

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELERİN İN-VİTRO
ÇOĞALMASINDA KORDON KANI KAYNAKLI
TROMBOSİT LİZATLARIN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Fulden YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELERİN İN-VİTRO
ÇOĞALMASINDA KORDON KANI KAYNAKLI
TROMBOSİT LİZATLARIN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Fulden YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent ÜNDAR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından Desteklenmiştir
(Proje No:TYL-2018-3909)

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünohematoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. 05.02.2020

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Levent ÜNDAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Erdal KURTOĞLU
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ozan SALİM
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK 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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Fulden YILDIRIM

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Levent ÜNDAR

İmza

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin her aşamasında sağladığı katkı ve destekleri için tez danışmanım Prof. Dr. Levent Ündar'a ve Doç. Dr. Ozan Salim hocalarıma,

Kordon kanı örnekleri için kaynak sağlayan Sayın Prof. Dr. Selahattin Kumru'ya,

Tezimin gerçekleşmesinde maddi olanak sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, Sağlık Bilimleri Enstitüsünün değerli çalışanlarına, laboratuvar ve altyapı destekleri için BabyLife Kordon Kanı Bankası yönetim kuruluna, istatistiksel analizler için destek sağlayan Sayın Ezgi Afşar'a,

Tez çalışmamda bana destek olan değerli çalışma arkadaşlarım Züleyha Kıracı, Gökçe Ercan, Ayşenur Ulaştı ve Dr. Durmuş Burgucu'ya,

Benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen her koşulda yanımda olan; eğitimi her zaman ön planda tutan en büyük destekçilerim annem ve babama, tüm destek ve sabrından dolayı eşim Uğurcan Duyar'a sonsuz teşekkürler.

Fulden Yıldırım

ÖZET

Amaç: Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) lösemi hücrelerinin ilaç tedavisi ile yok edildikten sonra kemik iliğinin yeniden yapılandırıldığı standart bir tedavi yöntemidir. HKHN sonrası Doğal öldürücü hücreler (DÖH) kemik iliğinde yeniden yapılanan ilk hücre grubudur. Nakil sonrası enfeksiyon oluşumunu azaltması ve GVHD oluşumunu geriletmesi gibi özellikleri DÖH'lerin klinik açıdan önemli kılmaktadır ayrıca farklı hematolojik hastalıklarda anti-lösemik etkileri tanımlanmıştır. Hücrelerin in-vitro ortamda çoğaltılıp kullanılabilmesi için alternatif besi ve destek ortamları oluşturma yaklaşımı kök hücre ve hücresele tedavilerin klinik uygulamalarındaki artışa paralel olarak artmaktadır. Bu amaçla trombosit lizatları hücre çoğaltılmasında etkin bir biçimde kullanılmaktadır. Bu çalışmada Kordon kanından elde edilen trombosit lizatların DÖH'lerin in-vitro ortamda çoğaltılmasında hücre çoğalmasını artırıcı yönde etkisi değerlendirildi.

Yöntem: Gönüllü gebelerden kordon kanı toplandı, MNH izolasyonu ve DÖH seçilimi yapıldı. Trombosit lizat oluşumu için öncelikle trombositten zengin plazma elde edildi daha sonrada lizat hazırlandı. Hücre kültürü ortamında DÖH'ler IL-2 ve trombosit lizat varlığında uyarıldı. Hücrelerin belirlenmesi, sayımı ve uyarım sonrası gruplar arasındaki farklar flow sitometrik yöntem ve otomatik hücre sayımı ile değerlendirildi.

Bulgular: Bu çalışma kordon kanı kaynaklı trombosit lizatların DÖH'ler üzerine etkinliğini ortaya koyan ilk çalışmadır.

Sonuç: DÖH'ler genellikle in-vitro olarak uzun süreli inkübasyonlar sonunda çoğalabilen hücre grubudur. Uyarım aşamasında birden çok sitokin kullanım ihtiyacı doğmaktadır. Ayrıca ek uyarılara da ihtiyaç duyulur. Bu çalışma ile elde edilmesi kolay ve ucuz bir preparatla birlikte IL-2 uygulamasının kısa sürede doğal öldürücü hücreler üzerinde proliferasyonu indükleyebileceği ilk kez gösterilmiştir. Bununla birlikte inkübasyon süresinin uzatılması ve trombosit lizat konsantrasyonlarının değişkenliklerinin test edildiği çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler :Kordon Kanı, Trombosit Lizat, Doğal Öldürücü Hücre, IL2

ABSTRACT

Objective: Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a standard treatment for bone marrow reconstruction after leukemia cells are destroyed by drug therapy. Natural killer cells after HSCT are the first group of cells to be engraftment in the bone marrow. NK cells are clinically important because they can reduce the occurrence of post-transplant infection and reduce the formation of GVHD, in addition, anti-leukemic effects have been described in different hematological diseases. Different studies have been designed for the expansion of NK cells in vitro applications. There is a need to create alternative nutritional and support medium in cellular therapy applications. For this purpose platelet lysates are used effectively in cell proliferation. Through the formation of lysate the factors in the platelet granule are released into the medium. Our aim is to evaluation of the effect of cord blood platelet lysates on natural killer cells.

Method: Cord blood was collected from volunteer pregnant women then MNH isolation and natural killer cell selection were performed and platelet lysate was prepared. NK cells were stimulated in the presence of IL-2 and platelet lysate under cell culture conditions. Differences between groups were evaluated by flow cytometric method and automatic cell count.

Results: To our knowledge, this is the first study to demonstrate the efficacy of cord blood derived platelet lysates on natural killer cells.

Conclusion: NK cells are usually can proliferate after prolonged incubations in vitro. There is a need to use multiple cytokines during the NK stimulation phase. This study demonstrated for the first time that platelet lysates can provide NK proliferation in a short time with IL 2. However, incubation time should be extended and supported by studies in which changes in platelet lysate concentrations are tested.

Key Words: Cord Blood, Platelet Lysate, Natural Killer Cell, IL2

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doğal Öldürücü Hücreler	3
2.2. Doğal Öldürücü Hücrelerin Efektör Fonksiyonları	3
2.3. Çeşitli Hastalık Koşullarında Doğal Öldürücü Hücrelerin Tedavideki Uygulamaları	4
2.4. Kordon Kanı	7
2.5. Trombosit Lizat	7
3. GEREÇ ve YÖNTEM	9
3.1. Çalışma Grubu	9
3.2. Mononükleer Hücre izolasyonu ve DÖH pozitif Seçilimi	9
3.3. Hücre Sayımı	10
3.4. Trombosit Lizat Hazırlanması	10
3.5. Hazırlanan Trombosit Lizatların Mikrobiyolojik yönden Kontrolü	10
3.6. Hazırlanan Trombosit Lizatlarda PDGF Tayini	10
3.7. Hücrelerin Monoklonal Antikorlarla İşaretlenmesi	11
3.8. Flow Sitometrik Analiz	11
3.9. Hücre Kültürü	11
3.10. İstatistik	12

4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA	22
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	26
KAYNAKLAR	27
EKLER	36
Ek-1. Etil Kurul Onayı	
ÖZGEÇMİŞ	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Tüplere konulan moAb renk ve miktarları	11
Tablo 4.1. Çalışmaya katılan gönüllülerin özellikleri.	13
Tablo 4.2. Kordon kanı kaynaklı trombositlerden hazırlanan trombosit lizatlarıdaki PDGF miktarı ve PDGF ELİSA standart grafiği.	16

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Trombosit lizat hazırlamada kullanılan kordon kanı kaynaklı trombositlerin canlılık, aktivasyon ve immünofenotipik özellikleri flow sitometrik histogramlar.	14
Şekil 4.2. Kordon kanı kaynaklı trombosit lizat hazırlama koşulları ve mikrobiyolojik tarama sonuçları	15
Şekil 4.3. Kordon kanı kaynaklı doğal öldürücü hücrelerin immünofenotipik özellikleri flow sitometri histogramları.	17
Şekil 4.4. Kordon kanından MNH izolasyonu sonrası doğal öldürücü hücre oranları.	18
Şekil 4. 5. CD16+/CD56+ Hücre seleksiyonu sonrası doğal öldürücü hücre immünofenotipik özellikleri.	18
Şekil 4. 6. Başlangıç anında (T0) ve uyarım sonrası doğal öldürücü hücre oranları.	19
Şekil 4.7. Başlangıç anında (T0) ve uyarım sonrası doğal öldürücü hücre oranları (ortalama)	20
Şekil 4. 8. Uyarım sonrası doğal öldürücü hücre oranları (ortalama)	21

SİMGELER VE KISALTMALAR

AML	:	Akut Miyeloid Lösemili
APC	:	Allophycocyanin
CMP	:	Common Myeloid Progenitor
DÖH	:	Doğal Öldürücü Hücreler
FasL	:	Fas Ligandı
FBS	:	Fetal bovine serum
FITC	:	Fluorescein isothiocyate
GMP	:	Good Manufacturing Practice
GVHD	:	Graft-Versus-Host Disease
HIV	:	Human immunodeficiency Virus
HKHN	:	Hematopoetik Kök Hücre Nakli
HKH	:	Hematopoetik Kök Hücre
HLA	:	Human leucocyte antigen
IFN- γ	:	İnterferon gamma
IL-2	:	İnterlökin 2
MHC	:	Major Histocompatibility Complex
MNH	:	Mononükleer Hücre
MPV	:	Mean Platelet Volume
PBS	:	Fosfat tuz solüsyonu
PDGF	:	Platelet Derived Growth Factor
PE	:	Phycoerythrin
TF	:	Transkripsiyon Faktörü
THR	:	T hücre reseptörü

1. GİRİŞ

Doğal öldürücü hücreler (DÖH) bağışıklık sistemde önemli görevleri olan büyük granüler lenfosit görünümündeki hücrelerdir. Tümör ve virüs ile enfekte olmuş hücreleri hedef alırlar. Dolaşım kanında ki lenfositlerin % 10-15' ini oluştururlar (Aharon, 2006). DÖH'ler, tümör ve virüsle enfekte olmuş hücreleri tanıyarak öldürme ve immün düzenleyici sitokinlerin üretimi olmak üzere iki ana fonksiyona aracılık ederler (Robertson,1990;Cooper,2001;Fehniger,2003). DÖH'ler fonksiyonlarını, yüzeylerinde ifade ettikleri çeşitli aktivatör ve inhibitör reseptörler arasındaki etkileşimler ile gerçekleştirirler. IFN- γ , IL-2, IL12 gibi sitokinler tarafından aktive olurlar (Fehniger,2003; Aktas,2009). İnhibitör reseptörler bir inhibisyon sinyali oluştururken, aktivatör reseptörler DÖH aktivasyonunu ve hedef hücre lizisini başlatırlar. Bu reseptörler arasında NKG2A inhibitör, NKG2D ve NKp44 ise aktivatör reseptördür (Aktas,2009). DÖH'ler aktivasyonu takiben uygun hedef hücelere karşı sitotoksik fonksiyonlar sergilemenin yanı sıra doğal ve kazanılmış immün yanıtları düzenleyen çeşitli sitokinler ve kemokinler salgırlar (Fehniger,2003).Doğal öldürücü hücrelerin kanser immünoterapisi ve hematopoetik kök hücre naklinde (HKHN) önemli roller aldığına dair veriler yapılan klinik ve temel araştırmalarda ortaya konulmuştur.

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) lösemi hücrelerinin ilaç tedavisi ile yok edildikten sonra kemik iliğinin yeniden yapılandırıldığı standart bir tedavi yöntemidir. HKHN sonrası DÖH'ler kemik iliğinde yeniden yapılanan ilk hücre grubudur. Nakil sonrası enfeksiyon oluşumunu azaltması ve GVHD oluşumunu geriletmesi gibi özellikleri DÖH'leri klinik açıdan önemli kılmaktadır ayrıca farklı hematolojik hastalıklarda anti-lösemik etkileri tanımlanmıştır (Ruggeri,2002;Feuchtinger,2009). DÖH'ler immünoterapi uygulamalarında kullanılmak üzere periferik kan dışında kordon kanından da elde edilmektedir. Kordon kanında DÖH'ler lenfositlerin % 30' u gibi yüksek oranlarda bulunabileceği gösterilmiştir (Anushruti,2017). DÖH'lerin kordon kanında periferik kana göre yüksek oranlarda oluşunun temel mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. Her iki kaynaktan da elde edilen DÖH'lerin in-vitro ortamda çoğaltılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Temel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. 1- Sitokin uyarımı yöntemi ve 2- besleyici/aksesuar hücre ile kültür

yöntemi (Markus,2017). Hücrelerin in-vitro ortamda çoğaltılıp kullanılabilmesi için alternatif besi ve destek ortamları oluşturma yaklaşımı kök hücre ve hücrel tedavilerin klinik uygulamalarındaki artışa paralel olarak artmaktadır. Bu amaçla trombosit lizatları özellikle mezenkimal kök hücre çoğaltılmasında etkin bir biçimde kullanılmaktadır (Matthew,2012).

Trombositler temel olarak kanamanın durdurulması ve pıhtı oluşmasında önemli görevler üstlenirken son yıllarda biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ile birlikte ticari olarak farklı tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Ortopedik, Oftalmolojik, Dermatolojik, Estetik ve kozmetik alanda barındırdıkları büyüme faktörlerinin iyileştirici-yenileyici özelliğinden dolayı geniş kullanım alanı bulmaktadır (Jeremy,2014). Trombositlerin alfa granüllerinde bulunan PDGF, VEGF, SDF-1, IL-8 gibi önemli biyolojik etkileri olan faktörlerin aynı zamanda tümör mikroçevresinde bulunan ve tümör hücreleri tarafından salgılanan faktörlerden olması dikkatimizi çeken bir gözlemdir (Pilar,2013). Bu gözlemimizi destekler nitelikte yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada özellikle PDGF' nin tümör mikro çevresinde bulunması DÖH'lerin NKp44 reseptörü aracılığı ile aktivasyonunu artırıp tümör büyümesini engellediğini ortaya koymuştur (Barrow,2007).

Kordon kanından elde edilen trombositler periferik kan trombositleri ile kıyaslandığında uyarılara daha düşük yanıt (hyporesponsiveness) verme eğiliminde olduğu tanımlanmıştır (Sola-Visner,2012). Bu özelliği de kordon kanı kaynaklı trombosit lizatların allogeneik kullanımda tercih edilebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmanın Hipotezi (H1) : Kordon kanından elde edilen trombosit lizatları doğal öldürücü hücrelerin in-vitro ortamda çoğaltılmasında hücre çoğalmasını artırıcı yönde etki eder. Hipotezi test edebilmek için gönüllü gebelerden kordon kanı toplanacak, MNH izolasyonu ve doğal öldürücü hücre seçilimi yapılacaktır. Trombosit lizat oluşumu için öncelikle trobositten zengin plazma elde edilecek daha sonrada lizat hazırlanacaktır. Hücre kültürü ortamında doğal öldürücü hücreler IL-2 ve trombosit lizat varlığında uyarılacaktır. Hücrelerin belirlenmesi, sayımı ve uyarım sonrası gruplar arasındaki farklar flow sitometrik yöntem ve otomatik hücre sayımı ile değerlendirilecektir. Lizat etkinliğini test etmek için ELİZA yöntemi ile PDGF seviyeleri incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doğal Öldürücü Hücreler

Doğal öldürücü (DÖH) hücreler başlangıçta sadece kemik iliğinde geliştiği düşünülen özelleşmiş bir hücre grubudur. Son kanıtlar bademcikler, dalak ve lenf nodları da dahil olmak üzere sekonder lenfoid dokularda da gelişebileceğini ve olgunlaşabileceğini düşündürmektedir (Scoville ve ark,2017). DÖH'lerin hücrel progenitörleri ve ara popülasyonlarının immünoyolojisi, köken spesifik yüzey markerlarının diferansiyel ekspresyonu ile tanımlanır (Sun ve ark;2011). T-box transkripsiyon faktörleri T-bet ve eomesodermin gibi kritik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu DÖH'lere özgü nitelikleri kontrol eder (Simonetta ve ark,2016). DÖH'ler, insanlarda dolaşımdaki lenfositlerin % 5-20'sini oluşturur (Langers ve ark,2012).DÖH'ler özgün fonksiyonları ve yüzey antijenlerinin ekspresyonu ile ayırt edilirler. DÖH'lerde, T hücrelerinin klonotipik T hücre reseptörü (TCR) ve bununla ilişkili sinyal transdüksiyon adaptörü CD3ε yoktur. İnsanlarda DÖH'lerin alt kümeleri aktive edici Fc reseptörünü, CD16'yı ve çoğu CD56'yı eksprese eder.(Lanier ve ark,1986,Lanier ve ark,1989). DÖH'ler doğuştan gelen lenfoid hücreler (innate lenfoid hücreler) olarak bilinen bir grup lenfosit benzemektedir (Spits ve ark;2013). İnnate lenfoid hücreler üç farklı gruba ayrılır ve hem insanlarda hem de farelerde bulunur (Zhang ve Huang,2017). DÖH'ler grup 1 İnnate lenfoid hücreler ile ilişkilidir (Kondo,1997). Her ikisi de uyarım sonucu interferon-gama (IFN-γ) ve tümör nekroz faktörü (TNF) -α üretir. Bununla birlikte, grup 1 İnnate lenfoid hücrelerin aksine, DÖH'ler CD8 + sitotoksik T lenfositlerinin benzeyen sitolitik fonksiyonlara da sahiptir (Zhang ve Huang,2017).Farelerde DÖH'ler özelleşmiş kemik iliği nişlerinde gelişir. DÖH hücre öncüleri (Pre-NKP'ler) olarak tanımlanan bu erken progenitörün bir alt kümesi, IL-2 reseptör β zincirini (CD122) NKP haline getirmektedir (Male ve ark,2014)

2.2. Doğal Öldürücü Hücre Etki Faktör Fonksiyonları

DÖH'ler, iki kritik etki faktörüyle immünoyomodülatör etki gösterir. İlk olarak DÖH'ler ,malign bir dönüşüm geçirmiş, bir virüs veya başka bir hücre içi patojen ile enfekte olmuş hücreleri doğrudan lizise uğratabilen sitotoksik lenfositlerdir (Zhang ve Huang,2017). DÖH'lerin sitolitik işlevi, degranülasyon ve ölüm reseptörü ligasyonu

dahil olmak üzere çeşitli işlemlerle başlayabilir. Bu fonksiyon hastalıklı ve işlevsiz hücrelerin ortadan kaldırılması için kritik öneme sahiptir. (Stabile ve ark,2017; Smyth ve ark,2005). DÖH'ler, aktivasyon reseptör stimülasyonuna ve ayrıca inflamatuvar sitokin kaynaklı aktivasyon sinyaline yanıt olarak çeşitli inflamatuvar sitokinler üretebilir (Fauriat ve ark,2010; Freeman ve ark,2015). DÖH efektör fonksiyonları, bağışıklık yanıtın temel bileşenleridir ve DÖH'ler koruyucu bağışıklığa aracılık ettiği primer mekanizmalardır. DÖH sitotoksitesini düzenleyen moleküler mekanizmalar tanımlanmıştır ve üç ana işlem basamağı tanımlanır: 1) hedef hücre tanıma, 2) hedef hücre kontağı ve immünolojik sinaps oluşumu 3) DÖH kaynaklı hedef hücre ölümü. Hedef hücrelerin DÖH'ler tarafından nasıl tanındığı ve hastalıklı hücreleri imha mekanizmalar tanımlanmıştır. Hedef hücre bir kez tanındığında, DÖH'ler iki temel mekanizma yoluyla hedef hücre ile etkileşime girer (Krzewsk ve Strominger,2008). Birinci mekanizma, hedef hücrenin apoptotik sinyalini başlatan hedef hücrenin yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu içerir (Khosravi ve Esposti,2004). Bu reseptörlerden Fas95 ve CD95Ldir. NK hücreleri üzerinde mevcut olan TRAIL, reseptörüdür. DÖH aracılı sitotoksitenin birincil mekanizması, litik moleküllerin hedef hücreye yönlendirilmiş salımını içerir (Bhat ve Watzl,2007).

2.3. Çeşitli Hastalık Koşullarında Doğal Öldürücü Hücrelerin Tedavideki Uygulamaları

Bugüne kadar, memeli hücrelerindeki DÖH'lerin çeşitli fonksiyonları tam olarak anlayamamıştır. Bununla birlikte, DÖH eksikliği ile karakterize nadir hastalıklara sahip hastalardan toplanan veriler, insan sağlığına olan etkilerine ışık tutmuştur (Orange,2013). Genetik olarak modifiye edilmiş fare modellerini kullanan çalışmalar, proinflamatuvar ve immünsüpresif fonksiyonları ile ilgili önemli veriler üretmiştir (Zamora ve ark,2015). DÖH'ler, inflamatuvar uyaranları üretir, bunlara yanıt verir ve en çok anti viral bağışıklık ve tümör immüno-gözetimindeki rolleriyle bilinir;bununla birlikte DÖH'ler, patolojik inflamasyonun itici güçleri olarak çeşitli otoimmün bozukluklarda da rol oynamaktadır (Poggi ve Zocchi,2014). Ortaya çıkan kanıtlar ayrıca DÖH'lerin doku onarımı gibi anti-inflamatuvar programları düzenleyebildiğini göstermektedir (Jewett ve ark,2013; Kumar ve ark,2013). DÖH'lerin adaptif immün yanıtın bir parçası olarak hareket edip etmedikleri net değildir, ancak birinci basamak

yanıt vermeleri ve temel inflamatuvar araçlar olarak katkıları sağlam bir şekilde kurulmuştur. Doğal Öldürücü hücreler vücudumuzdaki tümör hücrelerine saldırmada önemli bir rol oynar ve kanser tedavisi için umut verici bir araç olarak kabul edilir. Son yirmi yıldaki tedavi yaklaşımlarında, endojen DÖH'leri aktive etmek veya IL-2 ile aktive edilen DÖH'leri kullanmak üzere IL-2 uygulamasını içermektedir (Keilholz ve ark,1994). Böbrek hücreli karsinom, malign glioma ve metastatik meme kanseri tedavisinde otolog DÖH tedavisi denenmiştir. Otolog denemelerde ortaya çıkan istenmeyen durumlardan sonra, çalışmalarda allojenik DÖH'lerin tedavide kullanılmasına yol açmıştır. Bir çalışmada Rugby ve arkadaşları akut miyeloid lösemili (AML) hastalara verilen alloreaktif DÖH'lerin nüksü ve greft reddini ortadan kaldıracabileceğini ayrıca GVHD'ye karşı koruyabildiğini göstermiştir (Ruggeri ve ark,2002). Daha sonra, allojenik DÖH'ler haploidentik donörlerden hücre transferinin de böbrek hücreli karsinom, metastatik melanom, refrakter Hodgkin hastalığı ve refrakter AML tedavisi için uygulanmıştır. Ayrıca nöroblastom, böbrek, kolon, gastrik ve yumurtalık kanserleri gibi çeşitli solid tümörlerde de uygulanmıştır (Castriconi ve ark,2004; Carlsten ve ark,2007). DÖH transferinin güvenli ve etkili olduğu ortaya konuldu. Son zamanlarda tekrarlayan metastatik meme ve yumurtalık kanseri olan hastalarda da benzer çalışmalar yapılmıştır (Geller ve ark,2011). Allojenik DÖH'ler sağlıklı donörlerden üretilebilme avantajına sahiptir ve daha sitotoksik aktiviteye sahiptir. Ayrıca DÖH'ler, T hücrelerinin aksine GVHD'yi indüklemeyiz. DÖH tedavisi böylece astım, multipl skleroz, diyabet, artrit gibi hastalıklar için de araştırılmaktadır (Brauner ve ark,2010). DÖH'lerin HIV enfeksiyonunun kontrolündeki etkinliği, in vitro ve in vivo deneylerde gösterilmiştir (Alter ve ark,2007). Terapötik uygulama amacıyla, allojenik DÖH'ler göbek kordon kanından, yetişkin donör aferez ürünlerinden hatta NK-92 gibi DÖH dizilerinden elde edilebilir. Son zamanlarda, çalışmalar, insan embriyonik kök hücrelerinden (hESC) ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerinden (iPSC) fonksiyonel DÖH'lerin in vitro olarak üretilebildiğini göstermiştir (Woll ve ark,2005; Ni ve ark,2011) hESC ve iPSC'den türetilmiş DÖH'ler güçlü anti-tümör , anti -HIV aktivitesi göstermiştir ve fenotipik olarak periferik kan kaynaklı olanlara benzerdir. Ayrıca, daha yüksek KIR ekspresyon seviyelerine sahip oldukları için kordon kanından türetilen DÖH'ler daha üstün kabul edilirler. DÖH'ler, önceden duyarlılaştırma olmadan kansere

ve virüs ile enfekte hücrelere karşı hızlı sitotoksosite, dolayısıyla "doğal" öldürme yeteneğine sahip doğuştan gelen immün efektörlerdir (Phillips ve ark,1992).

2.4. Kordon Kanı

Kordon kanı, önemli bir hematopoietik kök hücre kaynağıdır. 1988 yılından günümüze kadar 35.000 üniteden fazla kordon kanı kemik iliği nakli amacı ile kullanılmıştır (Mayani ve ark,2020). Hematopoetik kök hücre naklinden sonra engrafman süresi ile kordon kanı CD34+ hücre sayısı ve CFU sayısı arasında ilişki rapor edilmiştir. Greftlerdeki düşük megakaryosit progenitörlerinin (CFU-MK) kordon kanı transplantasyonundan sonra gecikmiş trombosit engrafmanı için bir açıklama olarak önerilmiştir. Aktif araştırmalara rağmen, gecikmiş trombosit engrafmanı kordon kanı transplantasyonu da dahil olmak üzere hematopoietik kök hücre transplantasyonundan sonra bir sorun olmaya devam etmektedir. Günümüzde TNC (ve bir dereceye kadar CD34 + hücre konsantrasyonu) kordon kanı bankacılığı için birimleri seçmek üzere kordon kanı hematopoietik potansiyelinin belirleyicileri olarak kullanılmaktadır (Moroff ve ark,2006). Miadında doğan bebeklerde normal yetişkinlerde trombosit konsantrasyonu ve ortalama trombosit hacmi (MPV) tespit edilir CFU-MK sayıları tam dönem ve erken doğan bebeklerin kordon kanında erişkin periferik kandan daha yüksektir. Ayrıca, tam dönem bebeklerde yüksek kordon kanı trombopoietin konsantrasyonları bildirilmiştir (Patrick ve ark,1987; Olson ve ark,1992).

2.5. Trombosit Lizat

Kan, diğer kaynaklardan elde edilemeyen hem hücresel hem de protein ürünlerini içeren önemli bir terapötik ürün kaynağıdır. Kan bileşenleri, kan bankaları tarafından hazırlanan tek donörlü veya küçük havuzlu ürünlerdir. Bunlar arasında kırmızı kan hücresi konsantreleri, trombosit konsantreleri ve transfüzyon için plazma ve kriyopresipitat bulunur. Plazma türevleri, plazma fraksiyonlaması ile büyük plazma havuzlarından üretilen tıbbi ürünlerdir. Çoğu kan ürünü intravenöz, intramusküler veya subkutan kullanım içindir. Kandan türetilen biyomalzemeler, topikal kullanım için oldukları, plazma ve hücre kaynaklı aktif bileşenleri birleştirebildikleri için benzersiz bir kan ürünü grubunu temsil eder. Fibrin yapıştırıcısı , doku hemostazı ve sızdırmazlık için geliştirilmiş protein bazlı bir üründür. Trombosit bazlı malzemeler plazma proteinlerini ve trombositleri birleştirir, yara iyileşmesi ve doku onarımını arttırmak için kullanılır. Son otuz yılda, rejeneratif tıpta yeni klinik endikasyon spektrumlarına sahip yeni

preparatlar ortaya çıktıkça, kan biyomalzemelerinin üretimi ve klinik kullanımında büyük gelişmeler olmuştur (Burnouf ve ark,2016).

Trombositler doku onarımı, vasküler remodeling ve organ rejenerasyonu için çok önemlidir. Aktif trombositler, hücrelerin toplanmasını, büyümesini ve morfogenezini destekleyen biyolojik olarak aktif molekülleri serbest bırakır veya yüzeyinde açığa çıkarır. Trombosit içinde çoğunlukla α -granüllerde bulunan büyüme faktörleri, doku rejenerasyonunu düzenleyen anahtar faktörlerdir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), disülfür bağları ile bağlanmış bir grup homo- (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC) ve PDGFDD) ve heterodimerik (PDGF-AB) polipeptit dimerlerinden oluşur (Golebiewska ve Poole ,2015; Nurden ve ark,2008). Trombosit a-granüllerinde çok miktarlarda bulunur. PDGF sert ve yumuşak dokuların yara iyileşmesi ve merkezi sinir sistemi (CNS) gelişimi için önemlidir ayrıca osteoblastlar ve farklılaşmamış osteoprogenitor hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve gliyal hücreler için önemli bir mitojendir (Sekido ve ark,1987). PDGF, yara bölgesine nötrofiller ve makrofajların kemotaksisini uyarır ve doku re- epitelyalizasyonuna ve bazı dokularda anjiyogeneze katılır (Nurden ve ark,2008). Trombositlerin mekanik olarak invitro ortamda parçalanması ile granül içerikleri açığa çıkarılabilir. Trombosit lizat döngüsel dondurma ve çözme işleminin ardından granül içeriğinin hücre kültürü ve doku mühendisliği alanında besi ortamına destek olarak kullanılmaktadır (Burnouf ve ark,2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalı Dalı ameliyathane/doğumhanede doğumları gerçekleştirilen ve çalışmaya katılmayı kabul eden 10 sağlıklı gebe dahil edildi. Çalışmada gebelere yönelik kontrol grubu yoktur. Helsinki Bildirgesi Kuralları gereği bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulmuş ve gerekli izinler alındı (Karar no: 315/02.05.2018). Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylere aydınlatılmış onam formu okunarak bireylerin çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair imzaları alındı. Toplam 10 sağlıklı vajinal / sezeryan doğum gerçekleştikten sonra tıbbi atık olan kordon dokusunun anne tarafında kalan kısmı alt bölgesinden klemplenip, batikon ile dezenfeksiyon işleminden sonra 45 derecelik açı ile umbilikal vene girildi. Alım esnasında akım kontrol edilip kan akımı yavaşlayana kadar işlem devam ettirildi. Akım kesilince iğne venden çıkarılıp, çıkış noktasının üst kısmından tekrar klemplendi. Bu yöntemle toplamda 10 torba kordon kanı alındı ve alınan kan hücre izolasyonu için laboratuara ulaştırıldı. Alınan örnekler kayıt altına alındıktan sonra transfer dezenfeksiyonu (torba dışından) yapılarak GMP laboratuvarına alındı. Hacim azaltma ve mononükleer hücre ayırıştırma işlemi gerçekleştirildi.

3.2. Mononükleer Hücre (MNH) İzolasyonu ve DÖH Pozitif Seçilimi

1. 15ml lik konik tüp içinde 3 ml histopaque 1077 üzerine yavaşça 6 ml kordon kanı eklendi
2. Daha sonra 1150 rpm'de 25 dakika santrifüj edilip dansite gradiyentiyle mononükleer hücreler ayırıştırıldı.
3. Elde edilen mononükleer hücreler 3 kez Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi (PBS) ile yıkandı.
4. Hücre peleti 1,1 ml medium içinde resüspanse edildi.
5. 0,1 ml lik kısmı Flow sitometride 7-AAD ile canlılık analizi için kullanıldı.
6. 1 ml lik kısmı sonraki deneylerde kullanıldı.
7. İlgili deneyler için kullanılmak üzere Doğal Öldürücü izolasyonu kit ile yapılmıştır. (pluriSpin® Human NK Cell Enrichment Kit)

3.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı Coulter (Coulter Electronics Ltd. England) marka otomatik tam kan sayımı cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Eş zamanlı olarak DÖH hücrelerinin mikro litredeki miktarı flow sitometri ile teyit edildi.

3.4. Trombosit Lizat Hazırlanması

1. MNH izolasyonu yapıldıktan sonra iki farklı santrifüj işleminden sonra

- Birinci santrifüj işleminde 560rpm de 6 dk
- İkinci santrifüj işleminde 1200rpm de 12 dak.

Trombositten zengin plazma (PRP) elde edilir.

2. Elde edilen PRP daha sonra 50 ml steril tüpe alınır, 2500rpm de 5 dak santrifüj edilir. Süpernatant atılır pelet 1 ml hacim içinde resüspanse edilir ve 1,8ml dondurma tüplerine alınır.

3. Daha sonra pelet -80°C de dondurulup (24 saat) daha sonra hızla çözülür.

Bu işlem 3 defa tekrarlanır. Trombosit lizat sonraki uygulamalarda kullanılmak için -80°C de saklanır.

3.5. Hazırlanan Trombosit Lizatların Mikrobiyolojik Yönden Taranması

Hazırlanan lizatlar hücre kültürü uygulamalarında kullanılmadan önce Triptik soy agar (TSA) besiyerine ekildi. 48 saat 37°C de inkübe edildi. Herhangi bir koloni olmadığı tespit edildi.

3.6. Hazırlanan Trombosit Lizatlarda Trombosit Kaynaklı Büyüme

Faktörü(PDGF) Tayini

1. Her kuyucuğa 100 μL standart veya numune eklendi. 37°C 'de 90 dakika inkübe edildi.

2. Supernatanat uzaklaştırıldı. 100 μL Biotin işaretli antikor eklendi. 37°C 'de 1 saat inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonrası Aspirasyon yapıldı ve 3 kez yıkama işleminde yapıldı.

4. 100 μL HRP Konjugatı eklendi. 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi.

5. Aspirasyon yapıldı ve 3 kez yıkama işleminde yapıldı.

6. 90 μL Substrat Reaktif eklendi. 37°C 'de 15 dakika inkübe edildi.

7. 50 µL Durdurma Solüsyonu eklendi. Hemen 450 nm'de okutuldu.
8. Standart grafiği hazırlandı ve örnek içerikleri hesaplandı.

3.7. Hücrelerin Monoklonal Antikorlarla İşaretlenmesi

Flow sitometri tüplerine alınan hücreler 10 µl anti- CD3 FITC, 10 µl anti-CD56 PE, 10 µl anti-CD16 APC monoklonal antikorları (moAb) ile 20 dk 25⁰ C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 defa 400 g de 5 dk santrifuj edilerek PBS ile yıkandı. Aynı işlemler antikorların izotiplerinin bulunduğu ikinci bir tüpe de uygulandı. Canlılık ölçümü için 10 µl 7-AAD flurokromu kullanıldı. Hazırlanan tüplerdeki antikor renk ve miktarları tablo halinde aşağıda belirtilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo.3.1. Tüplere konulan moAb renk ve miktarları

1.tüp	2.tüp	3.tüp
anti-IgG1-FITC 10 µl	anti-CD3-FITC 10 µl	7-AAD 10 µl
anti-IgG2-PE 10 µl	anti-CD56-PE 10 µl	
anti-IgG1-APC 10 µl	anti-CD16-APC 10 µl	

3.8. Flow Sitometrik Analiz

Analizler BD (Accuri C6) Flow sitometri cihazı kullanılarak kullanılarak gerçekleştirildi. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik ön saçınım (forward scatter) üzerinden ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Öncelikle hücreler büyüklük ve granüleritelerine göre hücrelerin dağılımlarını gösteren ön (forward) ve yan 90⁰ lik yan (side) saçınım histogramı ile lenfositler kapılanarak bu bölge üzerinden analizler gerçekleştirildi. İlgili monoklonal antikorun ekspresyonunu saptamak için analiz bölgesindeki partiküllerden, negatif izotipik kontrolün floresanından daha yoğun floresan gösteren bölgeler belirlendi.

3.9. Hücre Kültürü

Hücreler 37⁰C de 5% CO2 'li ortamda, %10 fetal dana serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI besi yerinde uyarılma ve kültür işlemi yapıldı. Bazal medyum dışındaki uyarma işlemlerinde IL-2 ve %10 Trombosit lizat kullanıldı. Uyarım

işlemi 72 saat boyunca yapıldı. Hücre kültüründe Nunc ve Greiner marka plastik malzemeler kullanılmıştır. Besi yeri (Gibco -292553), serum(Gibco-41A0525K) ve antibiyotikler (Gibco-1219997) Gibco'dan alınmıştır.

3.10. İstatistik

Değişkenler ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığı için Mann-Whitney U Testi ve Fredman Testi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilen değişkenler için $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Analizler SPSS programında yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Çalışma Grupları

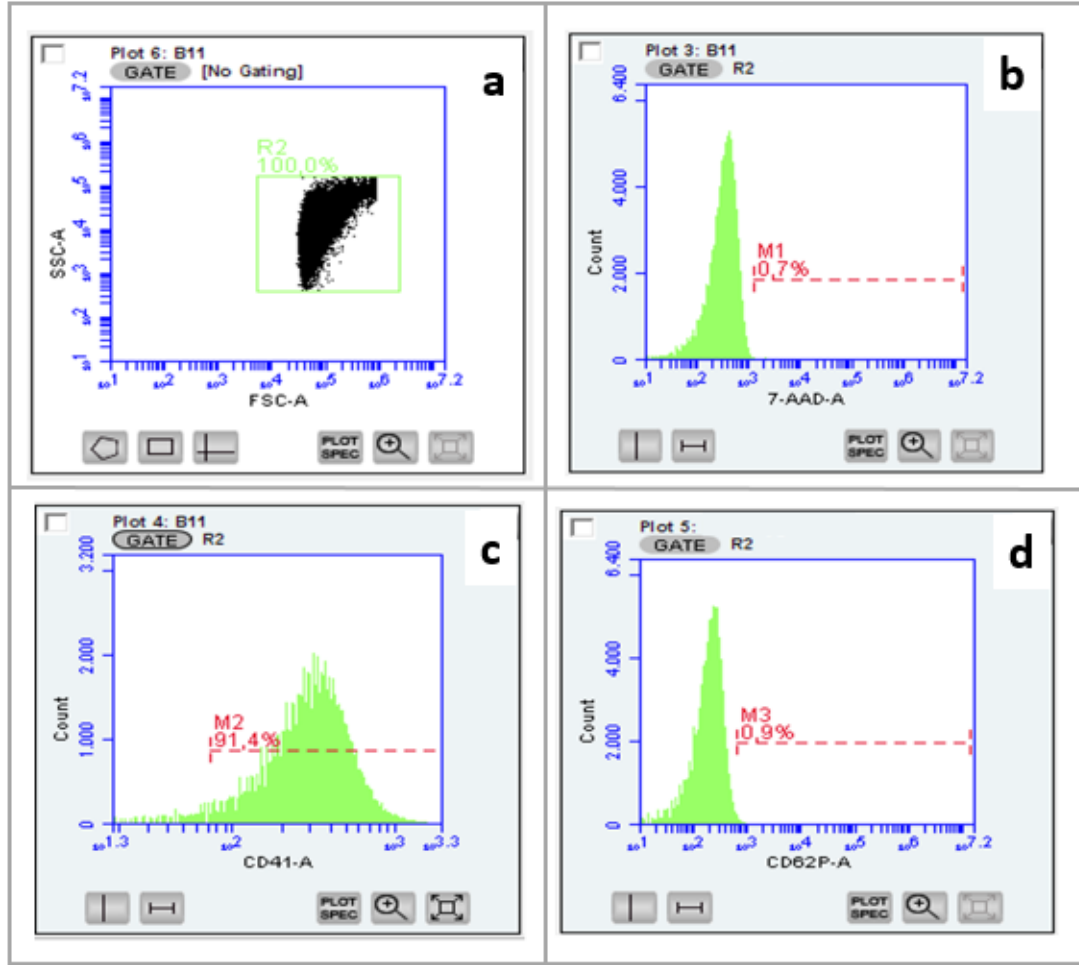
Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri; çalışmaya katılmayı kabul eden, 10 sağlıklı gebenin doğum sonrası tıbbi atık olan kordon kanlarından alındı. 1 kan örneği hariç diğer örnekler sezeryan doğum sonrası tıbbi atıktan alındı.

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan gönüllülerin özellikleri.

NO	Ad S.AD	YAŞ	DOĞUM ŞEKLİ	DOĞUM SAYISI	HAFTA	AĞIRLIK (GRAM) /CİNSİYET
1	E. G.	31	S / C	2	38+	3400/ERKEK
2	F. A. Ö.	36	S / C	1	37+	2985/ERKEK
3	A. A.	27	Doğal	2	40	2760/KIZ
4	T. Ç.	32	S / C	3	38+	3290/ERKEK
5	Y. M.	27	S / C	2	37+	3270/KIZ
6	E. N.	37	S / C	2	38	3046/KIZ
7	A. P.	31	S / C	1	36	2500/ ERKEK
8	S. B.	34	S / C	2	38	3930/KIZ
9	Ç. A.	30	S / C	1	40+	4180 KIZ
10	Ş.S.	29	S / C	1	39+	2865/KIZ

4.2. Trombosit Lizat Hazırlamada Kullanılan Kordon Kanı Kaynaklı Trombositlerin Canlılık, Aktivasyon ve İmmünofenotipik Özellikleri

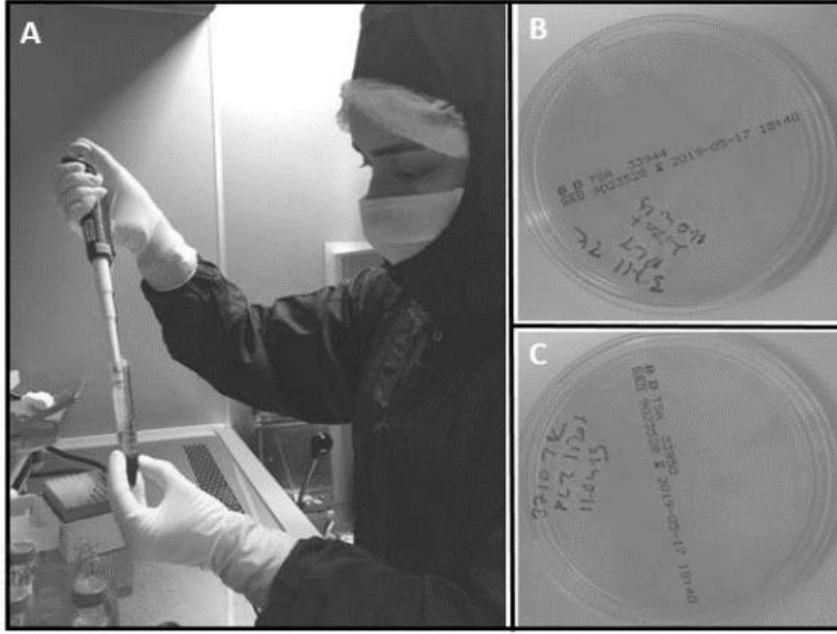
Kordon kanından elde edilen trombositler mililitrede 10^6 hücre olacak şekilde izole edildikten sonra canlılık oranı ve aktivasyon durumu değerlendirildi. Eş zamanlı olarak trombosit belirteçlerini taşıyıp taşımadığı kontrol edildi. Canlılık oranı % 95 ve üzeri olanlar ve aktivasyon belirteci düşük ifade edilen trombositler lizat hazırlamada kullanıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Trombosit lizat hazırlamada kullanılan kordon kanı kaynaklı trombositlerin canlılık, aktivasyon ve immüfenotipik özellikleri flow sitometrik histogramlar. a) izole edilen trombositlerin SSC/FSC histogramı b) Canlılık Analizi 7AAD ifadesi c) CD41 trombosit belirteci d) CD62p trombosit aktivasyon belirteci.

4.3. Trombosit Lizat Hazırlamada Kullanılan Kordon Kanı Kaynaklı Trombositlerin Biyolojik Aktivitelerinin (Sterilite) Kontrolü

İzole edilen trombositler lizat hazırlandıktan sonra mikrobiyolojik kontaminasyon açısından TSA besiyerine ekim yapılarak kontrol edildi. Lizatlar GMP koşullarında hazırlandı. Herhangi bir bakteriyolojik bulaş tespit edilmedi (Şekil 4.2).

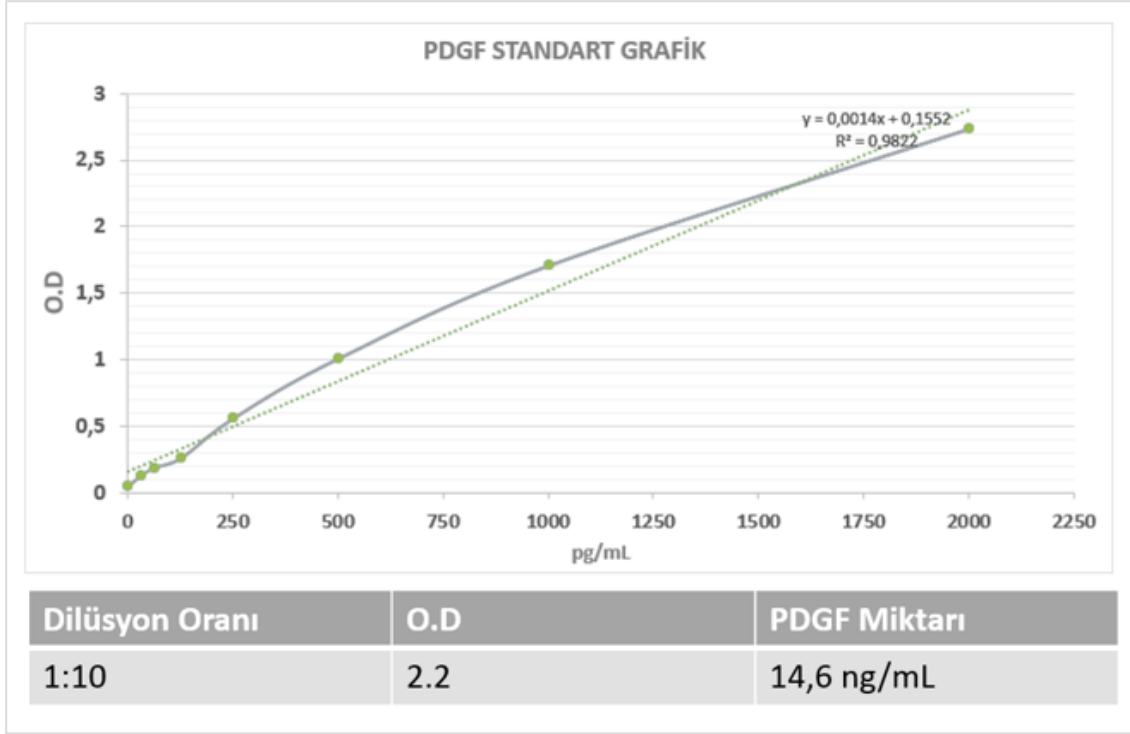


Şekil 4.2. Kordon kanı kaynaklı trombosit lizat hazırlama koşulları ve mikrobiyolojik tarama sonuçları. A) Aseptik GMP koşulları ve kıyafetleri B) ve C) TSA besiyerine mikrobiyolojik ekim ve inkübasyon sonrası petri görüntüleri. Herhangi bir üreme tespit edilmedi.

4.3. Kordon Kanı Kaynaklı Hazırlanan Trombosit Lizatlardan Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) Ölçümü

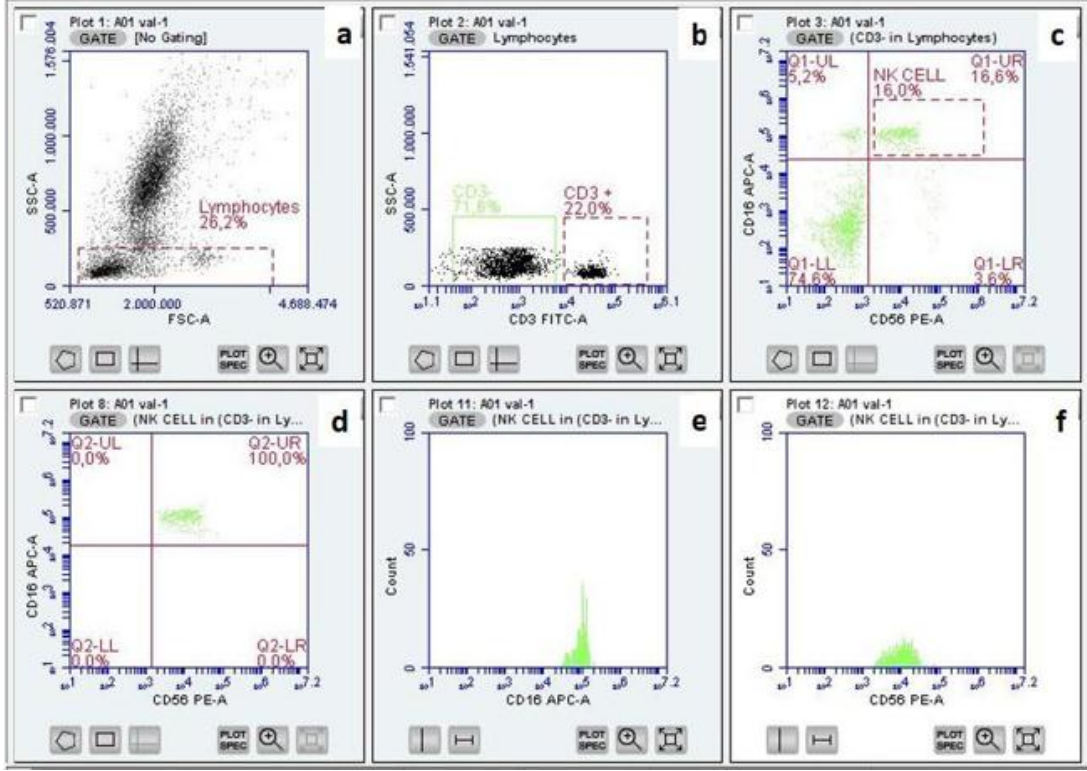
Hazırlanan trombosit lizatlardan Eliza yöntemi ile PDGF miktarı tespit edildi. Lizatlar donör kaynaklı değişkenliği dışlamak için hazırlandıktan sonra havuz yapılarak donduruldu ve kullanım anına kadar -80°C de muhafaza edildi. PDGF ölçümü lizat etkinliğini değerlendirmek için şahit parametre olarak kullanıldı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kordon kanı kaynaklı trombositlerden hazırlanan trombosit lizatlardaki PDGF miktarı ve PDGF ELİSA standart grafiği. Havuzlanarak hazırlanan lizatlar 3 tekrar ölçümü ve ortalaması. Dilüsyon oranı1:10



4.4. Kordon Kanında Bulunan Doğal Öldürücü Hücrelerin İmmünofenotipik Özellikleri.

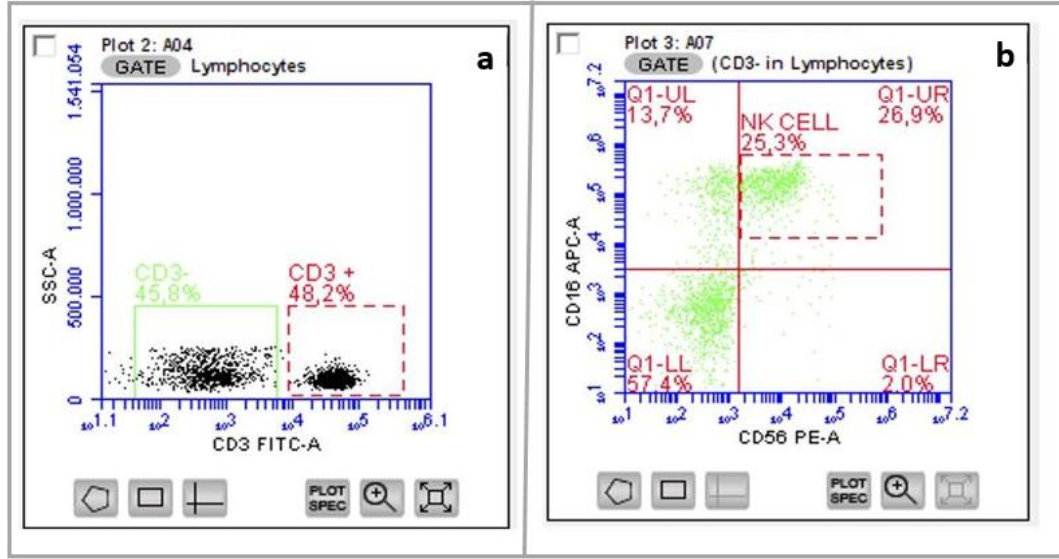
Çalışmaya dahil edilen kordon kanlarından başlangıç aşamasında herhangi bir hücre izolasyon işlemi yapılmadan (tam kan halinde iken) doğal öldürücü hücrelerin immünofenotipik özellikleri flow sitometrik olarak analiz edildi (Şekil 4.3).



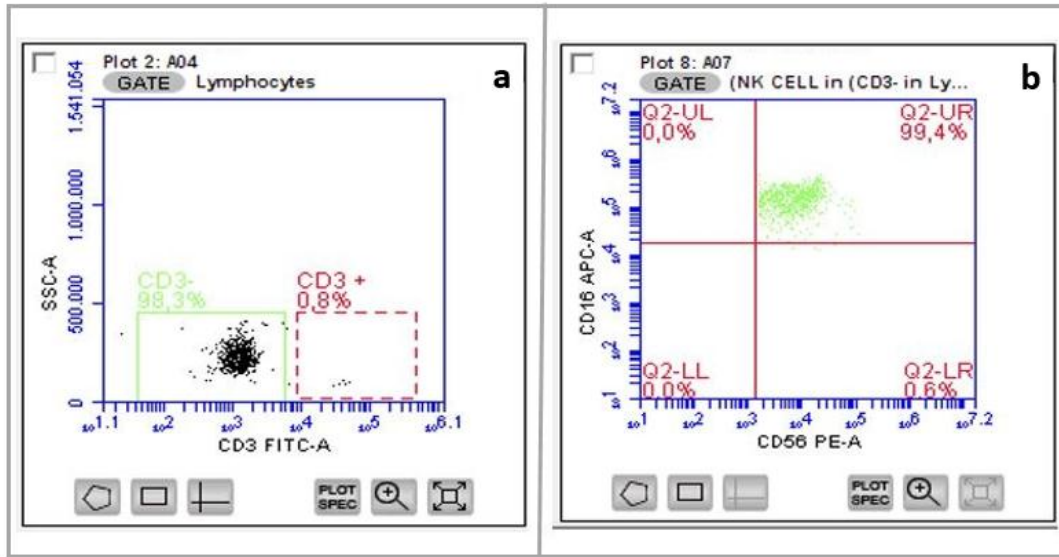
Şekil 4.3. Kordon kanı kaynaklı doğal öldürücü hücrelerin immünofenotipik özellikleri flow sitometri histogramları. a) SSC/FSC histogramı lenfosit kapılma b) CD3- /CD3+ hücre ayrımı c) CD16+CD56+ hücrelerin seçilmesi d) CD16+CD56+ hücreleri geri kapılma (back gate) e) - f) CD16 ve CD56 ifadelerinin histogram görüntüleri.

4.5. Kordon Kanından Mononükleer Hücre (MNH) izolasyonu ve CD16+/CD56+ Hücre Seleksiyonu Yapıldıktan Sonra Doğal Öldürücü Hücrelerin İmmünofenotipik Özellikleri.

Doğal öldürücü hücreler kordon kanı kaynaklı trombosit lizat ile uyarılmadan önce iki basamakta izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Birinci basamakta ficoll ile MNH izolasyonu yapıldı daha sonra ise CD16+/CD56+ pozitif seleksiyon kiti ile konsantr doğal öldürücü hücre süspansiyonları hazırlandı. Uyarım öncesi her iki işlemin de etkinliğinin değerlendirilmesi için flow sitometrik olarak immünofenotipik özellikleri değerlendirildi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4. 4. Kordon kanından MNH izolasyonu sonrası doğal öldürücü hücre oranları. a) CD3-/CD3+ ayrımı b) CD16+CD56+hücre oranı

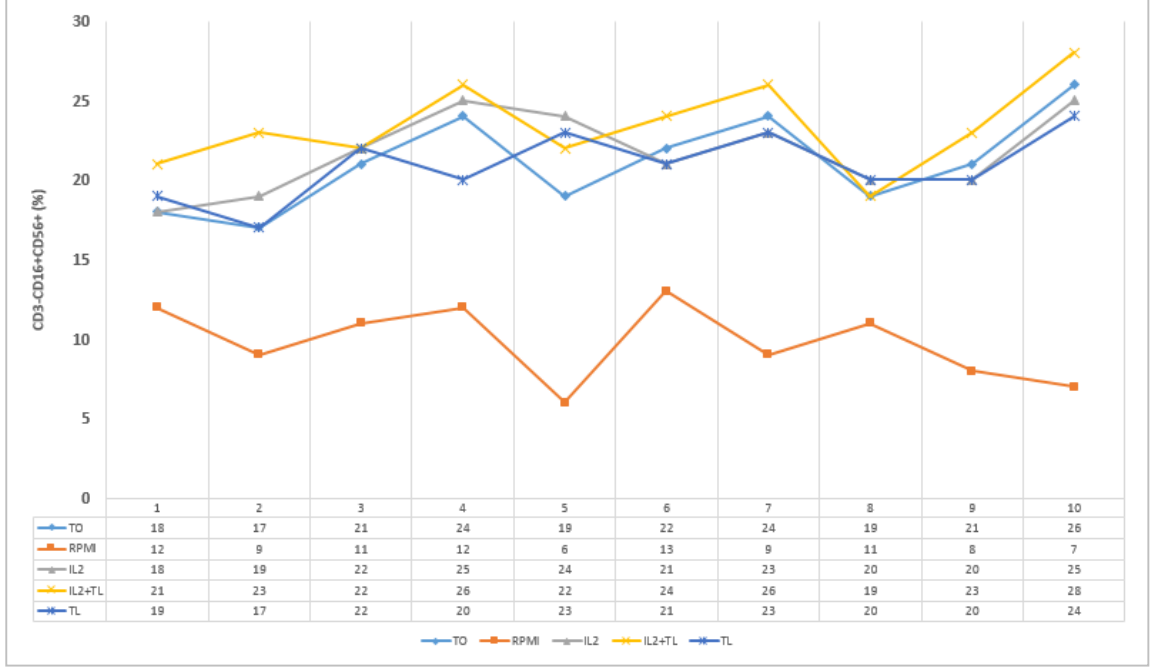


Şekil 4. 5. CD16+/CD56+ Hücre seleksiyonu sonrası doğal öldürücü hücre immünofenotipik özellikleri. a) CD3-/CD3+ ayrımı b) CD16+CD56+hücre oranı

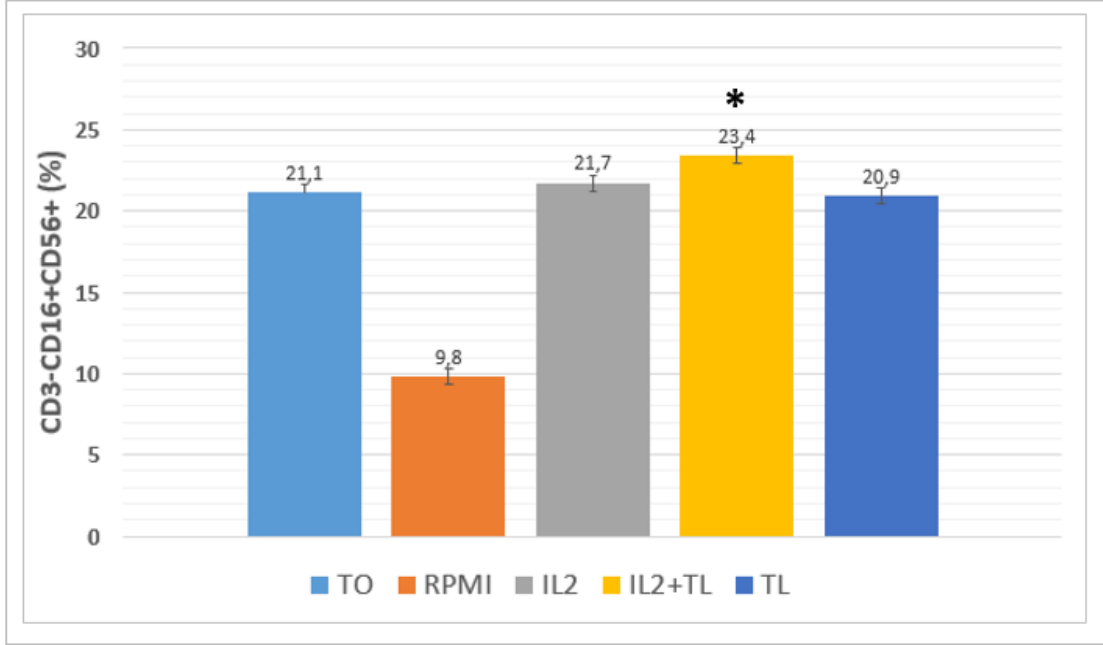
4. 6. Kordon Kanından Mononükleer Hücre (MNH) izolasyonu Sonrası İn-Vitro Uyarım.

MNH izolasyonu sonrası hücreler bazal medium (RPMI), trombosit lizat (%10), interlökin-2 (500 IU/mL) (IL-2) ve trombosit lizat+IL-2 ile birlikte 72 saat süre ile uyarıldı. Uyarım sonrası flow sitometrik olarak CD3- CD16+CD56+ hücrelerin MNH içindeki oransal değişiklik tespit edildi. Uyarım olmayan grupta başlangıç anındaki (T0)

değerin altında bir doğal öldürücü hücre oranı tespit edildi. Bu sonuca ek olarak ortalamalar karşılaştırıldığında, IL2+TL grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (Şekil 4.7.).



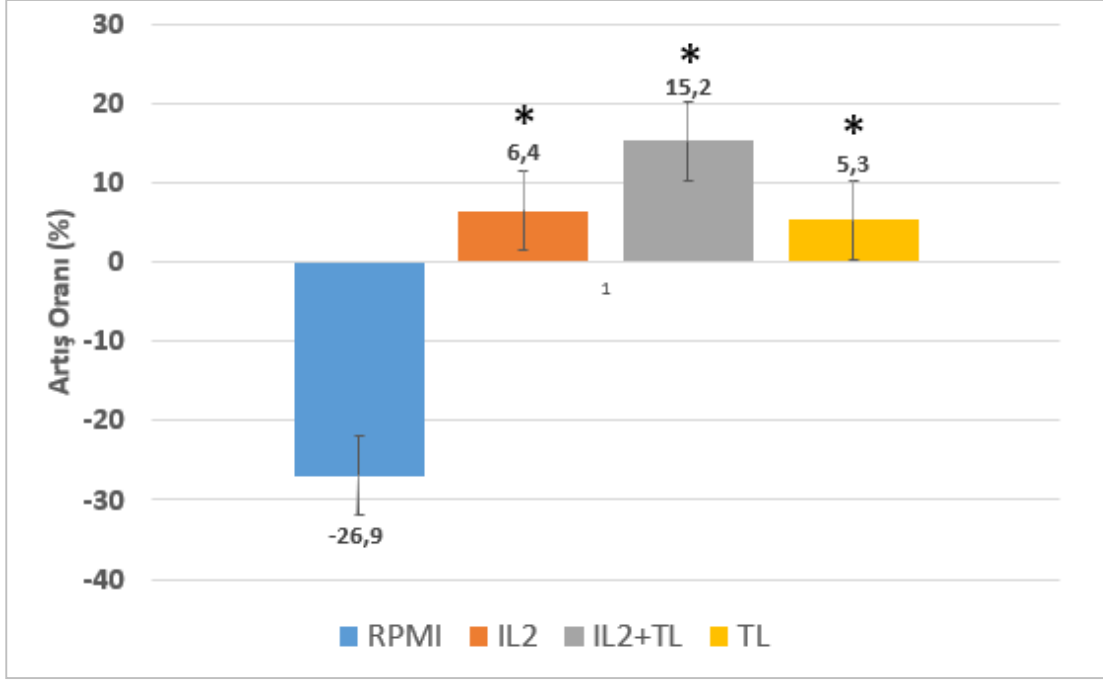
Şekil 4. 6. Başlangıç anında (T0) ve uyarım sonrası doğal öldürücü hücre oranları. (RPMI: Bazal medium, TL: Trombosit Lizat (%10), IL-2(500 IU/mL .): interlökin-2)



Şekil 4. 7. Başlangıç anında (T0) ve uyarım sonrası doğal öldürücü hücre oranları (ortalama).
 (RPMI: Bazal medium, TL: Trombosit Lizat(%10), IL-2(500IU/mL): interlökin-2) * p<0,05

4. 7. CD16+/CD56+ Hücre Seleksiyonu Yapıldıktan Sonra Doğal Öldürücü Hücrelerin uyarımı ve Oransal hücre artışı.

Seleksiyon yapıldıktan sonra başlangıçta hücre sayısı her grup için 10^5 olacak şekilde ayarlandı ve in-vitro uyarım gerçekleştirildi. 72 saatlik uyarım sonrası hücreler kültür ortamından alındı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. Bazal medium ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Trombosit lizat ve IL-2'nin birlikte uygulandığı grup en yüksek hücre artışının olduğu grup olarak bulundu (Şekil 4.8.).



Şekil 4. 8. Uyarım sonrası doğal öldürücü hücre oranları (ortalama). (RPMI:Bazal medium, TL: Trombosit Lizat(%10), IL-2(500 IU/mL): interlökin-2) * p<0,05

5. TARTIŞMA

Hematopoez kan yapıcı kök hücre grubundan tüm olgun kan hücrelerinin oluşturulup periferik kana serbest bırakılması olarak tanımlanan ve sıkı bir biçimde kontrol edilen fizyolojik bir süreçtir. Bu süreç normal şartlarda dışarıdan gelen uyarılar ve hücre içi faktörlerin koordineli biçimde çalışması ile fizyolojik sınırlar içinde yaşam boyunca kan dokusunun devamını sağlar (Kosan ve Godmann,2016). Olgun kan hücreleri dolaşım kanında belirli sınırlar içinde bulunur. Bu hücrelerden trombositler milimetreküp de 150 bin ile 450 bin arasında bir aralıkta bulunması fizyolojik olarak normal kabul edilir. Trombositler temel olarak kanın pıhtılaşmasında önemli görevler üstlenirken son zamanlarda biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ile birlikte ticari olarak farklı sağlık uygulamalarında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Ortopedik, oftalmolojik, dermatolojik, estetik ve kozmetik alanda, barındırdıkları büyüme faktörlerinin iyileştirici ve yenileyici özelliğinden dolayı geniş kullanım alanı bulmaktadır (Magalon ve ark,2014).

Trombositler kaynağı insan olan kısa raf ömrüne sahip biyolojik ilaç olarak nitelendirilebilir, bunun yanında farklı formlarda saklamak, transfer etmek ya da kullanım dozu belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örnek sayılarındaki farklılıklar, sitokin ve büyüme faktörü etkileri, mikroçevre kullanılan laboratuvar yöntemleri gibi temel noktalar transfüzyon dışındaki klinik kullanımlarda henüz bir standartizasyonun oluşmasına izin vermemektedir(Cohn ve Lockhart,2015; Busilacchi ve ark,2013). Doğumdan sonra erişkin dönemde sadece kemik iliğinde yapılıp dolaşım kanına verilen trombositler, gebelik sürecinde anne ve bebek arasındaki dolaşımda görevli kordon dokusunda da bulunmaktadır. Kordon kanından elde edilen trombositler erişkinlerle kıyaslandığında uyaranlara daha düşük yanıt verme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir (Sola-Visner,2012). Bu özellik laboratuvar destekli klinik uygulamalarda geniş kullanım alanı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Transfüzyon dışında kullanım için trombositlerin elde edilme yöntemleri incelendiğinde plazma içinde hazırlanıp taze halde kullanılabileceği gibi tekrarlayan dondurma ve çözme siklusları sonrasında lizat haline getirilip klinik kullanıma sunulabileceği görülmektedir (Hyojin ve ark,2015).

Hücre kültürü ve doku mühendisliği için standart in-vitro besi ortamı takviyesi ve büyüme faktörlerinin kaynağı fetal sıgır serumu (FBS) olmuştur. 1995 yılında Lazarus ve arkadaşlarının ilk raporundan bu yana (Lazarus ve ark,1995), hücre tedavilerde çoğunlukla klinik araştırmalar için hücreler FBS'de kültüre edilmiştir (Koc ve ark,2001). FBS kullanımı durumunda, Sığır antijenlerine karşı kseno-immünizasyon risklerinin bulunması, patojenlerin bulaşma riski, FBS toplama yöntemleriyle ilişkili etik sorunlar ve potansiyel bulunabilirlik sınırları uygun insan alternatiflerinin üretilmesi çalışmaların yoğunlaşmasına sebep olmuştur (Selvaggi ve ark,1997). Trombosit kaynaklı preparatların in vivo kullanımının yayılmasına paralel olarak in-vitro hücre proliferasyonu için trombosit lizatlarının kullanımı 1980'lerde başlatılmıştır. Trombosit konsantrasyonlarının lizinden sonra elde edilen lizatlar, fibroblastların, endotel hücrelerinin veya tümör hücre dizilerinin in-vitro kültürü için etkili bir şekilde kullanılmıştır (Holmovist ,1989; Alden ve ark,2007).

Doğal öldürücü hücreler bağışıklık sistemde önemli görevleri olan büyük granüler lenfosit görünümündeki hücrelerdir. Tümör ve virüs ile enfekte olmuş hücreleri hedef alırlar. Trombositlerin alfa granüllerinde bulunan PDGF, VEGF, SDF-1, IL-8 gibi önemli biyolojik etkileri olan faktörlerin aynı zamanda tümör mikroçevresinde bulunan ve tümör hücreleri tarafından salgılanan faktörlerden olması dikkatimizi çeken bir gözlemdir (Pilar,2013). Bu gözlemimizi destekler nitelikte yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada özellikle PDGF' nin tümör mikro çevresinde bulunması Doğal öldürücü hücrelerin NKp44 reseptörü aracılığı ile aktivasyonunu arttırıp tümör büyümesini engellediğini ortaya koymuştur (Barrow,2017). Doğal öldürücü hücrelerin in-vitro ortamda çoğaltılmasında mevcut şartlarda kullanılan yöntemlerden sitokin uyarımı aracılı yöntem uygulama olarak daha pratik olmasına rağmen verimlilik olarak daha düşüktür. Yaklaşık olarak on ila yüz kat daha yüksek verimliliğe sahip olmasına karşın destek/aksesuar hücre temelli olan yöntem uygulama zorluğu açısından sitokin yöntemine göre daha az tercih edilmektedir.

Allojenik trombosit lizat preparatı için trombosit konsantreleri ulusal ve uluslararası yasal düzenlemelere göre üretilir. Donör kalifikasyonu, kanın test edilmesi ve işlenmesi için bileşenler birçok ülkede trombosit konsantreleri lisanslı kan merkezlerinin

sorumluluğundadır ve iyi imalat uygulamaları (GMP) ilkelerine uymak zorundadır (<http://www.who.int>, 10 Ocak 2020).

Bu çalışmada Kordon kanından elde edilen trombosit lizatların doğal öldürücü hücrelerin in-vitro ortamda çoğaltılmasında hücre çoğalmasını arttırıcı yönde etkisi değerlendirildi. Çalışmanın tüm aşamalarında GMP ilkelerine göre oluşturulmuş altyapı ve proselere uygun şekilde deneyler planladı ve gerçekleştirdi. Öncelikle gönüllü gebelerden kordon kanı toplandı, MNH izolasyonu ve doğal öldürücü hücre seçilimi yapıldı. Trombosit lizat oluşumu için öncelikle trobositten zengin plazma elde edildi daha sonrada lizat hazırlandı. Hücre kültürü ortamında doğal öldürücü hücreler IL-2 ve trombosit lizat varlığında uyarıldı. Hücrelerin belirlenmesi, sayımı ve uyarım sonrası gruplar arasındaki farklar flow sitometrik yöntem ve otomatik hücre sayımı ile değerlendirildi. Lizat etkinliğini test etmek için ELİZA yöntemi ile PDGF seviyeleri ölçüldü.

Çalışmaya 10 sağlıklı gönüllü gebe dahil edildi (Tablo4.1.) doğumlardan biri doğal doğum dokuzu sezaryen kesi şeklinde gerçekleşti. Tüm kordon kanlarından lizat eldesi ve hücre izolasyonları başarılı şekilde gerçekleştirildi. Lizatlar GMP koşullarında ve herhangi bir kontaminasyon gözlenmeden elde edildi, şahit parametre olan PDGF seviyesi yeterli olarak tespit edildi (Şekil 4.2.-Tablo 4.2.). MNH izolasyonu sonrası hücreler bazal medium (RPMI), trombosit lizat (%10), interlökin-2 (500 IU/mL) (IL-2) ve trombosit lizat+IL-2 ile birlikte 72 saat süre ile uyarıldı. Uyarım sonrası flow sitometrik olarak CD3- CD16+CD56+ hücrelerin MNH içindeki oransal değişiklik tespit edildi. Uyarım olmayan grupta başlangıç anındaki (T0) değerinin altında bir doğal öldürücü hücre oranı tespit edildi. Bu sonuca ek olarak ortalamalar karşılaştırıldığında, IL2+TL grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (Şekil 4.7.). Seleksiyon yapıldıktan sonra başlangıçta hücre sayısı her grup için 10^5 olacak şekilde ayarlandı ve in-vitro uyarım gerçekleştirildi. 72 saatlik uyarım sonrası hücreler kültür ortamından alındı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. Bazal medium ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Trombosit lizat ve IL-2'nin birlikte uygulandığı grup en yüksek hücre artışının olduğu grup olarak bulundu (Şekil 4.8.). Bildiğimiz kadarı ile bu çalışma kordon kanı kaynaklı

trombosit lizatların doğal öldürücü hücreler üzerine etkinliğini ortaya koyan ilk çalışmadır. Doğal öldürücü hücreler genellikle in-vitro olarak uzun süreli inkübasyonlar sonunda çoğalabilen hücre grubudur. Uyarım aşamasında birden çok sitokin kullanım ihtiyacı doğmaktadır. Ayrıca ek uyaranlara da ihtiyaç duyulur. Bu çalışma ile elde edilmesi kolay ve ucuz bir preparatla birlikte IL-2 uygulamasının kısa sürede doğal öldürücü hücreler üzerinde proliferasyonu indükleyebileceği ilk kez gösterilmiştir. Bununla birlikte inkübasyon süresinin uzatılması ve trombosit lizat konsantrasyonlarının değişkenliklerinin test edildiği çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Mononükleer hücreler izole edildikten sonra trombosit lizatlar ile uyarıldığında doğal öldürücü hücre oranı artmaktadır. IL-2 ve trombosit lizat birlikte kullanıldığında aditif etki gözlenir.
2. Kordon kanı kaynaklı trombosit lizatlar doğal öldürücü hücrelerin in-vitro çoğalmasında pozitif bir etki gösterir.
3. Bu çalışma inkübasyon süresinin uzatılması ve trombosit lizat konsantrasyonlarının değişkenliklerinin test edildiği çalışmalar ile desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

A. Alden, L. Gonzalez, A. Persson, K. Christensson, O. Holmqvist, S. Ohlson, Porcine platelet lysate as a supplement for animal cell culture, *Cytotechnology* 55 2007: 3e8.

A.T. Nurden, P. Nurden, M. Sanchez, I. Andia, E. Anitua, Platelets and wound healing, *Front. Biosci.* 2008;13:3532e3548.

Aharon G. Freud., et al., A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and differentiates into CD56bright Natural Killer Cells. *Immunity*, Vol. 22, 295–304, March, 2005

Aharon G. Freud., et al., Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 203, No. 4, April 17, 2006 1033–1043

Aktas E., Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009. 5(4): 405–420

Alexander D. Barrow., et al., Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell*. 2017 Dec 20. pii: S0092-8674(17)31388-0

Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med* 2007;204(12):3027–36.

Anushruti Sarvaria., et al., Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Frontiers in Immunology* March 2017 | Volume 8 | Article 329

Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells – enhancement by therapeutic antibodies. *PLoS One* 2007;2:e326. doi:10.1371/journal.pone.0000326

Brauner H, Elemans M, Lemos S, Broberger C, Holmberg D, Flodström-Tullberg M, et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2010;184(5): 2272–80

Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RA., Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydr Polym.* 2013 Oct 15;98(1):665-76.

Carlsten M, Björkström NK, Norell H, Bryceson Y, van Hall T, Baumann BC, et al. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res.* 2007;67(3):1317–25.

Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, Lanino E, Pende D, Moretta L, et al. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1- poliovirus receptor interaction. *Cancer Res* 2004;64(24):9180–4.

Chanvillard C, Infante-Duarte, and R.C. Nayak., The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol*, 2013. 4: 63.

Christian Kosan and Maren Godmann., Genetic and Epigenetic Mechanisms That Maintain Hematopoietic Stem Cell Function *Stem Cells International* Volume 2016, Article ID 5178965,

Cohn CS, Lockhart E., Autologous platelet-rich plasma: evidence for clinical use., *Curr Opin Hematol.* 2015 Nov;22(6):527-32.

Cooper MA., The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunol* 2001. 22: 633–640.

E.M. Golebiewska, A.W. Poole, Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond, *Blood Rev.* 2015;29: 153e162.

Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010; 115:2167–76. doi:10.1182/blood-2009-08-238469

Fehniger TA., CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, 2003. 101(8): 3052–3057

Freeman BE, Raue HP, Hill AB, Slifka MK. Cytokine-mediated activation of NK cells during viral infection. *J Virol* 2015;89:7922–31. doi:10.1128/JVI.00199-15

Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 2011;13(1):98–107.

Günnur DENİZ., NK AND NKT CELLS. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3(43):18-25

H.M. Lazarus, S.E. Haynesworth, S.L. Gerson, N.S. Rosenthal, A.I. Caplan, Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use, *Bone Marrow Transplant*. 1995;16:557e564.

Hyojin Kim, Nutan Prasain, Sasidhar Vemula , Michael J. Ferkowicz , Momoko Yoshimoto , Sherry L. Voytik-Harbin , Mervin C. Yoder, Human platelet lysate improves human cord blood derived ECFC survival and vasculogenesis in three dimensional (3D) collagen matrices, *Microvascular Research* 2015;101: 72–81

J.W. Semple, J.E. Italiano Jr., J. Freedman, Platelets and the immune continuum, *Nat. Rev. Immunol.* 2011;11: 264e274.

Jagannathan-Bogdan M., Hematopoiesis. *Development*. 2013 Jun;140(12):2463- 7

Jeremy Magalon., et al., Characterization and Comparison of 5 Platelet-Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 30, No 5 (May), 2014: pp 629-638

Jewett A, Man YG, Tseng HC. Dual functions of natural killer cells in selection and differentiation of stem cells; role in regulation of inflammation and regeneration of tissues. *J Cancer* 2013; 4:12–24. doi:10.7150/jca.5519

Keilholz U, Scheibenbogen C, Brado M, Georgi P, Maclachlan D, Brado B, et al. Regional adoptive immunotherapy with interleukin-2 and lymphokineactivated killer (LAK) cells for liver metastases. *Eur J Cancer* 1994;30A(1):103–5.

Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1051–7. doi:10.4161/cbt.3.11.1173

Kiel MJ1., et al., SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005 Jul 1;121(7):1109-21

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91:661–72. doi:10.1016/S0092-8674(00)80453-5

Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:597–605. doi:10.1016/j.ceb.2008.05.006

Kumar P, Thakar MS, Ouyang W, Malarkannan S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol* 2013; 6:69–82. doi:10.1038/mi.2012.49

Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics* 2012; 6:73–82. doi:10.2147/BTT.S23976

Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986;137:2735–9.

Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989; 169:2233–8. doi:10.1084/jem.169.6.2233

Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol*2013; 4:499

Magalon J, Bausset O, Serratrice N, Giraud L, Aboudou H, Veran J, Magalon G, Dignat-Georges F, Sabatier F, Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model. *Arthroscopy*. 2014 May;30(5):629-38

Male V, Nisoli I, Kostrzewski T, Allan DS, Carlyle JR, Lord GM, et al. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J Exp Med* 2014;211:635–42. doi:10.1084/jem.20132398

Markus Granzin., et al., Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Frontiers in Immunology* April 2017 | Volume 8 | Article 458

Martha Sola-Visner., et al., Platelets in the neonatal period: developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:506-11

Matthew B. Murphy., et al., Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials* 2012;33: 5308e5316

Mayani H, Wagner JE, Broxmeyer HE. Cord blood research, banking, and transplantation: achievements, challenges, and perspectives. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jan;55(1):48-61.

Moretta L, Pietra G, Montaldo E, Vacca P, Pende D, Falco M, Del Zotto G, Locatelli F, Moretta A, Mingari MC Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. *Front Immunol* 2014;5:87

Moroff G, Eichler H, Brand A, Kekomaki R, Kurtz J, Letowska M, Pamphilon D, Read EJ, Lecchi LP, Reems JA, Sacher R, Seetharaman S, Takahashi TA; Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Multiplelaboratory comparison

of in vitro assays utilized to characterize hematopoietic cells in cord blood. *Transfusion* 2006;46:507-15.

N M-Reboredo, A Di'az, A Castro and RG Villaescusa Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 1263–1270

Ni Z, Knorr DA, Clouser CL, Hexum MK, Southern P, Mansky LM, et al. Human pluripotent stem cells produce natural killer cells that mediate anti-HIV-1 activity by utilizing diverse cellular mechanisms. *J Virol* 2011;85(1):43–50.

O.N. Koc, H.M. Lazarus, Mesenchymal stem cells: heading into the clinic, *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:235e239.

O.W.B. Holmovist, Blood Platelet Lysate, Method of its Preparation and a Cell Culture Medium Containing Said Blood Platelet Lysate, European Patent Office 1989, p:15 WO 89/10398 PCT/SE89/00232.

Olson TA, Levine RF, Mazur EM, Wright DG, Salvado AJ. Megakaryocytes and megakaryocyte progenitors in human cord blood. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992;14:241-7.

Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:515–25. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.020

Patrick CH, Lazarchick J, Stubbs T, Pittard WB. Mean platelet volume and platelet distribution width in the neonate. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1987;9:130-2.

Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon, delta proteins. *J Exp Med* 1992;175(4):1055–66.

Pilar de la Puente ., et al., Cell Trafficking of Endothelial Progenitor Cells in Tumor Progression. *Clin Cancer Res*; 19(13) July 1, 2013

Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol* 2014;5:27. doi:10.3389/fimmu.2014.00027

Robertson MJ., Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 1990. 76(12): 2421–2438.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295(5562):2097–100.

Ruggeri L., et al., Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2097-100.

Sainio S, Jarvenpaa AL, Renlund M, Riikonen S, Teramo. K, Kekomaki R. Thrombocytopenia in term infants: a population-based study. *Obstet Gynecol* 2000;95:441-6.

Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. *Front Immunol* 2017;8:360. doi:10.3389/fimmu.2017.00360

Simonetta F, Pradier A, Roosnek E. T-bet and eomesodermin in NK cell development, maturation, and function. *Front Immunol* 2016;7:241. doi:10.3389/fimmu.2016.00241

Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42:501–10. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034

Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013;13:145–9. doi:10.1038/nri3365

Stabile H, Fionda C, Gismondi A, Santoni A. Role of distinct natural killer cell subsets in anticancer response. *Front Immunol* 2017;8:293. doi:10.3389/fimmu.2017.00293

Strowig T., Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol*, 2008. 180(12): 7785–7791.

Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:645–57. doi:10.1038/nri3044

T Feuchtinger., et al., Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones. *Bone Marrow Transplantation* 2009; 43, 875–881

T.A. Selvaggi, R.E. Walker, T.A. Fleisher, Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virusinfected patients given syngeneic lymphocyte infusions, *Blood* 89 1997; 776e779.

Thierry Burnouf , Dirk Strunk , Mickey B.C. Koh d, Katharina Schallmoser. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016;76:371e387

Wilson A., et al., Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to selfrenewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008 Dec 12;135(6):1118-29

Woll PS, Grzywacz B, Tian X, Marcus RK, Knorr DA, Verneris MR, et al. Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood* 2009;113(24):6094–101.

Woll PS, Martin CH, Miller JS, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. *J Immunol* 2005;175(8):5095–103.

Y. Sekido, Y. Morishima, Ohya Ki, Activity of platelet-derived growth factor (PDGF) in platelet concentrates and cryopreserved platelets determined by PDGF bioassay, *Vox Sang*. 1987;52:27e30.

Zamora AE, Gossenbacher SK, Aguilar EG, Murphy WJ. Models to study NK cell biology and possible clinical application. *Curr Protoc Immunol* 2015; 110:14.37.1–14. doi:10.1002/0471142735.im1437s110

Zhang Y, Huang B. The development and diversity of ILCs, NK cells and their relevance in health and diseases. *Adv Exp Med Biol* 2017;1024:225–44. doi:10.1007/978-981-10-5987-2_11

EKLER

EK-1

Etik Kurul Onayı

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
2018

ETİK KURUL BİLGİLERİ		KARAR	
ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA		
TELEFON	0 (242) 249 69 54		
FAKS	0 (242) 249 69 03		
E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr		
ETİK KURUL KODU	2012-KAEK-20		
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Levent ÜNDAR		
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Doğal Öldürücü Hücrelerin in-vitro Çoğalmasında Kordon Kanı Kaynaklı Trombosit Lizatların Etkinliğinin Değerlendirilmesi		
DESTEKLEYİCİ	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 315	Tarih: 02.05.2018	
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.		

Prof.Dr. İsmail PAŞATARGIL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Dr. Öğr. Üyesi M. Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Murat CANPOLAT
Üye

Prof. Dr. Dilek İNAN
Üye

Prof. Dr. Selahattin KUMRU
Üye (İznil)

Prof. Dr. Başar KARSLI
Üye

Prof. Dr. Yeli YAZISIZ
Üye

Prof. Dr. Oğuz DİLBERGİN
Üye

Doç. Dr. Gülsüm ÖZGE DAYSAK
Üye

Doç. Dr. Dile KİPMEN KÖRĞÜN
Üye

Doç. Dr. Hanu NUR
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÖRKAY
Üye (İznil)

Dr. Onal HÖLÖR
Üye (İznil)

Harun ALTUN
Üye

Av. Mustafa AÇIKEL
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fulden	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Yıldırım	Tel no	05079344697
Doğum tarihi	15.07.1992	e-posta	fuldenyldrm92@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	75.Yıl Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2010
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü İç Hastalıkları İmmünohematoloji	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Teknokent-Babylife Kordon Kanı Bankası	(2014/-)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	31,25
İngilizce	YÖKDİL	41,250

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayımlar ve Bildiriler: