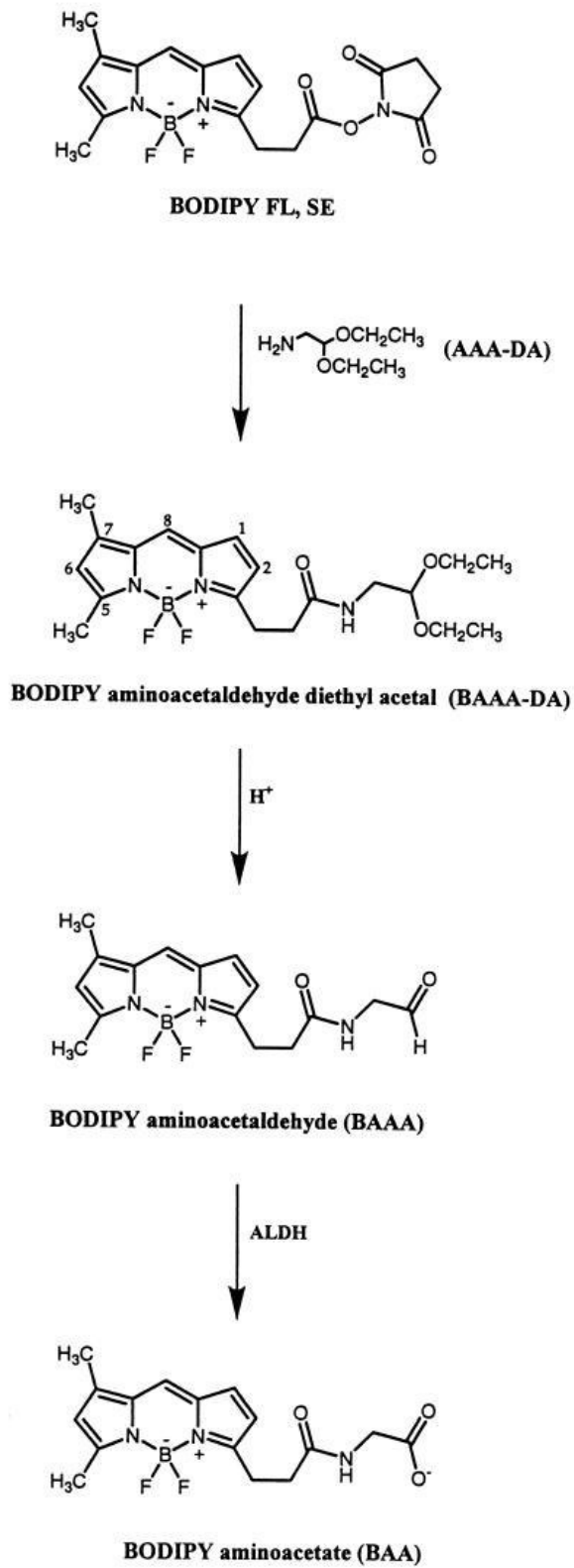
Sitokinler birçok hücre fonksiyonlarının inhibisyonunu ve aktivasyonunu düzenlerler. İnterlökinlerin bir grubu olan IL-6, 184 aminoasit içeren 26 kDa ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Hematopoesis ve inflamasyon oluşumunda immün yanıtın oluşmasında önemli rolü bulunmaktadır. Serumdaki IL-6 seviyesi inflamasyon sırasında 100 kata kadar artabilir. İnsanda IL-6, 7p15-p21 kromozomunda lokalizedir (107).

IL-6 ağırlıklı olarak monositler ve makrofajlar; küçük bir yüzdeyle de fibroblastlar, endotelyal hücreler, T lenfositleri, B lenfositleri, kondrositler ve amniyon sıvısı tarafından üretilirler. Son yıllarda IL-6'nın kanser için prognostik belirteç olmasına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Serumdaki IL-6 seviyesi en çok endometrial kanser, akciğer kanseri, kolorektal kanser, renal hücreli karsinom, meme kanseri ve yumurtalık kanserinde yükselmektedir.

2.9. Aldehid Dehidrogenaz (ALDH)

Kök hücreler periferik kana 3-4 günlük bir süre içerisinde mobilize olmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerin periferik kana mobilizasyonunu saptamada tercih edilen akım sitometri ile CD34 analiz yöntemidir. İnsan kök hücreleri genel olarak CD34 gibi yüzey belirteçlerinin anlatımı ile karakterizedir. Fakat hematopoetik kök hücrelerin tümünde CD34 anlatımı görülmeyebilir. Bu nedenle insan kök hücrelerini tamamen fenotipik hücre yüzey moleküllerine dayanmadan etkin olarak saptayan metodlara ihtiyaç vardır. Bu metotlardan retinoid metabolizması ve HKH'lerin siklofosfamid gibi alkilleyici ajanlara direncinde rol oynayan sitozolik ALDH'dır. İnsan kordon kanından izole edilen, farklılaşmış hücrelere ait belirteçleri olmayan ve ALDH aktivitesi yüksek olan HKH'lerin ilkel hücre belirteçleri CD34 ve CD133'ü bol miktarda sentez ettikleri gösterilmiştir. İnsan kordon kanında CD34+ kök ve progenitör hücre kompartmanlarını ayırmada ALDH aktivitesini ilk kullanan Storm ve arkadaşlarıdır. Farklı fonksiyonları olan insan hematopoetik kök ve progenitör hücrelerinin prospektif izolasyonunda floresan bir substratın (Aldefluor) ALDH aracılı metabolizması ve daha sonra akım sitometri yönteminin uygulanmasıdır (111).

Aldefluor, kendisi ALDH'nin substratı olmayan bodipy-aminoasetaldehit dietil asetal (BAAA-DA) şeklindedir. BAAA-DA, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünür ve ALDH için floresan bir substrat olan bodipy-aminoasetaldehite (BAAA) dönüştürülmek için asite maruz bırakılır. BAAA yüksüzdür ve intakt canlı hücreleri plazma membranlarından serbestçe difüzyona uğrar. İntraselüler ALDH, BAAA'yı serbest difüzyona izin vermeyen negatif yükü nedeniyle hücre içinde biriken bodipyaminoasetata (BAA) dönüştürür (Şekil 3-2) (112).



Şekil 2-15: BAAA-DA (Bodipy aminoasetaldehit dietilasetal), BAAA (Bodipy aminoasetaldehit) ve BAA (Bodipy aminoasetat)’nın yapısı

Aldefluor kiti içinde bulunan buffer BAA'nın hücrelerden dışarı çıkmasını engelleyen bir transport inhibitörü içerir. Sonuç olarak, yüksek miktarda ALDH sentezleyen hücrelerde BAA ve böylece floresans birikir. Bu floresans standart akım sitometri ile ölçülebilmektedir.

BAAA'lı hücrelerin 10 kat daha fazla miktarda ALDH inhibitörü dietil amino benzaldehit (DEAB) ile inkübasyonu ALDH^{br} hücrelerin floresans yoğunluğunda önemli azalmayla sonuçlanır ve negatif kontrol olarak kullanılır. Mobilize periferik kan hücrelerindeki ALDH sıklığı % 3.1±4.8 olarak bildirilmiştir. Kordon kanında ALDH^{br} (Aldehit dehidrogenaz bright) hücre sıklığı ise yaklaşık %1 olarak bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda CD34 ekspres eden ALDH^{br} hücrelerin sıklığı kordon kanı ve mobilize periferik kan hücreleri arasında küçük farkla % 73-95 olarak bildirilmiştir. CD34 anlatımı olan ALDH^{br} insan kemik iliği hücrelerinin sıklığı ise daha azdır (% 49-59). ALDH^{br} kordon kanı ve kemik iliği hücrelerinin büyük çoğunluğu, ALDH'nin ilkel hematopoetik hücrelerde anlatımı ile uyumlu olarak, CD34⁺CD38^{-lo} fenotipindedir. CD34⁺CD38^{-lo} olan ALDH^{br} hücrelerin mobilize periferik kandaki sıklığı sadece % 0.75±1.2 olarak bildirilmiştir. ALDH^{br} hücrelerin büyük kısmı ilkel hematopoetik hücrelerin diğer fenotipik özelliklerine de sahiptir (örneğin CD117 ve CD133).

ALDH^{br} hücrelerin % 63'ünde lineage antijenler azdır veya bulunmaz. Lin-ALDH^{br} hücrelerin çoğu CD34⁺'tir. CD34⁻ALDH^{br} hücreler lineage antijen anlatımı açısından heterojendir.

Fallon ve ark (113) otolog mobilize periferik kan kök hücre greftleriyle verilen ALDH^{br} hücre sayısı ile nötrofil ve trombosit düzelmesine kadar geçen süre arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar ALDH^{br} hücre sayımının CD34⁺ hücre ölçümüne bir alternatif olabileceğini yani HKH'lerin fenotip yerine fonksiyonel özelliklere dayalı olarak tanımlanıp sayılabileceğini gösterir (114).

Daha önce ALDH^{br} hücrelerle yapılan tüm çalışmalarda ALDH^{br} kordon kanı ve mobilize periferik kanın CD34⁺ ve CD38⁻ hücrelerden zengin olduğu gösterilmiştir (115,116,117). ALDH^{br}CD34⁺ hücreler en ilkel hematopoetik progenitörlerden zengindir. ALDH ve CD34 anlatımı insan hematopoezinin gelişimsel aşamalarını ayırmada da kullanılabilir. En ilkel hematopoetik hücreler ALDH ve CD34 sentezler.

İnsan hücrelerine toksik olmayan Aldefluor substratı; insan hücrelerinin çoğalma fonksiyonunu değiştirmez. Deoksiribonükleik asit (DNA) arasına girmez. Sonuç olarak ALDH aktivitesine bağlı izolasyon DNA'ya bağlanan boylarla seğime kıyasla relatif olarak daha güvenli olarak gözükmetedir. Değişken hücre yüzey molekülleri kullanmadan kök hücreleri diğer dokulardan ayırmada standart bir yöntem sağlayabilir (118).

BAAA ile boyama yüksek oranda tekrarlanabilen basit bir işlemdir. BAAA'nın emisyon spektrumu diğer florokromlarla önemli ölçüde çakışmaz böylece çok parametrelili FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analizi ile ilave belirteçlerin kullanılmasına izin verir.

BAAA'nın hücrenin canlılığını gösteren bir boya olması onu kriyoprezervasyon uygulanan hücrelerin ve canlılığı bozulmuş diğer örneklerin boyanmasında da yararlı kılar. CD34'e dayalı yöntemler canlı ve cansız hücreleri ayıramaz (119). BAAA boyası hem lineage negatif CD34⁺ hücreleri hem de CD34⁻ hücreleri kapsar. ALDH^{br} popülasyonunun bir alt grubu olan lineage negatif CD34 yüzey antijeninin hücrelerdeki biyolojik önemi halen bilinmememektedir.

SSC^{lo}ALDH^{br} hücrelerin izolasyonu tümör hücreleriyle kontaminasyonun temizlenmesinde yararlı olabilir.

Son olarak, birçok dokudaki kök hücreler yüksek miktarda ALDH ekspresyone edebileceğinden ALDH^{br} hücrelerin tanımlanması hematopoetik sistem dışındaki barsak, karaciğer ya da deri gibi diğer dokulardan kök hücrelerin izole edilmesinde yararlı bir yöntem olabilir (120, 121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Eritropoetin (Stem cell)

Kök Hücre faktörü (Stem cell)

BIT9500 Serum substitute (Stem cell)

Deksametazon (Stem cell)

Transforming growth factor beta (Stem cell)

İnterlökin 6 (Stem cell)

Akrilamit (Sigma)

Bis-Akrilamit (Sigma)

Amonyum persülfat (Sigma)

Brom fenol mavisi (Sigma)

2-merkapt etanol (MET) (Sigma)

Nitrobluetetrazolium (NBT) (Sigma)

Bromokloroindolfosfat (BCIP) (Sigma)

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma)

Fetal Bovin Serum (Sigma)

Penisilin-streptomisin (Sigma)

Histopak (Sigma)

DMSO (Sigma)

Nicotinamide Guanine Dinucleotide (NGD) (Sigma)

Nikotinamit Adenin Dinükleotit (NAD⁺) (Sigma)

BSA (Sigma)

Karbonik Anhidraz (Sigma)

Ovalbumin (Sigma)

HEPES, NaHCO₃, L-Glutamin, Triton X-100, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄,

K₂HPO₄, KCl, EDTA, Tris ve bütün diğer biyokimyasal malzemeler Stem cell ve

Sigma firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. Kitler

CD34⁺ selection kit (Stem cell)
ALDECOUNT RUO Assay Kit + Buffer (Stem cell)
Rosettesep B cell isolation kit (Stem cell)
Rosettesep T cell isolation kit (Stem cell)
MegaCult™-C Staining Kit – Erythroid (Stem cell)
Human TNF-Alpha High sensitive ELISA Quantikine
Human IL-10 High sensitive ELISA Quantikine
Human IL-6 High sensitive ELISA Quantikine

3.1.3. Antikorlar

CD34-APC (Santa-Cruz)
CD38-PE (Santa-Cruz)
CD38-FITC (Santa-Cruz)
DEAB (Stem cell)
BAA-FITC (Stem cell)

3.1.4. Radyoaktif Maddeler

[Karbonil -¹⁴C] nikotinamid adenin dinükleotit: 35 mCi/mmol (Amersham)

3.1.5. Kromatografik Maddeler

Sephadex G-100 (Sigma)

3.1.6. Deney Hayvanları

Ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen (ortalama 27 gram), 7-8 haftalık,
108 tane erkek Balb/c cinsi fare

3.1.7. Hasta ve Sağlıklı İnsan Serumları

Deneylerde kullanılan CEA değeri yüksek hasta serumları, İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalından temin edildi. Normal kontrol serumları ise, İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden sağlandı.

3.2. Çalışmada Kullanılan Eriyikler

3.2.1. PAGE (Poliakrilamid Gel elektroforezi) İçin Kullanılan Eriyikler

PAGE Alt Geli: (%12)

1,5 M Tris HCl pH=8.8	2 ml
Akrilamid/bisakrilamid (30:0,8)	3,22 ml
% 10 SDS	0,075 ml
%10 Amonyumpersülfat	30 µl
6,56 M TEMED	15 µl
bd H ₂ O	2,72 ml

PAGE Üst Geli:(%5)

1 M Tris HCl pH=6.8	0,625 ml
Akrilamid/bisakrilamid (30:0,8)	0,42 ml
% 10 Sodyumdodesilsülfat	0,025 ml
%10 Amonyumpersülfat	10 µl
6,56 M TEMED	5 µl
bd H ₂ O	1,46 ml

PAGE Tamponu:

Tris bazı	3 g	
Glisin	15 g	
SDS	1 g	bd H ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

PAGE Yükleme Tamponu (2x):

1 M Tris HCl pH:6,8	1 ml
Gliserin	1,6 ml
% 10 Sodyumdodesilsülfat	2 ml
MET	0,4 ml
% 0,1 Bromfenol mavisi	0,2 ml

bd H₂O ile 8 ml'ye tamamlanır.

SDS-PAGE'de kullanılan Molekül Ağırlık Standartları

Sığır serum Albumini	66	kDa
Yumurta Albumini	45	kDa
Karbonik Anhidraz	29	kDa

“Coomassie” Parlak mavisi ile Boyama**Gel Boyama Eriyiği**

- % 0,2 “ Coomassie “ parlak mavisi
- % 50 Metanol
- % 10 Asetik asit

Gelden Boya Çıkarma Eriyiği

- % 25 İzopropil alkol
- % 10 Asetik asit

3.2.2. Western (Bağışık) Emdirimi İçin Kullanılan Eriyikler**TBST (Tris Tamponlu Tuz) Eriyiği**

- 10 mM Tris HCl pH= 8.0
- 150 mM NaCl
- % 0,05 Tween 20

BSA (Sığır Serum Albumini) Eriyiği

TBST içinde % 0,05 BSA eritilerek hazırlanır.

Aktarım (Transfer) Tamponu

17,4 g Tris

87 g Glisin

3 g SDS

600 ml Metanol

bd H₂O ile 3000 ml' ye tamamlanır.**Alkalen fosfataz Substrat Tamponu**

100 mM NaCl

100 mM Tris HCl pH= 9.5

5 mM MgCl₂**Durdurma Eriyiği:**

20 mM Tris HCl pH= 8.0

5 mM EDTA

3.2.3. NAD⁺ Glikohidrolaz Etkinliğini Belirlemek İçin Kullanılan Eriyikler**AG 1X4 Tamponu**

20 mM HEPES

% 0,1 Triton X-100 pH= 7.2

AG 1X4 Elüsyon Tamponu

0,5 M NaCl

Sayım Eriyiğinin Hazırlanması (Bray sıvısı)

4 g PPO

0,2 g POPOP

50 g Naftalin

100 ml Metanol

20 ml Etilen Glikol

1,4-Dioksan ile 1000 ml' ye tamamlanır.

3.2.4. ELİSA İçin Kullanılan Eriyikler

380 pg/ml'lik standarttan 50 µl alınıp 550 µl standart seyreltme tamponuna konur. 32 pg/ml TNF-α standardı hazırlanır. 300 µl seyreltme tamponu üzerine hazırlanan 300 µl 32 pg/ml TNF-α standartından eklenerek 16 pg/ml standart hazırlanır. Ardından 8 pg/ml- 4 pg/ml- 2 pg/ml- 1 pg/ml- 0,5 pg/ml'lik diğerk standart çözeltiler hazırlanır.

3.2.5. Hücre Lizis Eriyiğı

PBS (Tuz İçeren Yıkama Eriyiğı)

1,44 g/l Na₂HPO₄.2H₂O

0,2 g/l KH₂PO₄.2H₂O

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

800 ml bd su ile çözölerek pH HCl ile 7.4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

Ghost Tamponları

NaCl Tamponu

9 gr NaCl 1000 ml'ye bdH₂O ile tamamlanır.

Na-fosfat tamponu

0,5 M Na₂HPO₄ ve 0,5 M NaH₂PO₄ hazırlanır. Baz üzerine asiditesi yüksek olanın eklenmesi suretiyle pH değeri 7,4 olana kadar eklenmeye devam edilir.

3.2.6. Kök Hücre Safılaştırılması İçin Kullanılan Medyum Ortamları

Faz 1 Medyumu

% 20 BIT 9500,

100 U/ml penisilin-streptomisin,

%15 FBS,

Epo 1 µl /ml,

SCF (100 ng/ml),

IL-3 (10 ng/ml),

IL-6 (10 ng/ml)

2 mM L-glutamin ile zenginleştirilmiş medyum IMDM.

Faz 2 Medyumu

% 20 BIT,

10^{-5} M β -merkapt etanol (β -ME),

10^{-5} M dexametazon

1 U/ml rh(rekombinant) insan Epo

5 ng/ml TGF- β 1 (transforming growth factor)

2 mM L-glutamin ile zenginleştirilmiş medyum IMDM.

3.2.7. Kullanılan Aletler

Floresan spektrofotometre (Perkin Elmer LS45)

UV-1601, UV-Visible Spektrofotometre (Shimadzu)

FACS Aria II (Becton Dickinson (USA))

Terazi (Metler P1210)

Terazi (Scaltec SBC 31)

PH Metre (Biorad)

Gel kurutucu sistem (543 Biometre)

Sıvı Sintilasyon Cihazı (Tri.Carb 1000 Tr, Packard)

Çalkalamalı su banyosu (Elektromag GFL-1083)

Sıvı azot tankı (34x T Taylor-Whartan)

Santrifüj (Soğutmalı) Universal 30 RF (Hettich Zentifuge, Tuttlingen-Almanya)

Derin Dorundurucu (Beko)

Protein elektroforezi Sistemi (Bio-Rad)

İmmun Blot Sistemi (Bio-Rad)

Kamera (Sanyo)

ELISA Okuyucusu (Titertek Uniskan)

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. Hücre Kültürü ve Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan Ehrlich asit tümör hücreleri %10 FBS ve antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM F-12 içinde 37⁰C'de ve % 5 CO₂'lik kültür ortamında yetiştirildi. Kültür şişeleri ters mikroskopa 3-4 günde bir kontrol edildi. Belli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra süspansiyon halindeki hücreler 15 ml'lik steril tüpe aktarıldı ve 2000 devir/dakika 5 dakika santrifüjlendi. 1-2 x10⁵ hücre olacak şekilde hücreler yeniden flaska ekildi.

3.3.2. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Tayini

0,1 mm³ hacimde sayım yapılma esasına göre, Thoma lamının bir çukur kısmına konulan örnek üzerine lamel konulduktan sonra (0,1 mm yüksekliğinde sıvı ile) sayım yapıldı. Lamda 16 büyük kare, her karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardı. Eritrositler, lenfositler ve Ehrlich asit hücreleri bu sayma methodu ile sayıldı.

$$\text{ml'deki hücre sayısı} = 16 \times 10^4 \times \text{hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü}$$

formülünden hesaplandı.

10⁴ = 0,1 mm³ hacimdeki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek için sabit olarak kullanıldı.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \text{ml'deki hücre sayısı} \times \text{toplam hacim}$$

formülünden hesaplandı.

Santrifüj sonrası, süspansiyon halindeki hücreler ile % 4'lük tripan mavisi çözeltisi 1:1 oranda karıştırıldı. 5 dakika bekleme sonrası Thoma lamına alınarak sayıldı. Canlı hücrelerin membran bütünlükleri ve geçirgenlikleri bozulmadığı için boyayı hücre içine almazlar. Bu özelliğe dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile canlılık (%) olarak hesaplandı.

3.3.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler 2000 devir/dakika 5 dakika santrifüj edilerek eski medyum uzaklaştırıldı. Her tüpteki hücre sayısı 2×10^6 olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 1:9 oranında DMSO:FBS varlığında yüksek derecede soğuğa duyarlı kriyotüplere alındı. 24 saat -80°C 'de bekletildi. Sürenin sonunda -196°C 'lik sıvı azot tankına alındı. Bu sayede hücre kültür koleksiyonunun devamlılığı sağlandı.

Ehrlich asit tümör hücreleri -80°C 'de 6 ay canlılığını koruyabilmekteler. Bu sebeple bir miktar EAT hücresi santrifüj sonrası asit sıvısından arındırılarak kriyotüp içerisinde -80°C 'de dondurularak saklanmıştır.

3.4. Hücrelerin manyetik esaslı sistemler ile ayrılması

Hücrelerin manyetik esaslı sistemler ile ayrılmasında/saflaştırılmasında manyetik sorbentlerin çoğu polistren esaslı, mikron ve nano boyutludur. Çok basit ve ucuz laboratuvar boyutlu sistemlerden çok daha karmaşık ancak kullanımı zor ve pahalı sistemler ticari olarak temin etmek mümkündür (108).

Genellikle kesikli ve akışlı sistemler kullanılmaktadır. Kesikli sistemlerin laboratuvar çalışmaları için uygun olduğu, teknolojik boyutlarda yüksek kapasiteler ile üretim söz konusu olduğunda akışlı sistemlerin tercih edildiği görülmektedir.

Manyetik yüklü sorbentlerin hücre ayırmasında kullanımı özellikle son 10-15 yılda yoğun bir şekilde uygulanmaya başlamıştır. Bunun en önemli nedeni bu manyetik partiküllerin uygulanmasının kolay/hızlı olması, ve kan, doku homojenatları, kültür ortamları, vb. gibi hücre, mikroorganizma ve diğer biyolojik moleküllerin bulunduğu ortamlardan doğrudan ayrılmayı sağlamasıdır (109,110)

Manyetotaktik bakteriler ve eritrositlerde olduğu gibi manyetik partiküller, (örneğin magnetit, Fe_3O_4) doğrudan bakteri ve hücre ile etkileştirilip ayrılabilir. Ancak, sunulan araştırmada da olduğu gibi, birçok örnekte uygulanan yöntemde esas olarak manyetik yüklü yüzeylerinde hücreleri (hücrelerin yüzeylerindeki reseptörleri) özgün olarak tanıma yeteneğine sahip genellikle monoklonal antikor içeren polimerik partiküller kullanılmaktadır. Bu partiküller ayrılacak hücrelerin bulunduğu ortamla inkübe edilmekte ve oluşan kompleksler genellikle manyetik alan yaratılabilen bir akışkan yataktan geçirilerek tutulmakta,

çeşitli kereler yıkama yapıldıktan sonra, değişik teknikler kullanılarak hücreler manyetik partiküllerden ayrılmaktadır.

Manyetik Ayırım Sistemlerinin Temeli

Genel olarak hücre ayırımında kullanılan manyetik ayırma sistemleri iki tiptedir. Birinci tipte hücreler içsel manyetik hareketler gösterdikleri için ayırımında herhangi bir müdahaleye gereksinim duyulmamaktadır. Doğada bu özellikte sadece iki hücre tipi bulunmaktadır. Bunlar yüksek konsantrasyonda paramanyetik hemoglobin içeren eritrositler (kırmızı kan hücreleri) ve içlerinde küçük manyetik partiküller bulunduran manyetotaktik bakterilerdir. İkinci tip ayırma sistemlerinde bir ya da daha fazla manyetik olmayan bileşen içeren karışım manyetik etiketler ile işaretlenir. Böylece işaretlenen bileşenin ortam arasında manyetik fark yaratılarak ayrılması sağlanır. Manyetik etiketlemede doğada çok çeşitli bulunan afinite ligandları hücre yüzeyinde bulunan hedef moleküller ile etkileşir. Genel olarak hücre yüzeyindeki antijen bölgelerine özgün antikolar kullanılmaktadır. Manyetik ayırım prosesi ise çeşitli formlarda tasarlanmış manyetik ayırıcılar ile gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin bu ayırıcı sistemlerde buldukları ortamlardan saflaştırılması 3 temel adımda uygulanmaktadır.

- 1) İstenen hücreyi içeren örnek süspansiyonu manyetik etiketler ile karıştırılır. Bu aşamada manyetik etiketler ile hedef hücreler arasında etkileşim ve bağlanma için 10-60 dakika arasında bir inkübasyon zamanı beklenir. Daha sonra manyetik kompleksi içeren ortam manyetik ayırıcı kullanılarak ortamdaki ayrılır ve üstsıvı uygun yöntemler kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılır.
- 2) Manyetik kompleks ortamdaki istenmeyen unsurların uzaklaştırılması için bir iki kez uygun tamponlar kullanılarak yıkanır. Bu aşamadan sonra hücreler istenilen amaca uygun olarak kullanılabilir.
- 3) Seçilen uygulamanın amacına uygun olarak manyetik etiketin hedef hücre saflaştırılması gerçekleştirildikten sonra hedef hücreden ayrılması da gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 3-1: Manyetik işaretli içeren hücrelerin manyetik ayırıcıdaki ayırımı.

3.5. Kök Hücre Tanımlama ve İzolasyonu

3.5.1. Akım Sitometrisi

Akım sitometri, süspansiyon haline getirilmiş bir çok hücrenin yüzey veya intraselüler yerleşimli, çok sayıdaki antijenik yapılarının, florokrom işaretli monoklonal antikorlar kullanarak çok yüksek hızda tek tek sayılarak, biyofiziksel ve biyokimyasal yönleri ile değerlendirilmesi, ayrıştırılması ve çok parametrelilikte incelenmesine dayanan bir tekniktir (122). Akım sitometri birçok sistemin bir araya gelmesi sonucu oluşmuştur. Bunlar,

Optik sistem (ışık enerjisinin oluşması ve sonrasında da toplanması);

Elektronik sistem (optik sinyallerin veri aktarımını sağlamak üzere dijital sinyallere çevrimi);

Örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistemler aracılığı ile süspansiyon halindeki hücreler ışık kaynağından (lazer) tek tek geçerken optik ve elektrik sinyal dedektörlerinden elde edilen bilgiler bilgisayarda toplanır. Tüm verilerin saklanması, sunumu ve analizi burada yapılır. Yazılım programları akım sitometrik verilerin görüntülenmesi ve analiz edilmesinde birçok seçenekler sunmaktadır. Histogram, nokta alan (dot plot), kontrolleme gibi. Her bir popülasyonu birbirinden ayırmak için kapılama sistemi kullanılır. Kısaca akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (123).

3.5.2. Akım Sitometrinin Çalışma Prensibi

Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur (Şekil 3-3) (123).

Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar (124).

Sitometri her bir hücre için aynı anda birçok parametre ölçer:

- Hücre çapı ile yaklaşık orantılı olarak düşük açıda ileri saçılma yoğunluğu
- Hücre içindeki granül yapı sayısı ile yaklaşık orantılı olarak ortogonal (90°) saçılma yoğunluğu
- Birçok dalga boyundaki floresan yoğunluğu

1. Forward scatter channel (FSC) Detektör (İleri saçılım kanal detektörü): Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ışığı ile aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar "forward scatter channel (FSC)" denilen bir lens yardımıyla toplanırlar. FSC detektör hücrenin boyutu hakkında bilgi verir.

2. Side Scatter Channel (SSC) Detektör (Yana saçılım kanal detektörü): Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışığın ölçülmesi ise "side scatter" olarak adlandırılır. SSC partiküllerin granüler içerikleri, içyapısı hakkında bilgi verir.

3. Floresan Filtreler ve detektörler: Antikorlar aracılığı ile antijeni göstermek için kullanılan renk maddelerine florokrom maddeler (floresan antikor) denir. "Akım" sitometride florokrom boya yani florokrom maddelerin kullanılmasının amacı; direkt olarak hedefimizin tespiti ile biyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin kolayca saptanmasıdır. Değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküller hakkında bilgi verir.

Tarihte ilk "akım" sitometri cihazı Wallace H. Coulter tarafından "High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer" başlığıyla 1956 yılında yayınlanmıştır. Elektrostatik FACS hücre ayrışması "akım" sitometrik analizde ölçülen özelliklerine göre hücrelerin ayrılması işlemine floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması (fluorescence activated cell sorting, FACS) denir. Bu özellik her "akım" sitometri modelinde bulunmamakta daha çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu cihazlar, kan gibi karışık bir hücre topluluğunun içeren süspansiyonlarda istediğimiz özelliğe sahip hücre alt gruplarının farklı tüplere ayrılabilmesini sağlar. Aynı anda 4 farklı hücre popülasyonu ayrıştırılabilir.

3.5.3. Akım Sitometrisi Kullanım Alanları

Lenfosit alt grupları (T lenfosit, B lenfosit, NK alt-grupları, immün yetmezlikler, AIDS)

Lösemi ve lenfoma immunfenotiplemesi (ALL, AML, KLL, Blast)

Trombosit çalışmaları (Aktivasyon, Otoantikor)

Eritrosit ve Retikülosit çalışmaları (Otoantikor, Sayım)

Stem hücre çalışmaları

Apoptozis çalışmaları

DNA miktar ve ploidi analizleri

RNA çalışmaları

Tümörlerde ilaç direnci çalışmaları

İntrasitoplazmik sitokin tayini

Organ Transplantasyonunda lenfositotoksiste testi (Crossmatch)

Enzim kinetik çalışmaları

Hücre fonksiyon çalışmaları

İntrasellüler iyonize Ca tayini

İntrasellüler pH tayini

Hücre membran potansiyel çalışmaları

İntrasellüler protein çalışmaları

Doğal Öldürücü (Natural Killer) Hücre çalışmaları

Anne kanında Fetal hücre çalışmaları

Kromozom analizi

Sperm ve fertilite çalışmaları

Mikrobiyolojik çalışmalar

Parazitolojik çalışmalar

Hücre Saflaştırma çalışmaları bunlar arasında sayılabilir.

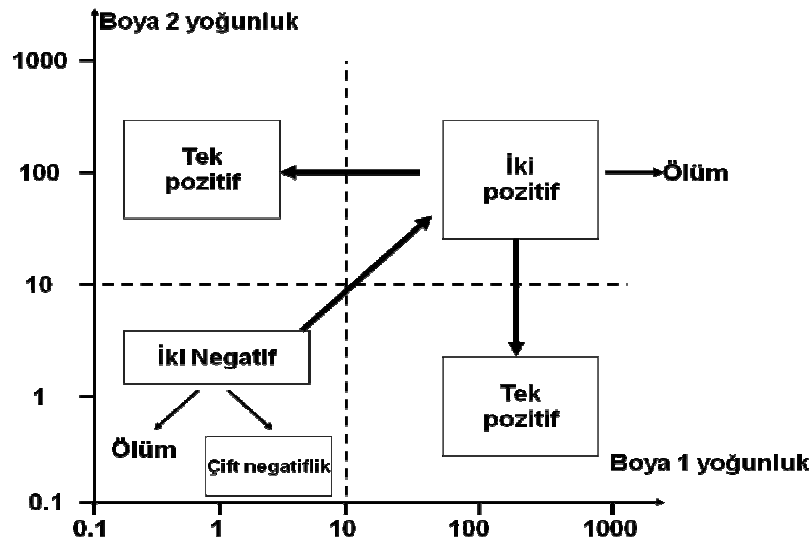
3.5.4. Akım Sitometrinin Avantajları

Hız: Teknik hızlıdır ve saniyede binlerce bireysel hücre test edecek kadar potansiyeli vardır.

Duyarlılık: Hücrelerin floreseni manuel epifluorosen mikroskobu ile ölçülebilecek kadar parlak değildir. Akım sitometri ile bu hücreler belirlenip, ölçülebilir.

Doğruluk: Tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve floresan ölçümleri için varyasyon sabiti (CV=standart sapma/ortalama); %1 gibi çok küçük değerde olur.

Gruplama: Akım sitometrinin en güçlü ve kendisine özgü avantajı, herhangi bir optik karakteristiğe veya bunların kombinasyonlarına bağlı olarak hücrelerin fiziksel olarak birbirlerinden ayrabilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur.



Şekil 3-2: Akım sitometride analiz

3.5.5. Akım Sitometrisi ile İncelenilebilen Örnekler

Tam Kan

Kemik iliği

Çesitli Vücut Sıvıları

Mekanik Olarak Parçalanıp Filtre Edilmiş Doku Örnekleri, akım sitometrik olarak incelenebilecek materyallerdir (125).

3.5.6. Akım Sitometrisinde Sık Kullanılan Floresan Boyalar

Fluorescein Isothiocyanate (FITC)

Phycoerythrin (PE)

Allophycocyanin (APC)

Peridinin-Chlorophyll Protein (PerCP)

Birleşik Boyalar:

PE-Texas Red (ECD)

Phycoerythrincyanin-5 (PE-Cy5 / PC5)

Phycoerythrincyanin-5 (PE-Cy7 / PC7)

gibi boyalar kullanılabilir. Bunlar: 488nm ile 633 nm arasında uyarılabilen boyalardır. Renk skalasında: FITC boya yeşil renkte, PE boya; turuncu renkte, PC5 boya ise kırmızı renkte görülür. Kullanılacak olan floresan boya, hücre yüzeyinde var olan antijenlerin miktarına göre belirlenir. Hücre yüzeyindeki antijen sayısı az ise PE veya PC5 boya, çok ise FITC boyalar kullanılmaktadır (126).

3.5.7. Kordon Kanından CD34⁺ Hücre İzolasyonu

2 ml'lik kordon kanı 1:1 oranda kordon kanı PBS ile seyreltildi. 15 ml'lik tüpe 5 ml ficoll eklendi ve üzerine seyreltilmiş olan kordon kanı yavaşça tabakalandırıldı. 3000 rpm'de 20' santrifüj yapıldı. Bulutsu ara faz (Buffy coat) polistrenli tüpe alındı ve 1 ml medyum (%2 FBS+ 1mM EDTA içeren PBS) eklendi. 100 µl kokteyl eklendi; pipetaj yapıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Ardından magnetik nanopartikül içeren karışımdan 50 µl eklendi; 4-5 kez çekip bıraktıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Toplam hacmin medyumla 2500 ml olması sağlandı ve magnet içerisine alınan tüp 5 dakika burada bekletildi. Magnetten çıkarmadan tüp içeriği 2-3 sn beklenerek boşaltıldı.

Tüp magnetten çıkartıldı ve tekrar PBS'ten 2,5 ml eklenerek 4 kez daha yıkandı. Tüp içeriği (CD34⁺ hücreler) saflaştırılmış oldu.

3.5.8. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ile Hücre İzolasyonu

İ.Ü. İTF Kadın Doğum Anabilim Dalı tarafından KEDTA'lı tüplere alınan 10 ml kordon kanı 1:1 oranda PBS ile seyreltildi. Seyreltilen kan üzerine 1/5 oranında (4 ml) hetastarch eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Eritrositlerin çöktüğü gözlemlendi. Üst sıvı toplandı (15 ml) ve 1:1 oranda PBS ile (15 ml) seyreltildi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pelet üzerine 10x parçalama tamponu eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı; pelet kısmı alındı. Belirteç tüpüne (reagent tube) 50 µl aktivatör eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpe 1,5 ml nötralizasyon tamponu eklendi. Aynı anda kontrol tüpüne 5 µl DEAB eklendi. 500 µl hacimde bulunan hücre örneği (kordon kanından elde edilen) belirteç tüpüne aktarıldı. 2 ml olan tüpten 500 µl kontrol tüpüne aktarıldı. 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi. Belirteç tüpünden 1 ml örnek ayrı bir flow tüpüne alındı. 5 µl CD34 APC ve 5 µl CD38 PE eklendi. DEAB kontrol tüpünden 250 µl örnek ayrı bir flow tüpüne alındı. 5 µl CD34 APC ve 5 µl CD38 PE eklendi. Tüm tüpler 37⁰C'de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak üstsıvısı alındı. 0,5 ml ölçüm tamponu eklenerek Becton Dickinson (USA) firmasının BD FACS Aria II cihazına geçildi. Cihaz açıldıktan sonra lazer sisteminin ısınıp, bilgisayar-cihaz bağlantısının aktif hale gelmesinden sonra işletim sistemi açılarak start verildi.

Açılış işleminden sonra cihazın günlük kalibrasyon ayarı olan CST (Cytometer Setup&Tracking Beads) ayarı yapıldı. CST ayarında bunun için özel hazırlanmış CST boncukları kullanıldı. CST'den sonra hücre ayırımı için Accudrop Delay ayarı yapıldı. Bunun için yine özel olarak hazırlanmış boncukları (Accudrop Beads) kullanıldı. Bu işlemin amacı ayırım için kapladığımız hücrelerin en iyi saflıkta ayrılmasını sağlamak oldu.

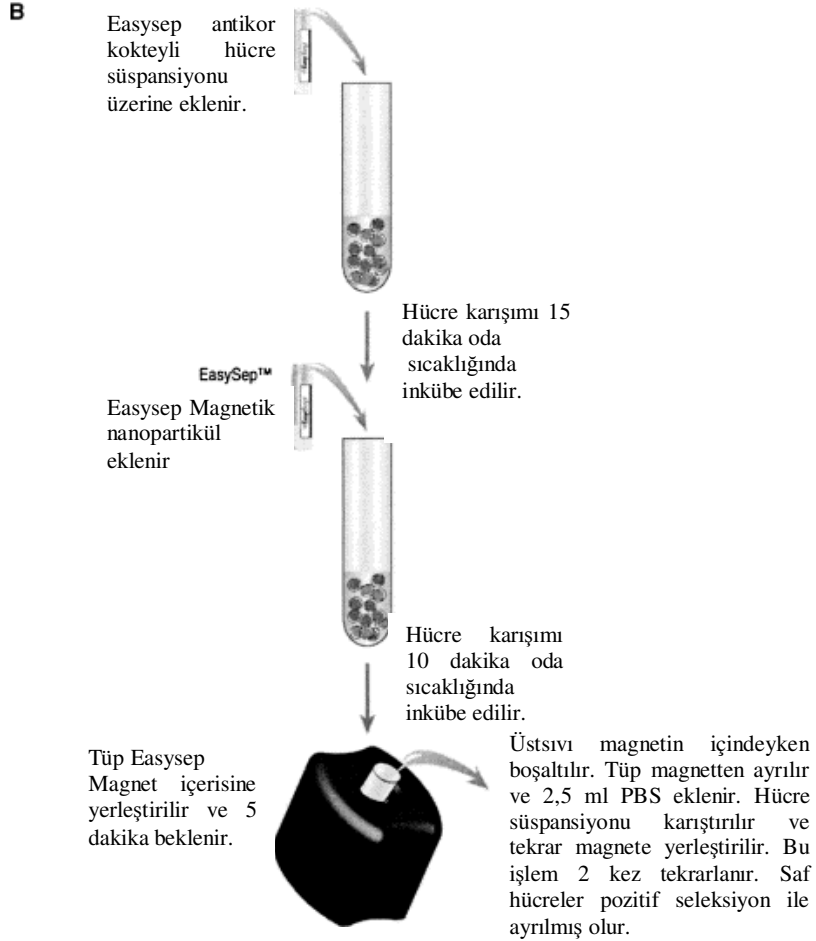
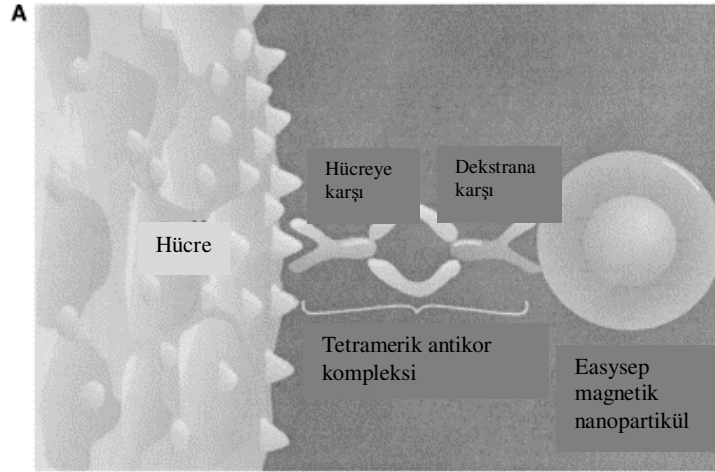
Veriler (Becton Dickinson) FACS Diva Software 6.1.2 program kullanılarak elde edildi.

3.5.9. Kordon Kanından CD34⁺ Hücre Seçiminden Sonra FACS ile Hücre Saflaştırma

2 ml'lik kordon kanı 1:1 oranda PBS ile seyreltildi. 15 ml'lik tüpe 5 ml ficoll eklendi ve üzerine seyreltilmiş olan kordon kanı yavaşça tabakalandırıldı. 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılarak bulutsu ara faz (Buffy coat) polistrenli tüpe alındı ve 1 ml medyum (%2 FBS+ 1mM EDTA içeren PBS) eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 100 µl kokteyl eklenerek pipetaj yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendi. Magnetik nanopartikül içeren karışımdan 50 µl eklendi; 4-5 kez çekip bıraktıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Toplam hacmin medyumla 2500 µl'ye tamamlandı. Magnet içerisine alınan tüp 5 dakika burada bekletildi. Magnetten çıkarmadan tüp içeriği 2-3 sn beklenerek boşaltıldı (Şekil 3-4). Tüp magnetten çıkartılarak tekrar PBS'ten 2,5 ml eklenerek 4 kez daha yıkandı. Kök hücre belirteci olan ALDH işaretlemesi için belirteç tüpüne (reagent tube) 50 µl aktivatör eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpe 1,5 ml nötralizasyon tamponu eklendi. Aynı anda kontrol tüpüne 5 µl DEAB eklendi. 500 µl hacimde bulunan hücre örneği (kordon kanından elde edilen) belirteç tüpüne aktarıldı. 2 ml olan tüpten 500 µl kontrol tüpüne aktarıldı. 37⁰C'de 30 dakika inkübe edildi. Belirteç tüpünden 1 ml örnek ayrı bir flow tüpüne alındı. 5 µl CD34 APC ve 5 µl CD38 PE eklendi. DEAB kontrol tüpünden 250 µl örnek ayrı bir flow tüpüne alındı. 5 µl CD34 APC ve 5 µl CD38 PE eklendi. Tüm tüpler 37⁰C'de 20 dakika inkübe edildi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak üstsıvısı atıldı. 0,5 ml ölçüm tamponu eklenerek Becton Dickinson (USA) firmasının BD FACS Aria II cihazına geçildi. Cihaz açıldıktan sonra lazer sisteminin ısınıp, bilgisayar- cihaz bağlantısının aktif hale gelmesinden sonra işletim sistemi açılarak start verildi. Kalibrasyon işlemi tamamlandıktan sonra çalışmaya geçildi.

Veriler (Becton Dickinson) FACS Diva Software 6.1.2 program kullanılarak elde edildi.

Genel popülasyon içinden P1 kapısı ile lenfositler kapılandı. Lenfosit grubu içinde CD34⁺ ve CD38⁺ hücreleri histogramda görerek ayrı ayrı kapılandı. Kapılanan hücreler CD38⁺CD34⁺ dot plotunda görerek sadece CD34⁺ hücreler seçildi. CD34⁺ hücre grubu içerisinde ALDH⁺ hücreler sort edildi (P6 kapısı ALDH⁺CD34⁺CD38⁻).



Şekil 3-3: CD34⁺ hücrelerin EasySep pozitif ayırma kiti ile immünomagnetik işaretleme ve ayırma (127)

3.5.10. ALDH⁺CD34⁺CD38⁻Lin⁻ Hücrelerin Eritropoetinli ve Kök Hücre Faktörlü (SCF) Kültür Ortamlarındaki Çoğalma İndeksi

ALDH⁺CD34⁺CD38⁻Lin⁻ hücreleri 5 ml hacme sahip kuyulu platelere her bir kuyuya 18000 hücre olacak şekilde ekildi. 1 kuyuya Eritropoetin ve SCF içeren medyum konurken diğer kuyuya Eritropoetin olmadan sadece SCF içeren medyum eklendi. Medyum olarak, 100 U/ml penisilin-streptomisin ve 2 mM L-glutamin ile zenginleştirilmiş serumsuz medyum IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) 4 gün arayla toplam 20 gün hücreler flow sitometride sayıldı.

3.5.11. Farklaştırma Fazı Sonrası Megacult c-Staining kit ile Eritroid Görüntülenmesi

Tüm boyama solüsyonları hazırlandı. Tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. 1,5 ml 0,05 M Tris /NaCl tamponu nazikçe uygulanarak slaytlar rehidrate edildi. 20 dakika bu tamponla inkübe edildi. Tampon uzaklaştırıldı. Spesifik olmayan antikorların bloke olması amacıyla 0,5 ml Tris/NaCl pH: 7.6 ile seyreltilmiş % 5 insan serumu uygulandı ve 20 dakika inkübe edildi. Çalışılacak olan örnek üzerine 0,5 ml birinci antikor olarak anti-human glycophorin A, kontrol kuyusuna ise negatif kontrol antikorunu eklenerek 30 dakika beklendi. Tris/NaCl pH: 7.6 tamponu ile her iki kuyu 3 kez (her biri 3 dakika) yıkandı. 0,5 ml biotin konjugatlı anti fare IgG antikorunu ile 30 dakika inkübe edildi. Tris/NaCl pH: 7.6 tamponu ile iki kuyu 3 kez (her biri 3 dakika) yıkandı. 0,5 ml Avidin alkalın fosfataz ile 30 dakika muamele edildi. Alkalın fosfataz substrat tamponu taze olarak kullanılması gerektiğinden bu aşamada hazırlandı. 1 ml dH₂O içerisine tris buffer tableti konarak vortekste karıştırıldı. Tam çözündüğünde naftol tableti konarak tekrar vortekslendi. Tris/NaCl pH: 7.6 tamponu ile iki kuyu 3 kez (her biri 3 dakika) yıkandı. 0,5 ml Alkalın fosfataz substrat tamponu ile 15 dakika inkübe edildi. Tris/NaCl pH: 7.6 tamponu ile iki kuyu 3 kez (her biri 3 dakika) yıkandı. 2ml metanol içerisine 8 damla evans mavisini damlatılmış olan boyadan her bir kuyuya 0,5 ml eklenerek 10 dakika bekletildi. (10 dakikadan fazla tutulmamalıdır eğer tutulursa boyamanın şiddeti azalır). Su ile çok nazikçe artık boya temizlendi. Kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Işık mikroskopunda hücreler incelendi.

Kullanılacak Malzeme	Yüzey alanı (mm ²)	Başlangıçta ekilecek hücre sayısı	(Mezenkimal kök hücre ise) Konfluente ulaşıldığındaki hücre sayısı	(Mezenkimal kök hücre ise) Tripsin (%0,25)	Medyum (ml)
35 mm dish	962	0,3x10 ⁶	1,2x10 ⁶	1	2
60 mm dish	2827	0,8x10 ⁶	3,2x10 ⁶	2	3
100 mm dish	7854	2,2x10 ⁶	8,8x10 ⁶	3	10
6 kuyucuklu plaka	962	0,3x10 ⁶	1,2x10 ⁶	2	3-5
12 kuyucuklu plaka	401	0,1x10 ⁶	0,4x10 ⁶	1	1-2
24 kuyucuklu plaka	200	0,5x10 ⁶	0,2x10 ⁶	0,5	0,5-1
T-25 flask	2500	0,7x10 ⁶	2,8x10 ⁶	3	3-5
T-75 flask	7500	2,1x10 ⁶	8,4x10 ⁶	5	8-15
T-160 flask	16000	4,6x10 ⁶	18,4x10 ⁶	10	15-30

Tablo 3-1: Kullanılan malzemeye bağlı olarak ekilen hücre sayısı

3.5.12. Kordon Kanından Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

1:1 oranda kordon kanı PBS ile seyreltildi. 15 ml'lik tüpe 5 ml ficoll eklenerek seyreltilmiş olan kordon kanı yavaşça tabakalandırıldı. 2000 devir/dak'da 20 dakika santrifüj yapıldı. Bulutsu ara faz (Buffy coat) 10 ml'ye PBS ile tamamlanarak 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üstüsvi döküldü ve 5 ml PBS ile tekrar yıkama yapıldı (1300 devir/dak 5 dakika). Pelet tablo 3-1'deki verilere göre T25 flaskına ekim yapıldı.

3.5.13. Kan örneklerinden Eritrosit Eldesi:

Sağlıklı ve kanserli hastalardan alınan antikoagülanlı kan örnekleri (4 ml) 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Lökosit, trombosit ve kan plazması atılarak, saf eritrosit kitlesi elde edildi.

3.5.14. Eritrosit Membran Posası ("ghost") Eldesi

Pıhtılaşmaları EDTA'lı tüpe alınarak önlenmiş kan örnekleri Hettich 32R model santrifüj aletinde dakikada 3000 devirde (devir/dakika) 5 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra eritrosit çökeltisi % 0,9' luk NaCl içine alındı ve yeniden dakikada 5000 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı. Eritrosit çökeltisi 5 mM Na-fosfat tamponu pH: 7,4 ile en az 5 kez tekrarlanan santrifüjleme işlemleriyle (beyazlaşmıca dek) yıkandı.

3.5.15. Lenfosit İzolasyonu

Lenfositler yoğunluk gradient santrifüjü kullanılarak izole edildi. EDTA'lı tüpe alınan kan örneği 1:1 oranında PBS ile seyreltilerek Histopak üzerinde tabakalandırıldı. 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası histopak üzerinde toplanan lenfosit tabakası alınarak trombositlerden arındırılmak üzere PBS ile 2 kez 1500 rpm'de santrifüj edildi. Pelet PBS (100 µl) içinde çözülerek -80°C' de saklandı. 3 kez çözülüp tekrar dondurulmak suretiyle (insülin enjektörü ile çekilip bırakılarak) membranı parçalanmış lenfosit içeriği 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak SDS-PAGE'e verilmek üzere denatüre edildi.

3.5.16. T/B Lenfosit İzolasyonu

İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalından temin edilen K₃EDTA'lı tüplerdeki 2 ml'lik CEA değeri yüksek hasta kanı üzerine 50 µl/ml Rosettesep human T cell/B cell enrichment cocktail eklenerek iyice karışması sağlandı. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Eşit hacimde (2 ml) % 2 FBS içeren PBS ile seyreltildi. 14 ml'lik tüpteki 4 ml histopak üzerine bu karışım tabakalandırılarak 20 dakika 1200 xg'de oda sıcaklığında santrifüjlendi. Histopak plazma ara faz toplanarak % 2 FBS içeren PBS ile 2 kez yıkandı. T ve B lenfositleri elde edildi. T

lenfosit saflığının % 95, B lenfosit saflığının % 90 olarak flow sitometre ile belirlendi.

3.5.17. NAD⁺ Glikohidrolaz Etkinliğinin Saptanması

NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği sonucu [¹⁴C]NAD⁺ den açığa çıkan [Karbonil-¹⁴C] Nikotinamid AG1X4 iyon değiştirici kromatografisi yoluyla belirlendi. Enzimatik tepkime; 12 µl örnek, 7 µl mix (10 mM NaCl, 500 mM ZnCl₂, 50 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl pH: 9.0), 5 µM [¹⁴C] NAD (35 mCi/mmol) içeren toplam 20 µl hacimde 37 °C' ta 30 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Tepkime 1 ml % 0,1'lik SDS ile durdurulduktan sonra tepkime karışımı Tampon A (20 mM Hepes, % 0,1 Triton X-100) ile dengelenmiş AG 1X4 anyon değiştirici kolonuna (kolon hacmi:0,4ml) uygulandı. Örneklerin kolona uygulanmasından sonra, kolondan 3 ml damıtık H₂O geçirilerek [¹⁴C] nikotinamid kesimi elde edildi. Kolonda bağlı kalan ve [¹⁴C]NAD kesimine karşılıklı gelen radyoaktivite 0,5 M NaCl ile yıkanarak alındı. Cam tüplerde ayrı ayrı toplanan kesimlerden alınan 0,5 ml örneklerin radyoaktivite içeriği Bray eriyiği içine alınarak sıvı sintilasyon sayacında belirlendi (128)

3.5.18. Radyoaktivitenin Ölçülmesi

AG 1X4 kolonunda yıkanan kesimler cam tüplerde toplandı. Kesimlerden alınan eşit hacim örneklerin radyoaktif içeriği 10 ml sayım sıvısı (BRAY) içinde sıvı sintilasyon sayacında dakikadaki sayım (cpm) olarak belirlendi.

Elde edilen değerler,

$$\text{pmol} = \frac{\text{cpm} \times 100}{2.22 \times \text{sayım verimi} \times \text{özgün etkinlik (\%)} \times \text{sayım verimi (Ci/mmol)}}$$

formülüne göre mol boyutlarına dönüştürüldü.

3.5.19. GDPR Siklaz Etkinliğinin Belirtimi

ADP-ribozil siklaz etkinliği substrat olarak NGD'nin kullanılması ve floresans özellikli cGDPR'nin ürün olarak izlenmesiyle belirlendi. cGDPR'nin ölçümlerinin gerçekleştirileceği uyarım ve yayınım dalga boyu değerleri, 20 mM Tris-HCl pH:7.4 içerisinde hazırlanan cGDPR (Sigma) çözeltisiyle Perkin Elmer LS45 luminesans spektrometre cihazında uyarım ve yayınım spektrum analiziyle belirlendi (3). Somut olarak, uyarım dalga boyu 300 nm'ye ayarlanarak yayınım spektrumu; yayınım dalga boyu 410 nm'ye ayarlanarak da uyarım spektrumu belirlendi. GDPR siklaz tepkimesi, 400 µl hacim içerisinde 100 µM NGD ile 5 milyon eritrosit ya da saflaştırılmış serum örnekleri ile, 20 mM Tris-HCl pH:7.4 37 °C'ta 30 dakika süreyle sürdürülen inkübasyon ortamında gerçekleştirildi. Tepkime sonunda açığa çıkmış olan cGDPR 300 nm uyarım ve 410 nm yayınım dalga boyları kullanılarak belirlendi (129).

3.5.20. Poliakrilamid Gel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Serum, ghost, lenfosit membran proteinleri ve kök hücre kültür üst sıvılarının SDS-PAGE analizleri Laemli yöntemine göre yapıldı (130). Molekül ağırlıkları olan Bovin Serum Albumin (BSA) (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa) ve karbonik anhidraz (29 kDa) standartları kullanıldı. Elektrofrez sonrası proteinler Coomassie parlak mavisi ile oda sıcaklığında 40 dakika süre ile boyandı. Boyanma sonrası gel 45 dakika boya çıkarma eriyiği içinde bekletildi. Fazla boya uzaklaştırılarak proteinlerin görüntülenmesi sağlandı (131). Sonrasında Western emdirim analizleri yapılacak örnekler için çift taraflı gel çalışıldı.

3.5.21. Western Emdirim Yöntemi

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid gel elektrofrez) sonrası Western emdirim analizi yapılacak olan boyanmamış gel büyüklüğünde nitroselüloz membran kesilerek 30 saniye süre ile aktarım tamponunda bekletildi. 3MM Whatman filtre kağıtları da aktarım tamponu ile çok kısa süre bekletildi. Boyanmamış gel, nitroselüloz membran ve 3 MM Whatman filtre kağıtları arasına yerleştirilerek sandviç düzeneği oluşturuldu. Oluşturulan düzenek, aktarım tamponu ile yüzeyi ıslatılmış olan semi dry elektro-blot cihazına yerleştirildi. 5 volt

gerilimde 30 dakika süreyle aktarım işlemi uygulandı. Aktarımdan sonra nitroselüloz membran; özgün olmayan bağlanmaları önlemek için % 0,5 BSA içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi (TBST) ile oda sıcaklığında 2 saat çalkalanarak doyuruldu. Membran; TBST çözeltisi ile üç kez yıkandıktan sonra monoklonal anti-CD38 H1157 ile oda sıcaklığında bir saat çalkalandı. Membran TBST çözeltisi ile üç kez yıkandı. Alkalen fosfataza bağlı fare Ig-karşıtı immunglobulin 1000 kez sulandırılarak ortama eklendikten sonra membran bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Tekrar TBST çözeltisi ile üç kez yıkandı. Alkalen fosfataz substratı BCIP (20 mg/ml) ve NBT (50 mg/ml) (%70 dimetil formamit içinde çözülerek) substrat tamponu içinde çözüldükten sonra membran bu ortama alınarak oda sıcaklığında, karanlıkta çalkalanarak bantların oluşması sağlandı. Membran, 20 mM Tris pH:8.0; 5 mM EDTA pH :8.0 içine alınarak tepkime durduruldu (132).

3.5.22. Serumda IL-6 düzeyinin belirlenmesi

2500 pg/ml'lik standarttan 10 µl alınıp 2490 µl standart seyreltme tamponuna kondu. 10 pg/ml Hu-IL-6 standartı hazırlandı. Bu standartın hazırlanmasından sonra 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16 pg/ml'lik diğer standartlarda hazırlandı. 25x'lik yıkama tamponundan 2 ml alındı 48 ml deiyonize su ile seyreltildi. Tüm malzemeler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Kuyulara 100 µl standart seyreltme tamponu eklendikten sonra ilk 8 kuyuya hazırlanan standartlardan 100 µl konuldu. 3 saat 37⁰C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Sürenin sonunda tüm solüsyon boşaltılarak 6 kez 400 µl yıkama tamponuyla yıkandıktan sonra biotin konjugatlı IL-6'dan 100 µl eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin sonunda tüm solüsyon boşaltılarak 6 kez 400 µl yıkama tamponuyla yıkandıktan sonra 100 µl streptavidin HRP solüsyonuyla 45 dakika ardından da renklendirici ile 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 100 µl durdurma tampon eklendi ve 450 nm'de ELİSA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçüldü. Standartlardan, standart eğri çizilip eğim çizgisi denklemi belirlendi.

3.5.23. İnsan TNF- α düzeyinin belirlenmesi

380 pg/ml'lik standarttan 50 μ l alınıp 550 μ l standart seyreltme tamponuna kondu. 32 pg/ml TNF- α standardı hazırlandı. Bu standartın hazırlanmasından sonra 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 pg/ml'lik diğer standartlar da hazırlandı. 25x'lik yıkama tamponundan 2 ml alındı 48 ml deiyonize su ile seyreltildi. Tüm malzemeler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Kuyulara 50 μ l standart seyreltme tamponu eklendikten sonra ilk 8 kuyuya hazırlanan standartlardan 50 μ l konuldu. 50 μ l'de biotin konjugatlı anti- TNF- α eklendikten sonra 2 saat 37⁰C'de su banyosunda inkübe edildi. Sürenin sonunda tüm solüsyon boşaltılarak 6 kez 400 μ l yıkama tamponuyla yıkandı. 100 μ l streptavidin HRP solüsyonuyla 30 dakika ardından da renklendirici ile 30 dakika oda sıcaklığında fakat karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 100 μ l durdurma tampon eklendi ve 450 nm'de ELISA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçüldü. Standartlardan, standart eğri çizilip eğim çizgisi denklemi belirlendi.

3.5.24. Çalışma Materyalinin Seçimi ve Saklama Koşulları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen (ortalama 27 gram), 7-8 haftalık, 108 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Fareler İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

İlk önce Ehrlich asit tümör hücresi çoğaltılmak üzere 6 adet Balb/c'ye enjeksiyon yapıldı. Ardından denekler seçilerek, 6'şar fareden oluşan 3 grup (EAT enjekte edilen, Co-60 ile ışınlanan, PBS enjekte edilen) oluşturuldu. Bu çalışmanın devamı olan her kafeste 6'şar Balb/c'nin bulunduğu farklı deney setleri kuruldu.

Tüm farklı grupta bulunan fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-%60 nem oranı, 22 \pm 1 $^{\circ}$ C ısıda tutuldular. Tüm gruplara standart fare yemi günlük olarak verildi.

Çalışmalar için kanlar 0,2 ml Ketalar enjeksiyonundan sonra anestezi altına alınan farenin kalbinden 2 ml'lik enjektör yardımıyla çekildi.

Çalışmamızda, deney hayvanlarından total kanları alınmıştır. Total kandan elde edilen serumların 100 μ l'sinin -80 $^{\circ}$ C'de saklanan donması sağlanmıştır. Bu işlem hücre ve DNA'nın bütünlüğünün optimum düzeyde kalması için gereklidir. Daha sonra kan örnekleri SDS PAGE elektroforezi ve Western emdirme yönteminin

uygulanacağı güne kadar -80°C 'de saklanmıştır. Hininger ve araştırma grubunun yaptığı bir çalışmada, kan örneklerinin -80°C 'de 4 ay saklanabileceği bildirilmiştir.

3.5.25. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis ANOVA ve Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırmalı z-değeri testi kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grupları

4.1.1. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Balb/c Türü Farelerde Kanser Modeli Oluşturulması

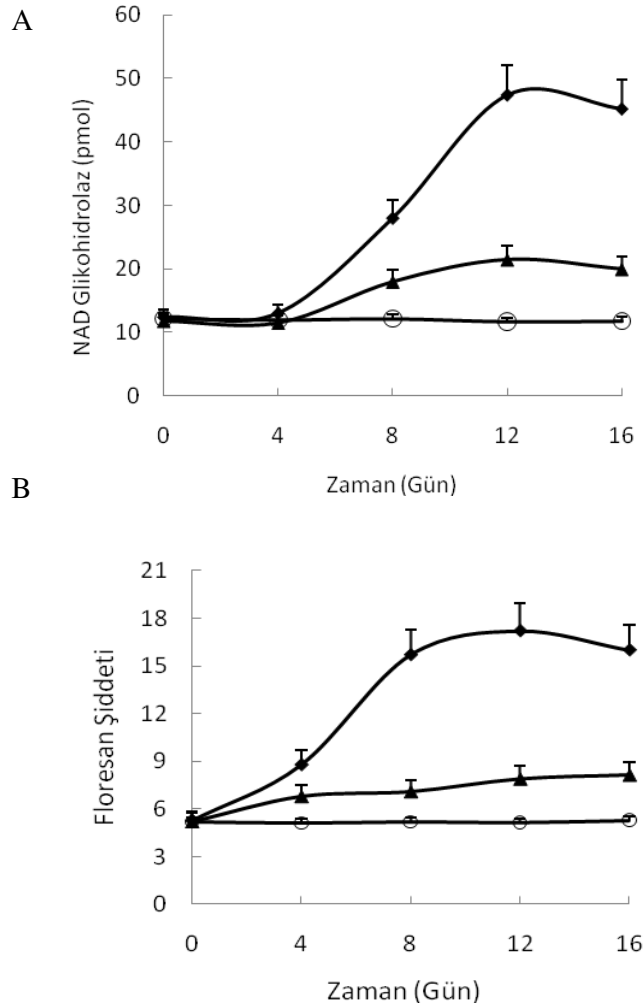
Altı adet erişkin, erkek Balb/c fareye Ehrlich asit hücresi intraperitoneal olarak enjekte edildi. 8 gün sonra batin içerisinde çekilen Ehrlich tümör hücresi, asit sıvısıyla birlikte alındı. 756 devir/dak da 5 dakikalık santrifüj sonrası pelet kısımdan alınan hücrelerin Thomada sayımı yapıldı; bir sonraki aşama için her bir Balb/c'ye enjekte edilecek 8×10^5 hücre hesapları yapıldı.

4.1.2. Ehrlich Asit Tümörü Hücrelerinin Işınlanarak Öldürülmesi

Ehrlich Asit tümörü hücreleri, sayıldıktan ve derişimi ayarlandıktan sonra İÜ Onkoloji Enstitüsü'nde 200 kV gücündeki bir radyoterapi aygıtıyla Co-60 ışınlarıyla 111,63 dak/cGy hızla 50 Gy ışınlanarak (44 dakika) öldürüldü.

4.1.3. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Oluşturulan Kanser Modelinde Serumdaki NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği

Kanser modeli oluşturmak amaçlı olarak kullanılan Ehrlich asit tümör hücreleri batin içerisinde çekildikten sonra Thoma da sayımı yapıldı. Periton içi enjeksiyonla 1. deney grubuna 0.2 ml hacim içinde 8×10^5 Ehrlich asit tümör hücresi, 2. deney grubuna aynı miktarlarda Co-60 ışınlarına maruz bırakılmış 8×10^5 Ehrlich asit tümör hücresi, 3. kontrol grubuna aynı hacimde steril PBS verildi. Balb/c'lerin farklı günlerde (0., 4., 8., 12., 16.) kalplerinden alınan kanlardan elde edilen serum kesimleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz etkinliği ve yine bu kesimin NGD ile işaretlenmeleri sonucu floresan spektrometresinde alınan floresan şiddet değerleri belirlendi (Şekil 4-1). Anestezik madde olarak Ketamine IM (100mg/kg) uygulandı. Her dört günde bir kanları alınarak yapılan çalışmalara 20. gün son verildi. Her grup çift çalışıldı. Yapılan çalışma sonucunda EAT hücre enjeksiyonu yapılan grubun NAD Glikohidrolaz etkinlik sonuçları kontrol grubuna göre 5,1 kat, floresan şiddeti sonuçlarına göre ise 3,2 katlık artış olduğu görüldü. 8. günde serum kesimleriyle yapılan NAD glikohidrolaz etkinliği ve floresan şiddet değerleri istatistiksel analize göre anlamlı derecede yüksek bulundu.



Şekil 4-1: A- Serum kesimleriyle yapılan NAD glikohidrolaz etkinliği.

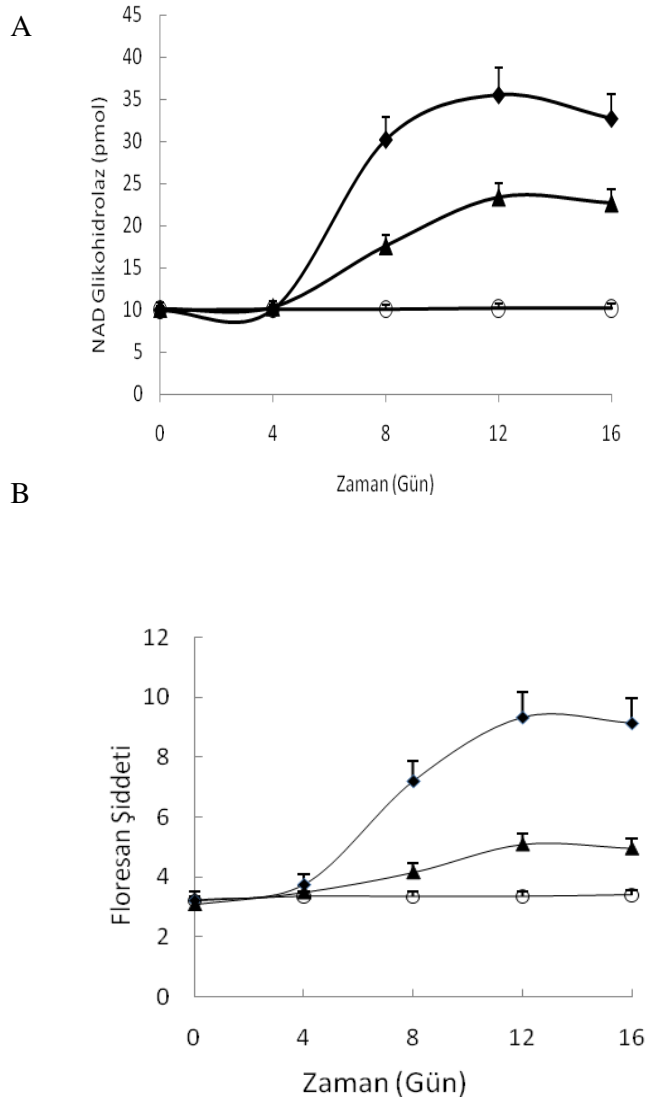
B-Serum kesiminin floresan şiddet-zaman grafiği

(◆-◆) Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilen grup, (▲-▲) Co-60 ışınlarına maruz bırakılmış Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilen grup, (○-○) PBS enjekte edilen grup.

Serum örnekleri için gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis multiple z testi ile analiz edildi. Canlı EAT hücresi verilen grup, ışınlanmış EAT hücreleri verilen gruba göre karşılaştırıldığında z-değeri > 3,92; canlı EAT hücresi verilen grup, PBS verilen gruba göre karşılaştırıldığında z- değeri > 3.92; ışınlanmış EAT hücreleri verilen grup, PBS verilen gruba göre karşılaştırıldığında z- değeri > 1.96 olarak bulundu.

4.1.4. Ehrlich Asit Tumor Hücresi İle Oluşturulan Kanser Modelinde Lenfositlerdeki NAD glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği

Aynı üç gruptaki Balb/c'lerin lenfosit kesimleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz etkinliği ve lenfositlerin NGD ile işaretlenmeleri sonucu floresan spektrometresinde alınan floresan şiddet değerleri grafiği Şekil 4-2'de gösterilmektedir. EAT hücresi enjekte edilen grubun lenfosit NAD Glikohidrolaz etkinlik değerinde kontrol grubuna göre 3,2 katlık; floresan şiddetinde ise 3 katlık bir artış görüldü. Sekizinci günde alınan EAT lenfosit kesimleriyle yapılan NAD glikohidrolaz etkinliği ve floresan şiddet değerleri istatistiksel analize göre anlamlı derecede yüksek bulundu.



Şekil 4-2: A- Lenfosit kesimleri ile yapılan NAD Glikohidrolaz etkinlik testi.

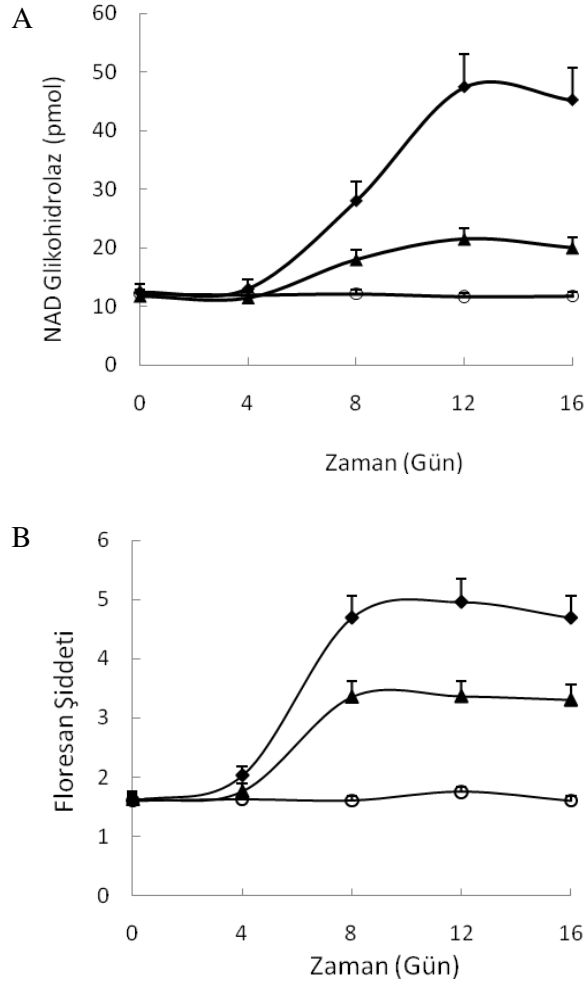
B- Lenfosit kesimlerinin floresan şiddeti-zaman grafiği.

(◆-◆) Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilen grup, (▲-▲) Co-60 ışınlarına maruz bırakılmış Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilen grup, (○-○) PBS enjekte edilen grup.

Lenfosit örnekleri için gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis multiple z testi ile analiz edildi. Canlı EAT hücresi verilen grup, ışınlanmış EAT hücreleri verilen gruba göre karşılaştırıldığında z-değeri > 1,96; canlı EAT hücresi verilen grup, PBS verilen gruba göre karşılaştırıldığında z- değeri > 3.92; ışınlanmış EAT hücreleri verilen grup, PBS verilen gruba göre karşılaştırıldığında z- değeri > 1.96 olarak bulundu.

4.1.5. Ehrlich Asit Tümör Hücresi İle Oluşturulan Kanser Modelinde Eritrositlerdeki NAD glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği

Aynı Balb/c grupların eritrosit kesimleriyle yapılan NAD glikohidrolaz aktivite testi ve eritrositlerin NGD ile işaretlenmeleriyle floresan spektrometresinde alınan floresan şiddet değerlerinin grafiği ise Şekil 4-3'de verilmektedir. Eritrosit NAD glikohidrolaz etkinlik değerinde kontrol grubuna göre 4,72 katlık, floresan şiddeti değerinde ise 2,62 katlık bir artış görüldü. Serum ve lenfosit kesimlerinde olduğu gibi sekizinci günde alınan örneklerin gruplar arası farklılıkları Kruskal Wallis multiple z testi ile NAD glikohidrolaz ve floresan şiddetleri analiz edildi. İstatistiksel analize göre anlamlı derecede yüksek bulundu.



Şekil 4-3: A- Eritrosit NAD Glikohlazolaz etkinlik testi.

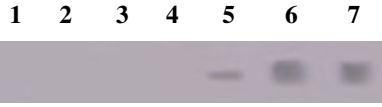
B- Eritrosit kesimlerinin floresan şiddeti-zaman grafiği.

(◆-◆) Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilen grup, (▲-▲) Co-60 ışınlarına maruz bırakılmış Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilen grup, (○-○) PBS enjekte edilen grup.

Eritrosit örnekleri için gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis multiple z testi ile analiz edildi. Canlı EAT hücresi verilen grup, ışınlanmış EAT hücreleri verilen gruba göre karşılaştırıldığında z-değeri > 1,96; canlı EAT hücresi verilen grup, PBS verilen gruba göre karşılaştırıldığında z- değeri > 3.92; ışınlanmış EAT hücreleri verilen grup, PBS verilen gruba göre karşılaştırıldığında z- değeri > 1.96 olarak bulundu.

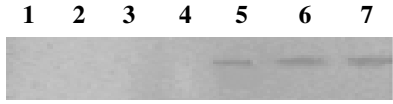
4.1.6. Kanser Modeli Oluşturulan Balb/c'lerin Eritrosit Ghost ve Lenfosit Kesimlerinin Western Emdirim Analizleri

Eritrosit ghost kesimlerine ait western blot emdirim sonucu Şekil 4-4, lenfosit kesimlerinin sonucu ise Şekil 4-5'te yer almaktadır. Ehrlich tümör hücrelerinin geliştirilmesiyle CD38 anlatımının zenginleştiği Western emdirim deneyinde gösterdik. Farenin eritrosit membran kesimi (ghost) ve lenfosit membran fonksiyonları, anti-CD38 ile tepkime veren 45 kDa molekül ağırlıklı bir proteine ilişkin sinyalde artış göstermiştir. Bu artışlar tümör gelişim süreci ile koşut bir seyir izlemiştir. Sekizinci günde yaklaşık 12. güne kadar sinyalde bir artış olmuştur. Benzer artışlar insan tümör hasta serumlarının Balb/c farelerine enjeksiyonu sürecinde de gözlenmiştir. Bu artışlar kontrol deney gruplarının anlamlı ölçüde üstündedir.



Şekil 4-4: Eritrosit kesimleriyle yapılan Western emdirim görüntüsü.

1.kuyu Kontrol (işlem görmemiş) Balb/c serumu, 2.kuyu Co-60 ile ışınlanmış EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun sekizinci gün ghostu, 3.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun sıfırıncı güne ait ghostu, 4.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun dördüncü güne ait ghostu, 5.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun sekizinci güne ait ghostu, 6.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun onikinci güne ait ghostu, 7.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun onaltıncı güne ait ghostu.



Şekil 4-5: Lenfosit kesimleriyle yapılan Western emdirim görüntüsü.

1.kuyu kontrol (işlem görmemiş) Balb/c lenfositleri, 2.kuyu Co-60 ile ışınlanmış EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun sekizinci gün lenfositleri, 3.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun sıfırıncı güne ait lenfositleri, 4.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun dördüncü güne ait lenfositleri, 5.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun sekizinci güne ait lenfositleri, 6.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun onikinci güne ait lenfositleri, 7.kuyu EAT hücrelerinin enjekte edildiği grubun onaltıncı güne ait lenfositleri.

4.2. NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliğinin Yüksek CEA Değerine Sahip Hastalardaki Değişimi

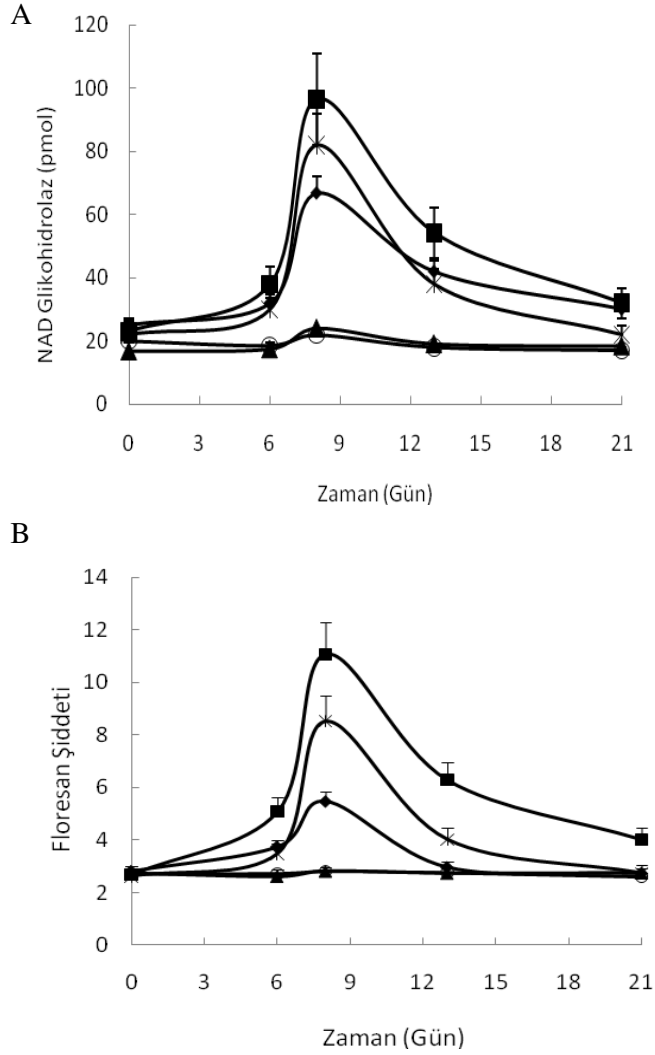
Çalışmanın devamı olarak birinci gruptaki Balb/c'lere önceki deneyde EAT hücresi verilen Balb/c'lerin NAD Glikohidrolaz ve floresan etkinliğinin yüksek olduğu sekizinci gün serumları, ikinci gruptaki Balb/c'lere insan kökenli yüksek CEA değerine sahip kanserli hasta serumları, üçüncü gruba ise asit sıvısı enjekte edildi. Sağlıklı insan serumlarının enjekte edildiği grup dördüncü ve sağlıklı Balb/c serumlarının verildiği diğer grup ise beşinci grubu oluşturdu. Bu son iki grup ilk iki grubun kontrollerini oluşturmak amaçlı olarak kuruldu.

4.2.1. Eritrosit kesimlerin NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği

Oluşturulan bu yeni deney gruplarının farklı günlerde (0., 6., 8., 13., 21.) kalplerinden alınan kanlardan elde edilen eritrosit membran kesimleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz ve floresan etkinliğinin verildiği grafikler Şekil 4-6'da verilmektedir.

4.2.2. Lenfosit kesimlerin NAD Glikohidrolaz ve cGDPR Etkinliği

Aynı Balb/c'lerin lenfosit kesimleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz aktivite testi için lenfositler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası pelet 100 µl PBS içinde çözülerek -80⁰ C 'de donduruldu. 3 kez dondurulup çözüldü (her aşamada insülin enjektörü ile çekilip bırakılarak). 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj sonrası üst sıvı alındı ve NAD Glikohidrolaz etkinlik testi yapıldı. Bu testin ve cGDPR etkinliğinin floresan şiddetlerinin verildiği grafikler Şekil 4-7'de gösterilmektedir. NAD Glikohidrolaz etkinlik değerinde 4,19 katlık, floresan şiddeti değerinde ise 3,92 katlık bir artış görüldü. İstatistiksel analize göre de NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği testi sekizinci günde anlamlı derecede yüksek bulundu.

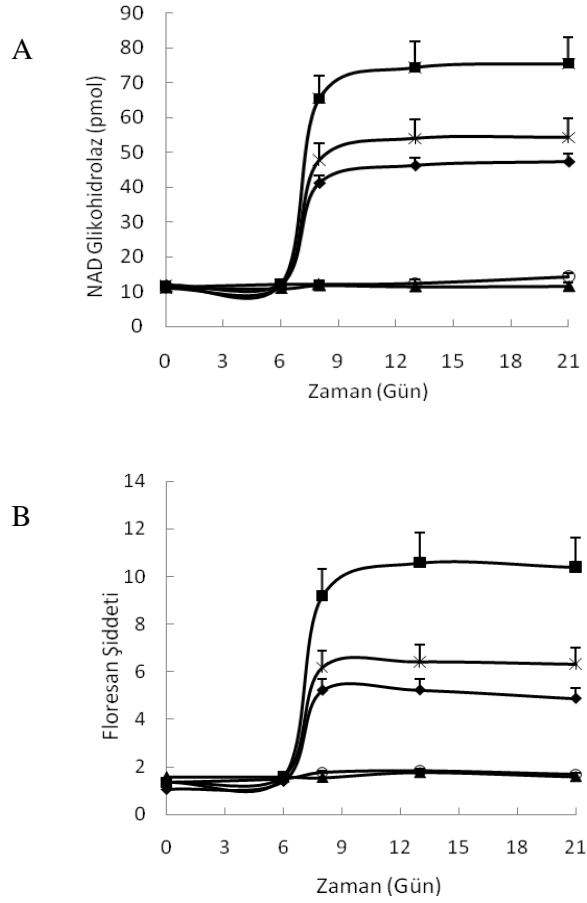


Şekil 4-6: A- Eritrosit NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği

B- Eritrosit floresan şiddeti-zaman grafiği.

Ehrlich hücreleri ile işlem görmüş fareden alınan örnek (◆-◆) Grup 1; Normal fare serumu ile işlem görmüş fareden alınan örnek (○-○) Grup 2; CEA değeri yüksek hasta serumu ile işlem görmüş fareden alınan örnekler (■-■) Grup 3; Sağlıklı bireylerin serumları ile işlem görmüş fareden alınan örnekler (▲-▲) Grup 4; Asit sıvısı ile işlem görmüş fareler (*-*)Grup 5.

Deneyler 4 gün ara ile tekrar edildi. EAT hücresi verilen Balb/c'nin NAD aktivitesi yüksek olan sekizinci gün serumunun verildiği grup, sağlıklı Balb/c serumu verilen grupla karşılaştırıldığında z-değeri > 2.807; asit sıvısı verilen grup, sağlıklı Balb/c serumu verilen grupla karşılaştırıldığında z-değeri > 3.29; yüksek CEA değerine sahip hasta serumu verilen grup, sağlıklı insan serumu verilen grupla karşılaştırıldığında z- value > 3.29 olarak bulundu. İstatistiksel analize göre de NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği testi sekizinci günde anlamlı derecede yüksek bulundu.



Şekil 4-7: A- Lenfosit NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği

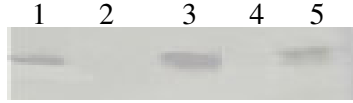
B- Lenfosit floresan şiddeti-zaman grafiği.

Ehrlich hücreleri enjekte edilmiş farelerin aktivitesi yüksek kesimlerin serumu ile işlem görmüş fareden alınan örnek (◆-◆) Grup 1; Normal fare serumu ile işlem görmüş fareden alınan örnek (○-○) Grup 2; CEA değeri yüksek hasta serumu ile işlem görmüş fareden alınan örnekler (■-■) Grup 3; Sağlıklı birey serumları ile işlem görmüş fareden alınan örnekler (▲-▲) Grup 4; Asit sıvısı ile işlem görmüş fareden alınan örnekler (*-*)Grup 5.

Deneyle 4 gün ara ile tekrar edildi. EAT hücresi verilen Balb/c'nin NAD aktivitesi yüksek olan sekizinci gün serumunun verildiği grup, sağlıklı Balb/c serumu verilen grupla karşılaştırıldığında z-değeri > 2.807; asit sıvısı verilen grup, sağlıklı Balb/c serumu verilen grupla karşılaştırıldığında z-değeri > 3.29; yüksek CEA değerine sahip hasta serumu verilen grup, sağlıklı insan serumu verilen grupla karşılaştırıldığında z- value > 3.29 olarak bulundu. İstatistiksel analize göre NAD⁺ glikohidrolaz etkinliği testi sekizinci günde anlamlı derecede yüksek bulundu.

4.2.3. Yüksek CEA Değerine Sahip Hasta Serumlarının Verildiği Balb/c'lerin CD38 Etkinliğinin Zamana Bağlı Western Emdirim Analizi

Eritrosit ve lenfosit kesimlerindeki CD38 etkinliği değişiminin izlenmesi amacıyla örnekler denatürasyon aşamasından sonra %12'lik SDS-PAGE'de (Sodyum Dodesil Sülfat- poliakrilamid gel elektroforezi) sığır serum albumin (66 kDa), yumurta albumini (45 kDa) ve Karbonik Anhidraz (29 kDa) moleküler belirteçler varlığında ayrıştırıldı. Paralel olarak anti CD38 fare kökenli antikor varlığında tanımlandı. 45 kDa'luk bölgede CD38 reaktif protein bantı saptandı (Şekil 4-8, Şekil 4-9).



Şekil 4-8: Eritrosit proteinlerinin Western emdirim analizi.

1.kuyu Ehrlich tümör hücresi enjekte edilmiş aktivitesi yüksek kesimlerin serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 2. kuyu sağlıklı Balb/c serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 3. kuyu CEA değeri yüksek kanserli hasta serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 4. kuyu sağlıklı insan serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 5. kuyu Ehrlich asit sıvısı enjekte edilen grubun 8.gün örneği



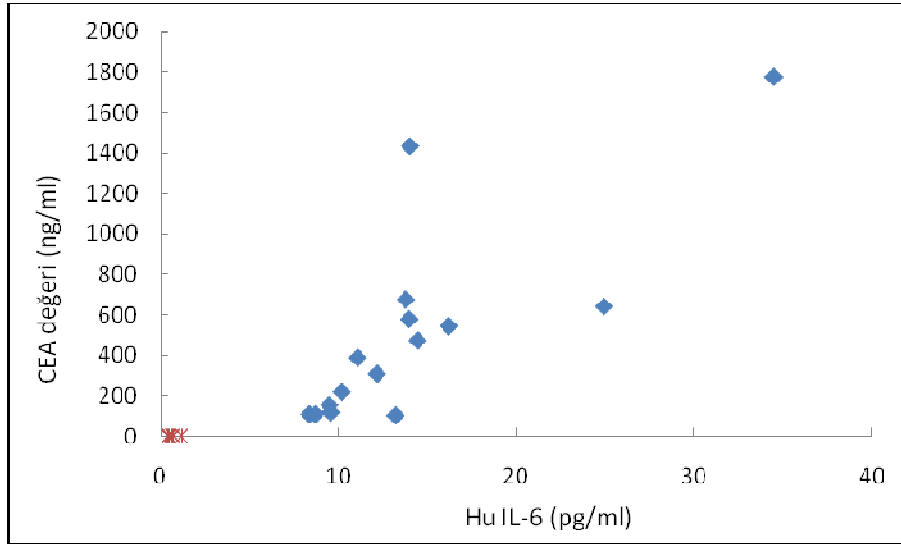
Şekil 4-9: Lenfosit membran proteinlerinin Western emdirim analizi.

1.kuyu Ehrlich tümör hücresi enjekte edilmiş aktivitesi yüksek kesimlerin serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 2. kuyu sağlıklı Balb/c serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 3. kuyu CEA değeri yüksek kanserli hasta serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 4. kuyu sağlıklı insan serumu enjekte edilen grubun 8.gün örneği, 5. kuyu Ehrlich asit sıvısı enjekte edilen grubun 8.gün örneği

İnsan tümör hasta serumlarının Balb/c farelerine enjeksiyonu sürecinde geliştirilen modelde, eritrosit membran proteinlerinin ve lenfosit membran proteinlerinin SDS-PAGE ve Western emdirim analizleri sonucu anti-CD38 ile tepkime veren 45kDa molekül ağırlıklı bir proteine ilişkin sinyalde artış görülmüştür. Bu artışlar kontrol deney bulgularına göre anlamlı ölçüde üzerindedir. Kanserli hasta serumunda CD38 anlatımını indükleyici bazı faktörlerin mevcut olduğunu bulgularımız göstermektedir.

4.2.4. CEA Değeri Yüksek Hasta Serumlarının ELİSA Yöntemi ile IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 Değerleri ve NAD Glikohidrolaz Etkinliği

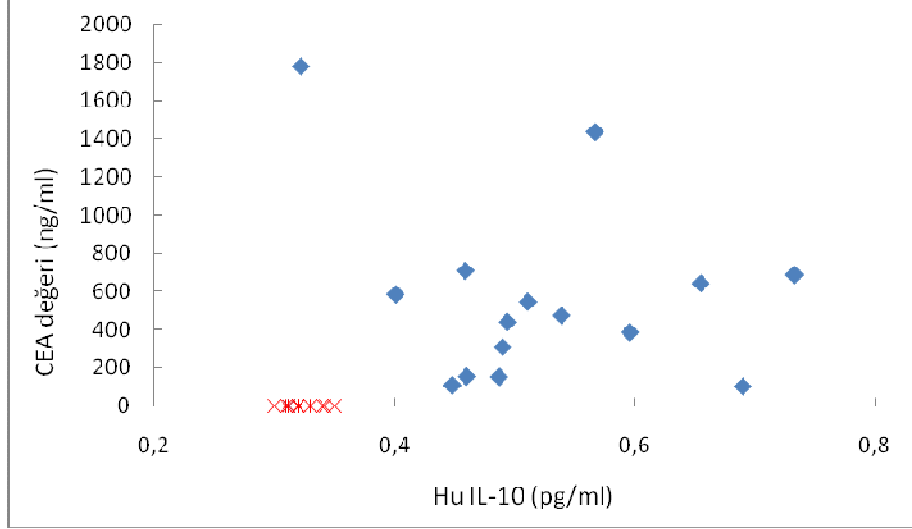
CEA değeri yüksek hasta serumlarının yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde ELİSA kitleriyle IL-6 (Şekil 4-10) değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde CEA değeri yüksek hasta serumlarının kontrol grubuna göre IL-6 değerinin yaklaşık 14,66 katlık bir artış gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$). Bu serum örneklerinin NAD Glikohidrolaz etkinliği ölçüldü (Şekil 4-14).



Şekil 4-10: Serum interlökin 6 değerleri

CEA değeri yüksek hasta serumları (♦-♦), sağlıklı birey serumları (x-x)

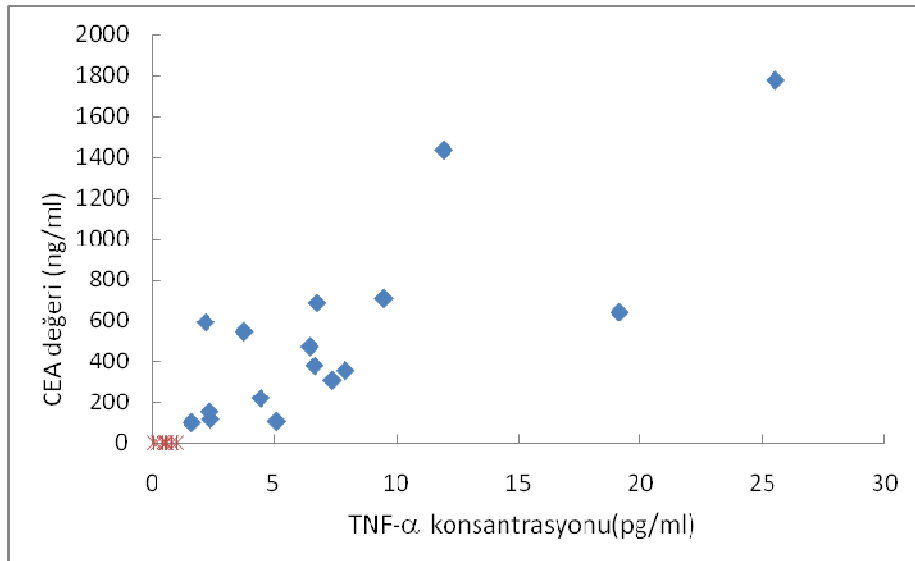
Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde kontrol grubun CEA değeri yüksek hasta serumlarına göre IL-10 değerinin yaklaşık 1,62 katlık bir artış gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$).



Şekil 4-11: Serum IL-10 değerleri

CEA değeri yüksek hasta serumları (♦-♦), sağlıklı birey serumları (x-x)

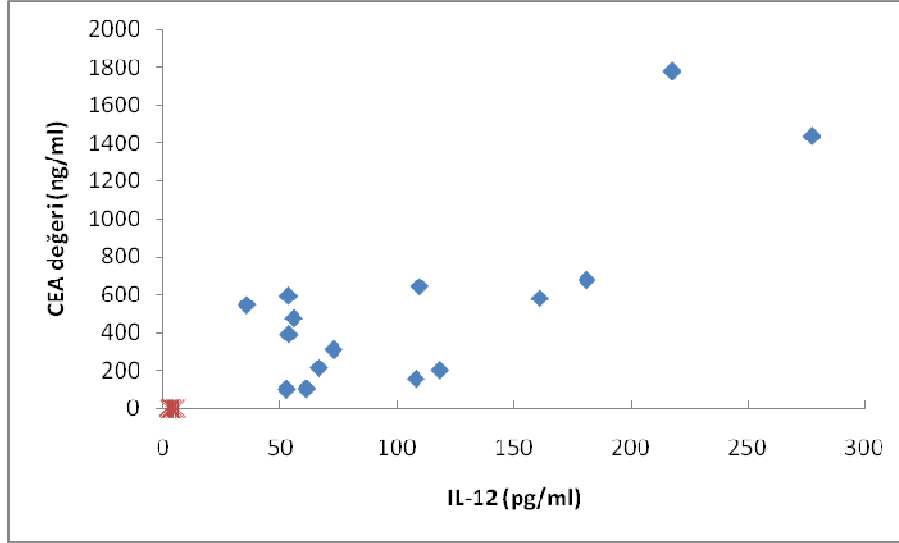
Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde kontrol grubun CEA değeri yüksek hasta serumlarına göre TNF- α değerinde 13,4 katlık artış olduğu görüldü ($p < 0.05$).



Şekil 4-12: Serum TNF- α değerleri

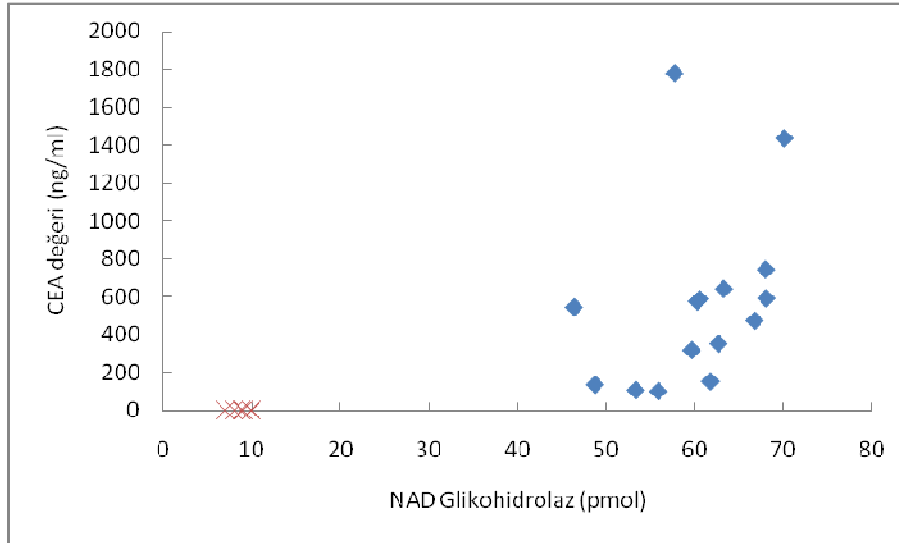
CEA değeri yüksek hasta serumları (♦-♦), sağlıklı birey serumları (x-x)

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde kontrol grubun CEA değeri yüksek hasta serumlarına göre IL-12 değerinde 48 katlık bir artış gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$).



şekil 4-13: Serum IL-12 Değerleri

CEA değeri yüksek hasta serumları (♦-♦), sağlıklı birey serumları (x-x)



şekil 4-14: Serum NAD Glikohidrolaz Etkinlik Değerleri

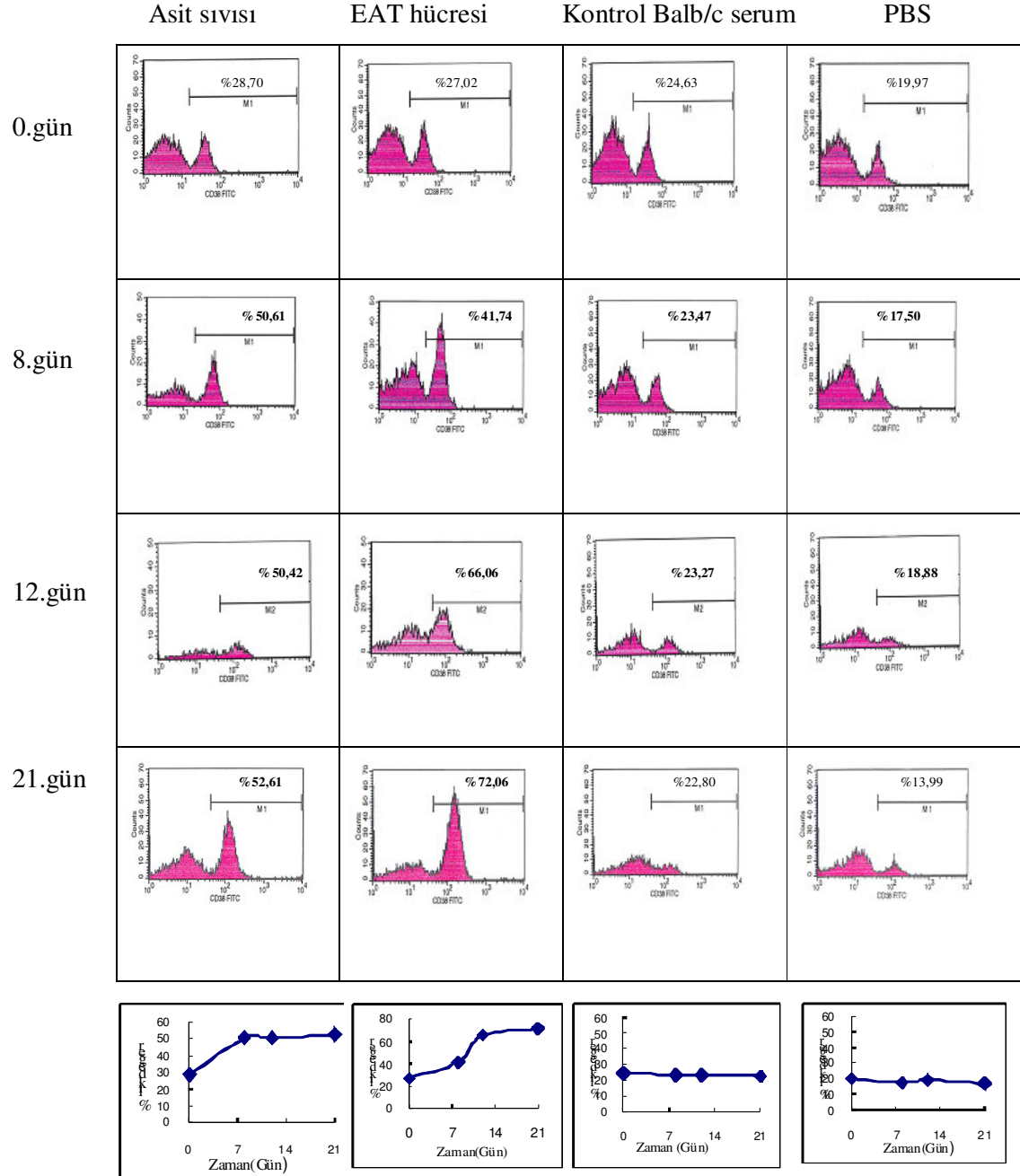
CEA değeri yüksek hasta serumları (♦-♦)

4.2.5. Çalışma Gruplarının Lenfosit Kesimlerinin Flow Sitometrik Analizi

Grupların lenfosit kesimlerinin FITC işaretli CD38 antikoruyla incelendiği flow sitometrik karşılaştırmalı analiz sonucunda, Ehrlich asit tümör hücrelerinin enjekte edildiği Balb/c'lerin sekizinci gün serumlarının ve asit sıvısının verildiği grupların CD38 etkinliklerinin kontrol gruplarına göre yükseldiği Şekil 4-15'te gösterildi.

4.2.6. CEA Değeri Yüksek Hastaların Lenfosit Alt Birimlerinin CD38 Etkinliğinin İncelenmesi

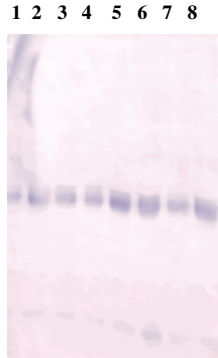
CEA değeri yüksek hasta kanlarından elde edilen lenfositlerin, yüksek bulunan NAD Glikohidrolaz etkinliğinin, lenfositlerin hangi alt biriminden kaynaklanarak arttığını belirlemek için T ve B lenfositleri saflaştırılarak etkinlikleri incelendi (Tablo 4-1). Saflaştırılan B lenfositlerinin saflığı flow sitometrede CD19 antikoruyla analiz edilerek %90, T lenfositleri ise CD3 antikoruyla analiz edilerek %95 olduğu görüldü. Sağlıklı kişilerden alınan kan örnekleriyle CEA değeri yüksek kanserli hasta kanlarından elde edilen total lenfositlerin, bu lenfositlerden saflaştırılan B ve T lenfositlerin ve alt birimleri olan yardımcı T lenfositleri (CD4) ve sitotoksik T lenfositleri (CD8)'in CD38 etkinliklerinin incelendiği Western emdirim analizi yapıldı (Şekil 4-16).



Şekil 4-15: Lenfosit kesimlerinin CD38 etkinliğinin incelendiği flow sitometrik analiz sonuçları

NAD Glikohidrolaz	
Sağlıklı kişi T lenfosit	9,2 pmol
CEA değeri yüksek hasta T lenfosit	32 pmol
Sağlıklı kişi B lenfosit	4,5 pmol
CEA değeri yüksek hasta B lenfosit	15,2 pmol
Sağlıklı kişi CD4 lenfosit	5,75 pmol
CEA değeri yüksek hasta CD4 lenfosit	5,4 pmol
Sağlıklı kişi CD8 lenfosit	7,5 pmol
CEA değeri yüksek hasta CD8 lenfosit	10,6 pmol

Tablo 4.1: CEA değeri yüksek hastalarla sağlıklı bireylerin B, T, yardımcı T (CD4) ve sitotoksik T lenfositlerinin (CD8) NAD glikohidrolaz değerleri



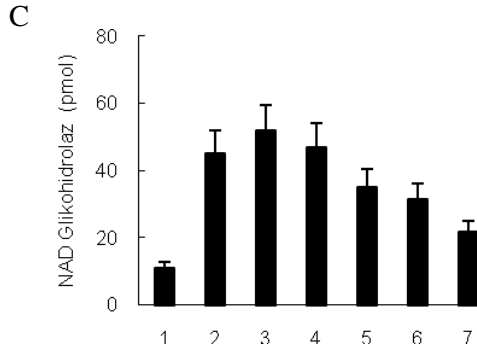
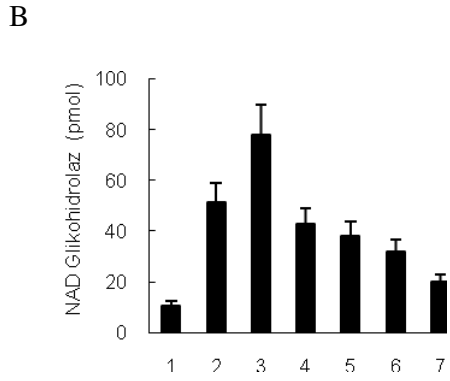
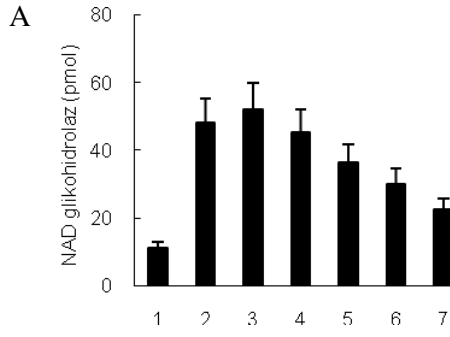
1. Sağlıklı kişi B lenfosit
2. Sağlıklı kişi T lenfosit
3. Sağlıklı kişi Yardımcı T lenfosit (CD4)
4. Sağlıklı kişi Sitotoksik T lenfosit (CD8)
5. CEA değeri yüksek B lenfosit
6. CEA değeri yüksek T lenfosit
7. CEA değeri yüksek Yardımcı T lenfosit (CD4)
8. CEA değeri yüksek Sitotoksik T lenfosit(CD8)

Şekil 4-16: Lenfosit alt birimlerinin Western emdirim görüntüsü

4.2.7. EAT Enjekte Edilen Balb/c'lerin Endoksan ile Muamele Sonrası NAD Glikohidrolaz Etkinliği Değişimi

Ehrlich asit tümör hücre si enjeksiyonundan 8 gün sonra artan NAD Glikohidrolaz etkinliği kemoterapik ajan olan Endoksan ile muameleden sonra Balb/c'lerin serum, lenfosit ve eritrosit membran posalarındaki değişiminin izlenmesi amacıyla yeni bir deney sistemi kuruldu. Çalışma gruplarındaki kontrol grubu dışındaki farelerin intraperitoneal bölgesine 0,2 ml medyum içerisinde 800.000 Ehrlich asit tümör hücre si enjekte edildi. Enjeksiyon yapıldıktan 8 gün sonra 24 saat içerisinde Endoksan artan konsantrasyonlarda Balb/c lere yine intraperitonel olarak verilmeye başlandı. 3., 4., 5. ve 6. gruplara 2 gün ara ile 3 kez Endoksan enjeksiyonu gerçekleştirildi. 1.grup işlem görmemiş Balb/c'lerin bulunduğu kontrol kafesi, 2. grup Ehrlich asit hücre sinin; 3. grup Endoksan konsantrasyon değer i 10 mg/kg; 4. grup Endoksan konsantrasyon değer i 20 mg/kg; 5. grup Endoksan konsantrasyon değer i 40 mg/kg; 6. grup Endoksan konsantrasyon değer i 100 mg/kg; 7. grup Endoksan konsantrasyon değer i 250 mg/kg olacak şekilde enjeksiyonları yapıldı.

Birinci grup kontrol grubu olduğundan diğer gruplara Endoksan enjeksiyonu sırasında bu gruba da serum fizyolojik enjekte edildi. Tümörlü hayvanların lenfosit, serum ve eritrosit membran proteinlerindeki sekizinci gün enzimatik etkinlik değerleri şekil 4-17'de verildi. Endoksan konsantrasyon değerleri ile NAD Glikohidrolaz etkinliği değerleri karşılaştırıldı.



**Şekil 4-17: A-Lenfosit proteinleri NAD Glikohidrolaz etkinlik grafiği,
B-Serum NAD Glikohidrolaz etkinlik grafiği,
C- Eritrosit membran proteini NAD Glikohidrolaz etkinlik grafiği.**

Kontrol (sağlıklı) grubu no 1,

Ehrlich asit tümör hücresi verilen grup no 2,

Ehrlich asit tümör hücresi verildikten sonra 10 mg/kg Endoksan (3 doz) verilen grup no 3,

Ehrlich asit tümör hücresi verildikten sonra 20 mg/kg Endoksan (3 doz) verilen grup no 4,

Ehrlich asit tümör hücresi verildikten sonra 40 mg/kg Endoksan (3 doz) verilen grup no 5,

Ehrlich asit tümör hücresi verildikten sonra 100 mg/kg Endoksan (3 doz) verilen grup no 6,

Ehrlich asit tümör hücresi verildikten sonra 250 mg/kg Endoksan (Tek doz) verilen grup no 7.

4.3. Kordon Kanından Kök Hücre Saflaştırılması

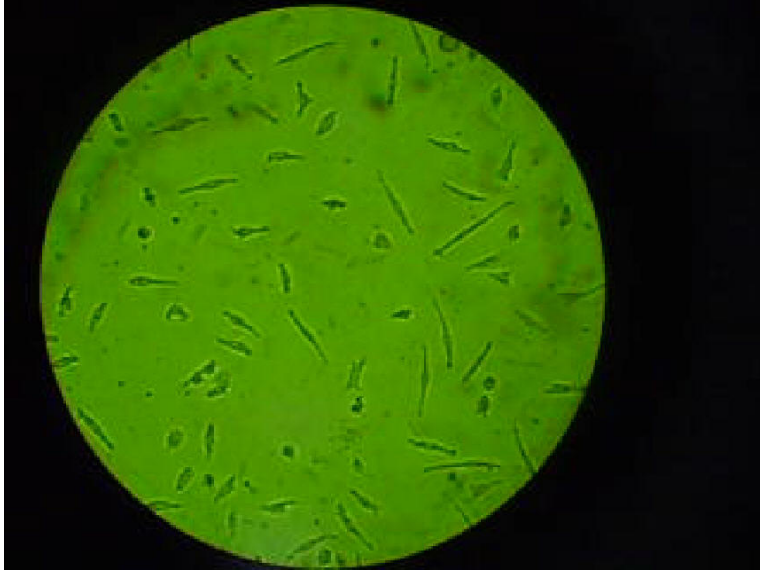
İ.Ü. Kadın Doğum Anabilim Dalı'ndan EDTA'lı tüplere alınan kordon kanlarından hematopoetik ve mezenkimal kök hücre olmak üzere 2 çeşit izolasyon gerçekleştirildi.

4.3.1. Kordon Kanından Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

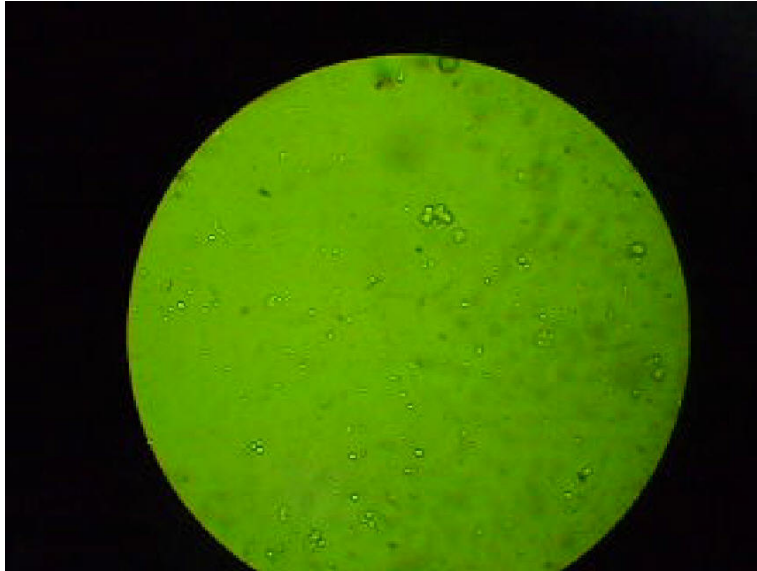
1:1 oranda kordon kanı PBS ile seyreltildi. 15 ml'lik tüpe 5 ml ficoll eklendi ve üzerine seyreltilmiş olan kordon kanı yavaşça tabakalandırıldı. 2000 devir/dak'da 20 dakika santrifüj yapıldı. Bulutsu ara faz (Buffy coat) alınır ve 10 ml'ye PBS ile tamamlanarak 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üstüsu dököldü ve 5 ml PBS ile tekrar yıkama yapıldı (1300 devir/dak'da 5 dakika). Üstüsu atıldı ve T25 flaskına ekim yapıldı ve 4. günün sonunda yapışık formdaki mezenkimal kök hücreler ışık mikroskopunda incelendi. Görüntü Şekil 4-18'da verildi.

4.3.2. Kordon Kanından CD34⁺ Hücrelerin Saflaştırılması

Hematopoetik kök hücrelerin tanımlanmasında da belirtildiği gibi hücre yüzey antijeni olan CD34 ve CD38 bu tip hücrelerin belirteçidir. Aynı zamanda ALDH enzimatik etkinliğinin de bulunması kök hücrelerin belirlenmesinde ve saflaştırılmasında kullanılmakta olan diğer bir belirteçtir. İ.Ü. Kadın Doğum Anabilim Dalı'ndan alınan 10 ml kandan yapılan progenitör hücre izolasyonunda öncelikle ficoll gradyent metodu ile bulutsu ara faz toplandı. CD34 pozitif selection kitin içerdiği magnetik nanopartiküller vasıtasıyla CD34 pozitif hücreler toplandı. Hücrelerin toplanması bir magnet ile gerçekleştirildi. Magnet içerisinde bulunan tüpün çeperlerine sadece kordon kanından elde edilen bulutsu ara fazda bulunan hücrelerin CD34 antijenine magnetik boncuk bağlı CD34 antikoru bağlanmış olan hücreler tutundu. Magnetik nanopartiküllerin tutunması sonucu diğer hücrelerin uzaklaşması sağlandı. Ardından tüpün magnetten çıkarılmasıyla elektromagnetik kuvvet kesilmiş oldu ve çeperdeki tutunmuş hücreler tüpten ayrıldı ve CD34⁺ hücreler toplandı. CD34⁺ hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü Şekil 4-19'de verildi.



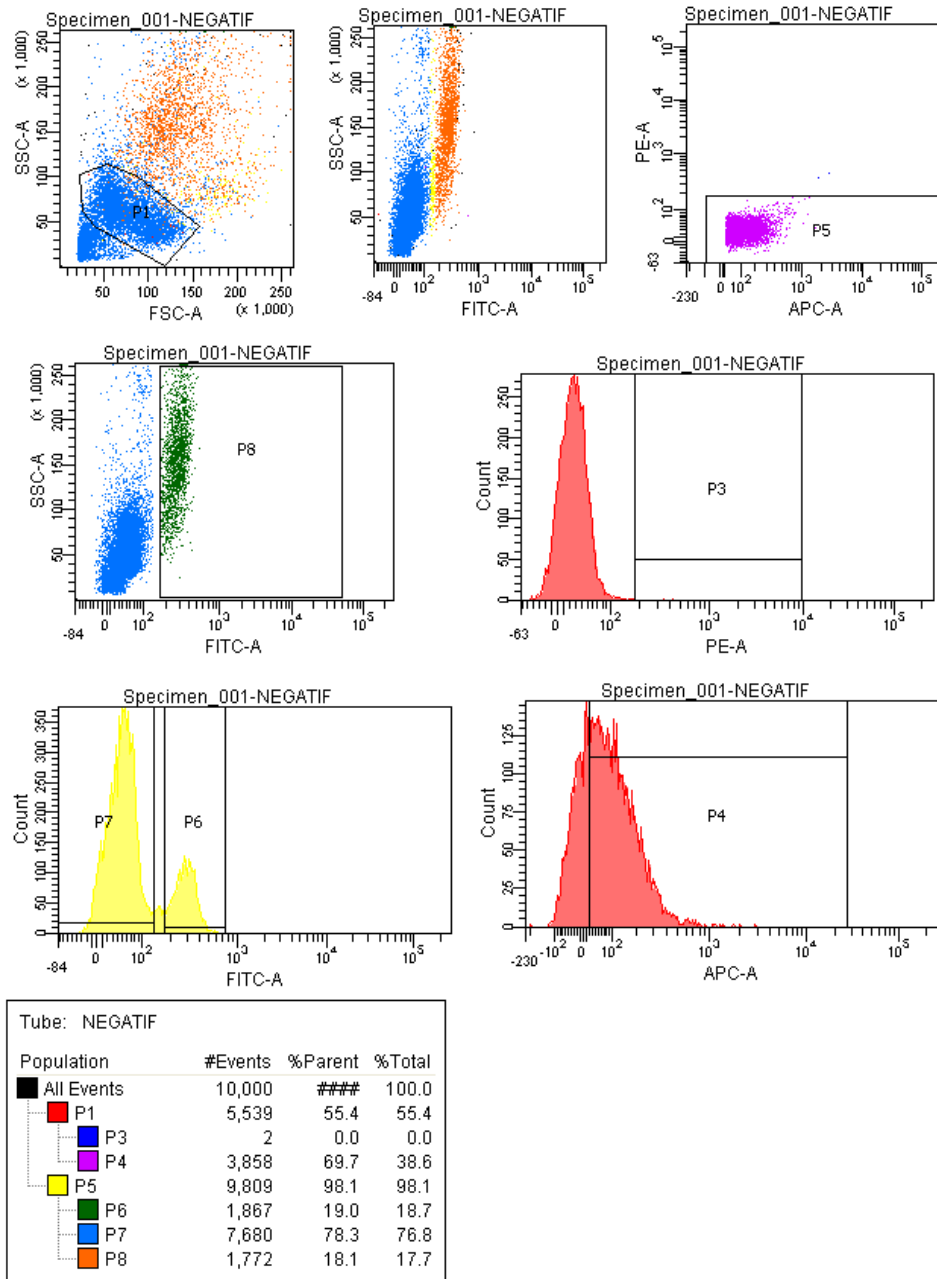
Şekil 4-18: Kordon kanından elde edilen mezenkimal kök hücre görüntüsü



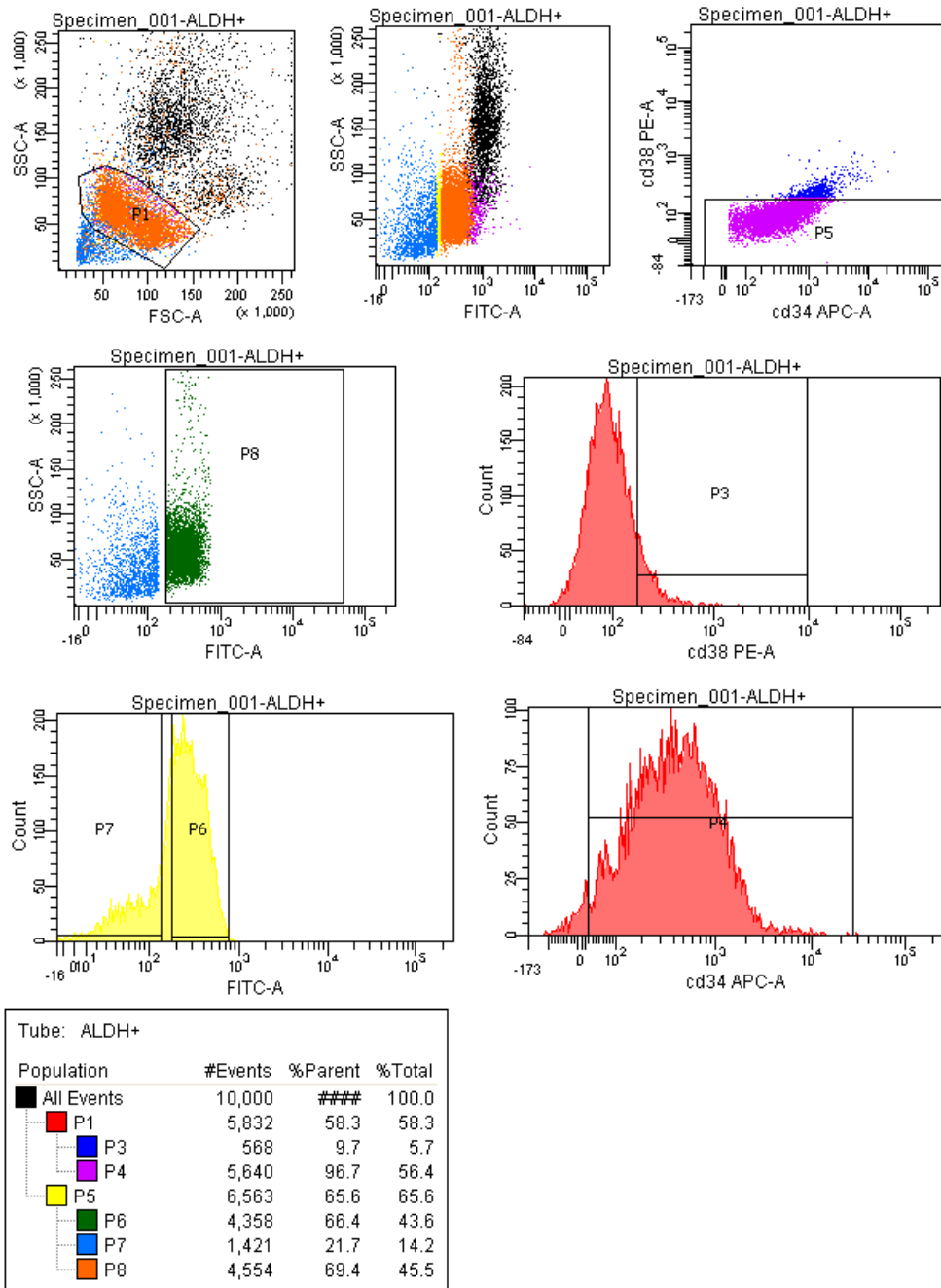
Şekil 4-19: CD34⁺ hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü

4.3.3. Kordon Kanından CD34⁺ Hücrelerin Seçiminden Sonra (ALDH)⁺ CD38⁻ Hücrelerin Seçilmesi

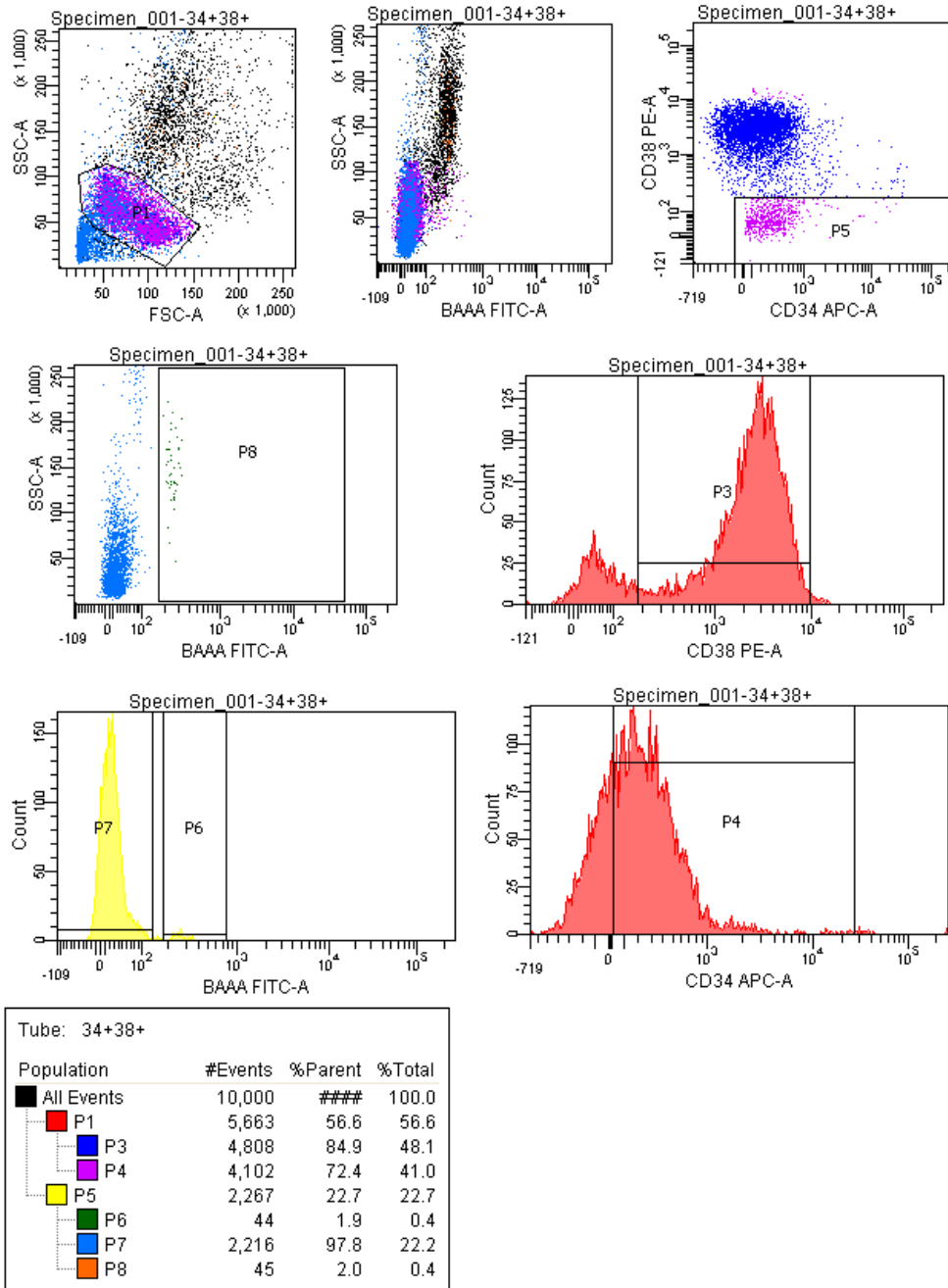
ALDH etkinliği olan hücrelerin seçimi yöntemler bölümünde FACS ile hücre izolasyonu kısmında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilip ardından CD38 antijeni için CD38-PE işaretli antikorla muamele edildi. Kit ile CD34⁺ elde edilmiş hücrelerden, bu işaretli antikorlar aracılığıyla CD38⁻ALDH⁺ hücreler seçildi (Şekil 4-20, 4-21, 4-22 ve 4-23). Becton Dickinson (USA) firmasının BD FACS Aria II cihazıyla bu seçilen hücreler toplandı. 1 nolu dot plotta CD34 hücrelerinden lenfosit kapısını aldık. Daha sonra seçmiş olduğumuz kapıdaki hücreleri CD34 (P4) ve CD38 (P3) parametrelerinde okuduk. CD34/CD38 parametresinden CD34(+)/CD38(-) olan hücre grubunu kapılayarak (P5) bu hücre grubu içerisindeki ALDH oranını okuduk. ALDH(+) (P6) ve ALDH(-) (P7) olarak gördüğümüz popülasyonlardan ALDH(+) (P8) olan kısmı sort ederek ayırdık.



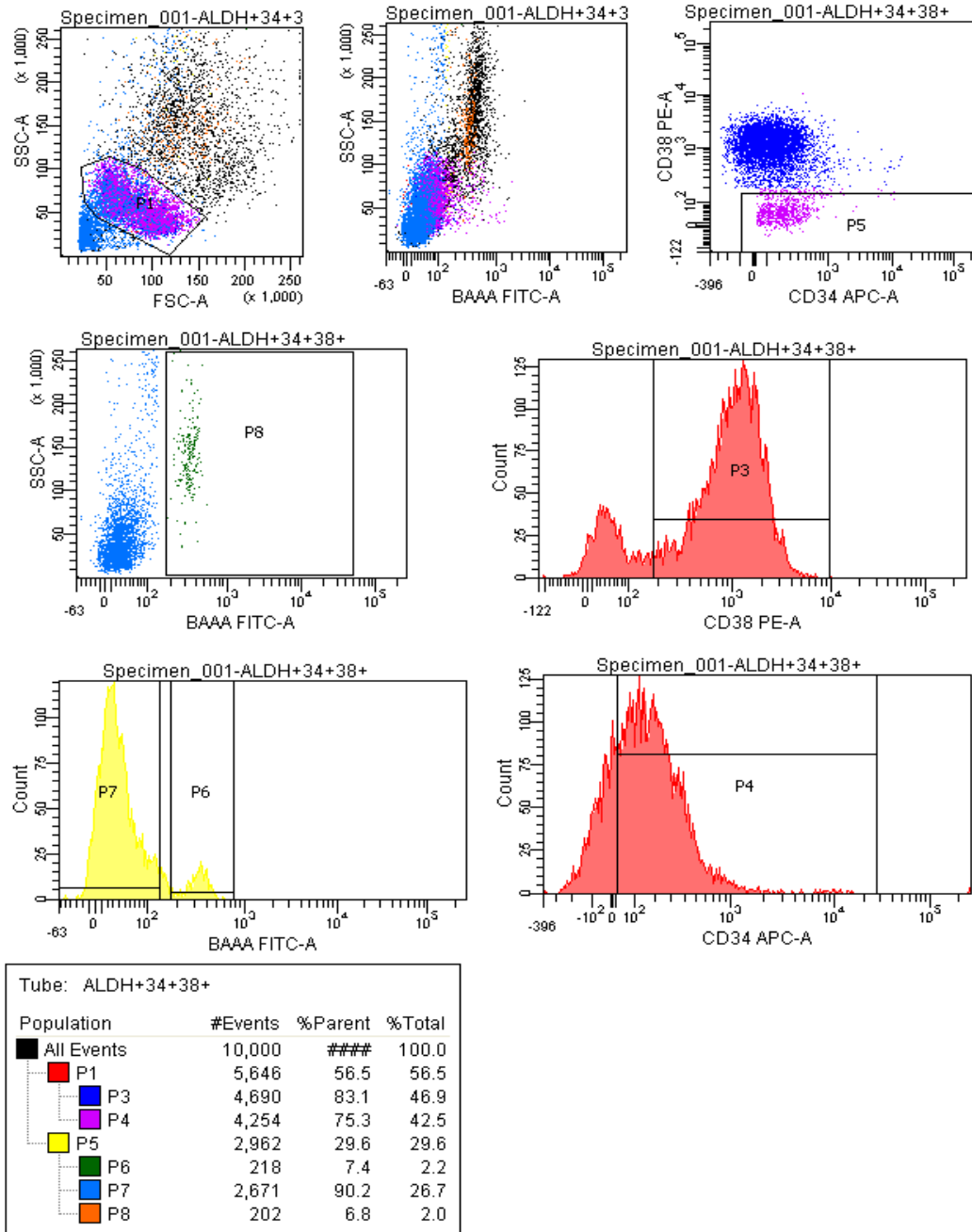
Şekil 4-20: Negatif kontrol tüpü. İnsan CD34 pozitif ayırma kiti ile saflaştırılan CD34+ hücrelerin ALDH etkinliğini inhibe eden Dietil Amino Benzaldehit (DEAB) ile muamele sonrası analizi



Şekil 4-21: İnsan CD34 pozitif ayırma kiti ile saflaştırılan CD34+ hücrelerin ALDH etkinliğinin izlendiği Bodipy-aminoasetaldehyd (BAAA)- FITC işaretli tüpün analizi



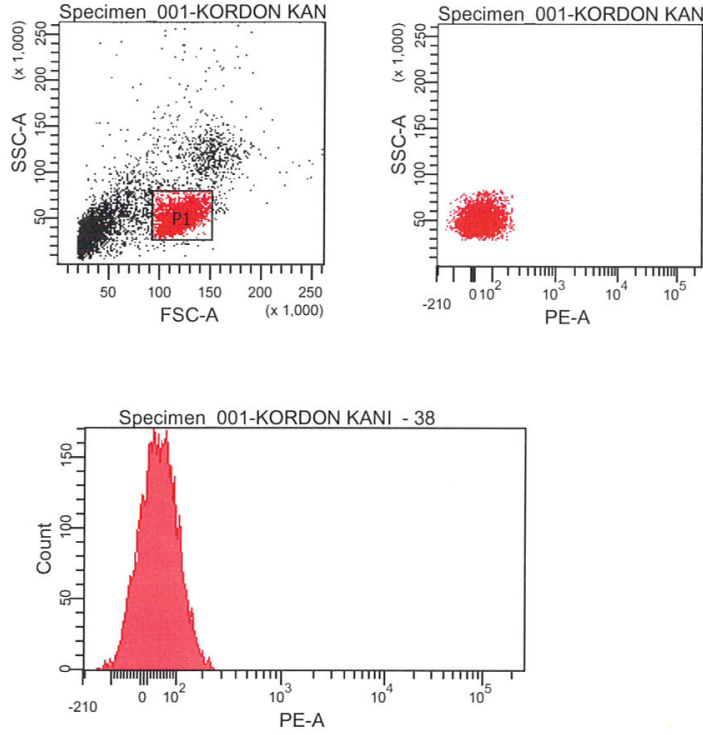
Şekil 4-22: İnsan CD34 pozitif ayırma kiti ile saflaştırılan CD34+ hücrelerin CD38 etkinliğinin izlendiği CD38-PE işaretli tüpün analizi



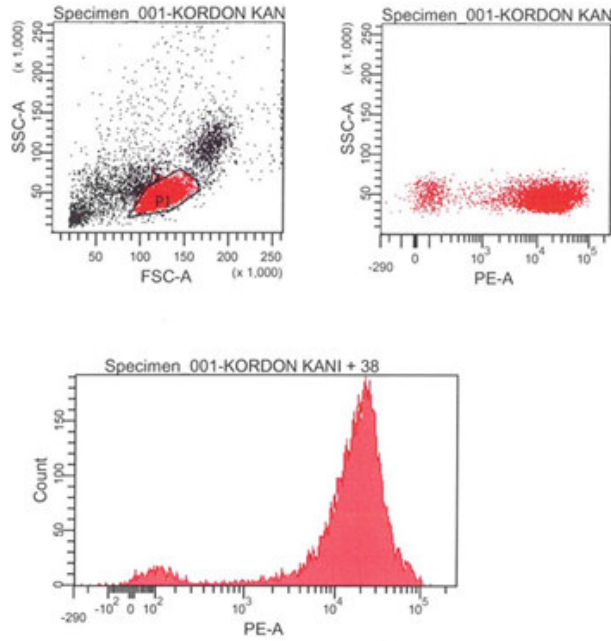
Şekil 4-23: Kök hücrelerin seçildiği tüp. CD34+ hücrelerin FITC işaretli Bodipy-aminoasetaldehid (BAAA), PE işaretli CD38 antikorlarıyla muamele edildiği tüpün analizi ve toplanacak hücrelerin seçimi

4.3.4. Kordon Kanı CD38 Etkinliği İle Sağlıklı Birey Periferal Kan CD38 Etkinlik Değerinin Karşılaştırılması

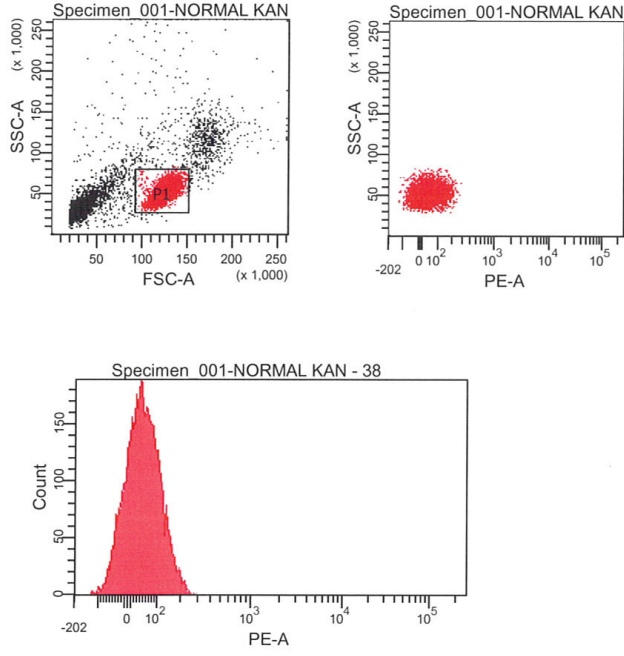
Kordon kanından hematopoetik kök hücre izolasyonu sırasında yapılan analizlerde kordon kanı CD38-PE işaretli hücre popülasyonunun çok yüksek olduğu görüldü. Bunun üzerine sağlıklı periferal kan ile kordon kanı lenfosit kesimlerinin CD38 yüzey antijeni karşılaştırması yapıldı. CD38-PE işaretli antikor ile muamele edilen kordon kanı ve sağlıklı birey periferal kanlarından saflaştırılan lenfosit kesimlerinin flow sitometrik analizleri sonucu elde edilen bilgilere göre kordon kanı periferal kana göre anlamlı derecede yüksek CD38(+) olduğu belirlendi (Şekil 4-24, 4-25, 4-26, 4-27).



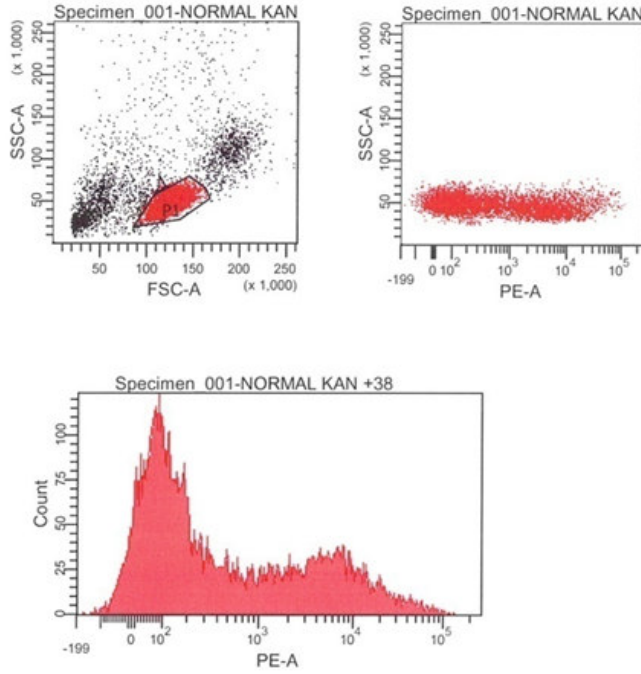
Şekil 4-24: Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının negatif kontrol tüpünün flow sitometrik analizi



Şekil 4-25: Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD38-PE ile işaretlenmesi sonrası yapılan flow sitometrik analizi



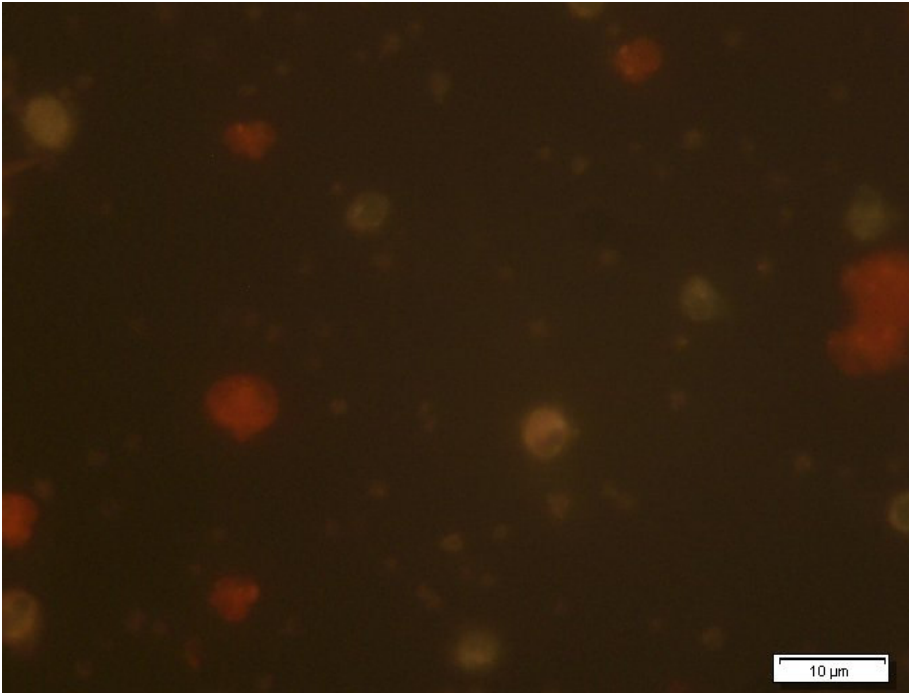
Şekil 4-26: Sağlıklı birey kanının histopak üzerine tabakalandırılıp santrifüj sonrası alınan histopak plazma ara fazının kontrol tüpünün flow sitometrik analizi



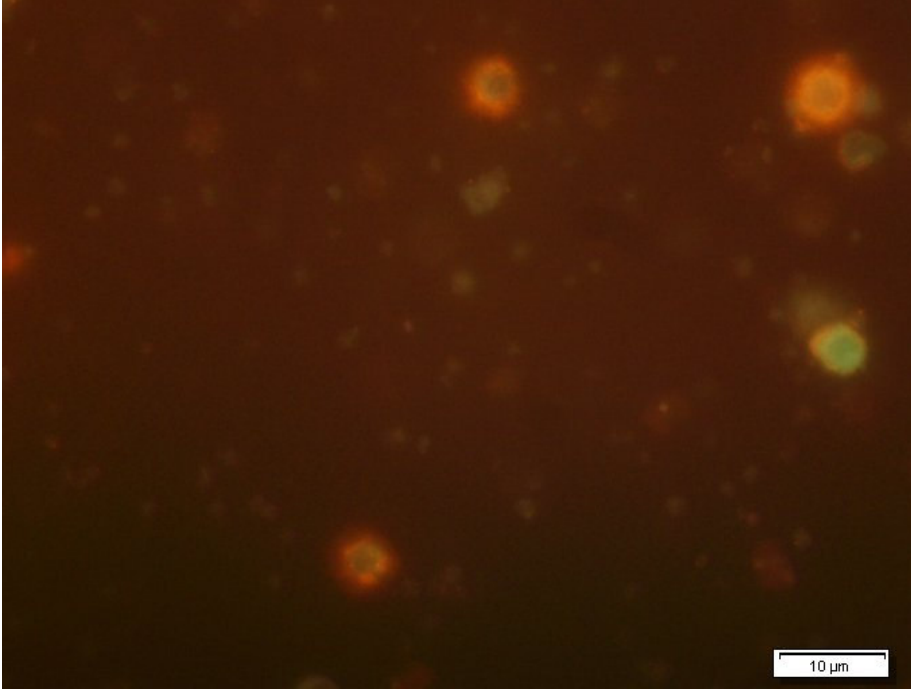
Şekil 4-27: Sağlıklı birey kanının histopak üzerine tabakalandırılıp santrifüj sonrası alınan histopak plazma ara fazının CD38-PE ile işaretlenmesi sonucu alınan flow sitometrik analizi.

4.3.5. Kordon Kanından Saflaştırılan Hematopoetik Progenitör Hücre ve Önceki Aşamalarının Floresan Mikroskopunda Görüntülenmesi

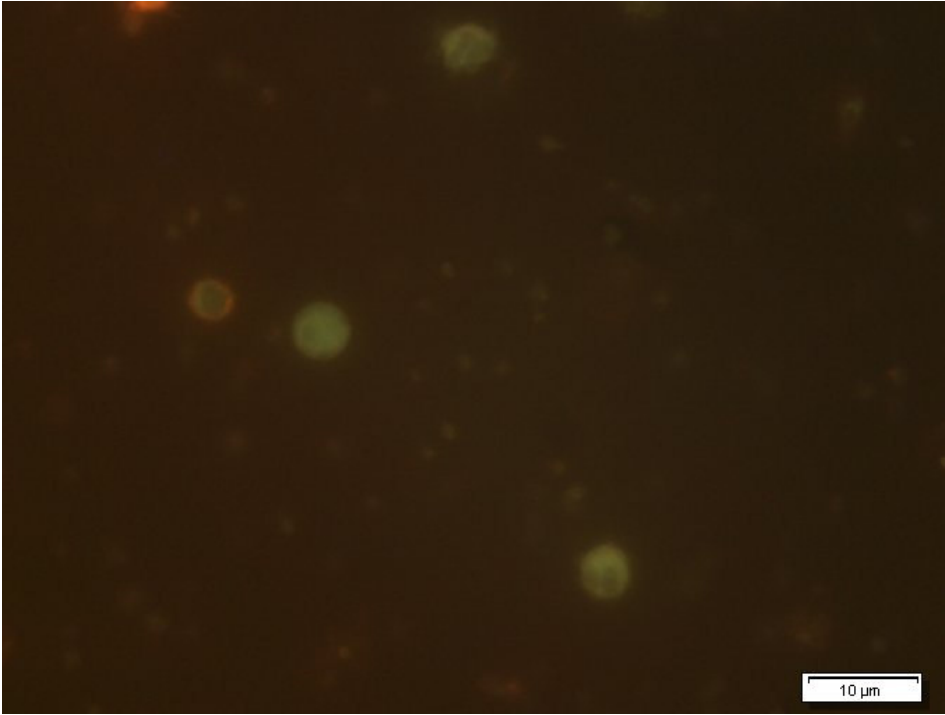
Kordon kanı histopak plazma ara faz kesimi, bu kesimden saflaştırılan CD34⁺ hücreler ve BD FACS Aria II cihazıyla ile seçilip toplanan CD34⁺CD38⁻ ALDH⁺ hücreler CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenerek Olympus BX51 floresan mikroskopunda görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. Kordon kanı histopak plazma arafazı kesiminde tüm yüzey antijenlerine sahip hücreler görülürken (Şekil 4-28a, 4-28b, 4-28c); CD34⁺ izolasyonu sonrası elde edilen hücrelerin ALDH ve CD38 işaretlenmeleri sonucu alınan görüntülerde bu hücrelerin tamamının kök hücre olmadığı görüldü (Şekil 4-29a, 4-29b). Sadece CD38-PE ile işaretlenen bu hücre grubunda CD38(+) olan hücrelerin olduğu görüldü (Şekil 4-30). ALDH(+), CD34(+), CD38(-) belirteçlerine sahip olan kök hücrelerin toplanması sırasında lazer ışığı kullanıldığından uyarılma sonrası toplanırken BAAA-FITC sönmüldü. Dolayısıyla FACS ile toplanmış olan kök hücreler floresan mikroskopunda, DAPI ile boyanmış çekirdekleri mavi renkte olan hücreler olarak görüntülendiler (Şekil 4-31).



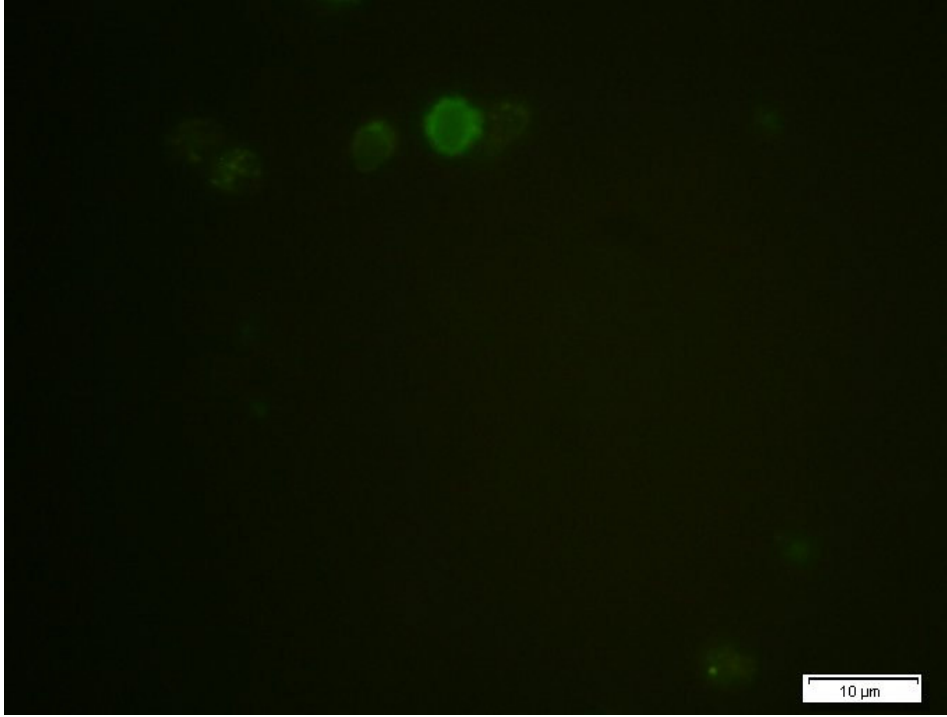
Şekil 4-28: a Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD34, CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenmesi sonucu alınan floresan mikroskop görüntüsü



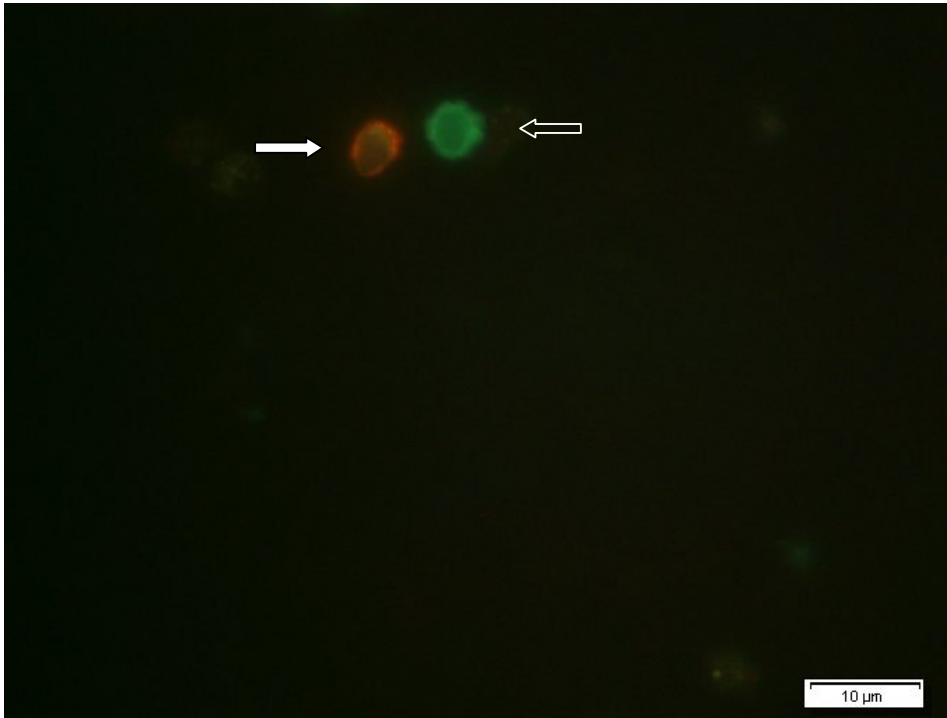
Şekil 4-28: b Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD34, CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenmesi sonucu alınan floresan mikroskop görüntüsü



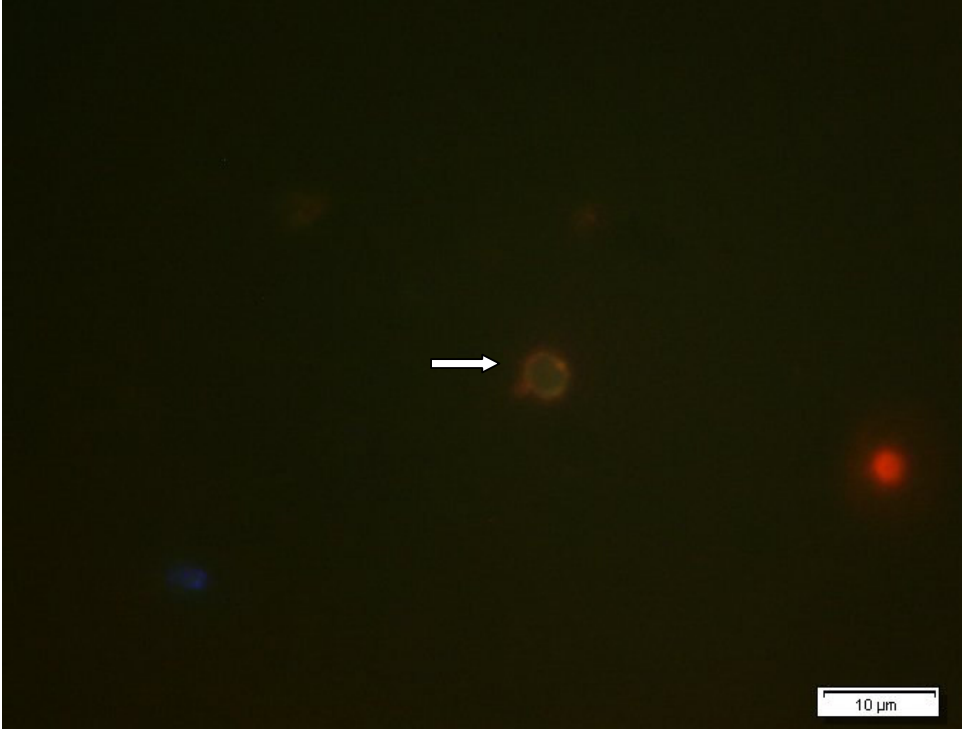
Şekil 4-28: c- Histopak üzerine tabakalandırılan kordon kanının santrifüj sonrası alınan ara fazının CD34, CD38-PE ve ALDH-FITC ile işaretlenmesi sonucu alınan floresan mikroskop görüntüsü



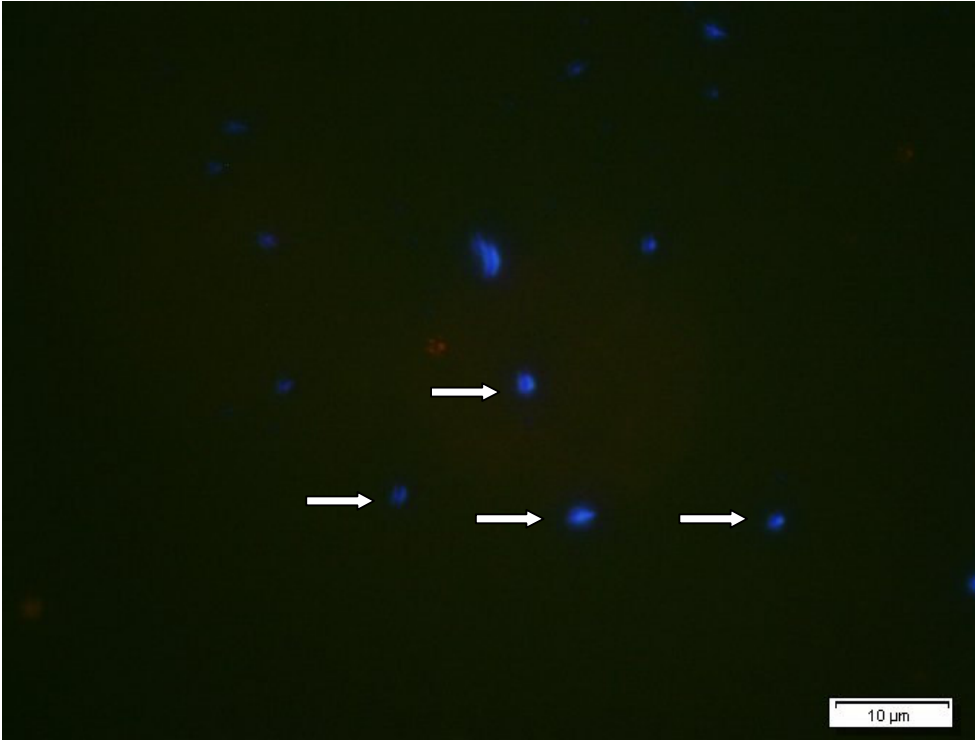
Şekil 4-29: a- CD34+ hücreler seçildikten sonra ALDH enzimatik etkinliğinin ve CD38 yüzey antijenine sahip hücrelerin incelendiği floresan mikroskop görüntüsü



Şekil 4-29: b- CD34+ hücreler seçildikten sonra ALDH enzimatik etkinliğinin ve CD38 yüzey antijenine sahip hücrelerin incelendiği floresan mikroskop görüntüsü



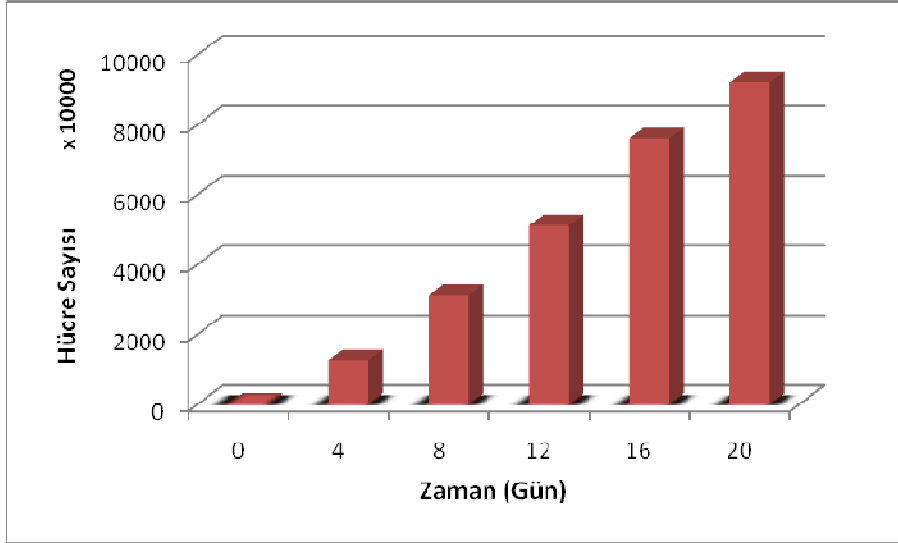
Şekil 4-30: CD34+ hücrelerin CD38-PE ile işaretlenmiş hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü



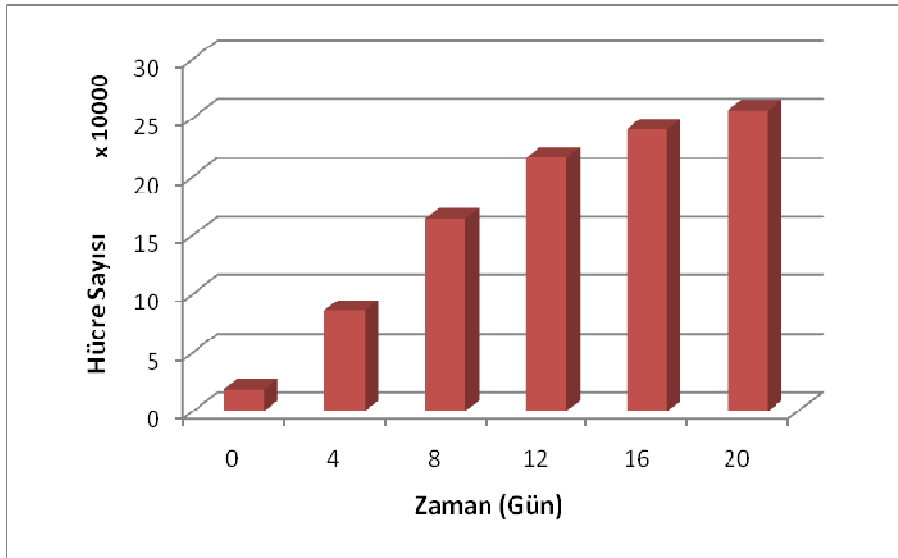
Şekil 4-31: CD34+CD38-ALDH+ hücrelerin facs ile toplanması aşamasından sonra hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

4.3.6. Hematopoetik Progenitor Hücrelerin Kök Hücre Faktörlü Ve Eritropoetinli Kültür Ortamlarındaki Çoğalmaları

Toplanan 36000 CD34⁺CD38⁻ALDH⁺ hücrenin yarısı (18000 hücre) eritropoetin (EPO) ve kök hücre faktörü (SCF) içeren medyuma diğer yarısı (18000 hücre) ise eritropoetin içermeyen sadece SCF içeren kültür ortamına alındılar. 4 gün arayla flow sitometre cihazında hücre sayımı gerçekleştirildi. Ölü hücreler sayım dışı bırakıldı. SCF eklenen hücrelerin sayısı Şekil 4-32'de, eritropoetin içeren hücrelerin sayısı ise Şekil 4-33'de verildi.



Şekil 4-32: CD34⁺CD38⁻ALDH⁺ hücrelerin kök hücre faktörü (SCF) varlığında zaman-hücre sayısı grafiği



Şekil 4-33: CD34⁺CD38⁻ALDH⁺ hücrelerin eritropoetin (EPO) ve kök hücre faktörü (SCF) varlığında zaman-hücre sayısı grafiği

4.3.7. Sıvı Kültürde İlkel Hematopoetik Hücrelerden Eritroid Öncüllerinin Geliştirilmesi (Evre 1)

ALDH⁺CD34⁺CD38⁻ hücreleri (10⁵ /ml) %20 BIT 9500, 100 U/ml penisilin-streptomisin, %15 FBS içeren medyuma gerekli olan sitokinler ve faktörler eklendi { Epo 1 µl /ml, SCF (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml)} ve 2 mM L-glutamin ile zenginleştirilmiş medyum IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) içinde yetiştirildi. Hücre sayısı, taze medyum içinde seyreltilerek 10⁶/ml altında tutuldu.

4.3.8. Sıvı kültürde eritroid farklılaşmasının son evreye dek sürdürülmesi (Evre 2)

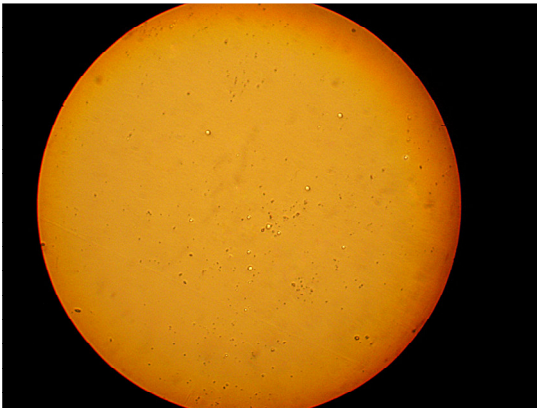
SCF(stem cell factor)/Epo (eritropoietin) stimülasyonundan 10 gün sonra yıkanan hücreler %20 BIT, 10⁻⁵ M β-merkaptto etanol (β-ME), 10⁻⁵ dexametazon ve 1 U/ml rh(rekombinant) insan Epo içeren IMDM içinde eritroid kültürün 2. fazına (2x10⁵ /ml) (PII,14 gün) geçirildi; TGF- β1 (transforming growth factor) (5 ng/ml) bu ikinci evrenin sıfırncı, beşinci ve onuncu günlerinde eklendi. Olgunlaşması (normoblast/eritroblast) esnasındaki farklı günlerde (0., 4., 8., 12. ve 16.) izlenen hücreler Megacult-c staining kit ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4-34).



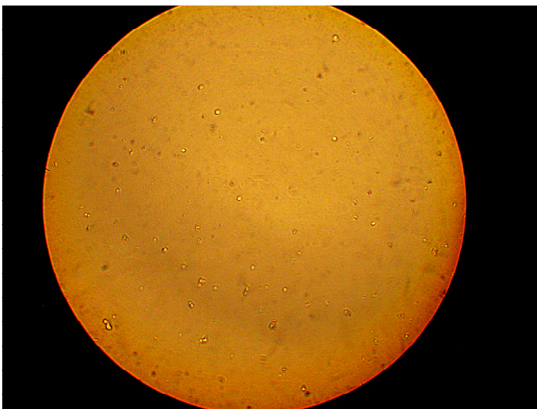
Sıfırncı gün



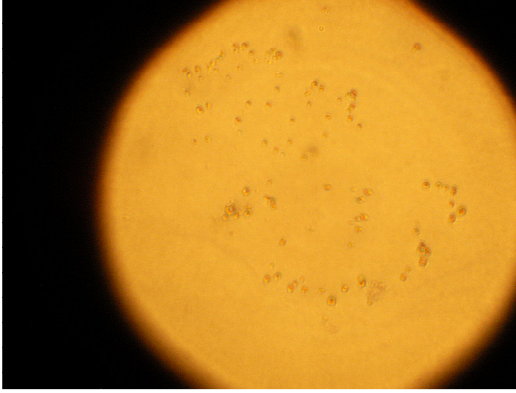
Dördüncü gün



Sekizinci gün



Onikinci gün

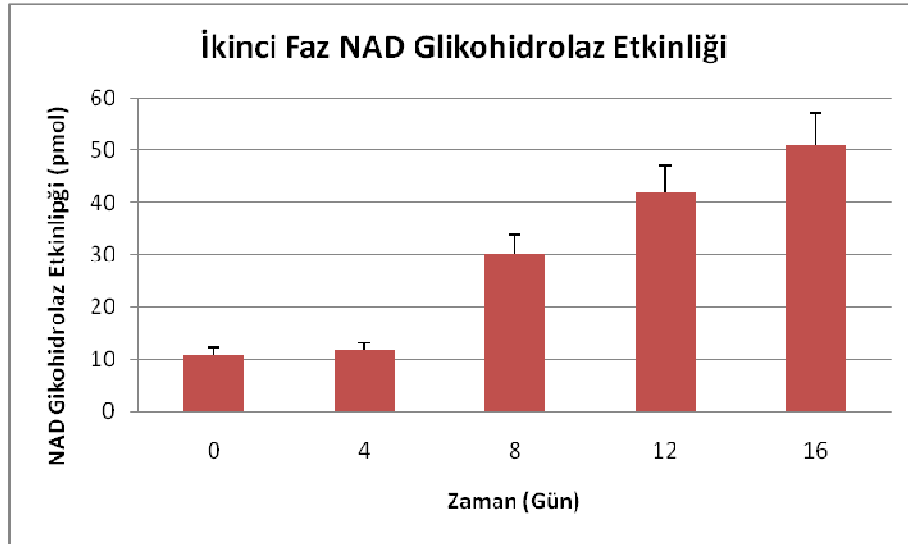


Onaltıncı gün

Şekil 4-34: İkinci faz kültür ortamına alınan hücrelerin sıfır, dört, sekiz, oniki ve onaltıncı günlerde Megacult c-staining kit ile boyanma sonucu ışık mikroskopunda alınan görüntüleri

4.3.9. Hematopoetik Progenitor Hücrelerin NAD Glikohidrolaz Etkinliğindeki Değişimi

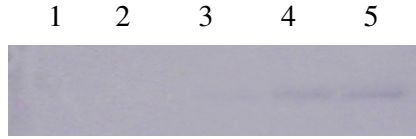
Kök hücre faktörüyle çoğaltılan ALDH⁺CD34⁺CD38⁻ hücreler (10⁵ hücre/ml) eritroid seri farklılaşma aşaması olan birinci faz için eritropoetin ve kök hücre faktörü içeren medyuma içerisine alındılar. 10 gün bu ortamda tutulduktan sonra hücreler (10⁵ hücre/ml) transforming growth factor β 1, merkapto etanol ve deksametazon içeren ikinci faz ortamına alındılar. Bu farklılaşma fazındaki hücrelerin farklı günlerde (0., 4., 8., 12., 16.) (hücre sayısı sabit tutularak) alınan üst sıvı örnekleriyle yapılan NAD Glikohidrolaz etkinliği değerlerinden edinilen sonuçlara göre CD38 etkinliklerinde de artış olduğu görüldü. NAD Glikohidrolaz etkinliği sonuçları da Şekil 4-35'de verildi.



Şekil 4-35: İkinci faza alınan progenitor hücrelerin zamana bağlı NAD Glikohidrolaz etkinliği değişimi.

4.3.10. İkinci Farklılaşma Fazı Western Emdirim Analizi

Kök hücre faktörüyle çoğaltılan hücrelerin ikinci farklılaştırma fazı esnasındaki 0., 4., 8., 12. ve 16. günlerde izlenen hücre üst sıvısının SDS-PAGE sonrası Western emdirim analizi Şekil 4-36’te verildi.

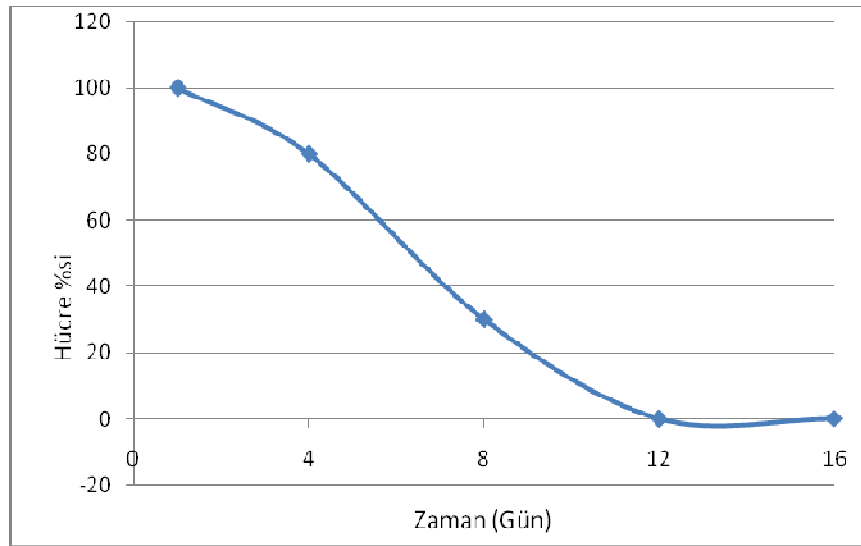


Şekil 4-36: Farklılaşma ikinci fazın 0., 4., 8., 12. ve 16. gün SDS-PAGE sonrası Western emdirim analizi

1.kuyu 0.gün üst sıvı örneği, 2. kuyu 4.gün üstsıvı örneği, 3. kuyu 8.gün üstsıvı örneği, 4. kuyu 12.gün üstsıvı örneği, 5. kuyu 16.gün üstsıvı örneği

4.3.11. İkinci Farklılaşma Fazı Esnasında Hücrelerdeki CD34 Değişimi

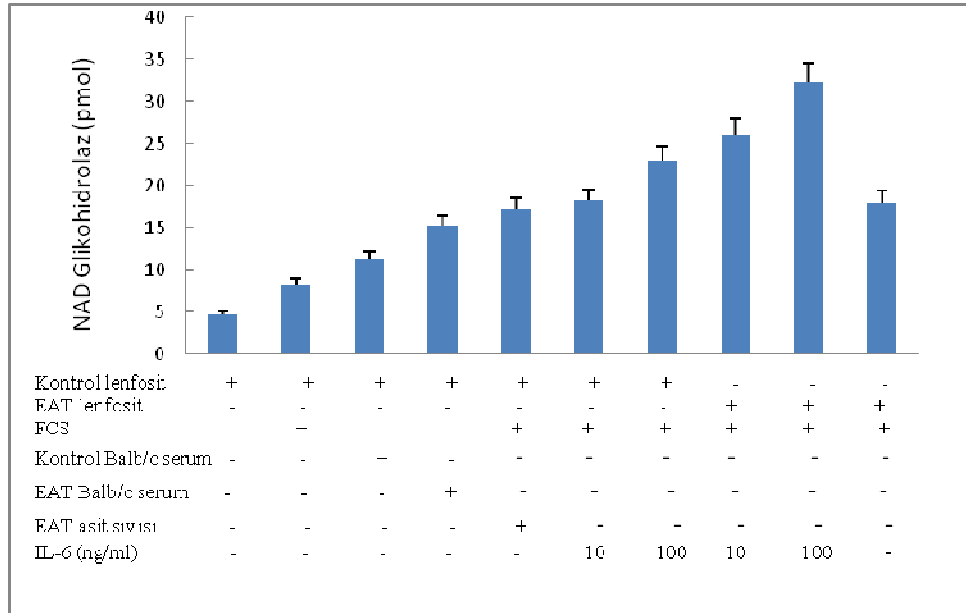
İkinci farklılaşma fazı esnasında hücrelerin 0, 4, 8, 12 ve 16. günlerde flow sitometrik analizleri gerçekleştirildi. Hücrelerin CD38 etkinliği zamanla artarken; CD34 yüzdelerinin zamanla azaldığı belirlendi (Şekil 4-37).



Şekil 4-37: İkinci faz sırasında hücrelerin CD34 yüzdesi

4.3.12. İnterlökin 6'nın Lenfositler Üzerindeki Etkisi

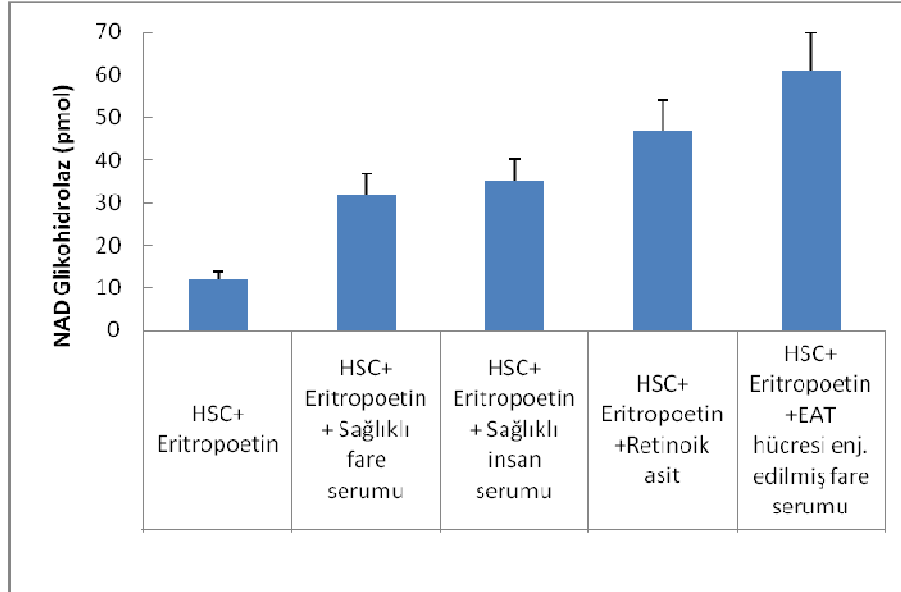
Invitro koşullarda sağlıklı ve kanserli fare lenfositleri ile yapılan çalışmada lenfosit sayısı 5×10^5 olarak belirlendi. IL-6'nın lenfositler üzerindeki etkisinin izlenmesi amacıyla, ekimi gerçekleştirilen lenfositlerin üzerine yapay olarak doğrudan iki farklı konsantrasyonda (10 ng/ml ve 100 ng/ml) interlökin 6 eklendi. Lenfosit membran proteinlerinin yedi gün sonraki NAD Glikohidrolaz etkinliği araştırıldı ve İnterlökin 6'nın CD38'in anlatımını indükleyici bir etki göstermekte olduğu belirlendi (Şekil 4-38).



Şekil 4-38: Lenfositlerin invitro koşullarda IL-6 varlığında NAD Glikohidrolaz etkinliği değişimi

4.3.13. Hematopoetik Kök Hücrelerin Çeşitli Sitokin ve Faktörler Varlığında NAD Glikohidrolaz Etkinlik Değişimi

5×10^5 CD34(+)/ALDH(+)/CD38(-) hematopoetik kök hücre ile yapılan çalışmada birinci kuyuya sadece eritropoetin, ikinci kuyuya sağlıklı Balb/c serumu, üçüncü kuyuya sağlıklı insan serumu, dördüncü kuyuya retinoik asit, beşinci kuyuya ise Ehrlich tümörlü fare serumu eklendi. 7 gün sonra üst sıvılarındaki NAD Glikohidrolaz etkinliğine bakıldı. Ehrlich tümörlü fare serumunun eklendiği kuyuda CD38 anlatımının diğer kuyulara göre bir artış gösterdiği görüldü (Şekil 4-39).



Şekil 4-39: Serum ve sitokinlerin hematopoetik kök hücrelerin NAD glikohidrolaz etkinliği üzerindeki etkisi

5. TARTIŞMA

Doğada yaygın olarak bulunan NAD glikohidrolazlar, uzun süreden beri bilinen, etki mekanizmalarının oldukça iyi tanımlanmış olduğu düşünülen, ancak yakın zaman öncesine dek işlevleri üzerinde -hidrolitik özellikleri nedeniyle yıkım süreçlerinde oynadıkları olası rollerinin ötesinde- fazla durulmayan bir enzim sınıfını oluşturmuşlardır. *Aplysia californica* (deniz salyangozu)'dan elde edilen bir enzimin NAD'yi nikotin amit grubunu ayrıştırarak siklik ADP-riboza(cADPR) dönüştürdüğüününün; cADPR'nin ise Ca^{2+} un hücre içi depolarından, inositol 3-fosfat sürecinden bağımsız bir biçimde açığa çıkardığının (133) bulunması bu konudaki görüşleri kökten değiştirmiştir. Lenfosit farklılaşma antijeni CD38'in aynı şekilde NAD glikohidrolaz etkinliğinin yanı sıra ADPR siklaz etkinliği de göstermesi ayrıca bilinen pek çok farklı diğer NAD glikohidrolaz enziminin de siklaz etkinliği içermesi bu enzimleri günümüzün önemli bir araştırma konusu konumuna getirmiştir.

Kinetik çalışmalar her iki tepkimenin (glikohidrolaz ve siklaz) yakın ilişkili olduğunu, enzimatik sürecin NAD kompleksinin bir ortak ara ürün üzerinden hidroliz ya da molekül içi halkalaşma yönünde ayrışarak ADPR ya da cADPR oluşumuna yol açtığını göstermektedir ('partition mechanism') (134).

NAD glikohidrolaz ve ADPR siklaz tepkimelerinin izlenmesinde değişik yöntemler kullanılmaktadır. Radyoaktif nikotinamid ya da adenin grubu üzerinden işaretlenmiş NAD türevlerinin kullanıldığı yöntemlerde, ortaya çıkan ürün tepkime sonrası yürütülen çeşitli kromatografik ayrıştırma tekniği (ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi ya da HPLC) aracılığıyla tanımlanabilmektedir. Ancak, bu yolla ürünlerin tanımlanması uzun süreler gerektirmektedir; dolayısı ile çok sayıda örnek ile çalışılan ya da hızlı kinetikler gerektiren deneyler için uygun değildir. Ethano-NAD ve NGD gibi, tepkimeler sonunda ethano-ADPR ve cGDPR gibi floresan ürünler veren bileşiklerin substrat olarak kullanılmaya başlanmasıyla radyoaktif substratlarla çalışmalarda karşılaşılan zorlukların aşılması mümkün olmuştur. Ayrıca, siklaz etkinliği sonucu ortaya çıkan cGDPR'nin, cADPR'nin aksine hidrolitik etkilere dirençli olması bu

etkinliğin çok daha sağlıklı biçimde araştırılmasını sağlamaktadır. Bu nedenlerle sözkonusu tepkimelerin floresans spektrometrik yöntemlerle incelenebilmesi çalışmalara son yıllarda büyük bir ivme sağlamıştır.

CD38, enzimatik özelliklerinin yanı sıra reseptör etkinliğine de sahiptir. Bu etkinliğin hücre içi sinyal iletisi yoluyla hücre çoğalması ve farklılaşma süreçlerinde rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer yandan, CD38'in enzimatik özellikleri ve reseptör benzeri davranışı arasındaki ilişkisi bilinmemektedir. CD38, etki biçimi ve fizyolojik işlevi açısından araştırılmaya değer bir sistem olarak öne çıkmaktadır. Albeniz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, farklı hasta gruplarından elde edilen eritrositlerde CD38 etkinliğine karşılaştırmalı olarak bakılmış ve kanserli hasta eritrositleri ile sistemik hastalıkların eritrositlerindeki bu aktivite, kontrollere oranla yüksek bulunmuştur. Kanserli hasta eritrositlerinde bu etkinlikteki yükselmeler özellikle anlamlıdır. Aynı zamanda yüksek CEA değerli kanser olgularında 45 kDa molekül ağırlığına karşılık gelen eritrosit protein bandının CD38'e özgü antikor aracılı "Western emdirim" sisteminde verdiği sinyaldeki artış kanser hastalığı sürecinde CD38 indükleyici bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir.

Kanser hastalarındaki CD38'i indükleyici etkinin bazı serum faktörlerinin varlığından kaynaklanacağını düşündürmüştür. Bu gözleme açıklık getirmek üzere Ehrlich asit hücrelerinin aktarıldığı Balb/c farelerin kullanılarak oluşturulduğu bir model sistemde, CD38 ilişkili enzim etkinliklerinde anlamlı artışlar bulunmuştur. Benzer artışlar Ehrlich asit hücrelerinin aktarılmasıyla tümör oluşturulan Balb/c farelerinden alınan serum ve insan kökenli yüksek CEA değerli kanserli hasta serumlarının normal Balb/c'lere enjekte edilmesi sonrasında zaman kinetiği yapılarak alınan CD38 etkinliği sonuçlarında da gözlenmiştir.

Kanser, içerisinde bulunduğumuz modern çağın en ciddi hastalığı olup, insan ölümlerine yol açan nedenler arasında önemli bir yere sahiptir. Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır. Günümüzde kanser ile mücadelede çok ciddi çabalar ve yüksek miktarlarda bütçeler harcanmaktadır. Bu tez çalışmasında Balb/c'lerde kanser modelini EAT hücreleriyle oluşturduktan sonra kanser süreci boyunca hücre yüzey antijeni olan CD38'in rolünün incelenmesi çalışmanın amaçlarından birini oluşturmaktadır.

Bu çalışmada öncelikli olarak, kanser hastalarında görülen NAD⁺ glikohidrolaz ve floresan şiddetlerindeki artışın uygun bir hayvan modeli oluşturularak kan örneklerinden elde edilen serum ve eritrosit kesimlerinde aynı etkinin oluşturulması amaçlanmıştır. Bu hususta, EAT hücreleri Balb/c türü farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve daha sonra enzim etkinlikleri tümör gelişimlerine paralel olarak takip edilmiştir. Genel olarak, bu hayvanların içinde asit tümör gelişimi EAT hücre enjeksiyonunu takiben 10-12 gün sonra gözlenmiştir.

Yaptığımız üçlü gruplu çalışmada Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilmiş fareler üzerindeki CD38 etkinliği değişiminin izlendiği çalışmamızda NAD⁺ glikohidrolaz ve GDP-ribozil siklaz etkinliklerinin kontrol grubuna oranla belirgin bir artış sergilediği belirlenmiştir. Kanserli olgulardaki bulgular doğrultusunda (135) EAT hücresi enjeksiyonu yapılmış olan Balb/c'lerin eritrositleriyle yapılan Western emdirim deneyinde, 45 kDa'luk bölgede CD38 reaktif protein bantı saptanmıştır. Bu farelerin Ehrlich hücresi enjeksiyonlarından sekiz gün sonra 45 kDa bandı görünür olup; onikinci günün sonunda maksimum yoğunluk kazanmıştır. Aynı grupların lenfosit membran proteinleriyle yapılan çalışma sonucunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunda anti-CD38 bantına rastlanmazken Ehrlich hücresi enjekte edilmiş grupta yine sekizinci günde bant görülüp, onikinci günde maksimum yoğunluk kazanıp yirminci güne kadar bu yoğunluğu korumuşlardır.

Bu sonuçlar, CD38 anlatımı üzerine olan uyarıcı etkisi olarak bazı serum faktörlerin varlığını düşündürmektedir. Konak hücre cevabı, tümör büyümesi ve metastazda, pro ve antiinflamatuvar sitokinlerin önemli rolleri olduğu bilinmektedir (136).

Bu nedenle, sitokinler tümör belirteci olarak ve hastalığın prognostik değerlendirmesinde artan yaygınlıkla kullanılmaktadır. Ancak bu bulgular aynı zamanda iltihap sitokinlerinin karmaşık etki biçimine de işaret etmektedir. Sitokinlerin tümör fizyopatolojisi açısından bu çelişkili etki mekanizmaları CD38'in kanser sürecine bağlı anlatımı bağlamında dikkate değer bir husus olarak öne çıkmaktadır. Nitekim CD38'e özgü agonistik monoklonal antikorların etkisiyle durağan insan monositlerinin aktifleşerek IL-1 β , IL-6 ve IL-10 salgılamaya başladıkları bildirilmiştir (137).

Bu nedenle çalışılacak olan kanserli hastaların serumlarında IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α düzeylerine ve NAD Glikohidrolaz etkinlik değerlerine bakılmıştır. Ardından, tümör gelişmiş farelerin hem serum ve asit sıvı örnekleri hem de insan kökenli kanserli hasta serum örnekleri ile deneyler tekrarlanmıştır. Deney seti kurulmadan önce çalışılacak olan kanserli hasta serumlarında bazı interlökin düzeyleri incelenmiştir. Kanserli (>100 ng/ml olan kanser hastalarında) CEA değerlerine sahip serumların verildiği gruplardaki Balb/c'lerden elde edilen serum, eritrosit hayalet ve lenfosit membran proteinlerinde NAD Glikohidrolaz etkinliklerine bakıldığında, canlı Ehrlich hücreleri enjekte edilmiş gruba benzer bir CD38 indükleyici etkisi bu enjekte edilen serumlarda da olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bu etkinlik, yine 45 kDa anti-CD38 reaktif bant Western bantı olarak ortaya çıkmıştır. Kontrol fare ve sağlıklı birey serumlarının verildiği grupta ise herhangi bir artış görülmemiştir. Aktivite eritrositlerde 12.günden itibaren yavaş yavaş azalmış; 20. gün itibariyle kontrol düzeyine inmiştir. Ancak lenfositlerde bu etkinlik 20. güne kadar devam etmiştir.

Bugün kanseri önlemede en umut verici strateji, kemoterapidir. Kemoterapi, insanda kanser gelişimini önleyici sentetik veya doğal maddelerin (yalnız başına veya birlikte) kullanımı olarak tarif edilir. Bizim yaptığımız çalışmada amacımız, iyileşme süreci boyunca hücre yüzey antijeni olan CD38'in rolünün incelenmesidir. Endoksan, siklofosfamidin sitotoksik etkisi, alkilenmiş metabolitleri ile DNA arasındaki etkileşmeye dayanmaktadır. Bu alkilasyon DNA zincirinde ve DNA-protein çapraz bağlarında kırılma ve bağlanmalarla sonuçlanır. Hücre siklusunda, G2 fazında geçişi geciktirir.

Kemoterapik ajan olarak Endoksan'ın kullanıldığı çalışmamızda, Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edilmiş fareler üzerindeki etkisi incelenerek CD38 etkinliğinin değişimi izlenmiş ve Ehrlich asit tümör hücresi verilmiş ve Endoksan kemoterapik ajanının verildiği grupta kanların NAD Glikohidrolaz değerlerine bakılmıştır. Etkinliğin kontrol grubuna oranla 250 mg/kg Endoksan verilen grupta anlamlı derecede bir düşüş sergilendiği belirlenmiştir. Western emdirim analizlerinde de aynı şekilde düşük dozdan yüksek doza doğru sinyalde düşüş olduğu kaydedilmiştir.

Diğer bir çalışma ise, kanser hastalarında CD38'i indükleyen faktörlerin özellikle iltihaba yol açan interlökinler grubunun temsilcileri (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12) ile ilişkisini ve CD38'i indükleme süreçlerinin izlenmesi olmuştur. ELISA test sisteminin kullanıldığı deneylerimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre yüksek CEA değerine sahip kanserli hasta serumlarının CEA değerleri arttıkça IL-6 ve TNF- α değerlerinin de arttığı belirlenmiştir. IL-10 düzeylerinde ise bu parametre ile bir korelasyon göstermeksizin artış saptanmıştır.

CD38 eritroid anlatımının hangi evrede başladığının, ne düzeyde gerçekleştiğinin ve bu ortama eklenen kanserli hasta serumunun yada interlökinin etkilerini belirlemek amacıyla hematopoetik kök hücrelerle çalışma uygun görülmüştür. İnsan organizmasında eritrositler, miyeloid hücreler, trombositler kemik iliğindeki kök hücreleri tarafından başlatılan farklılaşma ve matürasyon süreci sonucunda oluşmaktadır. Kök hücreleri kendilerini yenileyebilme, proliferasyon ve farklılaşma gösterebilen tipleri eritroid seri, miyeloid seri ve megakaryositik seri ile lenfoid serilerin her biri için birer unipotansiyel kök hücre olduğu kabul edilmektedir (6). CD38 ilişkili araştırılacak hematopoetik kök hücreler, kemik iliğinde, bebek göbek kordon kanında ve çevre kanında bulunan özel yöntemlerle erişkinde belli büyüme faktörlerinin yardımı ile üretilebilen ve kan hücrelerine dönüşebilen kök hücreleridir.

Kordon kanının dondurulması ve çözülmesi türü işlemler sırasında membran hasarına uğrayan hücreler ALDH reaksiyonuna ait ürünü kaybeder ve sonuçta tüm ALDH+ hücreler saptanamayabilir. Bu sebepten dolayı kordon kanından progenitor hücre saflaştırması yaptığımız çalışmamızda taze kordon kanı ile çalışılmıştır. CD34+ seleksiyon aşamasından sonra ALDH seçimine gidildiği için arada zamandan ve ortamdan kaynaklanan canlılığı bozulmuş hücreler olabilmektedir. BAA sayesinde bu canlılığı bozulmuş hücreler saflaştırma dışı bırakılmıştır. ALDH aktivitesi analizi yapıldığından canlılık boyası olan 7-aminoaktinomisin D (7-AAD) ilave edilmesine gerek kalmadan izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Monositler ALDH+ popülasyonu etkilediğinden analiz yapılırken monositler ayrılarak yapılması gerekmektedir. Monositler diğer lökositlerden daha fazla ALDH aktivitesine sahiptir; bu nedenle ALDH reaksiyonu öncesi CD14 antikoru ile monositlerin boyanması ALDH+ popülasyonun daha iyi ayrıt

edilmesini sağlar ya da CD34/CD38 grafiğinde monositlerin kapı alınarak analiz sırasında dışlanması gerekmektedir (138). Biz çalışmamızda CD34, CD38, ALDH antikörlerini işaretlemeye kullandık ve ardışık kapılar alırken monositleri kapı olarak analiz dışı bıraktık.

ALDH⁺ hücrelerin çoğunda CD34'ün de pozitif olduğunu ancak bazı hücrelerin ya CD34 ya da ALDH eksprese ettiğini Storms ve arkadaşları (139) yaptıkları çalışmada gösterdiler. Bulgularına göre; farklı serilere gelişim sağlayabilen ilkel progenitör hücrelerin birçoğu ALDH⁺CD34⁺ hücre grubundaydı ve kısa süreli miyeloid progenitörlerden zengindi, ALDH⁻CD34⁺ hücrelerde ise ilkel progenitör sayısı ve kısa süreli miyeloid potansiyel azdı. Bizim yaptığımız kordon kanından saflaştırılan CD34⁺ hücrelerin ALDH-FITC işaretlenmeleri sonucunda aldığımız floresan mikroskop ve flow sitometrik analizinde CD34⁺ olan hücrelerin birçoğunun ALDH⁺ olduğu görüldü. Armstrong ve arkadaşları (140) yaptıkları hayvan çalışmasında ALDH⁺Lin⁻ hücrelerin tipik primitif hematopoetik öncül hücreler olduğunu ve in vitro hematopoetik progenitör fonksiyonun Lin-ALDH⁺ grupta ALDH⁻ gruptan daha yüksek olduğunu gösterdiler. Bu hücreler daha yüksek telomeraz aktivitesi ve S fazında en az hücreye sahipti. Araştırmacılar yukarıda saptanan bulgular ışığında ALDH⁺ hücrelerin diğer hücrelerden ayrılarak izole edilmesiyle en primitif hematopoetik kök hücrelerin izole edilebileceğini ve klinik uygulamalarda kullanılabileceğini belirttiler(141). Analiz için kullanılan çok renkli flow sitometre ve saflaştırmada kullanılan yüksek hızlı hücre saflaştırma cihazı bu alandaki çalışmalarda kullanılan başlıca cihazlar olmuştur.

CD34⁺CD38⁻ hücreler, progenitör hücrelerin ilkel alt popülasyonlarıdır. Hao ve arkadaşlarının sonuçlarına göre kordon kanındaki CD34⁺CD38⁻ hücreler erişkin kemik iliği ile aynı immünofenotipi göstermekte fakat kordon kanından elde edilen bu hücreler SCF ve IL-6 varlığında kemik iliğine göre 7 kat daha hızlı çoğalmı göstermektedirler.

Bu bilgiler ışığında yaptığımız kordon kanından progenitör hücre seçimi sırasında ALDH⁺ / CD34⁺ / CD38⁻ hücrelerle çalışılmıştır. Hematopoetik hücreler eritropoetik gelişim süreci boyunca eritroblast/normoblast aşamasına kadar izlenmiştir. Seçim işlemi yapılmadan önce kordon kanı lökosit kesiminin

incelendiği floresan mikroskop görüntülerinde görülmüştür ki tüm kullanılan antikorlara sahip hücreler bu kesitte mevcuttur. Ardından yapılan CD34⁺ hücre seçiminden sonra yapılan işaretleme ile alınan görüntülerde, bu hücrelerin büyük bir kısmının ALDH⁺ fakat bir kısım CD38⁺ hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu CD38⁺ olan hücrelerden yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı kurtulmak için kullanılan FACS (floresanla aktive edilmiş hücre ayrıştırması) ile hücre toplanması aşamasında magnetik boncuklarla saflaştırılan CD34⁺ hücrelerden ALDH⁺CD38⁻ olan hücre grubu toplanmıştır. Bununla beraber eritroid farklılaşması sırasında 2. fazda CD38 aktivitesinin 8. günden itibaren belirgin bir şekilde arttığı hem NAD Glikohidrolaz etkinlik testiyle hem de SDS-PAGE elektroforezi sonrası yapılan Western emdirim tekniğiyle tespit edilmiştir.

Povsic ve arkadaşları (142) ise ALDH⁺ hücreler periferik kana geçmekte midir ve saptanabilir mi sorularının yanıtını kardiyak kateterizasyon yaptıkları hastalarında ALDH aktivitesine bakarak araştırdılar (143). Mobilizasyon yapılmadan periferik kanda dolaşan öncül hücrelerin saptanabileceğini gösterdiler. Fallon ve ark. (144) otolog kök hücre nakli için kemoterapi+G-CSF ile mobilizasyon yaptıkları hastaların periferik kan örneklerinde ALDH⁺ hücrelerin saptanabileceğini gösterdiler. ALDH⁺ hücre grubu CD133⁺CD34⁺CD38⁻ hücrelerden zengindi ve kültürde koloni oluşturma özelliğine sahipti. Bu da mobilize periferik kandaki ALDH⁺ hücrelerin ilkel hematopoetik hücrelerin fenotipik özelliklerine sahip oldukları sonucuna vardırıdı.

Kordon kanından FACS (floresanla aktive edilmiş hücre ayrıştırması) ile progenitör hücre seçimi sırasında ALDH⁺ / CD34⁺ / CD38⁻ hücreler toplanmıştır. Panzenboeck ve arkadaşları kordon kanı kökenli hematopoetik kök hücrelerin kırmızı kan hücrelerine farklılaşmaları için gerekli ortamı tanımlamışlardır. Daha genişletilmiş bir çalışma yaparak in vitro koşullarda çalışma yürütüp kök hücreler 2 fazlı kültür çalışmasına alınmıştır. 10 gün birinci fazda tutulan hücreler bu sürenin sonunda farklılaştırma evresi olan ikinci faza alınmış ve bu medyumda 16 gün tutulmuştur. Toplam 26 günlük sürecin sonunda progenitor hücrelerin Megacult c-staining kit ile boyanma suretiyle çekirdeklendikleri ve 8-10 µm büyüklüğündeki eritroid seri hücrelere farklılaştıkları belirlenmiştir. Bu süreç boyunca alınan üst sıvı örneklerinin NAD Glikohidrolaz etkinlik değerlerinde de zamanla gösterdikleri

bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu etkinliğin arttığını aynı zamanda yapılan SDS-PAGE sonrası Western emdirim tekniğiyle de 45 kDa anti-CD38 reaktif bantta sekizinci gün itibari ile artış gösterdiği görülmüştür.

Bu hücrelerle yapılan diğer bir çalışma ise çoğalma miktarlarının belirlendiği deneydir. Facs ile ALDH⁺ / CD34⁺ / CD38⁻ hücrelerin toplanması aşamasından sonra alındıkları iki ayrı medyum ortamında farklı çoğalmı indeksi verdikleri belirlenmiştir. Birinci kuyuda sadece kök hücre faktörü içeren medyum ortamı varken diğer kuyuda kök hücre faktörünün yanı sıra eritropoetinde bulunmuştur. Eritropoetin 34 kDa molekül büyüklüğüne sahip glikoprotein hormondur. Hematopoetik progenitor hücrelerin kırmızı kan hücrelerine farklılaşmasından sorumludur (145). Farklılaşma, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklılaşma sitokinlerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin kombine etkisiyle başarılan karmaşık olaylar bütünüdür. Farklılaşma aşamasına giren hücre, bir yandan bölünmeyi durdururken diğer yandan çevresinden gelen sinyallere yanıt vermeye hazırlanır. Bunun için genellikle enzim-bağımlı yüzey ve hücre içi reseptörler ve aktivasyon yolları ortaya çıkarak hücrede uzun erimli olayların başlamasını tetikler. Sadece kök hücre faktörü içeren kültür ortamındaki hücrelerin düzgün doğrusal bir grafik verecek şekilde çoğalmasının yanında, eritropoetinin içeren kültür ortamındaki progenitor hücrelerin yukarıda sayılan nedenlerden dolayı onikinci günden sonra çoğalma hızlarının azaldığı belirlenmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada ise lenfositlerde görülen NAD Glikohidrolaz etkinliğindeki artışlardaki sitokinlerin etkisi izlenmek üzere, sağlıklı ve kanserli hasta lenfositleri üzerine invitro koşullarda yapay olarak eklenen interlökin 6'nın yedi gün sonra NAD Glikohidrolaz etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. İnterlökinlerin tümör fizyopatolojisi açısından etki mekanizmaları, CD38'in kanser sürecine bağlı anlatımı bağlamında dikkate değer bir husus olarak öne çıkmaktadır. CD38'e özgü agonistic monoklonal antikorların etkisiyle durağan insan

monositlerinin aktifleşerek IL-1b, IL-6 ve IL-10 salgılamaya başladıkları bildirilmiştir.

Son olarak CD34⁺ /ALDH⁺ /CD38⁻ hematopoetik kök hücrelerle yapılan çalışmada retinoik asitin ve EAT hücresi enjekte edilmiş fare serumlarının etkisi izlenmiştir. İn vitro koşullarda hematopoetik kök hücre üzerine eklenen EAT hücreli Balb/c serum ve ayrıca retinoik asit eklenen medyum ortamından 7 gün sonra alınan üst sıvı örnekleri incelendiğinde retinoik asitinde, kanserli Balb/c serumunda NAD Glikohidrolaz etkinliğinde artışın olduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

CD38'in eritrosit ve lenfosit gelişimine bağlı olarak çıktığı somut olarak model hücre sistemlerinde, örneğin HL-60 hücrelerinde retinoik asitin lenfosit farklılaşması yönünde indüklediği ve etkinliğin ortaya çıktığı gösterilmiştir (146). CD38 indüksiyonu tüm deney hayvanlarından hem eritrosit hem de lenfositlerle birlikte kültürdeki periferik lenfositlerden de elde edilmiştir. Bu indüksiyonun hematopoetik hücre kökenlerinde ve ayrıca farklı farklılaşma seviyelerinde meydana geldiği gösterilmiştir. CD38 indüksiyonunun çoğalma sürecinde bazı proinflamator sitokinler üzerinden muhtemel tetiklenişi çoğalma veya apoptotik süreci birlikte içeren bir olay olabilir. Bu CD38'in bir enzim, reseptör ve adhezyon molekülü olarak çok yönlü kimliği üzerinden pleiotropik etkileri uyguladığı veya aracılık ettiği görülmektedir. Reseptörel özellikleri ve çeşitli sinyal yolları ile işbirliği üzerinden CD38, hücreleri apoptozdan korunmaktadır. Böylece onların yaşama şanslarını arttırmakta, onlara artmış bir çoğalma potansiyeli sunmakta ve habisliğine katkıda bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Wall K.A., Klis M., Kornet J., Coyle D., Amé J.C., Jacobson M.K., Slama J.T. Inhibition of the intrinsic NAD⁺ glycohydrolase activity of CD38 by carbocyclic NAD analogues. *Biochem. J.* 1998; 335:631–636.
- 2- Wall K.A., Klis M., Kornet J., Coyle D., Ame J.C., Jacobson M., and Slama J.T. Inhibition of the intrinsic NAD⁺ glycohydrolase activity of CD38 by carbocyclic NAD analogues: *Biochem. J.* (1998) 335, 631-636.
- 3- Maehama T., Nishina H., Hoshino S., Kanaho Y., Katada T. NAD⁺-dependent ADP-ribosylation of T lymphocyte alloantigen RT6.1 reversibly proceeding in intact rat lymphocytes. *J Biol Chem* 1995;270:22747-22751.
- 4- Todisco E., Suzuki K., Srivannaboon K., Smith C.E., Raimondi C.S., Behm G., Kitanaka A., Campana D. CD38 ligation inhibits normal and leukemic myelopoiesis. *Blood.* 2000;95(2):535-542.
- 5- McNagny K.M., Cazenave P.A., Cooper M.D. BP3 alloantigen: A cell surface glycoprotein that Marks early B lineage cells and mature myeloid lineage cells in mice. *J Immunol.* 1988; 141: 2551-2557.
- 6- Akel S., Perrow S.C., Laughlin J.M., Ruscett W. Neutralization of Aytocrine Transforming Growth β Factor- β in Human Cord Blood CD34⁺ CD38^{Lin}⁻ Cell Promotes Stem Cell Factor-Mediated Erythropoetin-Independed Early Erythroid Progenitor Development and Reduces Terminal Differentiation. *Stem Cells* 2003;21:557-567.
- 7- Kierszenbaum A.L. *Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş.* Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir, 2006; 87.
- 8- Weissman I.L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
- 9- Gardner R.L., Brook F.A. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol.* 1997;41:235.
- 10- Okarma T.B. Human primordial stem cells. *Hastings Cent Rep.* 1999; 29(2): 30.
- 11- İnan S., Özbilgin K. *Kök Hücre : Biyolojik ve Klinik Yaklaşım, Kök Hücre Biyolojisi Sağlıkta Birikim Cilt 1 Sayı 5.*

- 12- Demirsoy A. The Evolutionary Tale Of Aging And Death. Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri 1998; 1(1): 1-12.
- 13- Clare O'Connor. Telomeres of Human Chromosomes. Nature Education 2008 .
- 14- Klug W.S., Cummings M.R. Genetik kavramlar (Altıncı baskıdan çeviri). Palme Yayıncılık. Ankara, 2002.
- 15- Mitchell K.E., Weiss M.L., Mitchell B.M., Martin P. Matrix cells from Wharton's jelly from neurons and glia. Stem cells, 2003; 21(1):50-60.
- 16- Karaöz E., Ovalı E. Kök hücreler, 2004.
- 17- <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixC.asp>
- 18- Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. Stem cells: Hype and reality. Hematology, 2002; 1:369-391.
- 19- Mitchell K.E., Weiss M.L., Mitchell B.M., Martin P. Matrix cells from Wharton's jelly from neurons and glia. Stem cells, 2003; 21(1):50-60.
- 20- <http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/stemcells/images/graphic03.gif>
- 21- Coraux C., Nawrocki-Raby B., Hinrasky J. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2005;32: 87-92.
- 22- Ganz T. Paneth cells—guardians of the gut cell hatchery. Nature Immunology. 1: 99 – 100, 2000.
- 23- Valcz G., Krenács T., Sipos F., Leiszter K., Tóth K., Balogh Z., Csizmadia A., Múzes G., Molnár B., Tulassay Z. The Role of the Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in Colonic Epithelial Regeneration. Pathol Oncol Res. 2010.
- 24- Drukker M., Benvenisty N. The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. Trends Biotechnol 2004; 22(3):136-41.
- 25- [http://www.prayersforthepeople.com/sitebuildercontent/sitebuilderpictures/stem cells.jpg](http://www.prayersforthepeople.com/sitebuildercontent/sitebuilderpictures/stem%20cells.jpg)
- 26- http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_stem.pdf
- 27- <http://www.bayar.edu.tr/~saglik/sagliktabirikim/5/2.pdf>
- 28- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 6; 282 (5391):1145-1147.
- 29- BioTime Begins First Complete Database of Human Stem Cell Differentiations. June 30, 2008.

- 30- Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006; 27(2): 208-219.
- 31- Ross J., Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(4): 237-242.
- 32- Li Z., Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31(10): 589-595.
- 33- Chen Z.X., Chang M., Peng Y.L., Zhao L., Zhan Y.R., Wang L.J., Wang R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes: *Regul Pept.* 2007; 142(1-2):16-23.
- 34- Pansky A., Roitzheim B., Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab.* 2007; 53(1-2): 81-84.
- 35- Yamada Y., Yokoyama S.I., Wang X.D., Fukuda N., Takakura N. Cardiac stem cells in Brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow non-hematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. *Stem Cells.* 2007; 25(5): 1326 -1333.
- 36- İnan S., Özbilgin K., Sağlıkta Birikim Dergisi Cilt 1 Sayı 5, Kök Hücre: Biyolojik Ve Klinik Yaklaşım 11, Kök Hücre Biyolojisi.
- 37- Audet J., Miller C.L., Rose-John S., Piret J.M., and Eaves C.J. Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; 98: 1757–1762.
- 38- Lickliter J.D., McGlave P.B., DeFor T.E., Miller J.S., Ramsay N.K., Verfaillie C.M., Burns L.J., Wagner J.E., Eastlund T., Dusenbery K., and Weisdorf D.J. Matched-pair analysis of peripheral blood stem cells compared to marrow for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26: 723–728.
- 39- Sharp J.G., Kessinger A., Lynch J.C., Pavletic Z.S., and Joshi S.S. Blood stem cell transplantation: factors influencing cellular immunological reconstitution. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2000; 9: 971–981.
- 40- Rizo A., Vellenga E., Haan G., and Jan Schuringa J. Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche?, *Human Molecular Genetics*, 2006; 2: 210–219.

- 41- Ross J., Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(4): 237-242.
- 42- American Society of Hematology, 2006. ISSN: 1931-6860.
- 43- Gluckman,E., Rocha V., Arcese W. Factors associated with outcomes of umbilical cord blood transplantation: Guidelines for donor choice. *Exp. Hem.* 2004; 2:397-407.
- 44- http://www.tuba.gov.tr/userfiles/file/dosyalar_tr/KokHucreKitabi2pdfdosyalar%C4%B13_bolum.pdf
- 45- Can A. Kök Hücre Tanımları, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar- 1.
- 46- Sell S. *Stem Cells Handbook.* 2004;Humana Press, Totowa.
- 47- Svendsen C.N., Ebert A.D. *Encyclopedia of Stem Cell Research.* 2008; Vol 1 &2. SAGE Publications, USA.
- 48- Kuby Cells and organs of immun system, *Immunology,* 1997; 3: 47-83.
- 49- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Part I. *An Introduction to Immunobiology and Innate Immunity.* 5th edition New York and London. Immunobiology, 2001.
- 50- Kansu E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36:191-197.
- 51- Aydın F., Gürtekin M., (Edit:Çarin MN), İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, Nobel Tıp Kitapevi. *Tıbbi Biyoloji,* 2002; 300-304.
- 52- Kufe D.W., Pollock R.E., Weichselbaum R.R., Bast R.C., Ted S., Holland J.F., (Edit:Frei III Emil). *Hematopoietic System ed.* Hamilton (Canada). *Cancer Medicine.* 2003; 6:34.
- 53- Neildez-Nguyen T.M., Wajcman H., Marden M.C., Bensidhoum M., Moncollin V., Giarratana M.C., Kobari L., Thierry D., and Douay L.. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nature Biotechnology* 2002; 20: 467–472.
- 54- Dorn I., Lazar-Karsten P., Boie S., Ribbat J., Hartwig D., Driller B., Kirchner H., and Schlenke P. In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transplantation And Cellular Engineering.* 2008;48: 1122 – 1132.

- 55- Morrison S. J., and Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer *Nature* 441: 1068-1074.
- 56- Baum C.M., Weissman I.L., Tsukamoto A.S., Buckle A.M., and Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; 89: 2804–2808.
- 57- Chen J., Astle C.M., and Harrison D.E. Development and aging of primitive hematopoietic stem cells in BALB/c by mice. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 928–935.
- 58- Mehta K., Shahid U., and Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions with multiple functions. *FASEB J.* 1996; 10, 1408-1417.
- 59- Alessio M., Roggero S., Funaro A., De Monte L.B., Peruzzi L., Geuna M., Malavasi F. CD38 molecule: Structural and biochemical analysis of human T lymphocytes, thymocytes and plasma cells *J Immunol.* 1990; 145: 878-884.
- 60- Katz F., Powey S., Parker M., Schneider C., Sutherland R., Stanley K., Solomon E., Greaves M. Chromosome assignment of monoclonal antibody-defined determinant on human leukemic cells. *Eur J Immunol.* 1983; 13: 1008-1013.
- 61- McNagny K.M., Cazenave P.A., Cooper M.D. BP3 alloantigen: A cell surface glycoprotein that Marks early B lineage cells and mature myleoid lineage cells in mice. *J Immunol.* 1988; 141: 2551-2557.
- 62- Krishnaswamy G., Kang B.N., Panettieri A.R., Douglas N., F Walseth T., and Kannan M.S. Regulation of the CD38 promoter in human airway smooth muscle cells by TNF- α and dexamethasone *Respiratory Research.* 2008; 9:26
- 63- Grant A.O., John J.E., Nesterenko V.V., Starmer C.F., Moorman J.R. The role of inactivation in open-channel block of the sodium channel: studies with inactivation-deficient mutant channels. *Mol Pharmacol.* 1996:1643-1650
- 64- Maehama T., Nishina H., Hoshino S., Kanaho Y., Katada T. NAD⁺ -dependent ADP-ribosylation of T lymphocyte alloantigen RT6.1 reversibly proceeding in intact rat lymphocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270: 22747-22751.
- 65- Santos-Argumedo L., Teixeira C., Preece G., Kirkham P., Parkhouse R.M.E. B lymphocytes surface molecule on mediating activation and protection from apoptosis via calcium channel. *J Immunol.* 1993; 151: 3119-3130.
- 66- Zocchi E., Franco L., Guida L., Benatti U., Bargellisi A., Malavasi F., Lee H.C., De Flora. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺

glycohydrolase, ADP-ribosylcyclase and ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 196: 1459-1465.

- 67- Koch-Nolte F., Hang F. Mono ADP- ribosyl transferases and related enzymes in animal tissues-emerging gene families. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 419:1-13.
- 68- Funaro A., Horestein A.L., Malavasi F. Human CD38: A versatile leukocyte molecule with emerging clinical perspectives. *Fund Clin Immunol.* 1995; 3: 101-104.
- 69- Funaro A., Reinis M., Trubiani O., Santi S., Di Primio R., Malavasi F. CD38 functions are regulated through an internalization step. *J Immunol.* 1998; 160: 2238-2247.
- 70- Miler E.G. Effect of deoxyribonuclease I on the number and length of chains of poly (ADP-ribose) synthesised, in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 66: 280-286.
- 71- Kukimoto I., Hoshino S., Kontani K., Inegeda K., Wishina H., Takahashi K., Katada T. Stimulation of ADP-ribosyl cyclase activity of the cell surface antigen CD38 by zinc ions resulting from inhibition of its NAD⁺ glycohydrolase activity. *Eur J Biochem.* 1996; 239: 177-182.
- 72- Cesano A., Visonneau S., Deaglio S., Malavasi F., Santoli D. Role of CD38 and its ligand in the regulation of MHC-nonrestricted cytotoxic T cells *J Immunol.* 1998; 160: 1106-1115.
- 73- Kirkham P.A., Santos-Argumedeo L., Harnett M.M., Parkhouse R.M. Murine B cell activation via CD38 and protein tyrosine phosphorylation. *Immunology.* 1994; 83: 513-516.
- 74- Zupo S., Isnardi L., Megna M., Masssara R., Malavasi F., Dono M., Cosulich E., Ferrarini M. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood.* 1996; 88: 1365-1374.
- 75- Zupo S., Rugari E., Dono M., Taborelli G., Malavasi F., Ferrarini M. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevent apoptosis of human germinal center B cells . *Eur J Immunol.* 1994; 21: 1218-1222.

- 76- Funaro A., Morra M., Calosso L., Zini M.G., Ausiello C.M., Malavasi F. Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*. 1997; 49:7-15.
- 77- Lehninger A. *Principles of Biochemistry*, 2 Edition, Worth Publishers. 1993.
- 78- Silnennoinen O., Nihigaki H., Kitanaka A., Kumagai M., Ito C., Malavasi F., Lin Q., Conley M.E., Campana D. CD38 transduction in human B cell precursors. *J Immunol*. 1996; 156:100-107.
- 79- Fliegert R., Gasser A., Guse A.H. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35:109–114.
- 80- Muller-Steffner H.M., Schenherr-Gusse I., Tarnus C., Schuber F. Calf spleen NAD⁺ glycohydrolase: solubilization, purification and properties of the intact form of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 304: 154-162.
- 81- Muller-Steffner H.M., Augustin A., Schuber F. Mechanism of cyclization of pyridine nucleotides by bovine spleen NAD⁺ glycohydrolase. *J Biol Chem*. 1996; 271: 23967-23972.
- 82- Malavasi F., Funaro A., Alessio M, De Monte L.B., Ausiello C.M., Dianzani U., Lanza F., Magrini E., Momo M., Roggero S. CD38: A multilineage cell activation molecule with asplit personality. *Int J Clin Lab Res*. 1992; 22: 73-80.
- 83- Berridge M.J. A tale of two messengers. *Nature*. 1993; 365: 388-390.
- 84- Ellis J.H., Stevenson G.T., Crowe J.S. Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma. *J Immunol*. 1995; 155: 925-937.
- 85- Stevenson F.K., Bell A.J., Cusack R., Hamblin T.J., Slade C.J., Spellerberg M.B., Stevenson G.T. Preliminary studies for an immunotherapeutic approach to the treatment of human myeloma using chimeric anti- CD38 antibody. *Blood*. 1991; 77: 1071-1076.
- 86- Goldmacher V.S., Bouret L.A., Levine B.A., Rasmussen R.A., Pourshadi M., Lambert J.M., Anderson K.C. Anti-CD38-blocked ricin: a immunotoxin for the treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1994; 84: 3017-3025.
- 87- Kato I., Takasawa S., Akabane A., Tanaku O., Abe H., Takamura T., Suzuki Y., Nata K., Yanekura H., Yoshimoto T., Okamoto H. Regulatory role of

- CD38(ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in insulin secretion by glucose in pancreatic β cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 30045-30050.
- 88- Oppenheimier N. Protein glycosylation; ADP-ribosylation. *Methods in Enzymology.* 1984; 106:399-505.
- 89- Takasawa S., Nata K., Yonekura H., Okamoto H. Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic β cells. *Science.* 1993; 259: 370-376.
- 90- Ikehata F., Satoh J., Nata K., Tohgo A., Nakasawa T., Kato I., Kobayashi S., Akiyama T., Takasawa S., Toyota T., Okamoto H. Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase / cyclic ADP-ribose hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes patients. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1-7.
- 91- Webb D.L., Islam M.S., Efanov A.M., Brown G., Köhler M., Larsson D., Berggren P.O. Insulin exocytosis and glucose-mediated increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in the pancreatic β cell are independent of cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem.* 1996; 271: 19074-19079.
- 92- Clapper D.L., Walseth T.F., Dargie P.J., Lee H.C. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem.* 1987; 262: 9561-9568.
- 93- Galione A., Patel S., Churchill G.C. NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs. *Biol Cell.* 2000; 92: 197-204.
- 94- De Toledo F.G.S., Cheng J., Dousa T.P. Retinoic acid and triiodothyronine stimulate ADP-ribosyl cyclase activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 1997; 238: 847-50.
- 95- Lee H.C., Aarhus R. ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD^+ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul.* 1991; 3:203-209.
- 96- Lee H.C. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev.* 1997; 77: 1133-64.
- 97- Hellmich M.R., Strumwasser F. Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul.* 1991; 2: 193-202.
- 98- States D.J., Walseth T.F., Lee H.C. Similarities in amino acid sequences of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem Sci.* 1992; 17: 495.

- 99- Guse A.H. Cyclic ADP-ribose. *J Mol Med.* 2000; 78: 26-35.
- 100- Jacobson M.K., Laurean D.C., Strohm M.S., Jacobson E.L. NAD glycohydrolase and the metabolism of cyclic ADP-ribose. *Biochimie* 1995; 77: 341-344.
- 101- <http://www.uib.no/mbi/ziegler/research.html>
- 102- Kim S.K., Kim Y.K., Rho H.W., Park J.W., Park B.H., Han M.K., Kim U.H., Kim H.R. Purification and characterization of adenosine diphosphate ribose pyrophosphatase from erythrocytes. *The International Journal of Biochem& Cell Biology* 1998; 30: 629-638.
- 103- Hagen T., Ziegler M. Detection and identification of NAD-catabolizing activities in rat tissue homogenates. *Biochimie Biophys Acta.* 1997; 1340:7-12.
- 104- Licinio L., Kling M., Hauser P. Cytokines and brain function: relevance of interferon - α induced mood and cognitive changes. *Semin Oncol.* 1998; 25:30 - 38.
- 105- Rodriguez-Ramos C., Galan F., Diaz F., Elvira J., Martin-Herrera L., Giron-Gonzalez J.A. Expression of pro-inflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci.* 2001;46:1668-76.
- 106- Watanabe Y., Morita M., Ikematsu N., Akaike T. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta but not interferon gamma induce vascular cell adhesion molecule-1 expression on primary cultured murine hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:335-342.
- 107- Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. 2007; 117 (5-6): 247-251.
- 108- Safarik I., Safarikova M., Hafeli U., Schütt W., Teller J., Zborowski M. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers.* Plenum Press, 1997; 323. New York, London.
- 109- Lea T., Vartdal F., Nustad K., Funderud S., Berge A., Ellingsen T., Schmid R., Stenstad P., Ugelstad J. Monosized, magnetic polymer particles: their use in separation of cells and subcellular components, and in the study of lymphocyte function in vitro. *J. Mol. Recognit.* 1988; 1-9.



- 110- Keller R. Stem cells on the way to restorative medicine. *Immunology Letters*. 2002; 83:1
- 111- Storms R.W., Green P.D., Saford K.M., Niedzwiecki D., Cogle C.R., Colvin O.M., Chao N.J., Rice H.E., Smith C.A. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*. 2005; 106: 95-102.
- 112- <http://www.stemcell.com/technical/aldh.aspx>
- 113- Fallon P., Gentry T., Balber A.E., Boulware D., Janssen W.E., Smilee R., Storms R.W., Smith C. Mobilized peripheral blood SSClo ALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol*. 2003; 122: 99-108.
- 114- Hess D.A., Wirthlin L., Craft T.P., Herrbrich P.E., Hohm S.A., Lahey R., Eades W.C., Creer M.H., Nolte J.A. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2006; 107: 2162-9.
- 115- Zambelli A., Poggi G., Da Prada G., Pedrazzoli P., Cuomo A., Miotti D., Perotti C., Preti P., Robustelli della Cuna G. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res*. 1998; 18: 4705-8.
- 116- Jones R.J., Zuehlsdorf M., Rowley S.D., Hilton J., Santos G.W., Sensenbrenner L.L., Colvin O.M. Variability in 4- hydroperoxycyclophosphamide activity during clinical purging for autologous bone marrow transplantation. *Blood*. 1987; 70: 1490-4.
- 117- Russo J., Hilton J., Colvin O. The role of aldehyde dehydrogenase isozymes in cellular resistance to the alkylating agent cyclophosphamide. In: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. H.Weiner & T. Flynn, editors. p.65. New York.
- 118- Hess D.A., Meyerrose T.E., Wirthin L., Craft T.P., Herrbrich P.E., Creer M.H., Nolte J.A. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2004; 104: 1648-1655.

- 119- Williams O., Demirer T., Lilleby K., Buckner C.D. Bensinger W.I. Tempo of hematologic recovery correlates with peripheral blood CD34⁺ cell level in patients undergoing stem cell mobilization. *J Clin Apher.* 1998; 13: 1-6.
- 120- Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000; 6: 1229-34.
- 121- Armstrong L., Stojkovic M., Dimmick I., Ahmad S., Stojkovic P., Hole N., Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells.* 2004; 22: 1142-51.
- 122- Gacar G. Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda flow sitometri. Temel kök hücre teknikleri ve moleküler biyolojide uygulamaları kursu. 2010.
- 123- Dunphy C.H. Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004;128:9,1004-22.
- 124- Laane E., Tani E., Bjorklund E., Elmberger G., Everaus H., Skoog L., Porwit-MacDonald A. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry.* 2005;64:34-42.
- 125- Luider J., Cyfra M., Johnson P., Auer, I. Impact of the New Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-Color Flow Cytometer on a Regional Flow Cytometry Clinical Laboratory Service. *Laboratory Hematology.* 2004;10:102-8.
- 126- Stewart C.C., Woodring M.L., Podniesinski E., Gray E. Flow Cytometer in the Infrared: Inexpensive Modifications to a Commercial Instrument. *International Society for Analytical Cytology.* 2005; 67:104-111.
- 127- Wognum A.W., Eaves A.C., Thomas T.E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. 2003; 461-475.
- 128- Kim H., Jacobson E.L., Jacobson M.K. Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolase. *Science* 1993; 261: 1330-1333.
- 129- Yalçintepe L., Albeniz I., Adın-Çınar S., Tiryaki D., Bermek E., Graeff R.M., Lee H.C. Nuclear CD38 in retinoic acid-induced HL-60 cells. *Exp Cell Res* 2005; 303: 14-21.
- 130- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.

- 131- Gershoni J.M., Palade G.E. Protein blotting: Principles and applications. *Anal Biochem* 1983; 131: 1-15.)
- 132- Albeniz I., Demir Ö., Türker-Şener L., Yalçın-tepe L., Nurten R., Bermek E. Erythrocyte CD38 as a prognostic marker in cancer. *Hematology*. 2007; 12: 409-414.
- 133- Lee H.C. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev*. 1997; 77:1133-64.
- 134- Sauve E. The reaction mechanism for CD38. A single intermediate is responsible for cyclization, hydrolysis, and base-exchange chemistries. *Biochemistry*. 1998;37:13239-49.
- 135- Albeniz I., Demir Ö., Türker-Şener L., Yalçın-tepe L., Nurten R., Bermek E. Erythrocyte CD38 as a prognostic marker in cancer. *Hematology* 2007; 12: 409-414.
- 136- Knutsen A.P., Bellonec Kauffman M. Immunopathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *J.Cyst. Fibros* 2002; 2: 76-89.
- 137- Lande R., Urbani F., Di Carlo B., Sconocchia G., Deaglio S., Funaro A. CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes. *Cell Immunol*. 2002; 220: 30-38.
- 138- Gentry T., Deibert E., Foster S.J., Haley R., Kurtzberg J., Balber A.E. Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH bright cell population of cryopreserved banked UC blood. *Cytother*. 2007; 9:596-606.
- 139- Storms R.W., Green P.D., Saford K.M., Niedzwiecki D., Cogle C.R., Colvin O.M., Chao N.J., Rice H.E., Smith C.A. Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood*. 2005; 106: 95-102.
- 140- Armstrong L., Stojkovic M., Dimmick I., Ahmad S., Stojkovic P., Hole N., Lako M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2004; 22: 1142-51.
- 141- Mitchell S., Cairo and John E. Wagner Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. *Blood* The American Society of Hematology. 1997; 90, 12.

- 142- Huang X., Cho S. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal Spangrude Cell Death and Differentiation. 2007;14, 1851–1859.
- 143- Povsic T.J., Zavodni K.L., Kelly F.L., Zhu S., Goldschmidt-Clermont P.J., Dong C., Peterson E.D. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. J Am Col Cardiol. 2007; 50: 2243-8.
- 144- Fallon P., Gentry T., Balber A.E., Boulware D., Janssen W.E., Smilee R., Storms R.W., Smith C. Mobilized peripheral blood SSClo ALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. Br J Haematol. 2003; 122: 99- 108.
- 145- Lacombe C., Mayeux P. Biology of erythropoietin Haematologica 1998; 83:724-732.
- 146- Yalcintepe L., Albeniz I., Cinar S., Tiryaki D., Bermek E., Lee H.C. Nuclear CD38 in retinoic acid-induced HL-60 cells. Exp Cell Res. 2005;303(1): 14-21.

ETİK KURUL KARARI





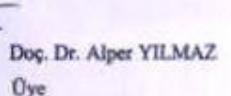
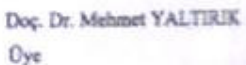

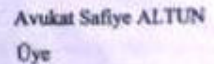

 **T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU** 

Sayı: 160 26.11.2008

Sn. Doç. Dr. Işıl Albeniz
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Karar No: 126
Başvuru Tarihi: 12.11.2008

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Doktora Öğrencisi Leyla Türker Şener'e ait "Ektopik bir enzim olan hücre yüzey antijeni CD38 anlatımının çeşitli hücre modellerinde incelenmesi" isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

 Prof. Dr. Mehmet KAYA İ. Ö. HADYEK Başkanı	 Prof. Dr. Müjdat UYSAL Üye	 Prof. Dr. Nuriye AKEV Üye
 Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN Üye	 Doç. Dr. Alper YILMAZ Üye	 Doç. Dr. Mehmet YALTIK Üye
 Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ Üye	 Avukat Safiye ALTUN Üye	 Mak. Müh. Seyfettin AVCI Üye

İstanbul Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Vakıf Güneba Caddesi 34280 Şişli-İSTANBUL
TEL : (0 212) 414 20 00/33375
E mail : dneyhyv@istanbul.edu.tr



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 26/11/2008
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu
Toplantı Sayısı : 11

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Işıl ALBENİZ'in üstlendiği ve Araştırma Görevlisi MSC.Leyla TÜRKER ŞENER'in yürüteceği 2008/3005 protokol numaralı "Ektopik bir enzim olan hücre yüzey antijeni CD38 anlatımının çeşitli hücre modellerinde incelenmesi" başlıklı deneysel tez çalışması kurumumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN (Katılmadı)
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bimodalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBECDİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pinar SAİP
I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKÖĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR
Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. İlgün ÖZDEN
Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Leyla	Soyadı	Türker Şener
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	15/07/1979
Uyruğu	T.C	TC Kim No	23996315750
Email	leylaturker@hotmail.com	Tel	0212 414 2187

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2006
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2002
Lise	Beşiktaş Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi	2004-...

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	62,5	İELTS= 6

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	74	71	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Visual Basic	Orta

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

ALBENİZ I, DEMİR O, TÜRKER-SENER L, YALÇINTEPE L, NURTEN R, BERMEK E. ERYTHROCYTE CD38 AS A PROGNOSTIC MARKER IN CANCER, HEMATOLOGY. 2007 OCT12(5):409-14.

YALÇINTEPE L, TURKER-SENER L, SENER A, YETKİN G, TIRYAKI D, BERMEK E. CHANGES IN NAD/ADP-RIBOSE METABOLISM IN RECTAL CANCER. BRAZ J MED BIOL RES. 2005 MAR38(3):361-5. EPUB 2005 MAR 8.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar

Measuring GDP-Ribosyl Cyclase Activities With Fluorescence Spectrometer In Erythrocytes, XIV international symposium,2010.

CD38 Expression in Cancer- An Animal Model, IXX. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2009.

Farede Geliştirilen Kanser Modelinde Serum, Lenfosit Ve Eritrositlerdeki NAD⁺ Glikohidrolaz, ADP-Ribozil Siklaz Aktiviteleri XX. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2008.

Kronik Böbrek Hastalığı Olan Kedilerde Hemoreolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi, 2008.

Floresans Spektroskopisi Yöntemlerinin Biyolojik Etkileşimlerin Ve Enzimatik Etkinliklerin İncelenmesinde Kullanımı, İstanbul Üniversitesi Bilim Günleri, 2008.

Kanser gelişim sürecinde CD38 anlatımı XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2007.

immünofloresan yöntem ile ökaryotik elongasyon faktör 2 (eef2) nin hücre içi dağılımının görüntülenmesi, XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2007.

Floresin izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen difteri toksininin hücre içindeki dağılımının protein sentezi ile ilişkisi, XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2007.

Eritrositlerin Kültür Ortamında GDP-Ribozil Siklaz Etkinliğinin Floresans Spektrometresiyle Değerlendirilmesi, XVIII. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2006.

Measuring GDP-Ribosyl Cyclase Activities With Fluorescence Spectrometer In Red Blood Cells, 6th Balkan Physics Congress, 2006.

Detection Of Erythrocytes Aging In Culture Medium Using Fluorescence Spectrometer, 4th

İnternational Student Conference of the Balkan Physical Union, 2006.
Effect Of Ecto-NAD Glycohydrolase, 31 th FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Congress, 2006.
Eritrosit Yüzey Antijeni CD38: Ektopik Bir Enzim Üzerine Çalışmalar, XVII. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2005.
NAD ⁺ Metabolism İn Breast Cancer, 30 th FEBS (Federation of the European Biochemical Societies) Congress and 9th IUBMB Conference, 2005.
Meme Kanseri Dokularında CD38 Belirlenmesi, XV. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2003.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Bilgisayar, satranç, sinema