

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LÖSEMİK KÖK HÜCRELERDE
ERKEN EMBRİYONİK KÖK HÜCRE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

HALİL ATEŞ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LÖSEMİK KÖK HÜCRELERDE
ERKEN EMBRİYONİK KÖK HÜCRE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

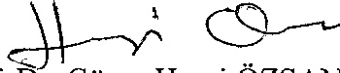
HALİL ATEŞ

Danışman Öğretim Üyesi: **Prof. Dr. GÜNER HAYRİ ÖZSAN**

Bu araştırma Türk Hematoloji Derneği tarafından “THD 2007 Araştırma Projelerini Destekleme Programı” kapsamında 08/249 sayı ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik doktora programı öğrencisi Halil Ateş'in "**Lösemik Kök Hücrelerde Erken Embriyonik Kök Hücre Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonunun Araştırılması**" isimli doktora tezi 18.06.2009 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek **Başarılı** bulunmuştur.

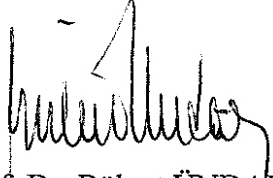
JÜRİ ÜYELERİ



Prof. Dr. Güner Hayri ÖZSAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

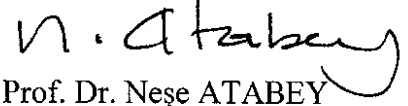
Erişkin Hematoloji BD



Prof. Dr. Bülent ÜNDAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Erişkin Hematoloji BD



Prof. Dr. Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

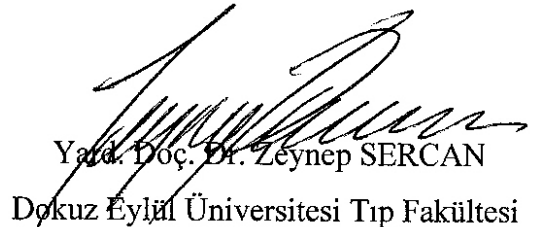
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD



Doç. Dr. Yusuf BARAN

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Yard. Doç. Dr. Zeynep SERCAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İçindekiler	<i>i</i>
Tablo listesi	<i>iii</i>
Şekil listesi	<i>v</i>
Kısaltmalar	<i>vii</i>
Teşekkür	<i>viii</i>
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Kök Hücre: Tanımı ve Özellikleri	7
2.2 Embriyonik Kök Hücreler	11
2.2.1 Embriyonik Kök Hücre Özellikleri ve Pluripotensi	11
2.2.2 Embriyonik Kök Hücre Transkripsiyon Faktörleri	14
2.3 Erişkin Kök Hücreler	17
2.4 Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler	19
2.5 Hematopoietik kök Hücreler	20
2.6 Kanser Kök Hücreleri	22
2.6.1 Lösemi-başlatıcı Hücreler (Lösemik Kök Hücre)	23
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	26
3.1 Çalışma Materyali	27
3.2 Kemik İliğinden MNC'lerin Ayrılmasında ve Dondurulması.....	28
3.3 Çok Parametrelili Manyetik Hücre Ayırma (MACS)	30

3.4 Akım Sitometrik Analiz	33
3.5 Oct-4, Nanog ve Rex-1 Gen İfadelerinin Analizi	36
3.5.1 Total RNA İzolasyonu	36
3.5.2 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	38
3.5.3 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
3.5.4 Agaroz Jel Elektroforezi	42
3.6 İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1 Manyetik Boncuklar ile Hücre Ayrılmasının kontrolü	47
4.2 PCR amplifikasyonlarının Agaroz Jeldeki Band Görüntüleri	48
4.2.1 Sağlıklı kontrol grubuna ait Hücreler PCR amplifikasyonları	48
4.2.2 AML Hasta Grubuna ait Hücrelerde PCR Amplifikasyonları	51
4.2.3 KML Hasta Grubuna ait Hücrelerde PCR Amplifikasyonları	54
4.3 CD34-negatif Hücelere ait Normalize Edilmiş PCR sonuçları	57
4.4 Akım Sitometrik Analiz Sonuçları	63
4.4.1 Akım Sitometrik SSEA.4 Ekspresyonu Analiz Sonuçları	65
4.4.2 Akım Sitometrik Oct.4 Ekspresyonu Analiz Sonuçları	68
4.4.3 Akım Sitometrik Nanog Ekspresyonu Analiz Sonuçları	71
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	86
8. EKLER	95

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Elde edildikleri kaynağa göre tanımlanmış olan kök hücre türleri.	10
Tablo 2: Fare ve insanlarda en iyi tanımlanan embriyonik kök hücre göstergeleri.	12
Tablo 3: cDNA sentezi için hazırlanan kalıp-primer karışım içeriği.	38
Tablo 4: cDNA sentezi için hazırlanan ikinci reaksiyon karışımı.	39
Tablo 5: Gerçek zamanlı PCR’da kullanılan primer dizileri ve amplicon büyüklükleri.	40
Tablo 6: Gerçek zamanlı PCR’da uygulanan ısı profilleri.	40
Tablo 7: Gerçek zamanlı PCR karışımının içeriği.	41
Tablo 8: Çalışmaya dâhil edilen AML olgu grubunun klinik ve patolojik verileri.	44
Tablo 9: Çalışmaya dâhil edilen KML olgu grubunun klinik ve patolojik özellikleri.	45
Tablo 10: Olguların cinsiyete göre dağılımı.	46
Tablo 11: Grupların yaş ortalamalarına göre dağılımı.	46
Tablo 12: Gruplara ait CD34- hücrelerde, rölatif kantitasyon oranı ortalamaları.	61
Tablo 13: Alt gruplara ait CD34- hücrelerde, rölatif kantitasyon oranı ortalamaları.	62
Tablo 14: Kontrol grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları.	65
Tablo 15: AML grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları.	66
Tablo 16: KML grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları.	67
Tablo 17: Kontrol, AML ve KML grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ortalamaları.	68
Tablo 18: AML alt grubunda akım sitometrik SSEA.4 ortalamaları.	68

Tablo 19: Kontrol grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct-4 analiz sonuçları.	70
Tablo 20: AML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct-4 analiz sonuçları.	71
Tablo 21: KML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct-4 analiz sonuçları.	72
Tablo 22: Kontrol, AML ve KML grubuna ait akım sitometrik Oct-4 ortalamaları.	73
Tablo 23: AML alt grubunda akım sitometrik Oct-4 ortalamaları.	73
Tablo 24: Kontrol grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct-4 analiz sonuçları.	76
Tablo 25: AML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct-4 analiz sonuçları.	77
Tablo 26: KML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct-4 analiz sonuçları.	78
Tablo 27: Kontrol, AML ve KML grubuna ait akım sitometrik Oct-4 ortalamaları.	79
Tablo 28: AML alt grubunda akım sitometrik Oct-4 ortalamaları.	79
Tablo 29: Kontrol, AML ve KML olgularında Oct-4, Nanog ve Rex-1 gen ekspresyon sonuçları.	85

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler.	8
Şekil 2: Pluripotent ve multipotent kök hücre tipleri.	9
Şekil 3: Embriyonik kök hücre ve Oct-4 ekspresyonu.	14
Şekil 4: Oct-4 geninin yapısı ve fonksiyonu.	15
Şekil 5: Embriyonik kök hücrelerde transmembran sinyal ileti yolağı.	16
Şekil 6: Kemik iliğı kökenli kök hücrelerin değişik hücre türlerine dönüşümü.	17
Şekil 7: İnsan normal ve lösemik hematopoietik hiyerarşinin şematik gösterimi.	24
Şekil 8: Çalışmada kullanılan yöntemlerin genel akış şeması.	26
Şekil 9: Manyetik ayrımı yapılan hücre fraksiyonlarının saflığın kontrol edilmesi.	47
Şekil 10: Kontrol grubuna ait CD34+CD38- hücrelerde PCR amplifikasyonları.	48
Şekil 11: Kontrol grubuna ait CD34+CD38+ hücrelerde PCR amplifikasyonları.	49
Şekil 12: Kontrol grubuna ait CD34- hücrelerde PCR amplifikasyonları.	50
Şekil 13: AML hasta grubuna ait CD34+CD38- hücrelerde PCR amplifikasyonları.	51
Şekil 14: AML hasta grubuna ait CD34+CD38+ hücrelerde PCR amplifikasyonları.	52
Şekil 15: AML hasta grubuna ait CD34- hücrelerde PCR amplifikasyonları.	53
Şekil 16: KML hasta grubuna ait CD34+CD38- hücrelerde PCR amplifikasyonları.	54
Şekil 17: KML hasta grubuna ait CD34+CD38+ hücrelerde PCR amplifikasyonları.	55
Şekil 18: KML hasta grubuna ait CD34- hücrelerde PCR amplifikasyonları.	56

Şekil 19: RT-PCR fluoresans grafiklerinin ve ergime eğrilerinin görüntüsü.	57
Şekil 20: Normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranının otomatik hesaplanması.	57
Şekil 21: AML örneklerinde Oct-4 ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyonu.	58
Şekil 22: KML örneklerinde Oct-4 ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyonu.	58
Şekil 23: AML örneklerinde Nanog ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyonu.	59
Şekil 24: KML örneklerinde Nanog ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyonu.	59
Şekil 25: AML örneklerinde Rex-1 ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyonu.	60
Şekil 26: KML örneklerinde Rex-1 ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyonu.	60
Şekil 27: CD34+ ve CD34- hücrelerde akım sitometrik SSEA.4 ekspresyonu.	63
Şekil 28: CD34+ ve CD34- hücrelerde akım sitometrik Oct-4 ve Nanog ekspresyonu.	64
Şekil 29: Kontrol, AML ve KML örneklerinde akım sitometrik SSEA.4 ekspresyonu.	69
Şekil 30: Kontrol, AML ve KML örneklerinde akım sitometrik Oct-4 ekspresyonu.	74
Şekil 31: Kontrol, AML ve KML örneklerinde akım sitometrik Nanog ekspresyonu.	80

KISALTMALAR

- AML : Akut myeloid lösemi (Acute myeloid leukemia)
- EC : Embriyonal karsinoma (Embryonal carcinoma)
- EKH : Embriyonik kök hücre (Embryonic stem cell)
- EPC : Endotelial öncü hücre (Endothelial progenitor cell)
- FGF : Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
- HKH : Hematopoietik kök hücre (Hematopoietic stem cell)
- ICM : İçsel hücre kitlesi (Inner cell mass)
- KML : Kronik myeloid lösemi (Chronic myeloid leukemia)
- LIF : Lösemi engelleyici faktör (Leukaemia inhibitory factor)
- LKH : Lösemik kök hücre (Leukemic stem cell)
- MACS : Manyetik aktive edilmiş hücre ayırma (Magnetic Activated Cell Sorting)
- MAPC : Çok potansiyelli erişkin öncü hücre (Multipotent adult progenitor cell)
- MİAMİ : İlik-kökenli uyarılabilir çok potansiyelli kök hücre
(Marrow-derived inducible multilineage stem cell)
- MKH : Mezenkimal kök hücre (Mesenchymal stem cell)
- NOD/SCID: Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
- OCT-4 : Oktamer-bağlanma transkripsiyon faktörü
(Octamer-binding transcription factor-4)
- PSC : Pluripotent kök hücre (Pluripotent stem cell)
- RT-PCR: Ters yazılımlı-polimeraz zincer reaksiyonu
- SOX-2 : SRY-related high-mobility group (HMG)-box protein
- SSEA.4 : Evre-özel embriyonik antijen-4 (Stage specific embryonic antigen-4)
- TRA : Tümör reddetme antijeni (Tumour-rejection antigen)

TEŞEKKÜR

Projenin mali kaynağını sağlayan Türk Hematoloji Derneğine,

Bu çalışmanın planlanması yürütülmesi ve sonuçların yorumlanması aşamalarında bilimsel görüşlerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta danışmanım Prof. Dr. Güner Hayri ÖZSAN'a, Erişkin Hematoloji BD başkanı Prof. Dr. Bülent ÜNDAR'a ve makale yazımındaki katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Özden PIŞKIN'e,

Kontrol kemik iliği örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Kalp-Damar Cerrahisi AD başkanı Prof. Dr. Eyüp HAZAN'a,

Moleküler çalışmaların planlanması ve gerçekleştirilmesinde bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Yard. Doç. Dr. Zeynep SERCAN ile Doç. Dr. Hakkı Ogün SERCAN'a ve laboratuardaki yardımlarından dolayı Dr. Sefa KIZILDAĞ'a,

İstatistiksel analizlerin yapılması ve değerlendirilmesindeki katkıları için Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,

Bütün çalışmalarım boyunca manevi desteğini hiç esirgemeyen aileme teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Halil ATEŞ

ÖZET

LÖSEMİK KÖK HÜCRELERDE ERKEN EMBRİYONİK KÖK HÜCRE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Halil ATEŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, İzmir.

Oct-4, Nanog ve Rex-1 gibi transkripsiyonel faktörler embriyonik kök hücrelerde self-renewal (kendini yenileme), differansiyasyon ve pluripotensi yönünden önemli rol oynamaktadır. Fenotipik olarak kanser hücreleri kendini yenileme, sınırsız çoğalma, farklılaşma ve yayılma özellikleri bakımından embriyonik kök hücreler (EKH) ile benzerlikler göstermektedir. Bu benzerlikler, bazı erken EKH transkripsiyon faktörlerinin kanser hücrelerinde yeniden eksprese edilebileceğini akla getirmektedir. Yapılan çalışmalarda, normal erişkin kök hücreler ile bazı insan tümör hücrelerinde bu transkripsiyon faktörlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir. Ancak hematopoietik kök hücre ve myeloid lösemilerde ekspresyonları bilinmemektedir.

Bu çalışmada sağlıklı kontrollere ait kök hücrelerde, akut myeloid lösemi (AML) ve kronik myeloid lösemili (KML) hasta örneklerinde erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve akım sitometrik analiz yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

Sonuçlarımız gerek kontrollerde ve gerekse de lösemi örneklerine ait CD34+ hücre fraksiyonunda RT-PCR aracılıklı Oct-4, Nanog ve Rex-1 amplifikasyonları bazı vakalarda negatiflik göstermektedir. Ancak CD34- hücre fraksiyonunda ise tüm örneklerde amplifikasyon gözlenmiştir. CD34- hücre fraksiyonunda ekspresyon seviyesi kıyaslamalarında AML ve KML gruplarında ekspresyonların kontrollere göre daha düşük olduğu saptandı. Bununla birlikte AML grubunda FAB (Fransız-Amerikan-İngiliz hematolog grubu) sınıflamasına göre tüm M1 fenotipindeki örneklerde Oct-4 ve Nanog ekspresyonlarının hem kontrollere göre hem de diğer AML FAB alt gruplarına göre daha yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Akım sitometrik analiz sonuçlarında da benzer şekilde CD34- hücre fraksiyonunda ekspresyon düzeylerinin kısmen yüksek olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu öncü çalışmada biz erken EKH transkripsiyon faktörlerinin gerek sağlıklı kontrollerde gerekse de lösemik hücrelerde eksprese edildiğini gösterdik. Bu ekspresyon ilginç bir şekilde kök hücrelerden çok CD34- kompartımandadır (hematopoietik dışı kök hücreler). En dikkat çekici bulgu, maturasyon özelliği göstermeyen M1 fenotipindeki AML hastalarının CD34- hücrelerinde Oct-4 ve Nanog transkript seviyelerinin yüksek olmasıydı. İleriye yönelik olarak bu transkripsiyon faktörlerinin prognostik öneminin araştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır. Yine ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu hücre serilerinde bu faktörlere karşı geliştirilmiş inhibitörlerin etkinliği de tedavide bu ekspresyonların önemini ortaya koyacaktır.

Anahtar Kelimeler: Oct-4, Nanog, Rex-1, SSEA.4, Lösemik kök hücre, AML, KML.

ABSTRACT

THE EXPRESSION OF EARLY EMBRYONIC STEM CELL TRANSCRIPTION FACTORS IN LEUKEMIC STEM CELLS

Halil ATES

Dokuz Eylul University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, Izmir.

Transcriptional factors such Oct-4, Nanog and Rex-1 have pivotal role in self-renewal, differentiation and pluripotency of the embryonic stem cells (ESC). In terms of self renewal, unlimited proliferation, differentiation and invasion, cancer cells and embryonic stem cells display similar phenotypic properties. This analogy implies that cancer cells may re-express some of the early ESC transcriptional factors. A couple of studies have revealed expression of early embryonic transcriptional factors on normal adult stem cells and some human cancer cell types. However, expression of early embryonic transcriptional factors has not studied in hematopoietic stem cells and myeloid leukemia cell lines, yet.

In this study, we was carried out to investigate the expression of early embryonic transcriptional factors in stem cells of healthy controls, acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML) by real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and flow cytometric analysis.

Our results showed that some samples of CD34 positive cell fractions from cases of both control and leukemic groups were negative for RT-PCR mediated Oct-4, Nanog and Rex-1 amplification. However, positive amplification was observed in all CD34 negative cells obtained from healthy volunteers and patients with AML or CML. Nonetheless, relative quantitative expression levels of these factors in these patient groups were lower than healthy volunteers. On the other hand, subgroup analysis revealed that Oct-4 and Nanog expressions were higher in patients with minimally differentiated AML (M1 phenotype according to FAB classification) than healthy controls and those patients with other leukemia types. Flow cytometric analysis of the CD34 negative cell fraction was also revealed moderately high expression levels. This finding was concordant with molecular studies.

In conclusion, in this pioneering study we have demonstrated that early ESC transcriptional factors were expressed by different cell fractions obtained from healthy controls and leukemic cells to some extent. The expression is interestingly founded in the CD34 negative compartment of the stem cells (non-hematopoietic stem cells). The most remarkable finding was the high Oct-4 and Nanog transcript levels of cell fractions of patients with acute myeloid leukemia without maturation (AML FAB M1) as indicating immaturity. Regarding our results, investigation of these embryonic transcription factors may help to determine the leukemic transformation step. Moreover, development of targeted therapies against these transcriptional factors may be a therapeutic approach in the near future.

Keywords: Oct-4, Nanog, Rex-1, SSEA.4, Leukemic stem cell, AML, CML.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler, kan yapıcı kök hücrelerin malign tümörleridir. Hematopoietik progenitör öncü hücrelerin belli bir evrede farklılaşmasının bozulması sonucu lösemik hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma özelliklerini kaybetmeleri, normal kan hücrelerinin yapılamaması, aşırı çoğalma yeteneği gösteren lösemik hücrelerin kemik iliğini, periferik kanı ve takiben diğer dokuları istila etmesiyle karakterize malign bir hastalıktır (1). Tüm kanserlerin %3-5'ini oluşturan lösemiler, 35 yaş altı nüfusta kanserlerden ölümlerin başlıca sebebidir. Erişkinlerdeki sıklığı 2-4/100.000 civarında olan akut lösemiler ise yaşla birlikte giderek artış göstermektedir. Lösemi gelişimi için çoğunlukla kabul edilen hipotez; kendini yenileme (self-renewal) ve birçok hematopoietik hücre serilerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hematopoietik kök hücre (HKH)'lerde neoplastik değişimin (transformasyon) oluşmasıdır (2,3). HKH'lerin kendini yenilemesi, çoğalması, belli bir hücre serisine farklılaşması ve sağ kalımında sinyal ileti yolları ile transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır (4-7).

Fenotipik olarak kanser hücreleri kendini yenileme, sınırsız çoğalma, farklılaşma ve yayılma özellikleri bakımından insan pre-implantasyon embriyonik kök hücrelerine (EKH) benzerlikler göstermektedir (8,9). Bu benzerlikler bazı erken EKH transkripsiyon faktörlerinin (SSEA.4, Oct-4, Nanog ve Rex-1 gibi) kanser hücrelerinde yeniden eksprese edilebileceğini ya da epigenetik olarak yeniden aktive olabileceğini akla getirmektedir. Yapılan çalışmalar, insan tümör hücreleri ile insan amniyon sıvısından elde edilen hücrelerde erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin eksprese edildiğini doğrulamaktadır (10,11). Erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin çeşitli erişkin kök hücrelerde ekspresyonunun gösterilmesi kanser gelişiminin kök hücre hipoteziyle tutarlı olduğunu desteklemektedir (12).

Kemik iliği kompartmanı hematopoietik ve non-hematopoietik (endotel öncü hücre, mezenkimal kök hücre, multipotent erişkin öncü hücre, uyarılabilir erişkin multilineage öncü hücre vb.) kök hücreleri de içeren heterojen bir hücre topluluğudur (13). Son günlerde ise fare kemik iliğinde HKH, epiblast kök hücre ve primordial germ hücre için karakteristik özellikleri taşıyan ve in vitro hücre kültürlerinde bütün üç germ tabakasının hücrelerine farklılaşabilen küçük embriyonik-benzeri CXXR4⁺SSEA-1⁺Oct-4⁺ kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir (14).

Hematopoietik ve lösemik kök hücreler (LKH) en iyi tanımlanan ve çalışılan erişkin kök hücre grubu olmasına rağmen bu hücreler farklı heterojeniteye sahiptirler. Bu nedenle yeni fenotipik ve genotipik özelliklerin tanımlanması ve normal gelişim sürecinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılma çalışmaları artarak devam etmektedir. Bazı kanser hücrelerinde erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinden Oct-4'ün eksprese edildiği belirtilmekle (15,16) birlikte yapılan bazı son çalışmalarda, insan tümör hücre hatlarında ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerde (MKH) eksprese edilmediği bildirilmektedir (17).

İnsan göbek kordon kanından elde edilen CD133⁺ kök hücrelerde Oct-4 transkripsiyon faktörünün eksprese edildiği ve bu hücrelerin embriyonik benzeri hematopoietik pluripotent kök hücreler olabileceği belirtilmektedir (18). Kök hücre hastalığı olarak kabul edilen AML ve KML ile normal HKH'lerde erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu, moleküler fenotipik özellikleri ve lösemi gelişimi tam olarak ilişkilendirilmemiştir.

Çalışmamızda, ilk aşamada AML, KML ve sağlıklı kontrollere ait örneklerden kök hücreleri immünofenotipik özelliklerine göre manyetik boncuklar yardımıyla ayırmayı ve elde edilen HKH ile LKH'de erken EKH transkripsiyon faktörlerinin (Oct-4, Nanog ve Rex-1) ekspresyonunu gerçek zamanlı RT-PCR ile araştırmayı planladık. İkinci aşamada ise ekspresyon saptanan hücre komponentlerinde ekspresyon seviyeleri yarı nicel olarak kıyaslanarak istatistiksel anlamlılığı değerlendirilecektir. Yine sağlıklı kontrol, AML ve KML hastalarına ait örneklerde, HKH belirteçlerini kullanarak akım sitometrisinde farklı hücre grupları üzerinde erken EKH transkripsiyon faktörlerinin (Oct-4, Nanog ve SSEA.4) ekspresyonları analiz edilecektir.

Normal ve LKH'lerde embriyonik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun araştırılmasının bu hücrelerin biyolojik özelliklerinin belirlenmesi açısından önemli olacağını düşünmekteyiz. Bu hasta örneklerinde prognostik bir değer olabileceği ve gelecekte biyolojik tedavi yaklaşımları bakımından önemli olabileceği öngörülmektedir. Şu an için prognostik yansımaları bilmiyoruz ancak ileride araştırma konusu olabileceğini düşünmekteyiz. Araştırmamız, AML ve KML'den elde edilen erişkin kök hücrelerde erken EKH transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu inceleyen literatürdeki öncü çalışma olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KÖK HÜCRE: Tanım ve Özellikleri

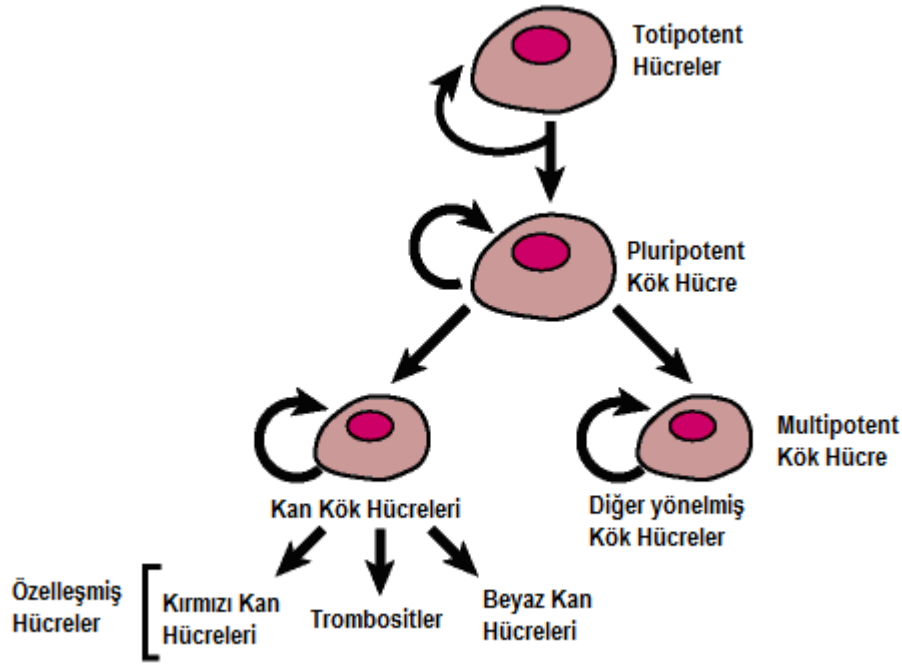
Kök hücre genel anlamda farklılaşmış hücre tiplerini oluşturabilen primitif hücreler olarak tanımlanmaktadır. Kendi kendini yenileyebilme, en az bir olgun hücre tipine (kan, karaciğer ve kas gibi) farklılaşabilme yeteneğine sahip klonal hücrelerdir. Kök hücreler bu özellikleri sayesinde sayılarını sabit tutarlar ve gerektiğinde kendilerinden sonraki hücrelere farklılaşmaya başlayarak görev yapacağı hücrelerin çoğalmasını, gelişimini ve olgunlaşmasını sağlamaktadır. Kök hücrelerin bölünmesi ve farklılaşmış yavru hücreler oluşturmasının yanı sıra yeni kök hücre de oluşturabilmektedir ve hayat boyu farklılaşmış hücrelerin üretiminde kaynak olarak görev yapabilmektedir.

Bir hücrenin, kök hücre olarak tanımlanabilmesi için bilim adamları birtakım kriterler kullanmışlardır (19,20);

- Kendi kendini yenileyebilme; uzun zaman dilimleri boyunca çok sayıda bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olmalıdır.
- Birçok hücre tiplerine farklılaşabilme; kök hücreler tamamen farklı bir başka dokunun hücre tiplerini oluşturabilme özelliği taşımalıdır.
- Kök hücreler özel bir hücreye dönüşebilmesi için şartlanmadan kalabilmelidir. Vücudun pek çok hücresi (kalp hücresi, sinir hücresi, deri hücresi vb.) özellikli bir işlev görmek için özelleşmiştir. Kök hücre ise uygun uyarı alana kadar şartlanmadan kalabilmektedir.
- Belli bir dokuyu oluşturabilme; kök hücrelerin hasar gören alıcıya aktarıldığında kaynak dokuyu yeniden çoğaltarak oluşturabilmelidir. HKH, karaciğer progenitor hücre (21) ve nöral kök hücreler için gösterilmiştir (22).

Kök hücreler üç germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (23) (Şekil 1).

Totipotent kök hücre: Her şeyi yapabilen anlamında olan bu hücreler her üç germ yaprağına ait hücelere dönüşmesi yanında trofoblastları da oluşturabilen hücrelerdir. Sınırsız farklılaşma ve embriyo dışındaki membranları ve dokuları oluşturabilme kapasitesine sahiptir (zigot, blastomer safhasındaki hücreler gibi). Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hüreye kadar ki tüm blastomerler totipotenttir. Totipotent bir hücre anne kaynaklı uygun destekle yeni bir bireyi oluşturabilen hücrelerdir.

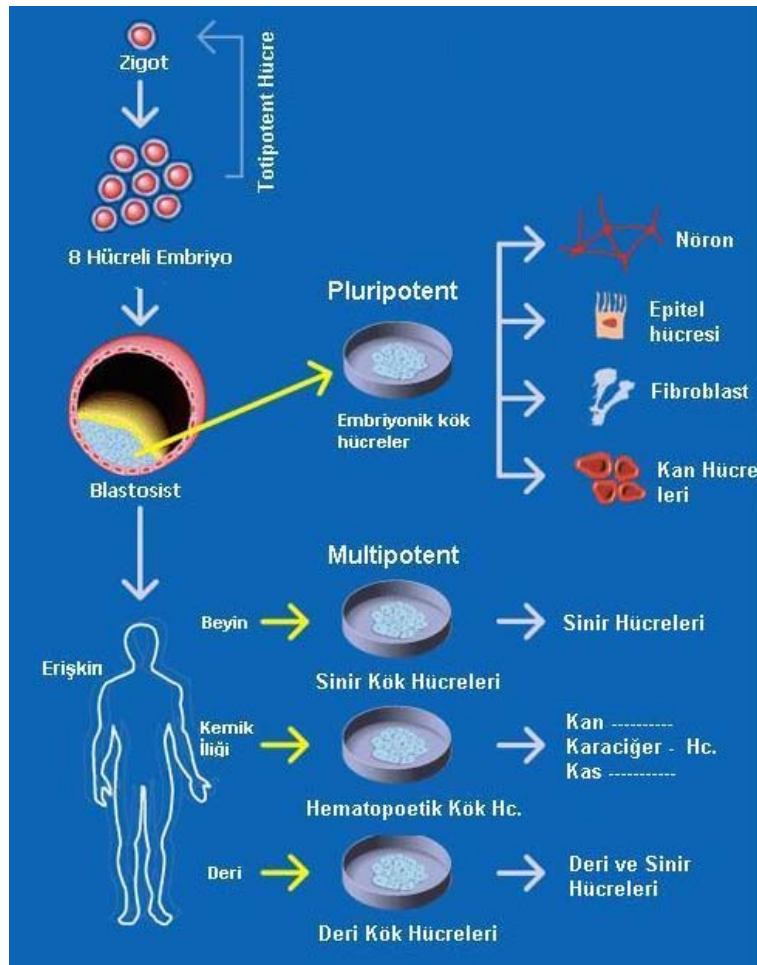


Şekil 1: Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler (24).

Pluripotent kök hücre (PSC): Totipotent hücreden farklı olarak sadece her üç germ yaprağına ait hücelere dönüşebilen hücrelerdir. Organizmanın bütün dokuları olmamakla birlikte çoğunu oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir. *In vivo* bütün hücre serilerine farklılaşabilir, EKH tanımına uygundur. Blastosistin içindeki bu içsel hücre kitlesindeki (ICM) hücreler vücudun endoderm, ektoderm ve mezoderm denilen üç germ tabakasından köken alan yaklaşık 270 çeşit hücre tipine farklılaşabilir (25,26).

Multipotent kök hücreler: Sadece bir germ yaprağına ait hücre türlerine dönüşebilen hücrelerdir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur. Somatik ya da erişkin kök hücresi olarak tanımlanan hücelere dönüşürler. Bu erişkin kök

hücreleri, tipik olarak buldukları dokunun hücre türlerini oluşturmaktadır. Örneğin, kemik iliğinde bulunan HKH, kırmızı ve beyaz kan hücreleriyle birlikte trombositler gibi pek çok farklı kan hücresine kaynaklık etmektedir. Yine kemik iliği kaynaklı MKH'ler ise fibroblastlara, osteoblastlara, kondroblastlara ve yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir. Sinir kök hücreleri, bütün sinir hücre türlerini oluşturabilmektedir (Şekil 2). Bazı erişkin kök hücreler ise sadece tek bir olgun hücre tipine farklılaşabilmektedir (korneal kök hücre gibi). Sınırlı ya da self-renewal yeteneği olmayan ve sadece sınırlı bir hücre tipine farklılaşan bu hücreler “progenitor hücre” veya “prekürsör hücreler” şeklinde tanımlanmaktadır (23-25).



Şekil 2: Pluripotent ve multipotent kök hücre tipleri (24).

Fertilizasyonu takiben yumurta hücresi bölünme sürecine uğruyor ve bölünme olarak bilinen hücre göçü süreci başlıyor. Bu erken süreçte her bir kardeş hücre, orijinal hücrenin tam kromozom bütününe alıyor ve her bir kardeş hücre aynı kalmaktadır. Bu bir simetrik hücre bölünmesi olarak bilinmektedir. Bu şekilde iki kardeş hücre, kök hücre özelliklerini

aynen devam ettirir. Aksine somatik kök hücreler ise asimetrik bölünme özelliği göstermektedir (27). Bölünme sonrası hücrelerden birisi kök hücre olarak kalırken diğeri farklılaşma sürecine gitmektedir.

Kök hücreler esas itibariyle iki farklı kaynaktan elde edilmektedir: Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin ICM'den elde edilen EKH'ler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler (dokuya özgün kök hücreler, doğum sonrası dönemdeki kök hücreler). Fertilize ovumdan itibaren gelişen embriyoda önce "sarı kese (yolk sac)" adı verilen primitif dokuda "EKH'ler", daha sonra bebeğin doğum anında göbek kordonundaki "kordon kanı kök hücreler" ve doğumdan sonrası dönemde "erişkin kök hücreler" olmak üzere değişik türleri bulunmaktadır. Elde edildikleri kaynağa göre günümüze kadar tanımlanan kök hücre tipleri Tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1: Elde edildikleri kaynağa göre tanımlanmış olan kök hücre türleri.

A- Embriyonik kök hücreler.

B- Embriyonik olmayan kök hücreler:

1- Erişkin (somatik) kök hücre.

- Hematopoetik kök hücre (HKH);
 - Kemik iliği kaynaklı kök hücreler.
 - Periferik kan kaynaklı kök hücreler.
- Stromal kök hücre;
 - Mezenkimal kök hücre (MKH).
 - Multipotent erişkin kök hücre.
 - Erişkin kemik iliği kökenli indüklenebilir multilineage kök hücre (MİAMİ).
 - İnsan kemi iliği kökenli kök hücre.
- Organ spesifik kök hücreler.

2- Fötal kök hücre.

3- Kadavradan elde edilen kök hücre.

4- Kordon kanı veya plasental kök hücre.

5- Parteneod hücreler.

6- De-differansiye olan hücre.

2.2 EMBRİYONİK KÖK HÜCRELER

Bilim adamları, farelerden pluripotent embriyonik kök hücreleri ilk olarak 1970'lerde keşfetti. Çok geçmeden bu primitif hücrelerin şaşırtıcı çok yönlülüğünü belirlediler. Bu hücrelerin olağanüstü umut açığa çıkarmasından yaklaşık 20 yıl sonra ise insan pluripotent EKH'leri tanımlandı. İnsan EKH'leri blastosist evresindeki erken insan embriyolarının bozulması ve özel kültür koşulları altında çoğaltılmasıyla elde edilmektedir. İnsan blastosist kökenli pluripotent kök hücre hatlarının normal karyotipe sahip oldukları ve yüksek seviyede telomeraz aktivitesi gösterdiği ve primitif EKH'leri tanımlayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (25).

EKH'ler embriyoda erken evrede bulunan totipotent/pluripotent kök hücreler olarak tanımlanmaktadır. Blastosistin ICM'den köken alan EKH'ler kendilerini yenileme ve pluripotent özelliklere sahip hücrelerdir. *In vitro* sınırsız olarak farklılaşmadan üretilebilen bu hücreler *in vivo* bütün hücre serilerine farklılaşabilir ve *in vitro* çoğu hücre tiplerine farklılaşması için uyarılabilir (21,23). Pluripotent olarak tanımlanmış olan EKH'ler her üç embriyonik germ tabakasına ait hücrelere farklılaşabilmektedir. Prensipte EKH'ler vücuttaki her hücreyi oluşturabilir ve farklılaşmış bir hücreyi meydana getirebilir. Kolombiya üniversitesindeki araştırmacılar fare EKH'lerinin spinal öncü hücrelerine ve motor nöronlarına farklılaştığını gösterdiler. İnsan EKH ile şimdiye kadar yapılan ksenograft ve *in vitro* deneme çalışmalarında, hematopoietik hücre, kardiyomyosit ve epitel hücreleri gibi birçok hücre tipinin oluştuğu bildirilmiştir (24).

2.2.1 Embriyonik Kök Hücre Özellikleri ve Pluripotensi

Organizmanın gelişimi geniş açıdan bakıldığında, embriyo kökenli PSC'ler gelişim sırasındaki genomik durumu gösteren bir model olarak düşünülebilir. Bu embriyo-kökenli kök hücreler EKH, embriyonal karsinoma (EC) ve embriyonik germ hücreleri gibi farklı isimler kullanılarak sınıflandırılmaktadır. Morula evresindeki EKH ve trofoblast kök hücreleri *in vitro* çoğaltılabilir ve *in vivo* implantasyon oluşturulabilir. İçsel hücre kitlesi, primitif ektoderm ve endoderm oluşturan tabakalara ayrılmaktadır. Embriyonal karsinoma hücreleri olarak bilinen pluripotent hücre hatları primitif ektodermden türemektedir ve EKH'lerden farklı olup olmadıkları bilinmemektedir.

Araştırmacılar, insan EKH'lerini fare embriyonik fibroblast hücreleri yerine insan fetal ve erişkin fibroblast besleyici tabaka kullanarak uzun süre farklılaşmadan kültüre ettiler. Normal karyotipe sahip bu hücreler Oct-4, Nanog, Sox-2, SSEA.3/4, TRA1-60 ve GCTM-2 gibi hücre yüzeyi ve nüklear antijenleri eksprese etmektedirler. İlginç olarak insan ve fare EKH'lerinin antijenik özellikleri birbirinden farklılıklar gösterebilmektedir (Tablo 2). Kök hücre kompartmanı içinde farklı fonksiyonel özelliklere sahip hücre alt gruplarının olasılığını akla getirmektedir (28,29).

Tablo 2: Fare ve insanlarda en iyi tanımlanan embriyonik kök hücre göstergeleri (29).

Undiferansiye EKH markırları	İnsan	Fare
<i>Hücre-yüzeyi ve nüklear antijenler</i>		
SSEA.1	-	+
SSEA.3/4	+	-
TRA1-60/81	+	-
GCTM-2	+	-
CD133/prominin	+	+
Oct-4	+	+
Nanog	+	+
Sox-2	+	+
Rex-1	+	+
<i>Enzimatik aktiviteleri</i>		
Alkalen fosfataz	+	+
Telomeraz	+	+
<i>İn vitro kültür gereksinimleri</i>		
Besleyici-hücre bağımlı	+	+
LIF bağımlı	-	+
FGF-4	-	+
<i>Büyüme Özellikleri</i>		
Trofoblast oluşturabilme	+	-
İn vivo teratom oluşumu	+	+

SSEA; stage-specific embryonic antigen, OCT4; octamer-binding transcription factor-4, TRA; tumour-rejection antigen, LIF; leukaemia inhibitory factor, FGF; fibroblast growth factor, SOX-2 (SRY-related high-motility group-box protein-2)

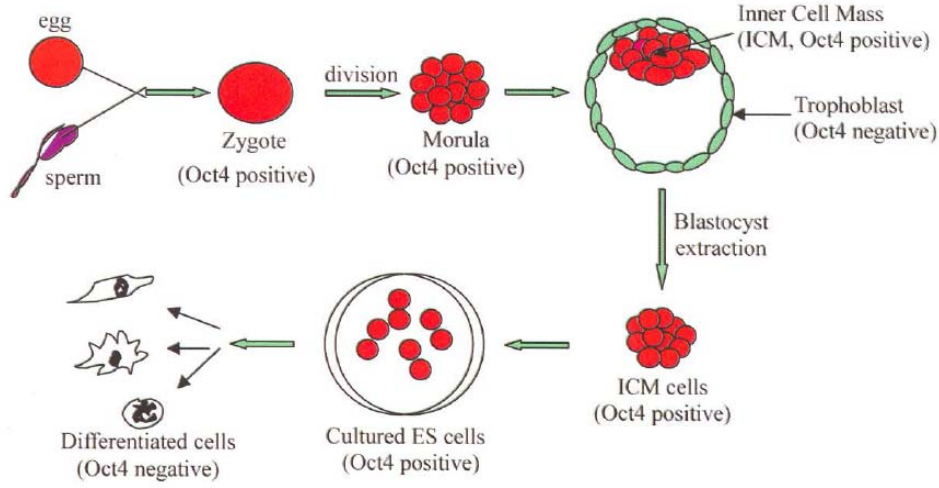
İnsan ve fare EKH'lerinde Oct-4, Nanog ve Sox-2 transkripsiyon faktörleri ve alkalen fosfataz yüksek oranda eksprese edilmektedir (30). Fonksiyonel çalışmalar PSC kaderini devam ettiren bu transkripsiyon faktörlerinin benzer rollerini akla getirmektedir. Örneğin insan EKH'lerinde genetik manipülasyonlarla Oct-4'ün azalan ekspresyonu trofoektodermal farklılaşmaya neden olmaktadır (31). Oct-4, Nanog ve Sox-2'nin nüklear transkripsiyonel mekanizmasının genomik etkileşim bölgelerinin analizi (32) undiferansiye kök hücrelerde var olan olası nüklear transkripsiyel sisteminin parçalarını göstermektedir. Bu transkripsiyon faktörleriyle fare ve insan EKH'lerinin intrinsik kontrolünün benzerliklerine rağmen ekstrinsik faktörlerin etkileri oldukça farklıdır. Fare EKH'leri besleyici hücre varlığında yaşamını sürdürebilmesi için LIF (lösemi inhibe edici faktör) sitokinine bağımlı olmasına rağmen insan EKH'leri için zorunlu değildir. Bundan başka aktivin ve TGF- β (tümör büyüme faktör- β) insan EKH'lerinin self-renewal'ını desteklerken BMP (bone morphogenic protein) ise fare EKH'lerinin farklılaşmasını uyarıyor ve kendi kendini yenileyebilmesini desteklemektedir (33).

Pluripotensi çok hücreli organizmalarda temel bir biyolojik fonksiyondur. Farklı kök hücre tiplerinde, olasılıkla evrimsel olarak çok sayıda genetik sistemlerle korunmaktadır. Embriyodaki pluripotentiğin düzenlenmesindeki moleküler temelini çok az bilinmesine rağmen çeşitli genlerin pluripotent hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğu tanımlanmıştır. Bunlar transkripsiyon faktör Oct.4, FoxD3 ve yeni genleri içermektedir (34,35). Homozigot fare embriyosunda bu genlerin herhangi birisinin yetersizliği embriyoda pluripotent serinin bozulmasına neden olmaktadır. ICM'nin uygun gelişiminin Oct-4 gen ekspresyon seviyesiyle doğrudan ilişkilidir. Orta aşırı ekspresyon, ekstra embriyonik endoderme farklılaşmasına sebep olurken yetersiz ekspresyon ise trofoektoderme farklılaşmayı zorlamaktadır (36). Erken embriyonik dönemde ifade edilen transkripsiyon faktörleri kök hücre pluripotensini düzenlemektedir. Hücrelerin kendisini yenilemesinde ve farklılaşmadan kalmasında önemli rol oynamaktadır (37).

Yapılan çalışmalar, EKH'lerin pluripotensi ve kendini yenileyebilmesi için Oct-4 ve Nanog transkripsiyon faktörlerinin zorunlu olduğunu göstermektedir (34,38). Bu transkripsiyon faktörleri özellikle embriyonik dönemde transkripsiyonel düzenleyici, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri, DNA hasar-yanıt sensorları ve lineage-özümlü genlerin baskılanmasını kodlayan genleri kontrol etmektedir (39).

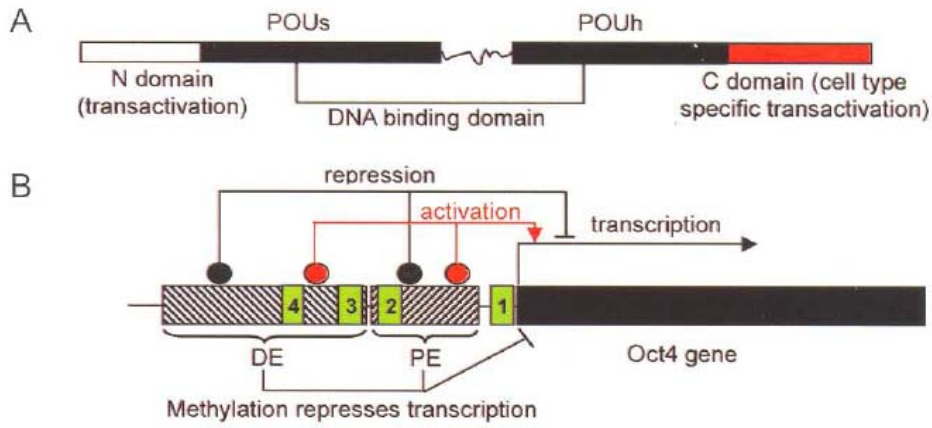
2.2.2 Embriyonik Kök Hücre Transkripsiyon Faktörleri

Oct-4 Transkripsiyon Faktörü: Embriyonun sadece ICM'de ifade edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Embriyo-dışı dokuları oluşturacak olan trofoektoderm'de eksprese edilmemektedir. Daha sonraki gelişim sırasında Oct-4 ekspresyonu germ hattının hücreleriyle sınırlanmaktadır (40,41). Hücrelerin totipotent ya da pluripotent özelliğinin devam etmesi ve senkronize bölünmesi için zorunlu olduğu belirtilmektedir (Şekil 3). Bununla birlikte, fare somatik kök hücrelerinin hem self-renewal hem de devamlılığı için zorunlu olmadığı da bildirilmektedir (42).



Şekil 3: Embriyonik kök hücre ve Oct.4 ekspresyonu.

Embriyonik düzenleyici faktör için en iyi adaylarından birisi Oct-4 transkripsiyon faktörüdür. Oct-4 (octamer binding transcription factor-4) alternatif olarak Oct-3, Oct-4 ya da *Pou5f1* olarak da tanımlanır. Bütün çift zincirli DNA bölgeleri arasında bulunan ATGCAAAT oktamerine etkili biçimde POU domaini ile tanıyarak bağlanmaktadır. POU domain protein ailesinin bir üyesidir. POU transkripsiyon faktörleri orijinal olarak promotör bölgesinde oktamerik bir dizi içeren cis-acting elementlerini taşıyan genleri aktive edebilen proteinler olarak tanımlandı (40). Oct proteinleri diğer transkripsiyon faktörlerini ya da aktive edici proteinleri kullanabilen çeşitli mekanizmalarla transkripsiyonu aktive etmektedir (43,44). Oct-4 geni 352 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır (45). POU domain olarak bilinen 150 amino asitlik korunmuş bir bölge içermektedir. Bu bölge sekans-spesifik DNA bağlanmasına aracılık etmektedir (43).



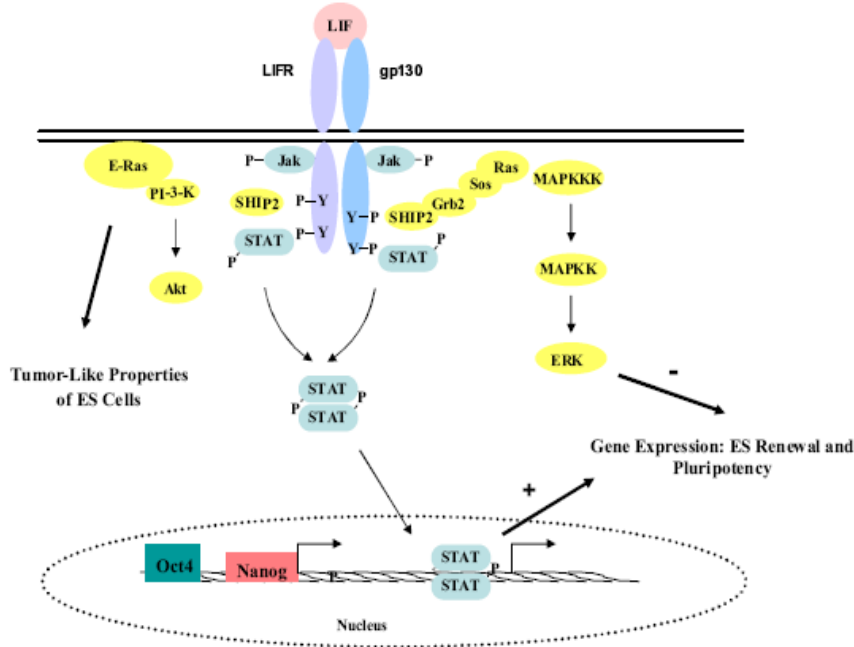
Şekil 4: Oct-4 geninin yapısı ve fonksiyonu: (A) Oct-4 domainlerin şematik gösterimi, (B) Oct-4 geninin upstream düzenleyici elementleri (45).

Oct-4 geni sadece memelilerde bulunmaktadır. Farelerde 17. kromozomda lokalize ve 1.5 kb'lık mRNA transkriptini kodlayan 5 ekzona sahiptir. İnsanlarda Oct-4 geni ise 6. kromozomda yer almakta ve fare ile % 87 benzerlik göstermektedir (37). İnsanlarda alternatif splicing ile iki transkript oluşturulmaktadır (Şekil 4), farede ise tek transkripti söz konusudur (45).

Nanog Transkripsiyon Faktörü: Son zamanlarda tanımlanmış olan Nanog embriyonik gelişim sırasında pluripotent ICM'in kaderinin düzenlenmesinde, pluripotent epiblastın devam etmesinde ve primitif endoderme farklılaşmasının korunmasında önemli rol oynamaktadır (46). EKH pluripotensini LIF-STAT3 yolağından bağımsız olarak devam ettirebilen önemli transkripsiyon faktörüdür (38) (Şekil 5). Nanog, homeobox transkripsiyon faktörüdür. Nanog mRNA'sı ilk olarak fare embriyo gelişimi sırasında morulanın iç hücrelerinde saptanmıştır. Ekspresyonu epiblastta sınırlı hale gelmektedir. İmplantasyondan sonra nanog ifadesi düşmektedir ancak germ hücrelerinde saptanabilir. Nanog, EKH pluripotensinde önemli fonksiyon gören hedef genlerin kontrolünü Oct-4 ve Sox-2 gibi diğer pluripotent faktörlerle birlikte yapmaktadır.

Nanog transkripsiyon faktörü EKH ve germ hücre tümörlerinde tek olarak eksprese edilmektedir ve self-renewal ve pluripotens için önemli olduğu düşünülmektedir. Nanog eksprese eden NIH3T3 hücreleri artmış büyüme ve formasyon hızı göstermekle birlikte

transforme bir fenotipi de ifade edebilmektedir. Bu hücreler, olasılıkla EKH transkripsiyon faktörü Nanog'un onkojenik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 5: Embriyonik kök hücrelerde transmembran sinyal ileti yolağı (47)

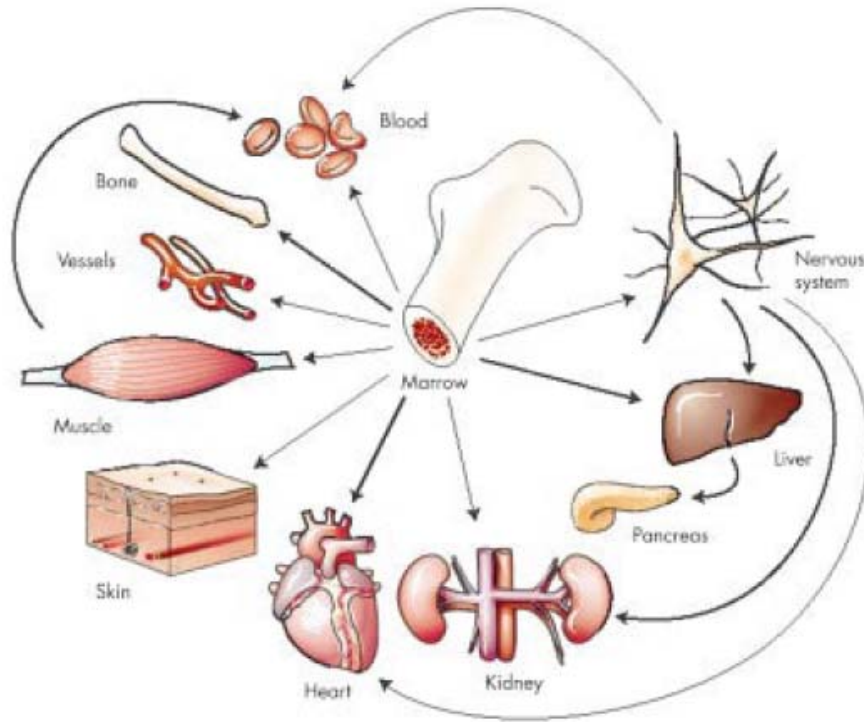
NIH3T3, H1299 ve HCT116 hücre hatlarında eksprese edilen Nanog'un transkripsiyon hedefleri araştırıldığında, Nanog tarafından düzenlenen genlerin listesi sadece % 5 ile her bir hücre tipi için tek olduğunu göstermektedir. EKH'lerde, Nanog tarafından promotörlerine bağlı olan genlerin çoğu bu hücre hatlarında aktif değildir. EKH'lerde ortaya çıkan resim kromatinin demetile ve ulaşılabilir olduğudur. Nanog, Oct.4 ve Sox-2 birçok promotöre bağlanabilmektedir, onların çoğu differensiyasyonu önlemek için baskılanmaktadır. Differensiyasyon sonrası sadece hücre spesifik genler ulaşılabilir kalmaktadır.

Rex-1 Transkripsiyon Faktörü: Rex-1 geni, gelişimsel olarak insan ve fare EKH'de yüksek oranda eksprese edilen bir çinko parmak (zinc finger, Zfg-42) ailesi transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. EKH ve erişkin kök hücrelerin pluripotent göstergesi için tanımlanan bir belirteçtir (48). Rex-1 yine kök hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. İleri çalışmalar kemik iliği, kas ve beyinden izole edilen çeşitli multipotent erişkin öncü hücrelerde Rex-1 ekspresyonunu göstermektedir (49).

Rex-1'in promotörü farklılaşmamış hücrelerde aktivitesi gerekli olan bir oktamer motif içerdiği gösterilmiştir. Daha sonraki analizler Oct-4'ün doza bağlı olarak oktamer motif yardımıyla Rex-1 promotörünün aktivitesini düzenlediğini göstermektedir (50). Transkripsiyonel seviyede Nanog, Oct-4 ve Sox-2 tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir.

2.3 ERİŞKİN KÖK HÜCRELER

EKH'lere göre daha sınırlı sayıda hücre tipini oluşturabilme yeteneğindedirler. Erişkin kök hücre, farklılaşmış bir dokuda bulunan farklılaşmadan kalmış olan hücre grubudur. Yine bu kök hücreler, kendini yenileyebilme, kaynaklandığı dokunun özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilme ve kaynaklandığı dokunun dışındaki hücelere dönüşebilme (kök hücre plastisitesi ya da transdiferansiyasyon) kapasitesine sahiptir. Örneğin kemik iliği hücreleri kan ve immün sistem hücrelerine dönüşebildiği gibi diğer doku hücrelerine de (beyin, iskelet ve kalp kası hücrelerine, karaciğer hücrelerine vb.) dönüşebilmektedirler (21) (Şekil 6). EKH'ler kadar farklılaşma kapasitesine sahip değildir. Erişkin kök hücreler genellikle bölünerek progenitör ya da prekürsör hücreleri oluşturur. Erişkin kök hücreleri ile yapılan çalışmalar genellikle hematopoietik doku kaynaklıdır.



Şekil 6: Kemik iliği kökenli kök hücrelerin değişik hücre türlerine dönüşümü (51)

Erişkin (somatik) kök hücreler içinde buldukları pek çok dokunun farklı hücrelerini oluşturabilmektedir (multipotent). Özel koşullarda diğer dokuların hücrelerine de dönüşebilirler (transdiferansiyasyon ya da plastisite). Pluripotent kök hücreden kaynaklandıkları, özgün organ ve dokuların gelişiminde yer aldıkları ve daha ileriki yaşamda bu organ ve dokuların homeostazisinde yeni hücreler oluşturmak kaydı ile nişlerin içinde çok az sayıda bulduklarına inanılmaktadır. Ortamdan kaynaklanan etmenler ile kök hücrenin gen ekspresyonundaki değişim, yeni hücrelere farklılaşmalarına yol açmakta ve yeni oluşan bu hücreler dokuya uyum sağlamaktadır. Ancak, kök hücrelerin bir kısmı sessiz durumda beklerken diğerlerinin kendini yenilemesi, çoğalması ya da farklılaşmasına yol açan iç ve dış etmenler henüz tam olarak bilinmemektedir.

Erişkin kök hücre ile EKH arasındaki en önemli fark hücrelerin kaynağıdır. Erişkin kök hücreler insanda çok az bulunmakla birlikte birçok dokudan elde edilebilir. EKH ise embriyonik dönemde uygun dokudan alınan hücrelerin kültür ortamında çoğaltılarak elde edilmektedir. Kültür şartlarına göre EKH'ler birçok hücre tipine farklılaşabilmektedir. EKH'ler immün sistemi normal bir fareye verildiğinde teratom oluştururken erişkin kök hücrelerin böyle bir özelliği bilinmemektedir. Bu nedenle EKH'ler tedavi amaçlı kullanılmamaktadır. Bununla birlikte erişkin kök hücreler EKH'ler kadar farklılaşma kapasitesine sahip değildir.

Erişkin kök hücre kaynağı olarak kemik iliği, periferik kan, çizgili kas, beyin, diş pulpası, karaciğer, kornea ve retina, deri, gastrointestinal sistem mukozası ve pankreas sayılabilir. Ayrıca her üç embriyonik germ tabakasından kaynaklanan dokulardan elde edilebilir. Nöral kök hücreler, insan EKH'sinden ya da erişkin beynindeki nörojenik bölgelerden de elde edilebilir. Mezenkimal kök hücreler kemik iliğinin hematopoietik olmayan multipotent kök hücreleridir.

Erişkin kök hücreler EKH'ler ile benzerlikler göstermektedir; kendilerini çoğaltabilirler ve kalp, beyin, kemik gibi özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler. Her iki hücre grubu da birtakım işaretleyiciler kullanılarak izole edilebilmektedir. İmmün sistemi baskılanmış farelere nakledildiklerinde çoğalabilmektedir. Hücrelerin farklılaşması tamamen kullanılan ortamın içeriği ile ilişkilidir.

2.4 KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ KÖK HÜCRELER

Kemik iliği incelendiğinde, hematopoietik elemanlar, endotel öncü hücreleri ve stromal hücreler dikkati çekmektedir. En iyi çalışılan erişkin kök hücresi olan HKH, kemik iliğinde erişkin yaşamda bulunmaktadır (52). HKH'nin varlığı letal olarak miyeloablatif konağın hematopoietik sistemini yeniden oluşturmak için transplante edildiğinde donörde tekrar engraftment oluşturma yeteneği ile gösterilmiştir. Fare HKH'leri lineage negatif hücrelerdir. Kök hücre antijeni-1 (Sca-1), düşük seviyede c-kit ve Thy1 eksprese etmektedir. İnsanlarda ise HKH yine lineage negatiftir ve CD34+CD38- hücre alt grubunda yoğunlaşmaktadır. Fare ve insanlarda, hematopoietik kök hücre onların ABCG2 transporter eksprese etmesine göre de zenginleştirilebilir ve böylece Hoeschst boyasını almaz. Bu tür hücreler yan-populasyon olarak adlandırılır. Hematopoietik kök hücreden ayrı kemik iliğinde çeşitli diğer kök hücreler de bulunmaktadır. Bu hücreler MKH'leri içermektedir. MKH'ler kemik iliğinden (53) izole edilebildiği gibi adipoz doku (54) ve fetal akciğerden de elde edilebilir. Hematopoietik kök hücre markerı CD45 negatiftir ancak insanlarda CD105 (SH2), SH3 ve CD13 eksprese eder. Mezenkimal hücreler *ex vivo* 20-50 populasyon doubling'ine kadar çoğaltılabilir, birçok dokularda düşük seviyede aşılandığı ve düz kas ile iskelet kas hücreleri gibi *in vivo* osteoblasta, adipoz ve kondroblast dokulara farklılaşabilir (55).

Kemik iliği yine endotelial progenitör hücrelerin (EPC) kaynağıdır. Endotel öncü hücreleri çok az miktarda da olsa dolaşımda bulunmaktadır. Bu hücreler uzun süre *in vitro* büyütülebilir ve post-natal yaşamda damar sisteminin oluşumuna katkıda bulunan yara iyileşmesi alanına toplanabilir. En azından farelerde EPC için hemanjioblast olarak isimlendirilen bir prekürsörün kemik iliğinde var olabileceği bulgusu vardır. Hemanjioblast başlangıçta HKH, EPC ve düz kas hücrelerine yol açabilen EKH kültürlerinde karakterize edildi (56-59). Son olarak, kemik iliğinden ve beyin ve kas gibi diğer organlardan izole edilen hücre tipinin kültüre edilebileceği gösterilmiştir. Bu hücreler multipotent erişkin progenitör hücre ya da MAPC olarak isimlendirilmektedir. MAPC uzun süre kültürde çoğaltılabilir ve endotelyuma, endodermal ve nöral lineage'e *in vitro* ve *in vivo* farklılaşabilir (60,61).

2.5 HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELER

HKH'ler fenotipik ve fonksiyonel seviyede en iyi tanımlanan erişkin kök hücre grubudur. Kendini yenileme ve bütün kan hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip farklılaşmamış, primitif hücreler olarak tanımlanmaktadır (62). Dokudaki toplam hücrelerin % 0,005 kadarını oluşturan HKH'in büyük çoğunluğu kemik iliğinde bulunmaktadır (3-5). Erişkin dokularda bulunan kök hücreler esas olarak sessiz (quiescent) durumdadırlar. Tek bir HKH birçok alıcıda yeniden yeterli primitif soyunu (progeny) oluşturabilmesine rağmen onların potansiyelini devam ettiren ya da onların self-renewal'ını düzenleyen moleküler mekanizmaları çok bilinmemektedir. Kök hücre self-renewal'ın moleküler mekanizmasının tamamen aydınlatılması kanser gelişiminin açıklanmasına katkıda bulunacaktır.

Hematopoietik kök hücrenin özelliklerini ve kemik iliğinde varlığının ilk bulgusunu fare modellerinde 1963 yılında Till ve McCulloch tarafından tanımlandı (63). Seri transplantasyonlar yaparak hematopoietik kök hücrenin self-renewal yeteneğini gösterdiler. Bu deneylere dayanarak hematopoietik kök hücre; sınırsız self-renewal gibi multilineage differansiyasyon yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlandı. Bu keşif modern günün kök hücre araştırmalarının başlangıcını oluşturmaktaydı. CD34 antijeni uzun zamandan beridir kök hücreyi belirlemede kullanılmaktadır. Diğer antijen hedefleri araştırılmıştır ve bunlar arasında CD133 en sık kullanılanlardan birisi olmuştur. CD133 antijeni sadece hematopoietik kök ve progenitör hücreler üzerinde eksprese edilmemektedir aynı zamanda nöral ve iskelet kası dokularında da eksprese edilmektedir (64,65).

İkinci trimester mezenkimal kök hücrelerin moleküler ve hücresel seviyede pluripotent hücre göstergelerini (Oct-4, Nanog ve SSEA.4) eksprese ettiği gösterilmiştir. Bundan başka bu dönemde elde edilen hücrelerin osteojenik, kondrojenik, adipojenik, nörojenik ve kardiyojenik hücre serilerine farklılaşabileceği gösterilmiştir (66). Göbek bağından izole edilen CD45-pozitif/Lin^{minus} hematopoietik hücreler fibroblast büyüme faktörü-4 / stem cell faktör / Flt3 ligand ilaveli mediumda kültüre edildiğinde bu hücreler Oct-4 ve Nanog ekspresyonunu düzenliyor, sadece mezenkimal hücrelere değil aynı zamanda nöral ve oligodendrositlere farklılaşabilmektedir. Kemik iliğinden köken alan bu hücrelerin CD45-pozitif ve CD45-negatif mezenkimal progenitor hücreler ile benzer özelliklere sahip olmasına

rağmen bu multi-potansiyel hücrelerin HKH'lerden ve mezenkimal hücrelerden farklı olabileceği ileri sürülmektedir (67).

Reyes ve arkadaşları (60) MKH'lerin prekürsörleri olarak multipotent erişkin progenitor hücrelerin izole edilebileceğini ve bu hücrelerin Oct-4 ve Rex-1 transkripsiyon faktörleri yanında bilinen MKH yüzey antijenlerini de eksprese etmektedir. Niwa ve arkadaşları (36) Oct-4 ve Rex-1 ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu gösterdiler. Paradoksal olarak Oct-4'ün fazla ya da düşük ekspresyonu Rex-1 ekspresyonunun down-regülasyonuna neden olmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri EKH'lerin totipotensini düzenlemektedir.

Hematopoez işlevi, kan hücrelerinin kendi içindeki genetik yapılanma ve buldukları çevre arasındaki karmaşık etkileşimle ilişkilidir. Bu etkileşim HKH'lerin progenitör ve matür kan hücrelerine çoğalması, farklılaşması, kendini yenilemesi ya da apoptozise maruz kalıp kalmaması ile belirlenir. Normal şartlar altında, HKH'ler ve öncü hücrelerin çoğu G0 fazında olmakla birlikte çoğalma ve yapım sürecini devam ettirirler. Normal süreçte olgun ve progenitör hücrelerdeki apoptozis oranı denge halindedir. Kanama yada enfeksiyon gibi durumlarda kemik iliği havuzunda depolanmış hücreler hasar bölgesine salınırken durgun HKH'ler çeşitli büyüme faktörleri ile uyarılarak olgun beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere farklılaşır ve çoğalır. Kanama yada enfeksiyon normale döndüğünde ise antiapoptotik ve proliferatif süreç yavaşlayarak hematopoez kinetiği normale dönmektedir. Bu süreç kişinin hayatı süresince sayısız kere tekrarlanmaktadır.

Hematopoez; sitokinler, kemokinler, hücreler arası matriks bileşenleri, diğer hematopoietik ve non-hematopoietik hücreler, vitaminler vb. birtakım fizyolojik süreçler tarafından düzenlenmektedir. Sitokinler hematopoezin en iyi tanımlanmış çevresel düzenleyicisidir. Genel olarak sitokinler, bir takım sinyal yollarının aktivasyonları ve spesifik reseptörlere bağlanması ile fonksiyon görürler. Sitokinler, ekstrasellüler matriks bileşeni olan kök hücre ve elementler arası etkileşimi kolaylaştırmaktadır. Kemokinler ise kan trafiğini ve hücrelerin çoğalmalarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Sonuç olarak hematopoez birçok kontrol mekanizmalarından oluşmaktadır.

2.6 KANSER KÖK HÜCRESİ

“Kanser-kök-hücre hipotezi” yaklaşık 150 yıl önce Rudolph Virchow ve Julius Cohnheim (68,69) gibi patologlar tarafından ilk defa ileri sürülmüştür ve kanserin uykudaki embriyonik-doku kalıntılarının aktivasyonundan kaynaklanabileceği yorumu yapılmıştır. Yıllardır tümörün başlaması ve gelişmesi, normal insan hücrelerinin maligniteye dönüşmesine neden olan genetik değişiklikleri ifade eden çok basamaklı (multistep) bir süreç olarak bakılmaktadır (70). Bugünkü bulgular, çoğu kanserin sık genetik mutasyonlar sonucunda malign transformasyona uğrayan tek bir hücreden kaynaklandığını göstermektedir (71). Bu tür olaylar, artan bir şekilde agresif bir davranış gösteren varyant hücrelerin klonal artışıyla devam ettiği düşünülmektedir. Bu hücreler, normal büyümeyi düzenleyen mekanizmaları hiçe sayarak çoğalabilme ve normal dokuyu istila etme-tahrip etme yeteneğiyle karakterize edilmektedir (72,73). Günümüzde, tümörün başlamasına neden olan hücrel ve moleküler olayların kanser kök hücre-benzeri hücreler tarafından yönlendirildiğini gösteren bulgular bulunmaktadır (74-77).

Birçok tümör, kök hücre benzeri özellikler gösteren hücreler içermesine rağmen tümör başlamasına neden olan ilk genetik olayın meydana geldiği normal hücrelerin kimliğinin tanımlanması zor görünmektedir (78). “Kanser kök hücre” deyimini, kendini yenileme yeteneğine sahip bir kanser hücresi olarak tanımlanan bir deyimdir. Farklı dokulardaki kök hücreler kendini yenileyebilme ve belli hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği bakımından farklılıklar göstermektedir (79,80).

Çoğu kanserler, transplantasyonda tümör oluşturabilme yeteneği yanı sıra farklı proliferatif potansiyele sahip heterojen bir hücre topluluğundan oluşmaktadır. Kanser kök hücre bulgusu, ilk hematolojik malignitelerde kanıtlanmıştır. Kanser başlatıcı hücrelerin tanımlanması, izolasyonu ve fonksiyonel analizleri hücre ayırma, doku kültürü, transjenik hayvan ve fare ksenograft tekniklerindeki gelişmelerle sağlanmıştır. Kanser-başlatıcı hücre teorisi, tümör oluşumu, büyümesi ve metastazının kanser hücrelerin farklı alt grupları tarafından yönlendirildiğini açıklamak için kurulmuştur. Esas olarak teori tümör oluşumu ile organ gelişiminin birçok bakımdan aynı olduğunu ifade etmektedir. Kök hücreler organizmada bulunan en uzun yaşayan hücrelerdir. Bu nedenle onların tümörojenik hale gelmesi için gerekli mutasyonları biriktirmesi daha olasıdır.

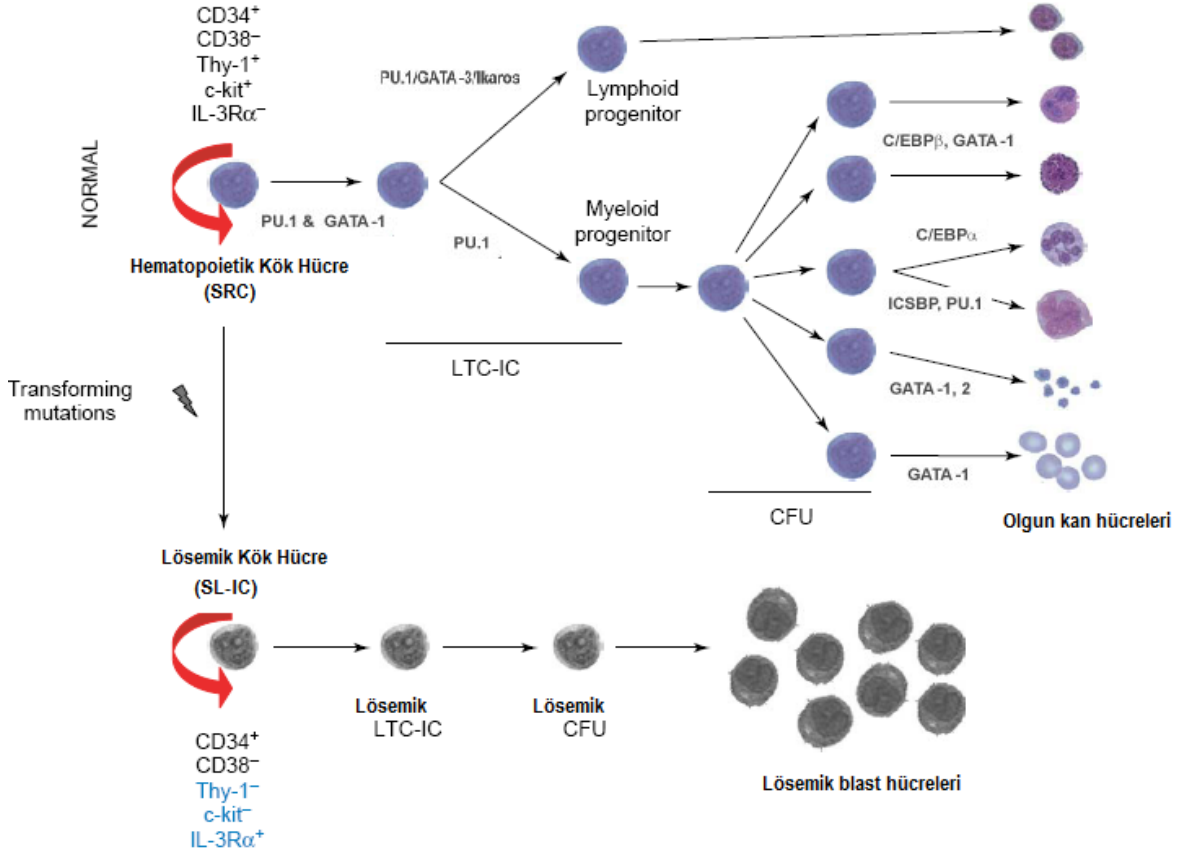
Normal kök hücreler ile kanser-başlatıcı hücreler self-renewal ve birçok seriye farklılaşabilme gibi ortak özellikler taşımasına rağmen kanser başlatıcı hücreler bozulmuş proliferasyon ve yayılma yetenekleri bakımından ise farklılıklar göstermektedir.

2.6.1 Lösemi-başlatıcı Hücreler (Lösemik Kök Hücre):

Normal kök hücre biyolojisindeki temel kavramlarda olduğu gibi lösemide kök hücre fikri özellikle KML ve AML'de yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Lösemi başlatıcı hücre için ilk bulgu 1994'de John Dick ve arkadaşları tarafından (81) rapor edilmiştir. AML'li hastalardan elde edilen nadir CD34+CD38- hücrelerin immün yetmezlik gösteren (severe combined immune-deficient-SCİD) farelere infüzyonu sonucunda lösemik blast üretimine neden olduğu gösterildi. Böylece John Dick ve grubu hem adaptif hem de doğal immünitesi yetersiz olan obez olmayan diabetik (NOD) SCID farelerde, lösemi hastalarından elde edilen lösemik hücrelerin lösemi başlatma yeteneğini test etmek için kullanmış oldu. NOD/SCID farelerde lösemi indüksiyonu daha düşük sayıdaki CD34+CD38- AML hücreleriyle olasıydı. Sonunda, myeloid lösemilerin esas olarak çoğu primitif seviyede hematopoezin bozulmasından kaynaklandığı ve lösemi başlatıcı hücrelerin normal hematopoietik kök hücrelerin malignant türevleri olduğu önerilmiştir (Şekil 7). Bu ilk çalışmada, birçok çözülememiş konular hala bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi, bütün AML örneklerinde lösemi başlatıcı CD34+CD38- hücrelerin yeterince zenginleştirilmemesi gösterilebilir.

FAB sınıflamasına göre AML-M3 alt grubundan elde edilen CD34+CD38- hücreler ile farelerde engraftment gösterilemedi. Bu lösemide, olasılıkla lösemi başlatıcı hücre primitif değildir ya da primitiftir ancak farklı primitif özelliklere sahip olması söz konusudur (ALDH+, CD133+ gibi). Yine lösemi-başlatıcı hücre miktarında hastadan hastaya göze çarpan değişiklikler bulunmaktadır. Hücre toplama ve zenginleştirme teknikleri basit olmakla birlikte aynı biyolojik temele ve prognostik anlama sahip olan hücrelerin ayrışmasının zor olduğu görülmektedir. Sonuç olarak CD34+CD38- AML hücreleri doğrudan normal HKH'lere benzer değildir. CD34+CD38- AML hücrelerinin daha detaylı tanımlanması gerekmektedir. Şimdiden IL-3R- α (CD123) normal HKH'lerin aksine AML-başlatıcı hücreler

üzerinde hücre yüzey reseptörü olarak tanımlanmıştır (82) ve tedavide kullanılabilen önemli yolları aydınlatılabilir söz konusudur.



Kısaltmalar: SRC, immün yetmezlik gösteren farelerde (SCID) yeniden popülasyon oluşturan hücre
 SL-IC, SCID farelerde lösemi-başlatan hücre
 LTC-IC, uzun süreli kültür başlatan hücre
 CFU, koloni oluşturan birim

Şekil 7: İnsan normal ve lösemik hematopoietik hiyerarşinin şematik gösterimi (83).

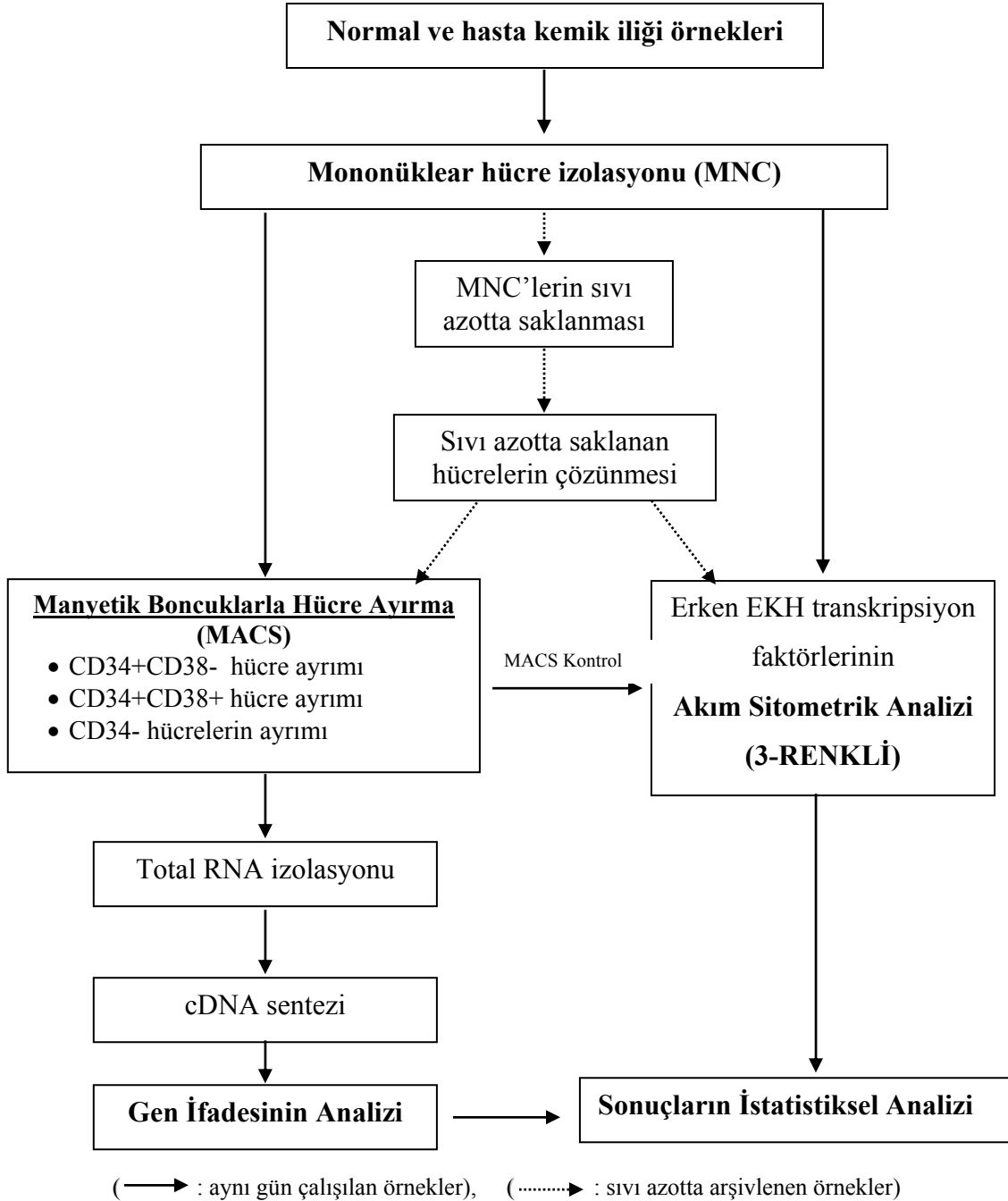
Kanserde klonalite ve klonal gelişimle ilgili ilk bulgular KML çalışmalarından sağlanmıştır. KML'nin klonal yapısı ve insan kanserleriyle ilişkili spesifik genetik değişikliklerin bulgusu KML hastalarında gösterilmiştir (84,85). Lösemnin, genetik değişikliğin meydana geldiği tek bir hücrenin klonal çoğalmasından kaynaklandığını akla getirmektedir. Farklı diferansiyasyon evresi gösteren AML'nin çeşitli hücre alt gruplarından elde edilen lösemik kök hücrelerin normal uzun-süreli HKH ile aynı yüzey markerları paylaştığını göstermektedir.

Hematolojik ve solid doku tümörlerinde kanser-başlatıcı hücreler kendini yenileme, birçok seriye farklılaşma, sessiz durumun (quiescent) devamı ve ilaç dirençliliği gibi normal kök hücrelerin anahtar özelliklerini paylaşmaktadır. Normal kök hücre biyolojisinde kullanılan uzun süreli kültür ve NOD/SCID ksenograft gibi testler, kanser çalışmalarında kanser-başlatıcı hücre popülasyonlarının tanımlanması için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Diğer solid tümörlerden kanser-başlatıcı hücrelerin izolasyonu için ilave metotların geliştirilmesi gerekmektedir. Kanser başlatıcı bir hücrenin kanseri başlatıp-başlatmadığı ya da kontrolsüz kanser hücrelerinin kök hücre-benzeri özellik kazanıp-kazanmadığının soruları henüz kesin olarak cevaplanmış değildir.

Bundan başka, çeşitli faktörler kanser hücre self-renewal, diferansiyasyon ve yayılma yeteneğini etkileyebilir. Kök hücre-benzeri yeteneğe sahip kanser hücrelerinin varlığı gelecek kuşakta hedeflenmiş kanser tedavilerinin başlamasına neden olması söz konusudur. Esas translasyonel amaç, normal kök hücre ile kanser-başlatan hücreler arasındaki farkların tanımlanmasıdır. Sonuç olarak, hücreler arasındaki farkların belirlenmesiyle doğrudan kanser hücrelerinin yok edilmesi hedeflenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Normal hematopoietik kök hücre ile lösemik kök hücrelerde erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun araştırılması için yapılan çalışmaların akış şeması Şekil 8’de verilmektedir.



Şekil 8: Çalışmada kullanılan yöntemlerin genel akış şeması.

3.1 ÇALIŞMA MATERYALİ

Tez projemizde çalışma materyali olarak:

1. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi, Erişkin Hematoloji Bilim Dalı laboratuvarına AML ve KML ön tanısıyla gönderilen EDTA'lı kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Gelen kemik iliği örnekleri, öncelikli olarak hastanın istek nedenlerinin analizi için değerlendirilmiştir. Yeterli sayıda hücre içeren kalan kemik iliği örnekleri ise DEÜTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunun 05.Haziran.2008 tarih ve 221/2006 sayılı izni (EK.1) ile hastalardan aydınlatılmış onayı (EK.2) alındıktan sonra standart protokollere (86) göre sıvı azotta mononükleer hücre (MNC) arşivi oluşturulmuştur. Oluşturulan arşivden kemik iliği aspirasyon raporu, immüfenotipik özellikleri ve moleküler çalışma sonuçlarına göre tanı konulan 20 adet AML ve 20 adet KML hasta örneği seçilmiştir. Yeterli sayıda hücre içermeyen 2 KML örneği sadece akım sitometrik inceleme için kullanılmıştır. AML olgularının 11'i erkek (% 55) 9'u kadın (% 45) hastadır. Yaş ortalaması ise $56,85 \pm 14,53$ 'dür. KML olgularının ise 9'u erkek (% 45) 11'i kadın (% 55) hastadır. Yaş ortalamaları ise $54,48 \pm 15,89$ 'dur.
2. EKH transkripsiyon faktörlerinin sağlıklı bireylerde ekspresyonlarının belirlenmesi ve rölatif kantitasyon analizi için sağlıklı bireylerin kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Normal kemik iliği örnekleri, hematolojik hastalığı olmaksızın DEÜTF Kalp-Damar Cerrahisinde açık kalp ameliyatı olan hastalardan elde edilmiştir. Hastaya hiçbir ek müdahale gerektirmeden sternektomi sonrası ortaya çıkan kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Bu şekilde aydınlatılmış onam alınan (EK.3) toplam 16 adet normal kemik iliği alınmıştır. 9'u erkek (% 56,25) 7'si kadın (% 43,75) olan sağlıklı kemik iliği donörlerinin yaş ortalaması $56,88 \pm 12,93$ 'dür. Yeterli sayıda hücre içermeyen 3 örnek sadece akım sitometrik inceleme için kullanılmıştır. Gönüllü kontrollerden EDTA'lı PBS (EK.4) içerisine minimum 15 ml kemik iliği toplanarak aynı gün bekletilmeden işleme alınmıştır.

3.2 KEMİK İLİĞİNDEN MNC'LERİN AYRIMLANMASI

3.2.1 Mononükleer Hücre İzolasyonu

Erişkin Hematoloji Bilim Dalı laboratuvarına AML ve KML ön tanısıyla gönderilen EDTA'lı kemik iliği örnekler ile sağlıklı kontrollerden EDTA'lı PBS'de alınan kemik iliği örneklerinden standart yöntemlerle MNC izolasyonu yapılmıştır (87). Bu yöntemde yoğunluğu 1,077 g/ml'ye ayarlanmış polisükröz ve sodyum diatrizoat solüsyonu (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Antikoagülanlı kemik iliği örneği Histopaque üzerinde tabakalandırıldıktan sonra 1650 rpm'de 15-20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan interfaz tabakasındaki MNC'ler alınmıştır. PBS ile yıkama sonrası örneklerden hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Mononükleer Hücrelerin Dondurulması (Cryopreservation)

Hasta örneklerinden elde edilen MNC'ler daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için dondurulmuştur.

Gereç ve Solüsyonlar:

- 1) Isı ile inaktive edilmiş fütal dana serumu (FBS / Biological Ind, 04-001-1B)
- 2) Dimetilsülfoksit (DMSO, D-2650, Sigma Chemical Co. Irvine, UK)
- 3) RPMI-1640 medium (Biological Ind, 01-100-1A)
- 4) Sıvı azota dayanıklı küçük şişeler (375418, Nunc Brand Products, Denmark)
- 5) Steril, Dibi konik 12 ml'lik tüp (CellStar Greiner Labortechnik, 164 160)
- 6) Soğutmalı santrifüj, J6-MI (Beckman)
- 7) Sıvı nitrojen tankı (MVE Cryo System 4000, USA)

Dondurma ortamı (Freezing medium): %10 DMSO, %20 FBS içeren RPMI-1640. Hücreleri süspanse etmeden önce dondurma ortamı buzdolabında 4°C'ye soğutulmaktadır.

Yöntem:

- 1) Hücre örnekleri 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2) Süpernatant atıldıktan sonra, hücreler soğutulmuş dondurma ortamında maksimum 1×10^7 /ml hücre olacak şekilde süspanse edildi.
- 3) Hücre süspansiyonu sıvı azot şişelerine transfer edildi.
- 4) Küçük sıvı azot şişeleri buzdolabında 30 dakika bekletildikten sonra gece boyunca -80°C 'de saklandı.
- 5) Son aşamada, hücreler sıvı azota (-196°C) aktarılarak daha sonra araştırmada kullanılmak üzere depolandı.

3.2.3 Sıvı Azotta Dondurulan Hücrelerin Çözündürülmesi

Sıvı azot arşivinden çıkarılan hücreler, hızla 37°C su banyosunda hafifçe sallayarak çözüldü. Hücre süspansiyonunda küçük buz kristalleri olduğu anda su banyosundan çıkarıldı. Şişenin dışı alkolle silindikten sonra hücreler 10 ml'lik steril dibi konik tüpe aktarıldı. İki dakika içinde hafifçe tüpü sallayarak damla damla soğuk (4°C) RPMI-1640 ilave edildi. Hücre süspansiyonu $200 \times g$ 'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde döndürüldü. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler, manyetik boncukla ayırma işleminde kullanılacak olan EDTA'lı fosfat tuz tamponunda yeniden süspanse edildi.

3.2.4 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Testi

Hücre süspansiyonunda bulunan ölü hücreler özgün olmayan antikor bağlanmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle hücreler mikrobuncuk bağlı antikor ile işaretlemeye önce % 0.4'lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi (72). Test, canlı hücrelerin boyayı membranlarından içeri geçirmeme prensibine dayanmaktadır. Kısaca, bire bir oranında hücre süspansiyonu örneği ile tripan mavisi lam üzerinde hafifçe karıştırıldı. Yaklaşık 2-3 dakika bekletildikten sonra ışık mikroskopunda en az 200 hücre sayıldı. Tripan mavisi ile boyanmayan hücrelerin yüzdesi hesaplandı. Canlılık testi % 95'in altında çıkan hücre süspanسیونları 3.2.1. bölümde anlatıldı gibi tekrar Histopaque'dan geçirilerek ölü hücreler uzaklaştırıldı.

3.3 ÇOK PARAMETRELİ MANYETİK HÜCRE AYIRMA

Hasta ve normal kemik iliği MNC'lerinden sırasıyla "CD34 MultiSort" ve "CD38 MicroBead" kitleri kullanılarak CD34+CD38-, CD34+CD38+ ve CD34- hücre fraksiyonları elde edilmiştir. Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır.

3.3.1 CD34+ Hücrelerin Ayrılması:

AML, KML ve sağlıklı kontrollerden elde edilen MNC örneklerinden "CD34 MultiSort Kit" (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) kullanılarak CD34 pozitif hücre ayrımı gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) % 0.5 fetal dana serumu içeren EDTA'lı PBS (EK.4)
- 2) Pozitif ayırma (MS) kolonları (Miltenyi Biotec, 130-042-201)
- 3) Pre-separation filtreleri (Miltenyi Biotec, 130-041-407)
- 4) MiniMACS manyetik hücre ayırıcı (Miltenyi Biotec GmbH)
- 5) CD34 MultiSort Kit (Miltenyi Biotec, 130-056-701)
- 6) Soğutmalı santrifüj, J6-MI (Beckman)

Yöntem

- 1) MNC süspansiyonu 30 µm'lik pre-separation filtresinden geçirildi.
- 2) Hücre süspansiyonundan dilüsyon hazırlanarak otomatik kan sayım cihazında hücre sayımı yapıldı. 300 x g'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde döndürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti, 300 µl'de 10^8 hücre olacak şekilde PBS'de süspanse edildi.
- 3) Hücre süspansiyonuna özgün olmayan ya da Fc-reseptör bağlanmalarını engellemek için 100 µl "FcR Blocking" reaktifi ilave edildi.
- 4) Hücre süspansiyonuna toplam 10^8 hücre başına 100 µl "CD34 MultiSort MicroBeads" ilave edildi, iyice karıştırıldı ve buzdolabında 30 dakika inkübe edildi (hücrelerin manyetik işaretlenmesi).
- 5) Hücreler 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve MS ayırma kolondan geçirmek için 1000 µl tamponda süspanse edildi.

- 6) Manyetik ayırma alanına kolon yerleştirildi ve 500 µl tampon ilave edilerek kolon yıkandı. Kolonun tepesinden hücre süspansiyonu ilave edildi. Kolondan CD34- hücrelerin geçmesine izin verildi. Daha sonra kolona tekrar tampon ilave ederek yıkanması sağlandı. Kolondan geçen hücreler “**CD34-negatif hücre**” fraksiyonu olarak ayrımlandı.
- 7) Manyetik alandan kolon uzaklaştırılarak toplama tüplerine yerleştirildi. Kolona yaklaşık 1 ml tampon pipetlendikten hemen sonra kolonla birlikte verilen pistonu kullanarak CD34+ hücreler toplama tüpüne boşaltıldı.
- 8) İzole edilen CD34+ hücre süspansiyonundan ~10-20 µl örnek alındı ve PBS ile dilüe edilerek akım sitometrisinde CD34+ saflığı kontrol edildi.
- 9) Manyetik işaretli hücreler ml başına 20 µl “Multisort Release” reaktifi ilave edilerek buzdolabında inkübe edildi (hücrelerden mikroboncukların koparılması).
- 10) Manyetik işaretli kalan hücrelerin uzaklaştırılması için hücre süspansiyonu yeni bir MS kolonundan geçirildi.
- 11) Kolondan salınan hücreler yıkandıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve 10^7 hücre başına 50 µl tamponda hücre pelleti süspanse edildi.
- 12) 10^7 hücre başına 30 µl “MultiSort Stop” reaktifi ilave edilerek iyice karıştırıldı.

3.3.2 CD34+ Hücrelerden CD38+ ve CD38- Hücrelerin Ayrımlanması

“CD34 MultiSort kit” kullanılarak izole edilen CD34+ hücre süspansiyonundan “CD38 MicroBead Kit” ((Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)) kullanılarak CD34+CD38- ve CD34+CD38+ hücre fraksiyonu elde edilmiştir. Üretici firmanın belirttiği şekilde yöntem gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) % 0.5 fötal dana serumu içeren EDTA’lı PBS (EK.4)
- 2) Pozitif ayırma (MS) kolonları (Miltenyi Biotec, 130-042-201)
- 3) MiniMACS manyetik hücre ayırıcı (Miltenyi Biotec GmbH)
- 4) CD38 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, 130-092-263)
- 5) Mouse anti-human CD34-FITC moab (Beckman Coulter, IM1870)
- 6) Mouse anti-human CD38-PE moab (Beckman Coulter, IM1832)
- 7) Soğutmalı santrifüj, J6MI (Beckman)

Yöntem

- 1) CD34+ hücre süspansiyondan sayım yapıldı ve 300 x g'de yeniden santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler 10^7 hücre başına 80 µl tamponda süspansiyon edildi.
- 2) Hücre süspansiyonuna 10^7 hücre başına 20 µl CD38-Biotin antikoruna ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra buzdolabında 15 dakika inkübe edildi.
- 3) 10^7 hücre başına 2 ml tampon ilave ederek 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
- 4) Hücre pelleti 80 µl tamponda yeniden süspansiyon edildi ve 10^7 hücre başına 20 µl Anti-Biotin mikro boncukları ilave edildi.
- 5) İyice karıştırıldı ve buzdolabında 15 dakika inkübe edildi.
- 6) MACS ayırma sonunda elde edilen hücre saflığını akım sitometrisiyle kontrol etmek için anti-human CD38-PE monoklonal antikoruna eklendi. Karıştırıldıktan sonra buzdolabında ilave 10 dakika daha inkübe edildi.
- 7) 2 ml tampon eklenerek 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 8) 10^8 'ye kadar hücreler 500 µl'de yeniden süspansiyon edildi.
- 9) MACS ayırma alanına MS kolonu yerleştirildi, kolon tamponla yıkandıktan sonra hücre süspansiyonu kolonun tepesinden eklendi.
- 10) Kolondan doğrudan geçen hücreler toplanarak "**CD34+CD38- kök hücre**" olarak tanımlanmıştır. Kolona üç defa 500'er µl tampon ilave ederek yıkandı.
- 11) Kolon MACS ayırma alanından kaldırılarak boş toplama tüpüne yerleştirildi.
- 12) Kolona yaklaşık 1 ml tampon ilave edildikten hemen sonra piston kullanılarak kolonda kalan hücreler toplama tüplerine boşaltıldı. Bu hücre grubu ise **CD34+CD38+ kök hücre** fraksiyonu olarak tanımlanmıştır.

Manyetik boncuklar ile hücre ayırma işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonlarından hücre sayılarına bağlı olarak ~20 µl numune alınarak dilüsyon hazırlandı ve akım sitometrisinde hücre saflığı kontrol edildi.

AML, KML ve sağlıklı kontrol örneklerinden elde edilen CD34+CD38-, CD34+CD38+ ve CD34- hücre süspansiyonlarından bekletmeden total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.4 AKIM SİTOMETRİK ANALİZ

Hücre düzeyinde erken EKH transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu araştırmak için AML, KML ve sağlıklı kontrollere ait MNC örnekleri kullanılmıştır. Floresans işaretli monoklonal antikolar yardımıyla hücre yüzey ve sitoplazmik boyama yapılmıştır. Aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan örnekler akım sitometri cihazı ve Expo32 ADC XL4 Color Analysis Software'i kullanılarak değerlendirilmiştir. Antikolar üretici firmanın önerdiği miktarlarda kullanılmıştır.

3.4.1 Hücre Yüzeyi SSEA-4 Ekspresyonunun Saptanması:

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) 5 ml'lik silikonize test tüpleri ve izoton sıvısı ya da PBS.
- 2) Mouse anti human CD38-FITC moab (340909, BD Pharmingen)
- 3) Mouse anti-human SSEA.4-PE moab (11-8843, eBioscience, Inc)
- 4) Mouse anti-human CD34-PE-Cy5 moab (555823, BD Pharmingen)
- 5) Mouse IgG1-FITC isotype control (IM1870, Beckman Coulter)
- 6) Mouse IgG3-PE isotype control (11-4742, eBioscience, Inc.)
- 7) Mouse IgG1-PE-Cy5 isotype control (555750, BD Pharmingen)
- 8) Akım sitometri cihazı, Epics XL-MCL, 2004 (Beckman Coulter, Inc)
- 9) Expo32 ADC XL4 Color Analysis Software (Beckman Coulter, Inc)

Yöntem

- 1) Test tüplerine $\sim 10^5$ MNC konuldu ve üzerine 20'er μ l CD38-FITC, SSEA.4-PE ve CD34-PE,Cy5 monoklonal antikoları ilave edildi. Başka bir test tüpüne ise aynı şekilde antikoların izotipik kontrolleri eklendi. Karışması sağlandıktan sonra oda ısısında ve karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi.
- 2) Bağlanmayan antikoların ortamdaki uzaklaştırılması için tüplere 2'er ml izoton sıvısı ilave edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant atılarak hücreler 500 μ l izoton sıvısında süspanse edildi.
- 4) Hücre süspanسیونları akım sitometri cihazından ~ 300 hücre/sn hızda örnek geçirilerek hücrelerin boyutu, granülaritesi ve floresans ışımaları ölçüldü.

3-Renkli Akım Sitometrik Analiz İşlemi; Akım sitometri cihazında hücrelerden elde edilen veriler kullanılarak 4 ayrı hücre görüntüsü (dot plot) oluşturuldu.

1) Dar açılı ışık saçılımı (FSC) ile 90° açıyla ışık saçılım (SSC) parametresi kullanılarak oluşturulan görüntüde hücre boyutu ve granülaritesi kontrol edildi.

2) CD34-PE,Cy5'in ışıma verdiği fluoresans-4 (FL4)'e karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta granülariteye bağlı hücrelerin CD34 ekspresyonu değerlendirildi. İzotipik kontrol ile belirlenen eşik değerin üzerindeki flüoresans ışımaları CD34+ hücreler kabul edildi. Bu hücreler üzerinde işaretleme yaparak hücrelerin yüzde olarak ne kadarının CD34 eksprese ettiği belirlendi.

3) Aynı şekilde eşik değerin altında kalan hücreler ise CD34 negatif hücrelerdir. Yine bu hücreler üzerinde de kapılama işlemi yapılarak CD34- hücre yüzdesi belirlendi.

4) FL1 (CD38-FITC)'e karşı FL2 (SSEA.4-PE) parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde SSEA.4 ve CD38 ekspresyonları değerlendirildi. CD34 pozitif hücreler bu görüntüye tanıtılmasıyla CD34+CD38-, CD34+CD38+ ve CD34+ hücreler üzerindeki hücre yüzeyi SSEA.4 ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı.

5) Üçüncü dot plot görüntünün aynısı oluşturuldu. Farklı olarak bu görüntüye CD34 negatif hücreler tanıtılarak CD34- hücrelerdeki SSEA.4 ekspresyonu yüzde değer olarak kaydedildi.

3.4.2 Sitoplazmik Oct-4 ve Nanog Ekspresyonunun Saptanması:

3.4.1 bölümünde anlatıldığı gibi MNC örneklerinde CD34-PE,Cy5 ve CD38-PE moab'larıyla yüzey boyama yapılmıştır. Takiben sitoplazmik boyama sonucu Oct-4 ve Nanog ekspresyonları değerlendirilmiştir. Hücre içi antijen boyama yöntemi üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır.

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) Mouse anti-human Oct.4-FITC moab (IC1759F, R&D systems,)
- 2) Mouse anti-human Nanog-FITC moab (11-5769, eBioscience, Inc.)
- 3) Mouse anti-human CD38-PE- moab. (IM1832U Beckman Coulter)
- 4) Mouse anti-human CD34-PE-Cy5 moab (555823, BD Pharmingen)
- 5) Rat IgG2b-FITC izotype control (IC013F, R&D systems)
- 6) Mouse IgG1-PE moab. (IM 1832, Beckman Coulter)
- 7) Mouse IgG1-PE-Cy5 isotype control (555750, BD Pharmingen)
- 8) Permeabilizing Solution (A07803, Beckman Coulter)
 - a. Fiksatif solüsyonu
 - b. Permeabilizing solüsyon

Yöntem

- 1) Yüzey boyama yapılan hücrelere 2 ml izoton sıvısı ilave edilerek 1200 rpm'de 5 dakika döndürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler 100 µl'de resüspanse edildi.
- 2) Hücre süspansiyonuna 100 µl fiksatif solüsyonu ilave edilerek 10 dakika oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
- 3) Yıkama işleminden sonra hücre pelletini bozmadan 100 µl permeabilizing (hücre membranında porlar açan) solüsyon ilave edilerek aynı koşullarda 10 dakika inkübe edildi.
- 4) İlgili tüplere 20'er µl Oct.4-FITC, Nanog-FITC ve izotipik antikorlar ilave edildi, hücre pelleti iyice karıştırılarak süspanse edilerek 15 dakika aynı koşullarda inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon sonunda yıkama işlemi yapıldı ve hücreler 500 µl'de süspanse edildi. Takiben akım sitometri cihazında ölçümleri gerçekleştirildi.

3-Renkli Akım Sitomerik Analiz İşlemi; 3.4.1 bölümünde anlatıldığı gibi sitoplazmik antijenlerin akım sitometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda; CD34+CD38-, CD34+CD38+, CD34+ ve CD34- hücrelerdeki Oct-4 ve Nanog ekspresyonları yüzde değer olarak saptanmıştır.

3.5 OCT-4, NANOG ve REX-1 GEN İFADELERİNİN ANALİZİ

3.5.1. Total RNA İzolasyonu:

Total RNA ekstraksiyonu, 3.3 bölümünde anlatıldığı şekilde hasta ve normal kemik iliği örneklerinden izole edilen CD34+CD38-, CD34+CD38+ ve CD34- hücre fraksiyonlarından “High Pure RNA isolation kit“ (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) Standart masa üstü mikrosantrifüj (Sartorius, Sigma, Germany)
- 2) 1.5 ml’lik steril mikrosantrifüj tüpleri
- 3) Absolute ethanol, % 96 (1.00971.25, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 4) High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, 11 828 665 001)

Kit içeriği;

- 1) 2 ml’lik toplama tüpleri
 - 2) Lysis/Binding tamponu
 - 3) DNase I enzimi
 - 4) DNase inkübasyon tamponu
 - 5) Yıkama tamponu-I
 - 6) Yıkama tamponu-II (kullanmadan önce 40 ml etanol ilave edildi)
 - 7) Elution tampon
 - 8) High Pure Filtreli tüpler
 - 9) Toplama tüpleri
- DNase I enzimi 550 µl elution tamponunda çözülerek, küçük miktarlarda ayrımlanarak -20°C’de saklandı.
 - Yıkama tamponu-I; ilk defa kullanmadan önce 20 ml etanol ilave edildi.
 - Yıkama tamponu-II; ilk defa kullanmadan önce 40 ml etanol ilave edildi.

Yöntem

- 1) Hücre süspansiyonları steril 1.5 ml'lik ependorf tüplerine transfer edildi.
- 2) 2600 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti 200 µl PBS'de süspanse edildi.
- 4) 400 µl Lysis/Binding tamponu ilave edildi ve 15 saniye vortekslendi.
- 5) High Pure Filtreli tüpler toplama tüplerine yerleştirildi.
- 6) Hazırlanan ~700 µl hücre lizatı filtreli tüplere pipetlendi.
- 7) 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 8) Toplama tüplerindeki sıvı döküldükten sonra filtreli tüpler tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi.
- 9) Bu aşamada DNase I solüsyonu hazırlandı; 1.5 ml'lik ependorf tüpe her örnek için 90 µl DNase inkübasyon tamponu ve 10 µl DNase I ilave edildi.
- 10) Filtreli tüplerin ortasına 100 µl DNase I solüsyonundan ilave edilerek oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
- 11) Filtreli tüplere 500 µl yıkama tamponu-I ilave edilerek 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 12) Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve filtreli tüpler aynı toplama tüplerine konuldu.
- 13) Filtreli tüplere 500 µl yıkama tamponu-II ilave edildi ve 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 14) Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve filtreli tüpler aynı toplama tüplerine konuldu.
- 15) Filtreli tüplere 200 µl yıkama tamponu-II ilave edilerek 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 16) Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
- 17) RNA'yı ayırmak için filtreli tüpün üst kısmına 50 µl Elution tamponu ilave edildi ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 18) Filtreli tüpler atıldı ve Total RNA örneğinin bulunduğu tüp daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklanarak arşiv oluşturuldu.

3.5.2 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi:

12 µl total RNA örneği cDNA sentezinde kalıp olarak kullanıldı. cDNA sentezinde “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit” (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) kullanıldı. Yöntem, üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır.

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) Thermal Cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- 2) Steril, DNase ve RNase içermeyen ependorf tüp
- 3) Standart masa üstü mikrosantrifüj (Sartorius, Sigma, Germany)
- 4) Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostic, 04 896 866 001)

Kit içeriği

- 1) Oligo (dT)₁₈ primer
- 2) DEPC’li distile su
- 3) 5X Reaksiyon Tamponu
- 4) Ribonuclease inhibitör
- 5) 10 mM dNTP mix
- 6) Transcriptor Reverse Transcriptase

Yöntem

- 1) 0.2 ml’lik ependorf tüp içerisinde Tablo 3’de gösterilen birinci reaksiyon karışımı sırasıyla konularak hazırlandı.

Tablo 3: cDNA sentezi için hazırlanan kalıp-primer karışım içeriği.

Bileşenler	Miktarı	Son konsantrasyonu
Oligo (dT) ₁₈ primer	1.0 µl	2.5 µM
Total RNA	12.0 µl	-
<i>Toplam hacim</i>	<i>13.0 µl</i>	

- 2) 65°C’de 10 dakika inkübe edildi ve tüpler hemen buz üzerine alındı. Örnekler buz üzerinde bekletilirken Tablo 4’de verilen ikinci reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 4: cDNA sentezi için hazırlanan ikinci reaksiyon karışımı.

Bileşenler	Miktarı	Son konsantrasyonu
5x Reaksiyon tamponu	4.0 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
RNase inhibitor	0.5 µl	20 U
dNTP mix (10 mM)	2.0 µl	Her biri (1 mM)
Transcriptor RT	0.5 µl	10 U
<i>Toplam hacim</i>	<i>7.0 µl</i>	

- 3) Thermal cycler’da aşağıdaki ısı profili uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.
1. basamak: ***25°C’de 10 dakika inkübasyon***
 2. basamak: ***50°C’de 60 dakika inkübasyon***
 3. basamak: ***85°C’de 5 dakika inkübasyon***
 4. basamak: ***4°C’de bekletme.***
- 4) Sentezlenen cDNA örnekleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kuruluncaya kadar buzdolabında bekletildi. Kalan kısmı ise daha sonraki kullanımları için -20°C’de saklandı.

3.5.3 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Gerçek zamanlı PCR için ön çalışmalar Erişkin Hematoloji BD laboratuvarında LightCycler[®] 1.5 (Roche Diagnostic) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. CD34 negatif hücrelerde gen ekspresyonlarının rölatif kantitasyonu ise Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD Moleküler laboratuvarında LightCycler[®] 2.0 (Roche Diagnostic) cihazı ve LightCycler software 4.0 kullanılarak gerçekleştirildi.

Elde edilen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak öncül primerler aracılığı ile RT-PCR reaksiyonu kuruldu. Oct-4, Nanog ve Rex-1 genlerine ait referans dizileri www.ncbi.nlm.nih.gov adresinden alındı ve “Oligo 6.0” programı kullanılarak primerler dizayn edildi. Yine aynı web sayfasında primer dizileri girildikten sonra “BLAST” edilerek

bütün genlerde çakışan yerlerin olup-olmadığı ve “Vector NTI” programı kullanılarak da primerlerin ekzon-intron boundary’de olup-olmadıkları kontrol edildi. Referans numaraları ve primer dizileri verilerek TIB MolBiol (Berlin, Germany) firmasına sentez ettirildi. Kontrol olarak da β -2-mikroglobulin genine spesifik primerler kullanıldı. Kullanılan primerlerin dizisi, referans numaraları ve ürün büyüklükleri Tablo 5’de verilmiştir. Her dört gen için primer konsantrasyonu, termal profili gibi değişkenler uygulanarak optimizasyonları gerçekleştirildi. Optimizasyon sonucunda Tablo 6’te belirtilen ısı profillerinde PCR gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

Tablo 5: Gerçek zamanlı PCR’da kullanılan primer dizileri ve amplicon büyüklükleri.

Primer/Ref. no	Dizi	PCR ürün büyüklüğü
Oct-4 (<i>POU5F1</i>) NM_002701.4	(F) 5’- GGTTCTGTAACCGGCGCCAG - 3’ (R) 5’- GTTCCCAATTCCTTCCTTAG - 3’	376 bç
Nanog NM_024865.2	(F) 5’- CCCAAAGCTTGCCTTGCTTT - 3’ (R) 5’- AGACAGTCTCCGTGTGAGGCA - 3’	132 bç
Rex-1 (<i>ZFP42</i>) NM_174900.3	(F) 5’- CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT - 3’ (R) 5’- GCGTACGCAAATTAAGTCCAAGA - 3’	306 bç
B2-M NM_004048.2	(F) 5’- CTACTCTCTTTTCTGGCCTG - 3’ (R) 5’- GACAAGTCTGAATGCTCCAC - 3’	191 bç

Tablo 6: Gerçek zamanlı PCR’da uygulanan ısı profilleri.

Program		Isı	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon		95°C	10 dk	1
Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C	10 sn	45
	Bağlanma	55°C	10 sn	
	Uzama	72°C	10 sn	
Erime eğrisi (Melting)		95°C	10 sn	1
		65°C	1 dk	
		95°C	0.1 °C/s	
Soğutma		40°C	30 sn	1

Gerçek zamanlı PCR, “FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kiti” (Roche Diagnostics, 03 515 885 001) kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntem, üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı.

Gereç ve Solüsyonlar

- 1) LightCycler[®] 1.5 ve 2.0 cihazları (Roche Instrument Center, Switzerland)
- 2) LC sample carousel (11 909 282 001, Roche Diagnostics)
- 3) LC santrifüj adaptörleri (11 909 312 001, Roche Diagnostics)
- 4) LC kapiller releaser (03 603 920 001, Roche Diagnostics)
- 5) LC capping tool (03 357 317 001, Roche Diagnostics)
- 6) LC kapiller tüpler, 20 µl (11 909 339 001, Roche Diagnostics)
- 7) LC FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit
- 8) Standart masa üstü mikrosantrifüj (Sartorius, Sigma, Germany)

Yöntem:

- 1) 0.2 ml’lik ependorf tüpte Tablo 7’te verilen reaksiyon karışımı hazırlanarak kapillere yüklendi. Kısa döndürülerek karışımın kapillerde toplanması sağlandı.

Tablo 7: Gerçek zamanlı PCR karışımının içeriği.

Bileşenler	Miktarı	Son konsantrasyonu
Distile su	12.0 µl	
5’-İleri primer	1.0 µl	0.5 pmol
3’-Geri primer	1.0 µl	0.5 pmol
SYBR Green Master karışımı	4.0 µl	
cDNA kalıbı	2.0 µl	
<i>Toplam hacim</i>	<i>20.0</i>	

- 2) PCR kapiller tüpleri LightCycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 6’te verilen gerçek zamanlı PCR için verilen ısı protokolü kullanıldı.
- 3) Floresans ölçümü ve ergime eğrisi (melting curve) analizi LightCycler Software 4.0 (Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı.

- 4) Rölatif kantitasyonun analiz basamağı ise PCR verimliliği (efficiency) 2.0'ye ayarlanarak tamamen otomatize LightCycler software 4.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Sağlıklı gönüllü kişilerin cDNA'sı kalibratör olarak kullanıldı. Rölatif kantitasyon deneyleri üç kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Ergime eğrisi çizdirilerek PCR ürünlerinin büyüklüklerinin ön değerlendirmesi yapıldı.
- 5) RT-PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek ürün büyüklükleri ve özgün olmayan PCR amplifikasyonları açısından kontrol edildi.

3.5.4 Agaroz Jel Elektroforezi:

Gereç ve Solüsyonlar

1. LE agarose (50000, FMC BioProducts, Rockland, USA)
2. TAE Buffer (10x) (V4271/Prpmega Corporation, Madison, USA)
3. Etidium bromide, 10 mg/ml (E-8751/Sigma Chemical Co, St Louis, USA)
4. 6x Yükleme boyası (#R0611, Fermentas GmbH)
5. pUC moleküler büyüklük belirleyici,8 (#SM0301, Fermentas GmbH)

PCR örnekleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek çalışılan her bir gen ürünü büyüklük ve özgün olmayan amplifikasyonlar açısından değerlendirildi. 6 gram agaroz 300 ml 0.5 x TAE tamponunda çözülerek hazırlandı. Agaroz ısıtılarak çözülmesi sağlandı. Agaroz çözeltisinin soğuması için oda ısısında bekletildi. Soğumaya yakın 15 µl ethidium bromide (10 mg/ml) ilave edildi. Hazırlanan jel, Thermo EC Maxicell® Primo elektroforez sisteminin jel dökme aparatına döküldü. Jelde kuyucuk oluşturmak için tarak yerleştirildi. Agaroz jelin polimerleşmesi için 30 dakika oda ısısında bekletildi. Donmuş olan jelden tarak çıkarıldı ve 0.5 x TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforezde yürütülecek PCR ürünleri 6x jel yükleme tamponuyla (Fermentas GmbH,#R0611) karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Örneklerin büyüklüklerinin belirlenebilmesi için jele eş zamanlı moleküler büyüklük belirleyici de (Fermentas GmbH, #SM0241) konuldu. 10V/cm akım uygulanarak örneklerin jelde yürümesi sağlandı. Elektroforez sonuçları EpiChemi 3 Darkroom (C-80 type) sistemi ve LabWorks Software (UVP, BioImaging Systems, Inc Upland, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler SPSS software versiyon 15.0 kullanılarak gerçekleştirildi.

Sağlıklı kontrol, AML ve KML gruplar arasındaki cinsiyet dağılımları Ki-kare testi ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplar arasındaki yaş ortalamaları, sağlıklı kontrollere göre normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranları ve hücre fraksiyonları arasındaki yüzde ekspresyon ortalamaları Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. $P < 0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sağlıklı kontrol, AML ve KML gruplarının kendi içinde bulunan farklı hücre grupları arasında yüzde ekspresyon ortalamaları Wilcoxon testi uygulanarak karşılaştırıldı. $P < 0.05$ değeri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen olgular 3 grupta toplanmıştır; herhangi bir hematolojik hastalığı bulunmayan ve Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalında sternektomi yapılarak by-pass ameliyatı olan olgular sağlıklı kontrol grubunu oluşturmaktadır. AML ve KML hasta grubu ise kemik iliği aspirasyon raporu ve akım sitometrik analiz sonuçlarına göre tanı alan olgulardan oluşmaktadır. AML hasta grubu ise kendi içinde FAB sınıflamasına göre alt gruplara ayrılmıştır. Çalışmaya dâhil edilen AML ve KML gruplarına ait olguların klinik özellikleri sırasıyla Tablo 8 ve 9’da verilmektedir.

Tablo 8: Çalışmaya dâhil edilen AML olgularının klinik ve patolojik verileri.

Olgu no.	Yaş (yıl)	Cins	K.İ. aspirasyonu	Klinik özellik
1	59	K	AML-M2	Yeni tanı
2	69	K	AML-M2	Yeni tanı
3	48	E	AML-M1	Yeni tanı
4	72	E	AML-M1	CMML'den dönüşüm
5	56	E	AML-M1	Yeni tanı
6	44	E	AML-M3	Yeni tanı
7	68	K	AML-M2	Yeni tanı
8	53	K	AML-M5	Yeni tanı
9	78	E	AML-M2	Yeni tanı
10	40	K	AML-M1	Yeni tanı
11	66	K	AML-M5	+ Meme CA
12	59	E	AML-M2	CMML'den dönüşüm
13	52	E	AML-M4	MDS'den dönüşüm
14	34	K	AML-M2	Yeni tanı
15	59	K	AML-M3	Yeni tanı
16	55	E	AML-M2	Yeni tanı
17	84	K	AML-M1	Yeni tanı
18	27	E	AML-M1	Yeni tanı
19	46	E	AML-M1	Yeni tanı
20	68	E	AML-M3	Yeni tanı

Kısaltmalar: E, Erkek, CMML, kronik myelomonositik lösemi,
K, kadın, MDS, myelodisplastik sendrom.

Tablo 9: Çalışmaya dâhil edilen KML olgularının klinik ve patolojik özellikleri.

Olgu no.	Yaş (yıl)	Cins	K.İ. aspirasyonu
1	24	E	KML-kronik faz
2	73	E	KML-kronik faz
3	41	K	KML-kronik faz
4	79	E	KML-kronik faz
5	68	K	KML-kronik faz
6	67	K	KML-kronik faz
7	56	E	KML-kronik faz
8	45	E	KML-kronik faz
9	48	K	KML-kronik faz
10	22	K	KML-akselere faz
11	33	K	KML-akselere faz
12	65	K	KML-kronik faz
13	21	E	KML-kronik faz
14	76	K	KML-kronik faz
15	35	E	KML-kronik faz
16	73	K	KML-kronik faz
17	30	K	KML-kronik faz
18	46	E	KML-kronik faz
19	53	K	KML-kronik faz
20	49	E	KML-kronik faz

Kısaltmalar: E, erkek,
K, kadın,
KML, kronik myeloid lösemi.

Sağlıklı kontrol, AML ve KML gruplarını oluşturan olguların cinsiyete göre dağılımları Tablo 10’de gösterilmiştir. Gruplar (kontrol, AML ve KML) uygun cinsiyet dağılımı göstermektedir ve gruplar arasında cinsiyete göre fark yoktur ($\chi^2=0.579$, $p=0.749$).

Tablo 10: Grupların cinsiyete göre dağılımı.

			Cinsiyet		Toplam
			ERKEK	KADIN	
Grup	Kontrol	Sayı	9	7	16
	grubu	(%)	56,25	43,75	100,0
	AML	Sayı	11	9	20
	grubu	(%)	55,0	45,0	100,0
	KML	Sayı	9	11	20
	grubu	(%)	45,0	55,0%	100,0
Toplam		Sayı	29	27	56
		(%)	51,8	48,2	100,0

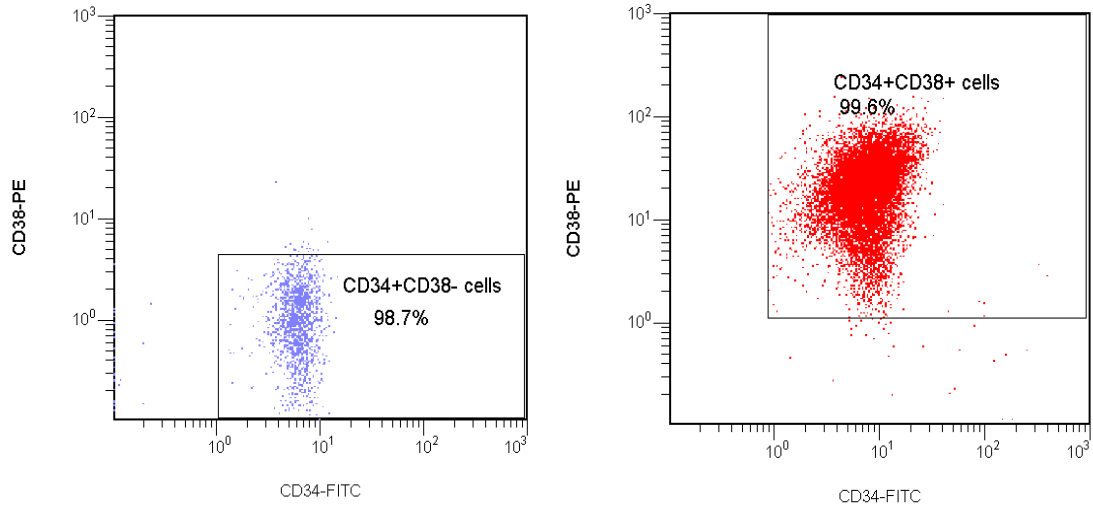
Sağlıklı kontrol, AML ve KML olgularının yaş ortalamasına göre dağılımı Tablo 11’de gösterilmektedir. Gruplar (kontrol, AML ve KML) yine yaş ortalaması bakımından uygun dağılım göstermektedir. Gruplar arasında yaşa göre fark saptanmadı (Kontrol-AML’de $p=0.836$, Kontrol-KML’de $p=0.323$ ve AML-KML’de $p=0.267$).

Tablo 11: Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı.

Grup	<i>Yaş ortalaması</i>	Std. Sapma	Sayı
Kontrol	56,88	12,925	16
AML grubu	56,85	14,525	20
KML grubu	50,20	18,917	20
Total	54,48	15,888	56

4.1 Manyetik Boncuklar ile Hücre Ayrılması (MACS)

Kontrol, AML ve KML kemik iliği örneklerinden MACS yöntemiyle CD34+CD38- ve CD34+CD38+ hücre fraksiyonları ayrıldı. İşlem sonunda ayrımlanan hücre fraksiyonlarının saflığı akım sitometrik analiz ile kontrol edildi ve hücrelerin saflığı %98,0±1,0 bulundu (Şekil 9). Akım sitometrisinde % 95,0'in altındaki saflıklarda ise hücre fraksiyonu kolondan ikinci defa geçirilerek saflığı artırıldı. MACS işlemi öncesinde mononükleer hücrelerin canlılıkları tripan-mavisi ile kontrol edildi (canlılık >% 97).



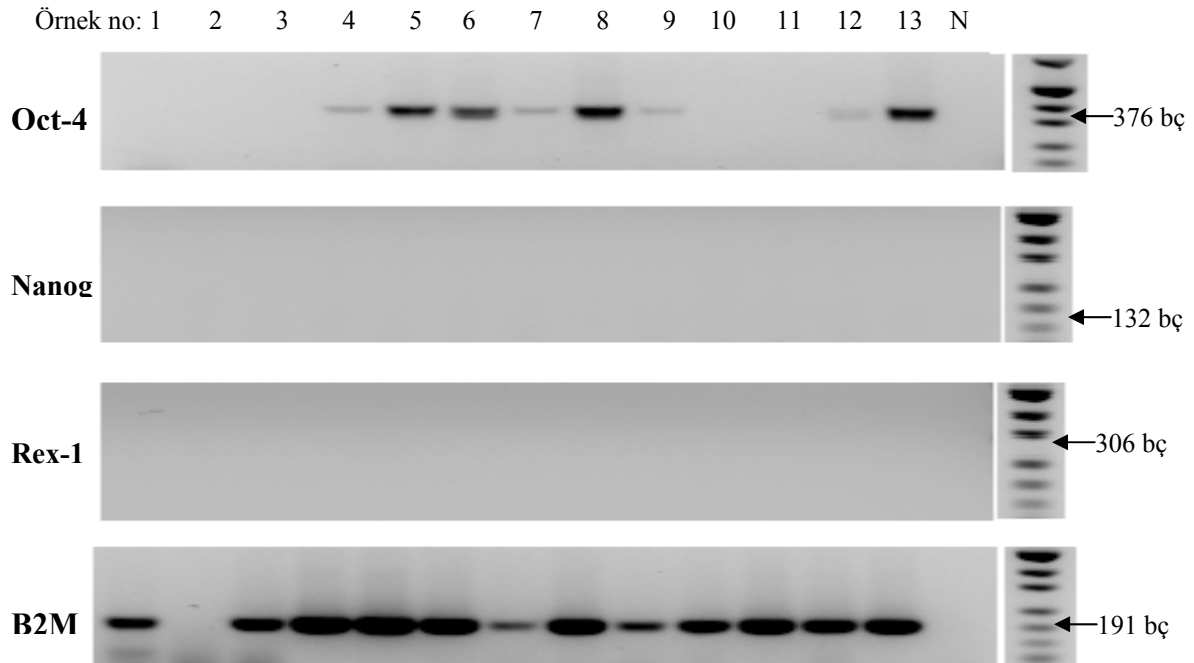
Şekil 9: Manyetik ayrımı yapılan hücre fraksiyonlarında saflığın kontrol edilmesi.

4.2 PCR Amplifikasyonlarının Agaroz Jeldeki Görüntüleri

Normal ve hasta kemik iliği örneklerinden izole edilen hücre fraksiyonlarının total RNA'larından ters transkriptaz ile sentezlenen cDNA örnekleri gen ifadesinin analizi için kalıp olarak kullanıldı. Normal ve hastalara ait hücre fraksiyonlarında, erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin (Oct-4, Nanog ve Rex-1) mRNA ekspresyonunu saptamak için yapılan reaksiyonlarda β 2-mikroglobulin iç kontrol ve referans gen olarak kullanıldı. Tüm örnekler büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından % 2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

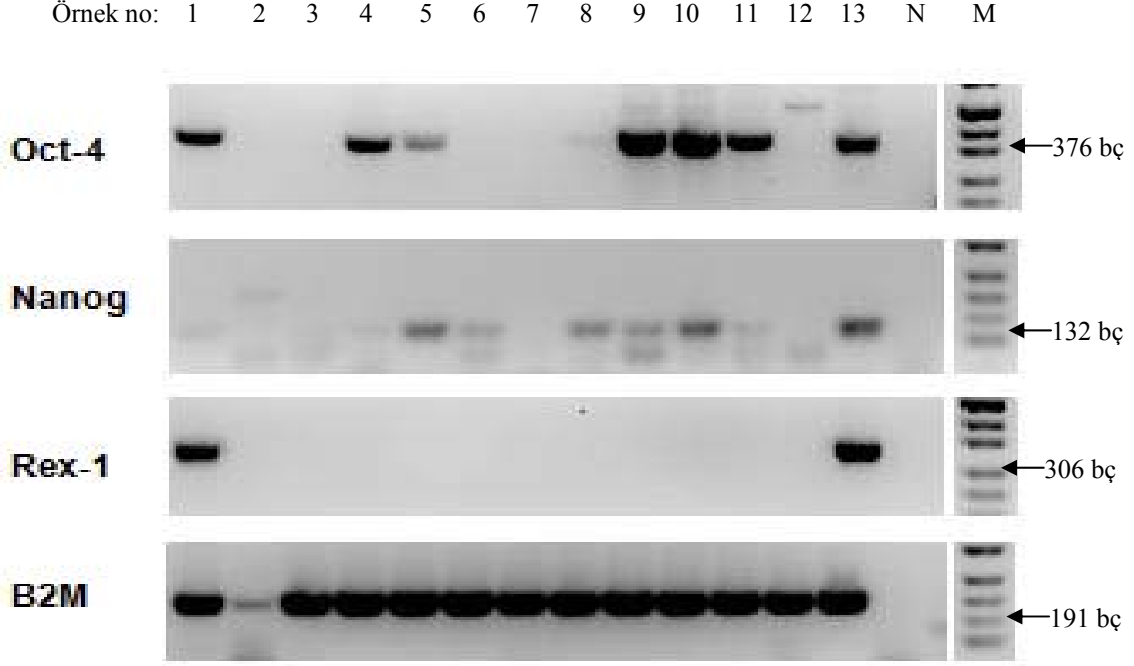
4.2.1 Sağlıklı Kontrol Grubuna ait Hücrelerde PCR Amplifikasyonları:

Sağlıklı kontrol grubuna ait **CD34+CD38-** hücrelerde Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 10'da gösterilmektedir. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



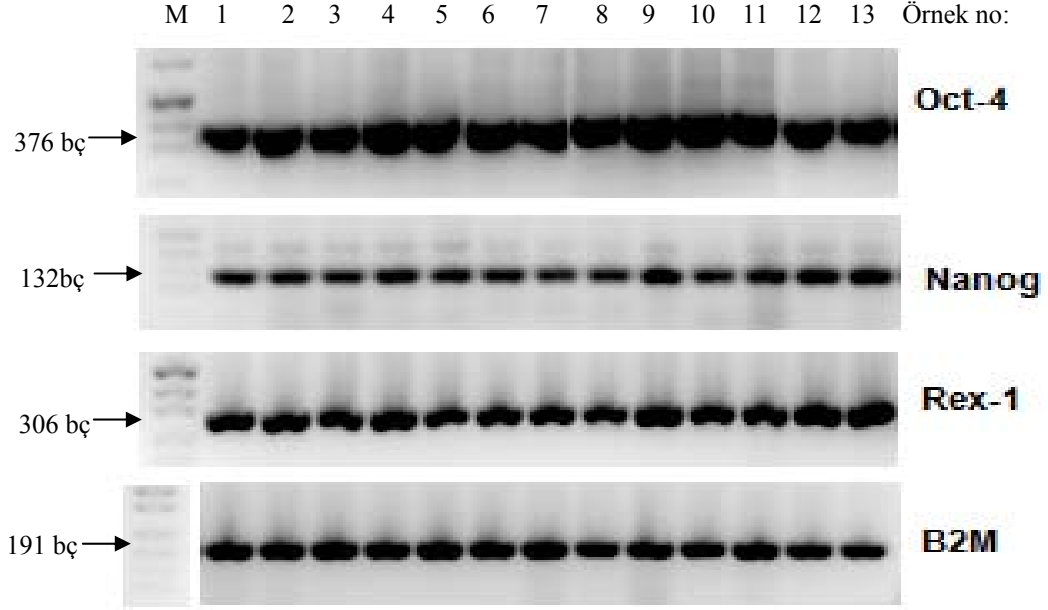
Şekil 10: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-13 Kontrol, N: distile su, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

Sağlıklı grubuna ait **CD34+CD38+** hücrelerde Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 11'de gösterilmektedir. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



Şekil 11: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-13 Kontrol, N: distile su, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

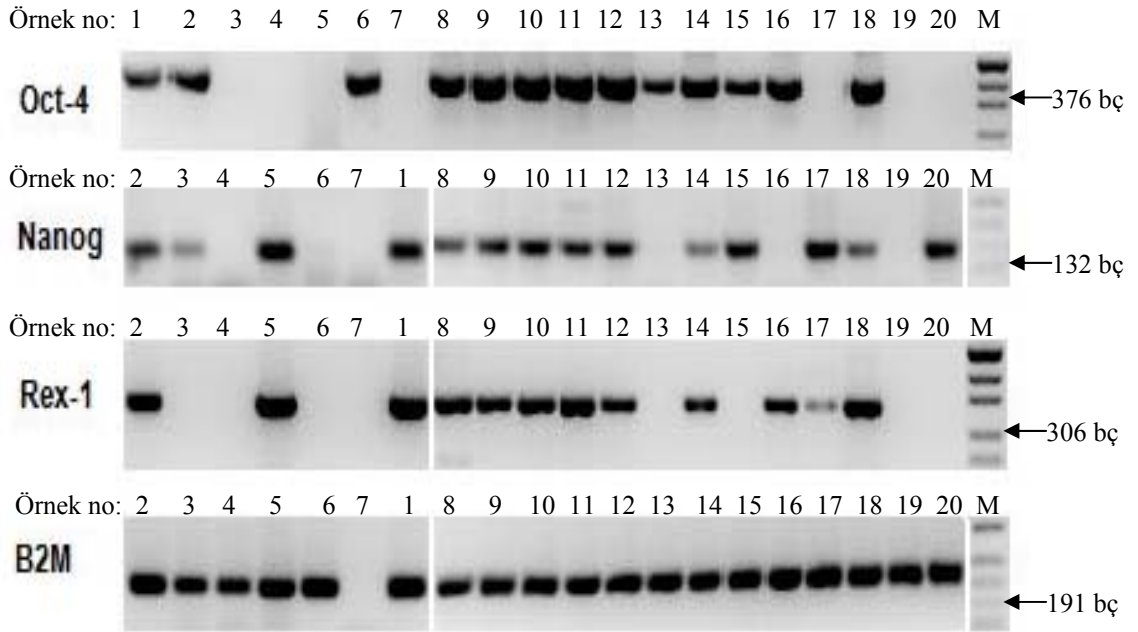
Sağlıklı grubuna ait **CD34-** hücrelerde Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 12'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



Şekil 12: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-13 Kontrol, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

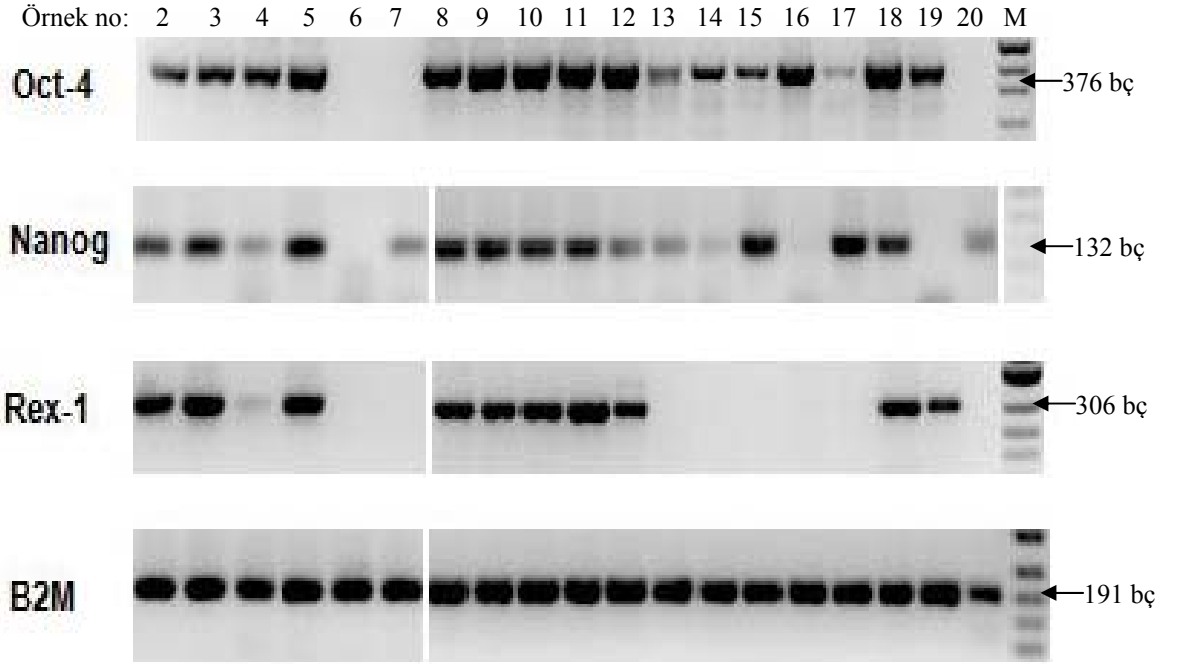
4.2.2 AML Hasta Grubuna ait Hücrelerde PCR Amplifikasyonları:

AML olgularındaki **CD34+CD38-** hücrelerine ait Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 13'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



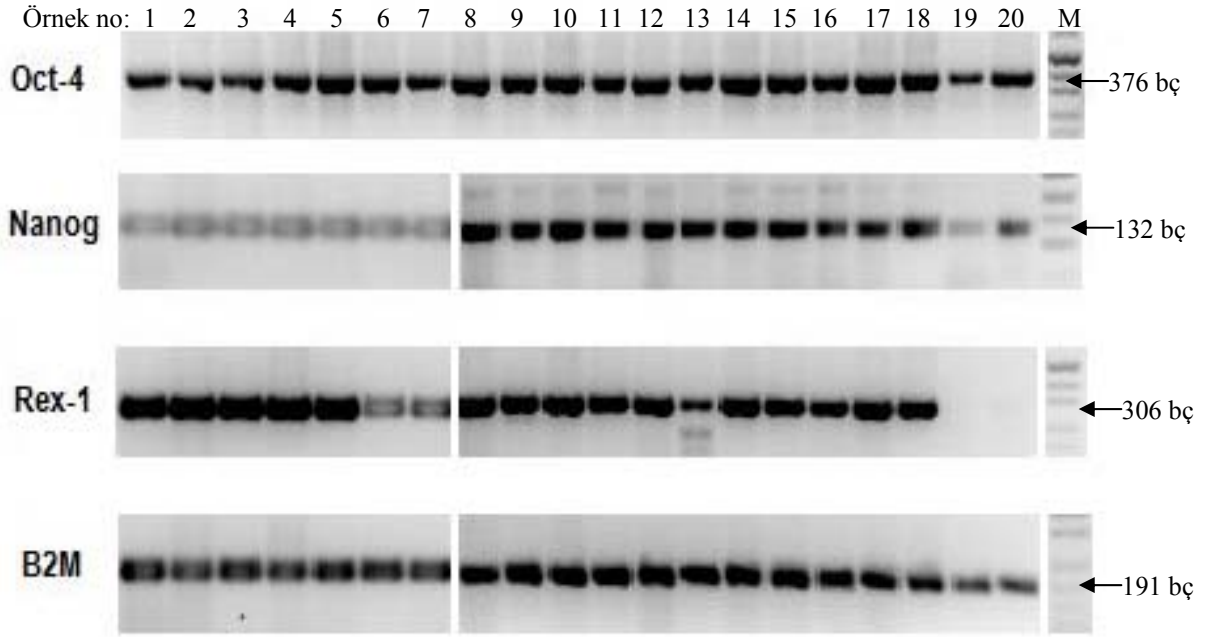
Şekil 13: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-20 AML, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

AML olgularındaki **CD34+CD38+** hücrelerine ait Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 14'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



Şekil 14: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (2-20 AML, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

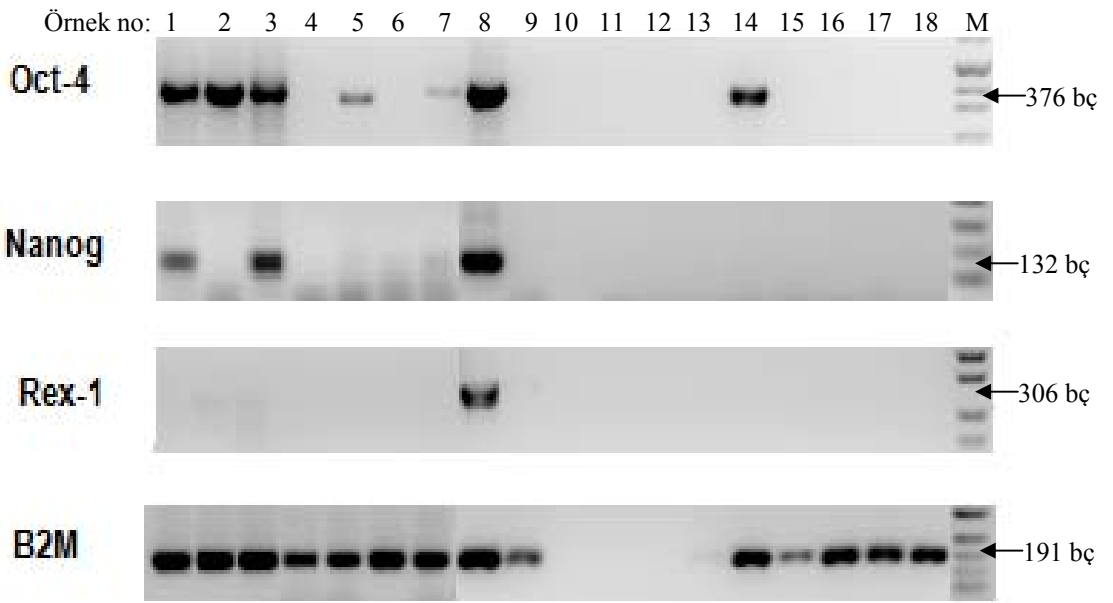
AML olgularındaki **CD34-** hücrelerine ait Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 15'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



Şekil 15: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-20 AML, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

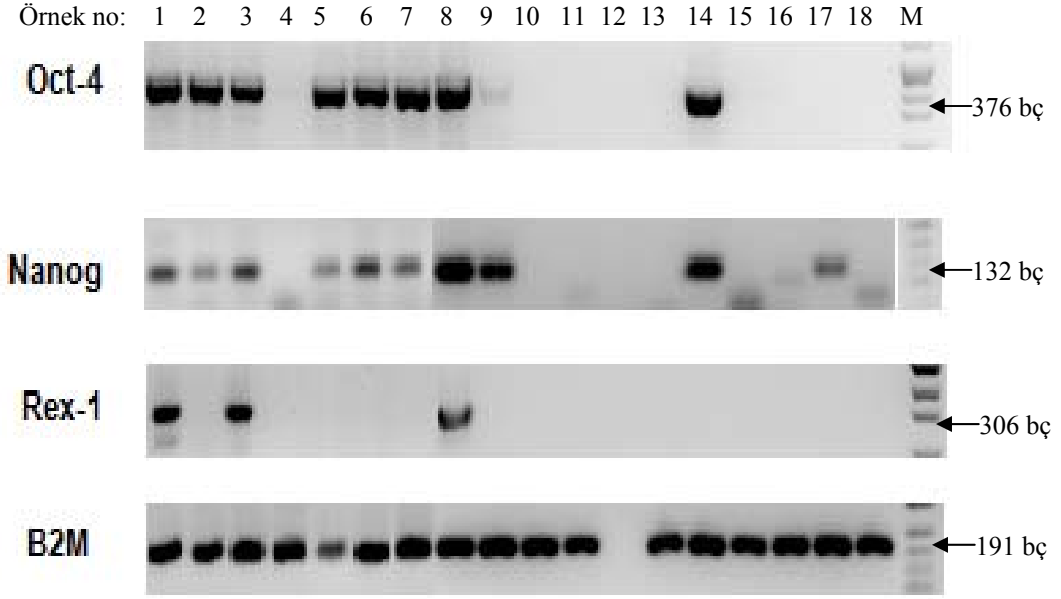
4.2.3 KML Hasta Grubuna ait CD34+CD38- Hücrelerdeki PCR Amplifikasyonları:

KML olgularındaki **CD34+CD38-** hücrelerine ait Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 16'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



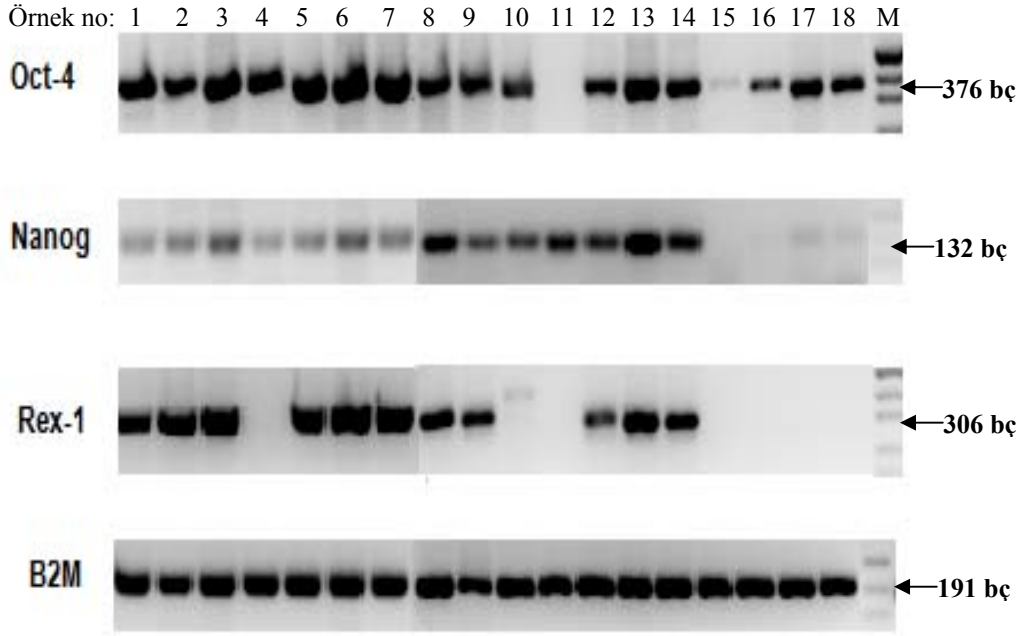
Şekil 16: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-18 KML, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

KML olgularındaki **CD34+CD38+** hücrelerine ait Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 17'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



Şekil 17: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-18 KML, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

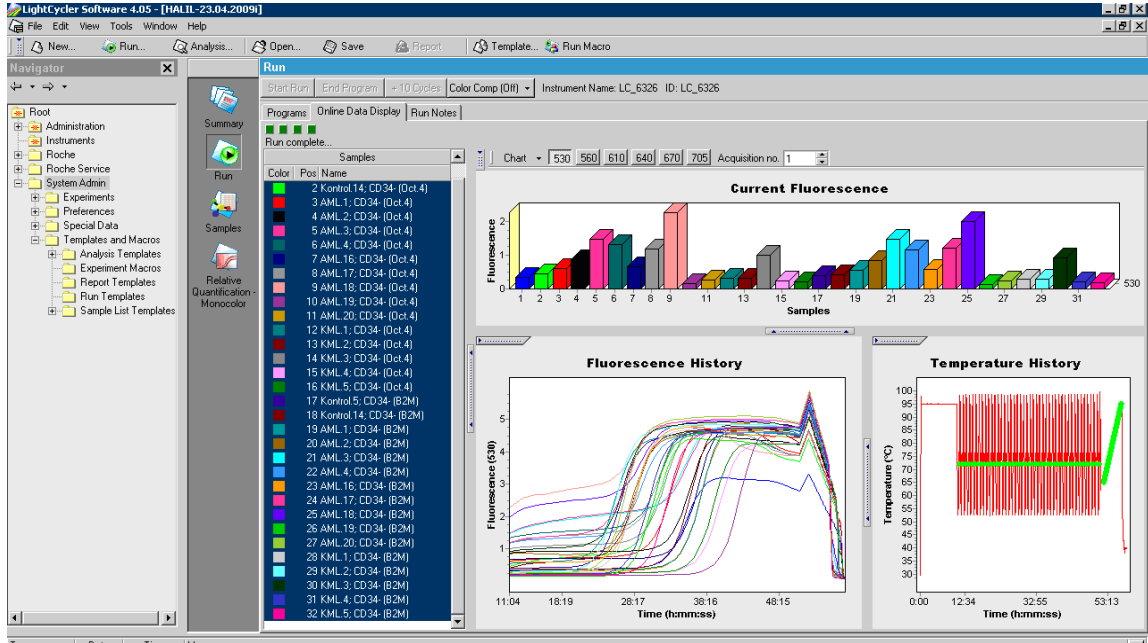
KML olgularındaki **CD34-** hücrelerine ait Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M için PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 18'de gösterilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde iki kez yürütülerek tekrar edildi.



Şekil 18: Oct-4, Nanog, Rex-1 ve B2M gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü (1-18 KML, M: pUC Mix Marker 8; Fermentas,#0301).

4.3 CD34- Hücrelere ait Normalize Edilmiş Rölatif Kantitasyon Oranları

Normal ve hasta örneklerinde Oct-4, Nanog ve Rex-1 genlerinin rölatif kantitasyon analizi LightCycler 2.0 cihazı ve LightCycler software 4.0 kullanılarak gerçekleştirildi.



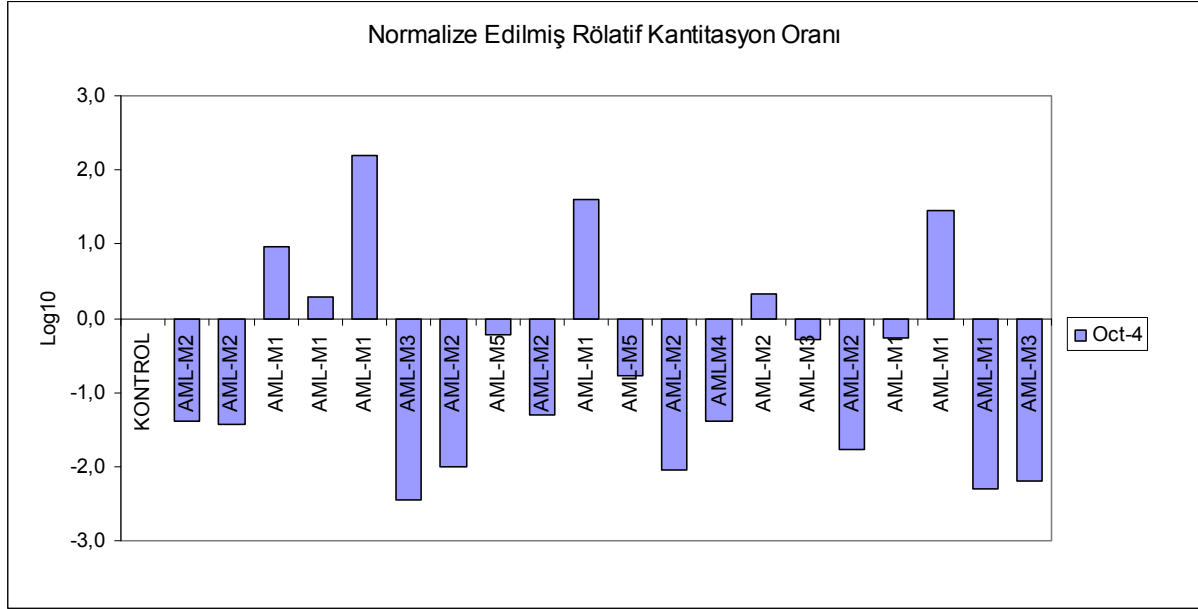
Şekil 19: RT-PCR çalışma sonunda fluoresans grafiklerinin ve ergime eğrilerinin görüntüsü.

The screenshot shows the 'Relative Quantification - Monocolor' window in LightCycler Software 4.05. The table displays the results of the relative quantification analysis, including sample names, Cp Medians, Concentration Ratios, Normalized Ratios, and Multiplication/Correction factors.

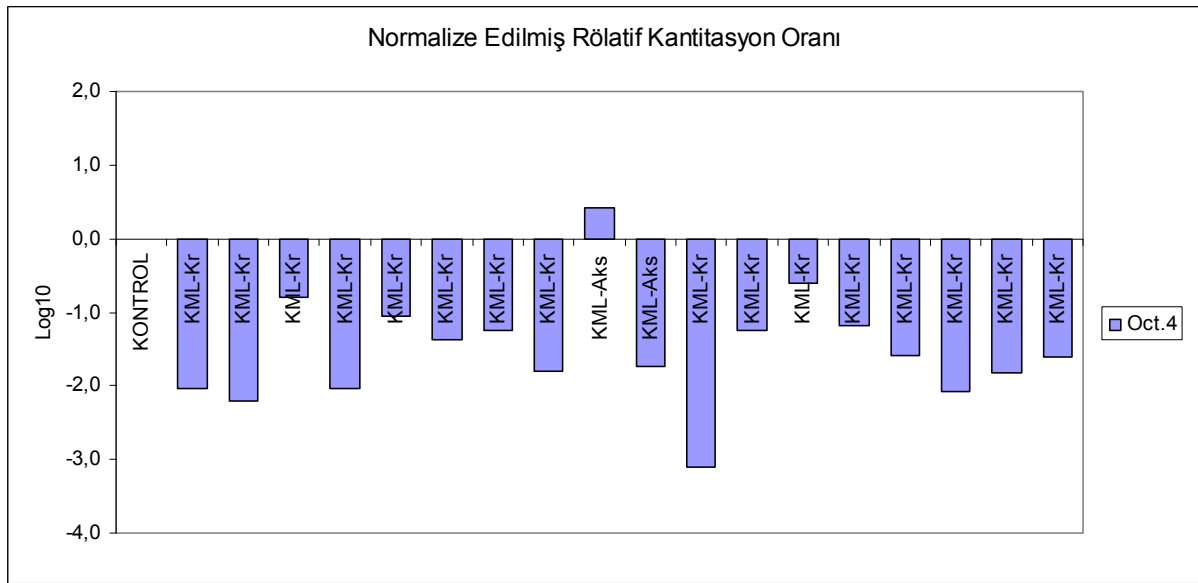
Group	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...
Target Calibrator	2	Kontrol 14; CD34-(Oct 4)	19.59	0.07	1.00		
Reference Calibrator	18	Kontrol 14; CD34-(B2M)	15.81				
Result Set 1	Target Unknown	1	Kontrol 5; CD34-(Oct 4)	23.64	9.77E-4	0.01	1/1
Result Set 1	Reference Unknown	17	Kontrol 5; CD34-(B2M)	13.64			
Result Set 2	Target Unknown	3	AML 1; CD34-(Oct 4)	21.50	2.46E-3	0.03	1/1
Result Set 2	Reference Unknown	19	AML 1; CD34-(B2M)	12.03			
Result Set 3	Target Unknown	4	AML 2; CD34-(Oct 4)	24.09	2.72E-3	0.04	1/1
Result Set 3	Reference Unknown	20	AML 2; CD34-(B2M)	15.57			
Result Set 4	Target Unknown	5	AML 3; CD34-(Oct 4)	23.68	0.73	9.95	1/1
Result Set 4	Reference Unknown	21	AML 3; CD34-(B2M)	23.21			
Result Set 5	Target Unknown	6	AML 4; CD34-(Oct 4)	19.52	0.15	2.03	1/1
Result Set 5	Reference Unknown	22	AML 4; CD34-(B2M)	16.77			
Result Set 6	Target Unknown	7	AML 16; CD34-(Oct 4)	25.31	1.47E-3	0.02	1/1
Result Set 6	Reference Unknown	23	AML 16; CD34-(B2M)	15.90			
Result Set 7	Target Unknown	8	AML 17; CD34-(Oct 4)	19.44	0.04	0.50	1/1
Result Set 7	Reference Unknown	24	AML 17; CD34-(B2M)	14.67			
Result Set 8	Target Unknown	9	AML 18; CD34-(Oct 4)	15.68	2.21	30.29	1/1
Result Set 8	Reference Unknown	25	AML 18; CD34-(B2M)	16.82			
Result Set 9	Target Unknown	10	AML 19; CD34-(Oct 4)	31.69	1.05E-4	1.44E-3	1/1
Result Set 9	Reference Unknown	26	AML 19; CD34-(B2M)	18.46			
Result Set 10	Target Unknown	11	AML 20; CD34-(Oct 4)	25.77	3.32E-4	4.56E-3	1/1
Result Set 10	Reference Unknown	27	AML 20; CD34-(B2M)	14.21			
Result Set 11	Target Unknown	12	KML 1; CD34-(Oct 4)	25.90	7.92E-4	0.01	1/1
Result Set 11	Reference Unknown	28	KML 1; CD34-(B2M)	15.59			
Result Set 12	Target Unknown	13	KML 2; CD34-(Oct 4)	24.30	3.43E-4	4.71E-3	1/1
Result Set 12	Reference Unknown	29	KML 2; CD34-(B2M)	12.79			
Result Set 13	Target Unknown	14	KML 3; CD34-(Oct 4)	20.47	0.01	0.15	1/1
Result Set 13	Reference Unknown	30	KML 3; CD34-(B2M)	14.00			
Result Set 14	Target Unknown	15	KML 4; CD34-(Oct 4)	28.58	5.49E-4	7.54E-3	1/1
Result Set 14	Reference Unknown	31	KML 4; CD34-(B2M)	17.75			
Result Set 15	Target Unknown	16	KML 5; CD34-(Oct 4)	27.72	7.39E-3	0.10	1/1
Result Set 15	Reference Unknown	32	KML 5; CD34-(B2M)	20.64			

Şekil 20: Normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranının otomatik hesaplanması.

AML ve KML örneklerinde Oct-4 ekspresyonunun normalize edilmiş rölaf kantitasyon oranlarının grafikleri Şekil 21 ve 22’de gösterilmektedir. Sağlıklı kontrollerin cDNA’sı kalibratör olarak kullanıldı. Rölaf kantitasyon deneyleri üç kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Ortalama değerler 10 tabanına göre logaritması alınarak grafik oluşturuldu.

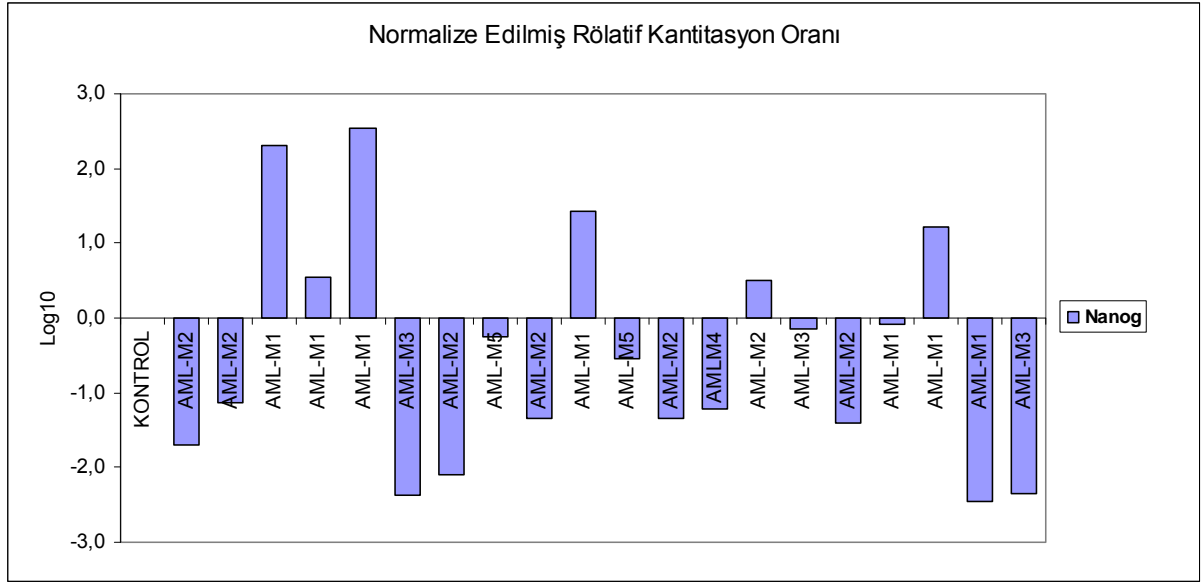


Şekil 21: AML örneklerinde Oct-4 ekspresyonunun normale göre rölaf kantitasyon oranı.

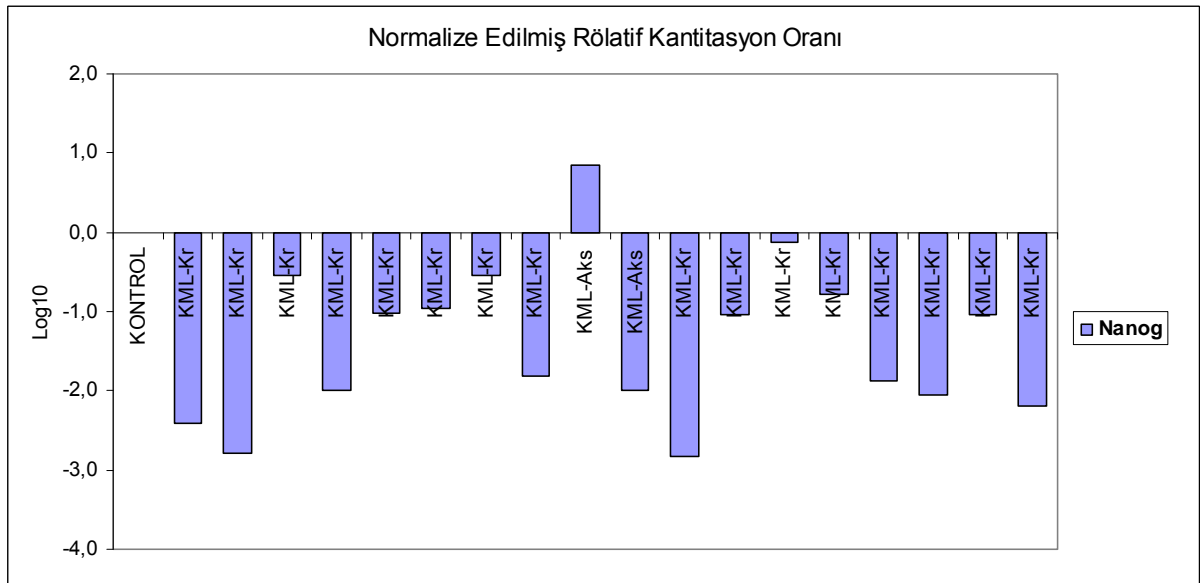


Şekil 22: KML örneklerinde Oct-4 ekspresyonunun normale göre rölaf kantitasyon oranı.

AML ve KML örneklerinde Nanog ekspresyonunun normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranlarının grafikleri Şekil 23 ve 24'de gösterilmektedir. Sağlıklı kontrollerin cDNA'sı kalibratör olarak kullanıldı. Rölatif kantitasyon deneyleri üç kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Ortalama değerler 10 tabanına göre logaritması alınarak grafik oluşturuldu.

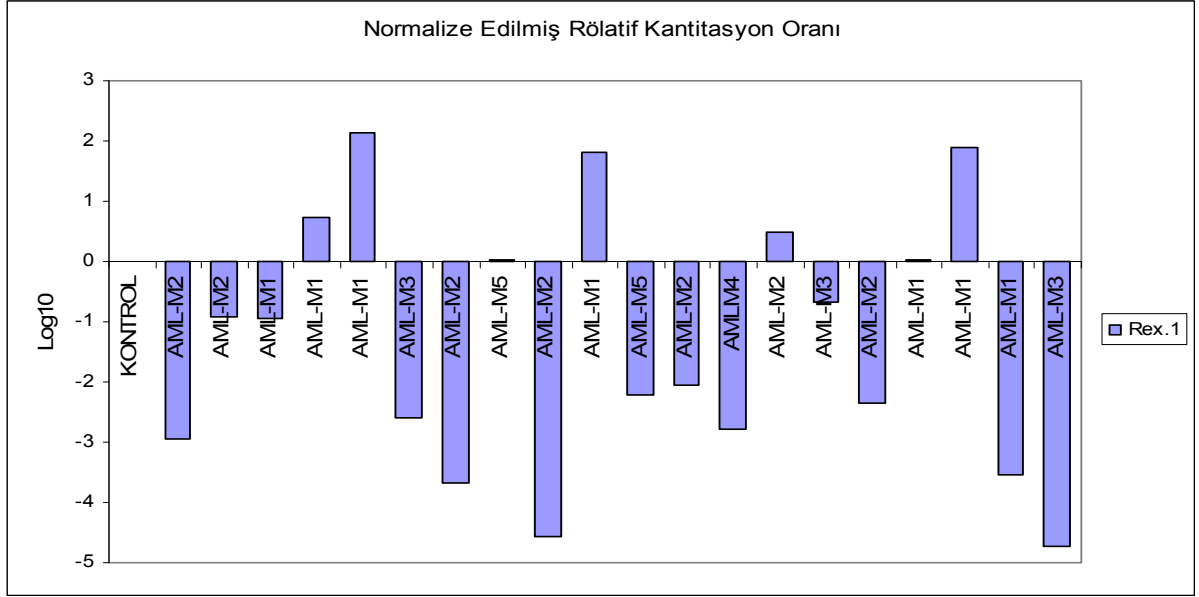


Şekil 23: AML örneklerinde Nanog ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyon oranı.

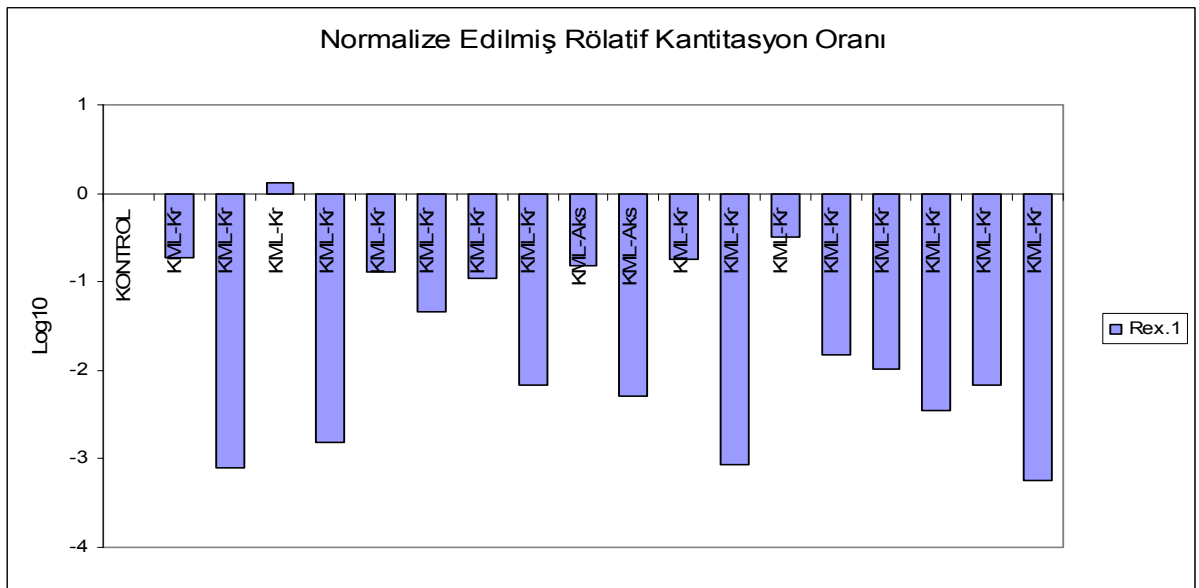


Şekil 24: KML örneklerinde Nanog ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyon oranı.

AML ve KML örneklerinde Rex-1 ekspresyonunun normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranlarının grafikleri Şekil 25 ve 26'de gösterilmektedir. Sağlıklı kontrollerin cDNA'sı kalibratör olarak kullanıldı. Rölatif kantitasyon deneyleri üç kez tekrarlanarak gerçekleştirildi. Ortalama değerler 10 tabanına göre logaritması alınarak grafik oluşturuldu.



Şekil 25: AML örneklerinde Rex-1 ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyon oranı.



Şekil 26: KML örneklerinde Rex-1 ekspresyonunun normale göre rölatif kantitasyon oranı.

Kontrol, AML ve KML gruplarına ait CD34- hücrelerde normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranı ortalamaları Tablo 12’de gösterilmektedir.

Tablo 12: Gruplara ait CD34- hücrelerde, normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranı ortalamaları.

Grup		OCT.4	NANOG	REX.1
AML	Ortalama	-0,66	-0,50	-1,35
	Sayı	20	20	20
	Std. Sapma	1,42	1,53	2,12
KML	Ortalama	-1,51	-1,40	-1,73
	Sayı	18	18	18
	Std. Sapma	0,75	0,98	1,02
TOPLAM	Ortalama	-0,74	-0,65	-1,07
	Sayı	54	54	54
	Std. Sapma	1,13	1,21	1,57

AML’de kontrole göre Oct-4 ve Nanog ekspresyonları oranı düzeyinde azalma yönünde fark saptandı (p=0,033). Rex-1 ekspresyonu bakımından ise fark yoktur (p=0,110).

KML’de kontrole göre Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonlarının oranı bakımından azalma olduğu saptandı (p=000).

AML ve KML grupları arasında Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonların oranlarına göre fark saptanmadı.

Kontrol, AML'nin alt grupları ve KML gruplarına ait CD34- hücrelerde normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranı ortalamaları Tablo 13'de gösterilmektedir.

Tablo 13: Alt gruplara ait CD34- hücrelerde, normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranı ortalamaları.

Alt grup		OCT.4	NANOG	REX.1
M0,1	Ortalama	0,54	0,77	0,30
	Sayı	7	7	7
	Std. Sapma	1,545	1,723	2,03
M2-7	Ortalama	-1,30	-1,18	-2,23
	Sayı	13	13	13
	Std. Sapma	0,85	0,88	1,62
KML grubu	Ortalama	-1,50	-1,40	-1,73
	Sayı	18	18	18
	Std. Sapma	0,75	0,98	1,02
Total	Ortalama	-0,745	-0,655	-1,075
	Sayı	54	54	54
	Std. Sapma	1,13	1,217	1,57

AML-M1 grubunda kontrole göre Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonu bakımından daha yüksek ekspresyon saptandı.(p=0,049; p=0,049; p=0,049).

AML-M2-7 grubunda kontrole göre Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonu bakımından ise daha düşük ekspresyon saptandı (p=0,000; p=0,000; p=0,000).

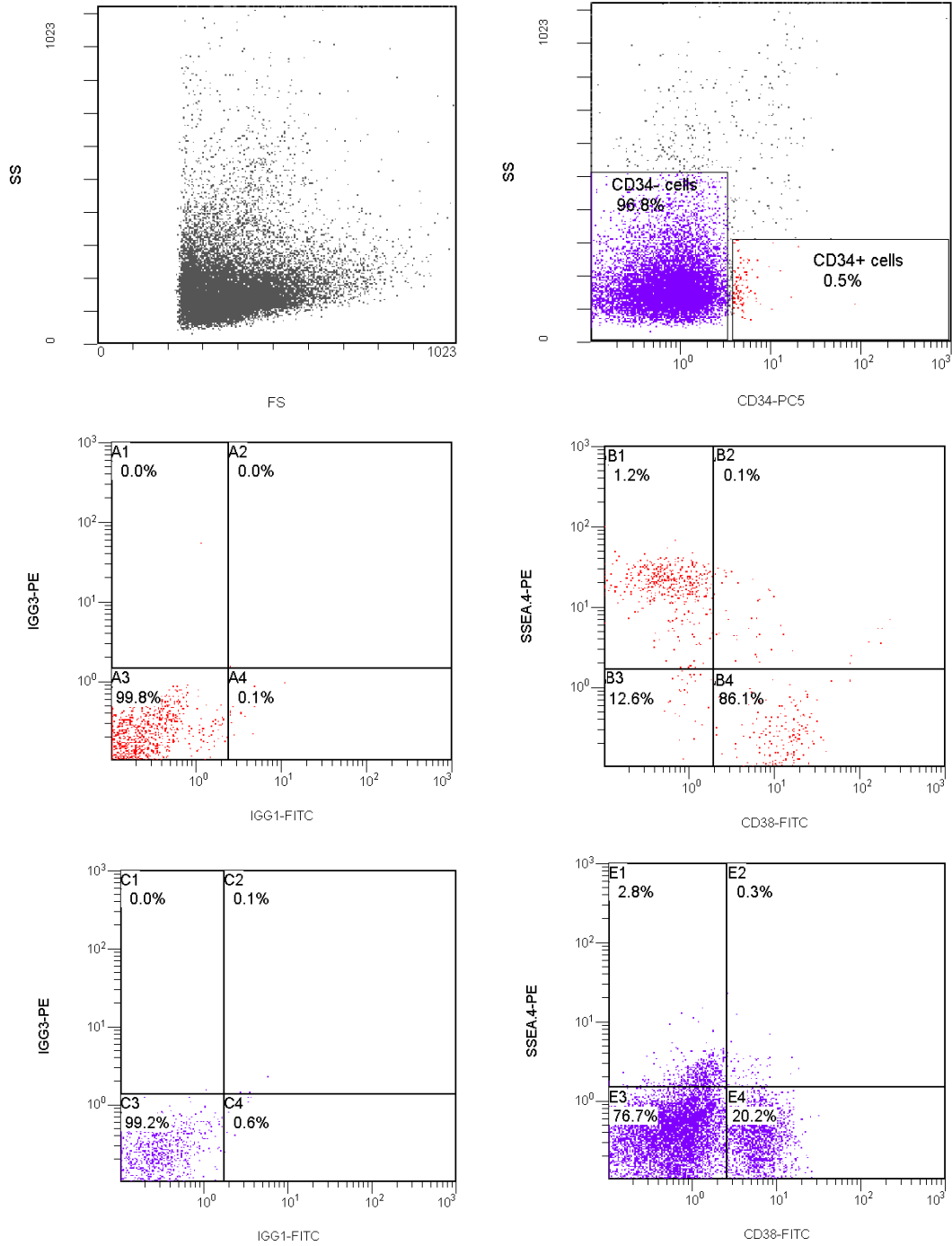
AML-M1 alt grubunda M2-7 alt grubuna göre Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=0,016; p=0,013; p=0,019)

AML-M1 ve KML grupları arasında ise Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonları bakımından AML-M1'de yine daha yüksek olduğu saptandı (p=0,008; p=0,006; p=0,021).

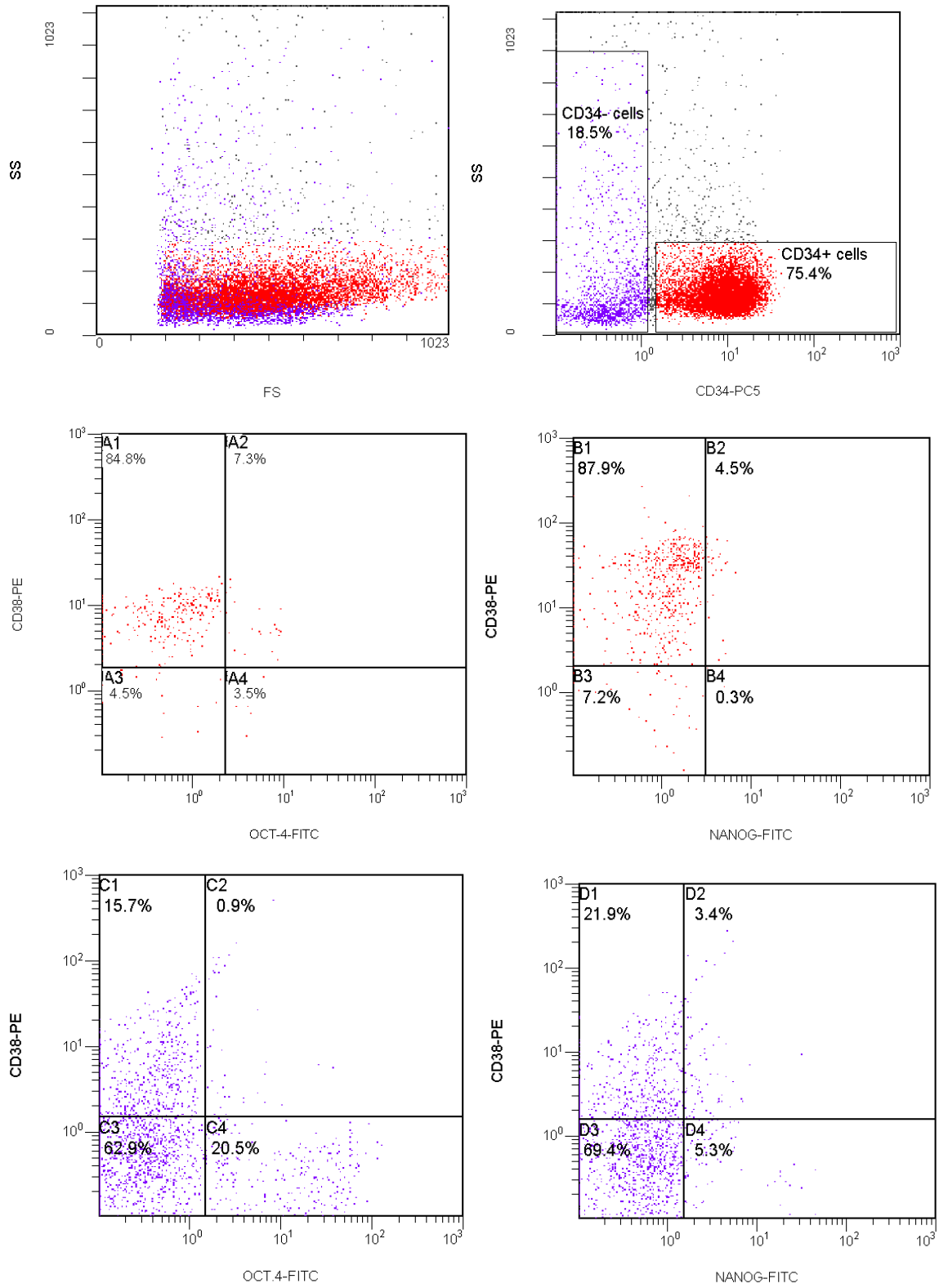
AML-M2-7 ve KML grupları arasında Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonları açısından ise fark saptanmadı.

4.4 Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Akım sitometrik analizler, argon lazerli Epics XL akım sitometri (Beckman Coulter) cihazı ve Expo32 ADC software'ı kullanılarak gerçekleştirildi. SSEA.4, Oct-4 ve Nanog ekspresyonları Şekil 27 ve 28'de gösterildiği şekilde analiz edildi.



Şekil 27: CD34-pozitif ve CD34-negatif hücrelerde yüzey SSEA.4 ekspresyonu.



Şekil 28: CD34-pozitif ve CD34-negatif hücrelerde Oct-4 ve Nanog ekspresyonu.

4.4.1 Akım Sitometrik SSEA.4 Ekspresyonu Analiz Sonuçları:

Olgulara ait taze alınmış kemik iliği ya da mononükleer hücre örneklerinde, akım sitometrisi ile SSEA.4, Oct-4 ve Nanog ekspresyonları üç-renkli analiz yapılarak değerlendirildi. CD34-PC5 & SSC noktalama (dot plot) görüntüsünde CD34 pozitif ve CD34 negatif hücreler tanımlandı. Üzerinde kapı alınan bu hücreler FL1&FL2 dot plot görüntülerine tanıtılarak analiz gerçekleştirildi. Cihazın günlük kalibrasyonları yapıldı. Floresans eşik değerleri izotipik antikolar kullanılarak ayarlandı. Kontrol grubuna ait SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları Tablo 14'deki gibi saptanmıştır.

Tablo 14: Kontrol grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- SSEA.4+	CD34+ CD38+ SSEA.4+	CD34+ SSEA.4+	CD34- CD38- SSEA.4+	CD34- CD38+ SSEA.4+	CD34- SSEA.4+
1	0,1	2,7	2,8	0,8	0,1	0,9
2	2,4	4,8	7,2	0,4	0,3	0,7
3	0,4	3,6	4,0	0,8	1,1	1,9
4	0,1	0,1	0,2	0,5	0,9	1,4
5	0,9	5,6	6,5	0,1	0,9	1,0
6	0,4	2,4	2,8	0,1	1,1	1,2
7	0,1	0,5	0,6	0,6	6,4	7,0
8	0,1	0,8	0,9	0,2	0,6	0,8
9	0,2	1,5	1,7	1,0	0,6	1,6
10	0,7	0,8	1,5	2,8	6,1	8,9
11	0,1	1,0	1,1	0,1	0,6	0,7
12	3,6	5,5	9,1	1,6	0,1	1,7
13	0,2	3,9	4,1	6,6	0,4	7,0
14	0,7	3,7	4,4	8,7	0,3	9,0
15	2,4	5,4	7,8	15,0	2,0	17,0
16	2,0	1,2	3,2	1,8	1,5	3,3
Ortalama	0,90	2,72	3,62	2,57	1,42	4,0

* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

AML hasta grubuna ait SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları Tablo 15'deki gibi elde edilmiştir.

Tablo 15: AML grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- SSEA.4+	CD34+ CD38+ SSEA.4+	CD34+ SSEA.4+	CD34- CD38- SSEA.4+	CD34- CD38+ SSEA.4+	CD34- SSEA.4+
1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1
2	0,1	0,3	0,4	0,0	0,2	0,2
3	1,2	0,2	1,4	12,3	1,8	14,1
4	1,8	1,1	2,9	0,2	0,1	0,3
5	0,1	0,6	0,7	0,1	0,1	0,2
6	0,5	2,4	2,9	2,1	0,8	2,9
7	0,5	0,1	0,6	0,1	2,5	2,6
8	0,0	0,3	0,3	0,2	0,5	0,7
9	0,6	0,9	1,5	1,0	0,5	1,5
10	0,0	0,1	0,1	3,6	0,8	4,4
11	0,1	0,4	0,5	0,3	0,7	1,0
12	1,5	10,2	11,7	0,1	0,3	0,4
13	0,9	1,4	2,3	0,3	0,1	0,4
14	0,9	15,0	15,9	0,3	0,4	0,7
15	1,7	16,2	17,9	0,5	0,1	0,6
16	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,4
17	1,5	1,4	2,9	0,9	3,3	4,2
18	0,1	0,1	0,2	2,3	0,4	2,7
19	0,1	0,2	0,3	0,9	1,1	2,0
20	0,1	19,4	19,5	0,1	0,1	0,2
Ortalama	0,6	3,5	4,1	1,3	0,7	2,0

* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

KML hasta grubuna ait SSEA.4 ekspresyonu analiz sonuçları Tablo 16'deki gibi elde edilmiştir.

Tablo 16: KML grubuna ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+CD38- SSEA.4+	CD34+CD38+ SSEA.4+	CD34+ SSEA.4+	CD34- CD38- SSEA.4+	CD34- CD38+ SSEA.4+	CD34- SSEA.4+
1	1,0	5,9	6,9	0,9	0,9	1,8
2	4,5	5,3	9,8	0,5	0,7	1,2
3	3,6	10,7	14,3	0,4	0,6	1,0
4	0,1	2,5	2,6	0,1	2,5	2,6
5	0,0	0,1	0,1	0,0	0,3	0,3
6	0,1	0,0	0,1	0,0	1,1	1,1
7	0,5	1,1	1,6	0,9	1,5	2,4
8	1,1	1,1	2,2	0,4	1,7	2,1
9	0,5	3,0	3,5	2,8	0,3	3,1
10	0,0	0,2	0,2	0,1	1,1	1,2
11	0,3	0,7	1,0	0,2	0,1	0,3
12	3,5	0,9	4,4	1,4	0,4	1,8
13	1,5	0,0	1,5	0,3	0,1	0,4
14	0,1	0,1	0,2	0,0	0,9	0,9
15	0,6	1,5	2,1	0,3	0,2	0,5
16	3,7	3,5	7,2	1,3	1,0	2,3
17	0,3	0,8	1,1	2,0	0,1	2,1
18	0,1	0,8	0,9	0,1	0,2	0,3
19	2,1	1,4	3,5	1,4	0,3	1,7
20	7,6	15,5	23,1	0,6	0,5	1,1
Ortalama	1,6	2,8	4,3	0,7	0,7	1,4

*Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Sağlıklı kontrol, AML ve KML hasta gruplarına ait akım sitometrik SSEA.4 ekspresyon sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 17). FAB sınıflamasına göre AML alt gruplarının SSEA.4 ekspresyon ortalamaları ise Tablo 18’de verilmiştir.

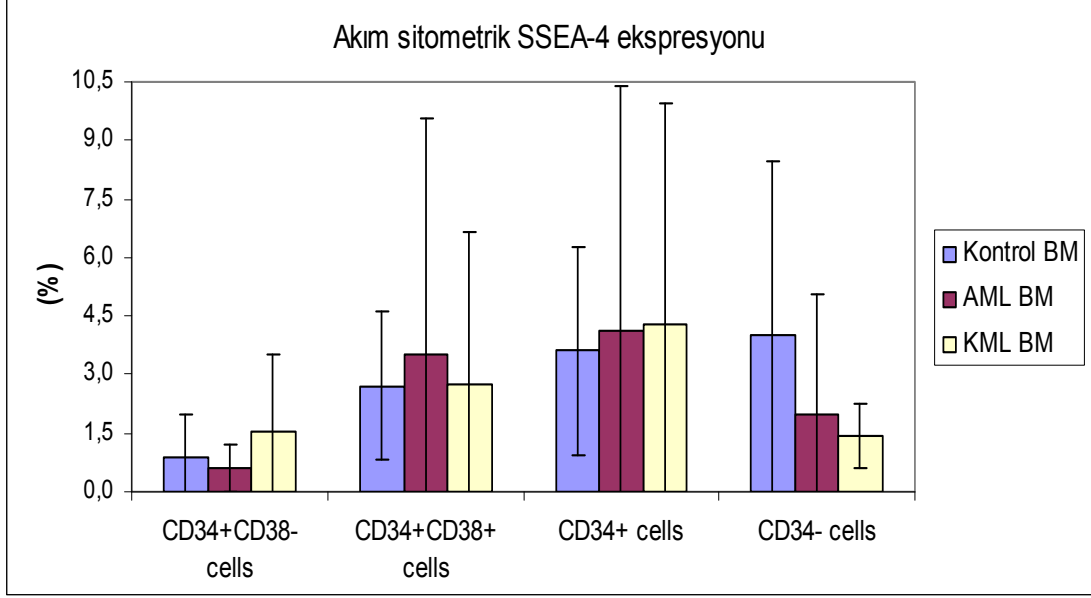
Tablo 17: Kontrol, AML ve KML hasta gruplarında, hücre fraksiyonlarına ait akım sitometrik SSEA-4 antijen ekspresyonunun analiz ortalamaları.

Grup		CD34+ CD38- SSEA.4+	CD34+ CD38+ SSEA.4+	CD34+ SSEA.4+	CD34- CD38- SSEA.4+	CD34- CD38+ SSEA.4+	CD34- SSEA.4+
Kontrol	Ortalama	0,90	2,72	3,62	2,57	1,44	4,01
	Sayı	16	16	16	16	16	16
	Std. Sapma	1,09	1,94	2,76	4,13	1,95	4,60
AML	Ortalama	0,60	3,53	4,13	1,27	0,71	1,98
	Sayı	20	20	20	20	20	20
	Std. Sapma	0,63	6,20	6,43	2,76	0,87	3,161
KML	Ortalama	1,56	2,76	4,32	0,69	0,73	1,41
	Sayı	20	20	20	20	20	20
	Std. Sapma	2,03	4,00	5,75	0,76	0,63	0,85
Total	Ortalama	1,03	3,02	4,05	1,43	0,92	2,36
	Sayı	56	56	56	56	56	56
	Std. Sapma	1,43	4,47	5,28	2,84	1,24	3,26

Tablo 18: AML alt gruplarında hücrelerde, SSEA-4 ekspresyonunun akım sitometrik analiz ortalamaları.

Altgrup		CD34+ CD38- SSEA.4+	CD34+ CD38+ SSEA.4+	CD34+ SSEA.4+	CD34- SSEA.4+
M1	Ortalama	0,69	0,53	1,21	3,99
	Sayı	7	7	7	7
	Std. Sapma	0,78	0,53	1,23	4,761
M2-7	Ortalama	0,54	5,14	5,69	0,90
	Sayı	13	13	13	13
	Std. Sapma	0,56	7,26	7,56	0,90

Sağlıklı kontrol, AML ve KML kemik iliği örneklerine ait CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerdeki SSEA.4 ekspresyonu için yapılan akım sitometrik analiz sonuçları Şekil 29’da özetlenmektedir.



Şekil 29: Kontrol, AML ve KML hücre örneklerinde akım sitometrik SSEA.4 ekspresyonu.

AML ve KML hücre fraksiyonlarında SSEA.4 ekspresyonu bakımından kontrole göre herhangi bir fark saptanmadı. AML M1 alt grubuna ait CD34⁺CD38⁻ ve CD34⁺CD38⁺ hücrelerde SSEA.4 ekspresyonu daha düşük olduğu gözlemlendi (p=0,007 ve p=0,030). Diğer alt grupta ise fark saptanmadı.

4.4.2 Akım Sitometrik Oct.4 Ekspresyonu Analiz Sonuçları:

Sağlıklı kontrol, AML ve KML hasta gruplarına ait hücrelerin akım sitometrik Oct-4 ekspresyon sonuçları Tablo 19, 20 ve 21’de gösterilmektedir.

Tablo 19: Kontrol grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Oct.4 analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- Oct.4+	CD34+ CD38+ Oct.4+	CD34+ Oct.4+	CD34- CD38- Oct.4+	CD34- CD38+ Oct.4+	CD34- Oct.4+
1	2,9	2,3	5,2	17,9	0,1	18,0
2	1,3	1,3	2,6	24,9	2,2	27,1
3	0,9	6,5	7,4	21,5	0,8	22,3
4	4,7	3,3	8	14,2	0,4	14,6
5	3,5	7,3	10,8	21,5	6,0	27,5
6	2,3	4,3	6,6	8,8	4,6	13,4
7	0,8	4,1	4,9	0,5	0,2	0,7
8	0,6	8,9	9,5	8,3	0,5	8,8
9	0,1	1,2	1,3	15,5	0,1	15,6
10	0,3	5,0	5,3	24,2	0,5	24,7
11	1,8	1,8	3,6	5,2	1,3	6,5
12	5,0	4,3	9,3	20,5	1,6	22,1
13	1,4	1,3	2,7	18,2	2,2	20,4
14	0,7	0,2	0,9	23,2	0,5	23,7
15	2,7	2,1	4,8	27,4	0,5	27,9
16	1,9	2,3	4,2	12,2	1,4	13,6
Ortalama	1,9	3,5	5,4	16,5	1,4	17,9

* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Tablo 20: AML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik OCT-4 analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- Oct.4+	CD34+ CD38+ Oct.4+	CD34+ Oct.4+	CD34- CD38- Oct.4+	CD34- CD38+ Oct.4+	CD34- Oct.4+
1	0,1	0,1	0,2	2,0	0,7	2,7
2	0,1	0,5	0,6	0,3	0,3	0,6
3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2
4	4,0	4,5	8,5	13,6	0,1	13,7
5	0,1	0,6	0,7	0,1	0,4	0,5
6	0,2	0,8	1,0	6,0	0,5	6,5
7	0,7	2,1	2,8	24,9	0,6	25,5
8	0,1	0,1	0,2	0,5	0,5	1,0
9	0,2	0,5	0,7	1,6	0,4	2,0
10	0,1	0,1	0,2	7,1	0,3	7,4
11	0,6	0,3	0,9	0,5	1,0	1,5
12	1,5	0,2	1,7	0,4	0,3	0,7
13	0,2	1,5	1,7	3,7	1,1	4,8
14	1,0	10,7	11,7	1,6	0,2	1,8
15	0,1	0,9	1,0	3,6	0,3	3,9
16	5,6	0,2	5,8	0,5	0,2	0,7
17	31,0	3,9	34,9	0,2	0,1	0,3
18	0,6	0,1	0,7	5,6	0,1	5,7
19	0,8	0,2	1,0	20,5	0,9	21,4
20	11,7	3,9	15,6	8,5	0,1	8,6
Ortalama	2,9	1,6	4,5	5,1	0,4	5,5

* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Tablo 21: KML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik OCT-4 analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- Oct.4+	CD34+ CD38+ Oct.4+	CD34+ Oct.4+	CD34- CD38- Oct.4+	CD34- CD38+ Oct.4+	CD34- Oct.4+
1	1,9	1,1	3,0	1,9	0,6	2,5
2	4,7	0,4	5,1	3,6	0,9	4,5
3	21,7	17,4	39,1	29,1	8,2	37,3
4	2,6	5,2	7,8	34,6	2,3	36,9
5	0,3	0,5	0,8	19,8	2,1	21,9
6	0,5	0,8	1,3	10,8	0,4	11,2
7	0,0	0,1	0,1	5,5	0,4	5,9
8	0,2	0,3	0,5	7,7	0,7	8,4
9	2,1	0,1	2,2	13,1	0,6	13,7
10	0,1	1,5	1,6	24,2	9,8	34
11	1,2	1,8	3,0	5,3	0,2	5,5
12	0,2	0,2	0,4	12,2	0,2	12,4
13	5,0	0,1	5,1	1,6	0,1	1,7
14	0,4	0,1	0,5	7,1	0,9	8,0
15	2,6	1,7	4,3	9,6	0,2	9,8
16	0,3	0,1	0,1	7,9	0,1	8,0
17	1,3	0,2	1,5	9,3	0,1	9,4
18	11,3	7,4	18,7	9,4	2,1	11,5
19	7,3	7,3	14,6	40,7	1,0	41,7
20	0,1	0,8	0,9	1,4	0,1	1,5
Ortalama	3,3	2,4	5,5	12,7	1,6	14,3

*Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Sağlıklı kontrol, AML ve KML hasta gruplarına ait akım sitometrik Oct.4 ekspresyon sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 22). FAB sınıflamasına göre AML alt gruplarının Oct-4 ekspresyon ortalamaları ise Tablo 23’de verilmiştir.

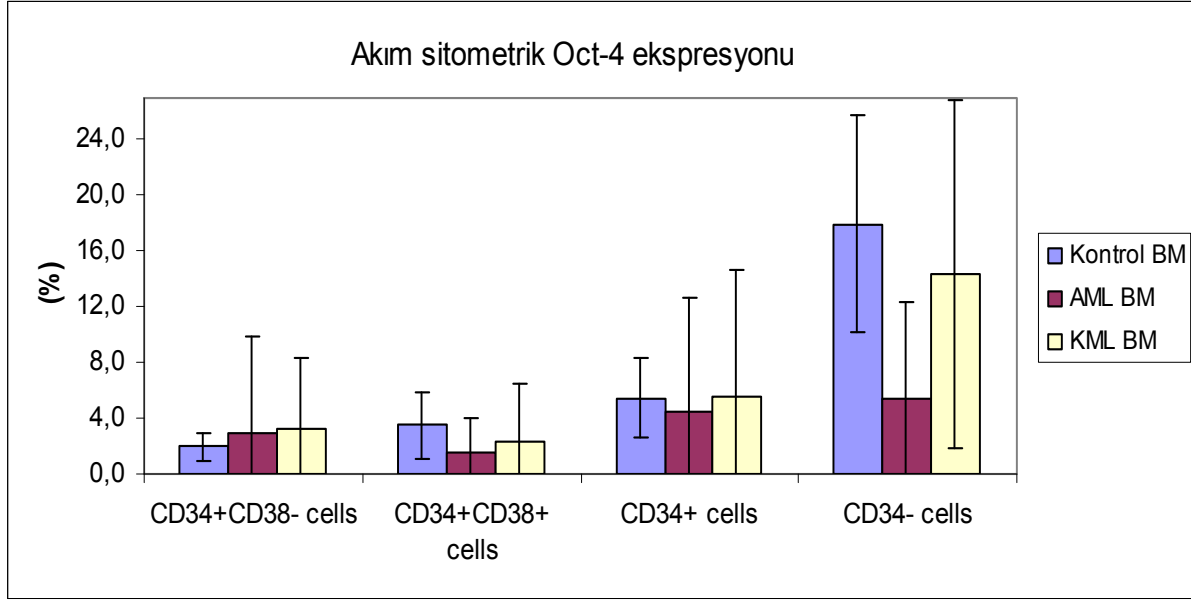
Tablo 22: Kontrol, AML ve KML hasta gruplarında, hücre fraksiyonlarına ait akım sitometrik Oct-4 ekspresyonun analiz ortalamaları.

grup		CD34+ CD38- Oct.4+	CD34+ CD38+ Oct.4+	CD34+ OCT.4+	CD34- CD38- Oct.4+	CD34- CD38+ Oct.4+	CD34- OCT.4+
Kontrol grubu	Ortalama	1,93	3,51	5,44	16,50	1,43	17,93
	Sayı	16	16	16	16	16	16
	Std. Sapma	1,49	2,45	2,95	7,74	1,67	8,01
AML grubu	Ortalama	2,94	1,57	4,51	5,06	0,41	5,47
	Sayı	20	20	20	20	20	20
	Std. Sapma	7,17	2,56	8,32	7,02	0,30	7,09
KML grubu	Ortalama	3,34	2,35	5,53	12,74	1,55	14,29
	Sayı	19	20	20	20	20	20
	Std. Sapma	5,33	4,22	9,29	11,21	2,65	12,81
Total	Ortalama	2,78	2,40	5,14	11,07	1,11	12,18
	Sayı	55	56	56	56	56	56
	Std. Sapma	5,34	3,26	7,51	9,97	1,87	10,92

Tablo 23: AML hasta alt gruplarına ait hücre bölüntülerinde, Oct-4 ekspresyonun akım sitometrik analiz ortalamaları:

Altgrup		CD34+ CD38- Oct.4+	CD34+ CD38+ Oct.4+	CD34+ OCT.4+	CD34- OCT.4+
M1 grubu	Ortalama	5,24	1,37	6,61	7,02
	Sayı	7	7	7	7
	Std. Sapma	11,44	1,94	12,82	8,03
M2-7 grubu	Ortalama	1,70	1,67	3,37	4,63
	Sayı	13	13	13	13
	Std. Sapma	3,35	2,91466	4,85	6,73

Sağlıklı kontrol, AML ve KML kemik iliği örneklerine ait CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerdeki Oct.4 ekspresyonu için yapılan akım sitometrik analiz sonuçları Şekil 30'da özetlenmektedir.



Şekil 30: Kontrol, AML ve KML hücre örneklerinde akım sitometrik Oct.4 ekspresyonu.

Kontrol ve AML grubunda;

- CD34+CD38- hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,39).
- CD34+CD38+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre AZALMA yönünde anlamlı farklılık saptandı (p=0,002).
- CD34+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre AZALMA yönünde anlamlı farklılık saptandı (p=0,014).
- CD34-CD38-Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre AZALMA yönünde anlamlı farklılık saptandı (p=0,000).
- CD34-CD38+Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre AZALMA yönünde anlamlı farklılık saptandı (p=0,015).
- CD34-Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre AZALMA yönünde anlamlı farklılık saptandı (p=0,000).

Kontrol ve KML grubunda;

- CD34+CD38-Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,703$).
- CD34+CD38+Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre AZALMA yönünde anlamlı farklılık saptandı ($p=0,009$).
- CD34+Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre ARTMA yönünde anlamlı farklılık saptandı ($p=0,048$).
- CD34-CD38-Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,111$).
- CD34-CD38+Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,512$).
- CD34-Oct.4+ hücre fraksiyonları arasında Oct.4 ekspresyon ortalamasına göre anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,080$).

4.4.3 Akım Sitometrik Nanog Ekspresyonu Analiz Sonuçları:

Sağlıklı kontrol, AML ve KML hasta gruplarına ait hücrelerin akım sitometrik Nanog ekspresyon sonuçları ve ortalamaları Tablo 24, 25 ve 26’de özetlenmektedir.

Tablo 24: Kontrol grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Nanog analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- Nanog+	CD34+ CD38+ Nanog+	CD34+ Nanog+	CD34- CD38- Nanog+	CD34- CD38+ Nanog+	CD34- Nanog+
1	2,7	3,8	6,5	3,4	0,4	3,8
2	2,6	2,7	5,3	23,6	0,2	23,8
3	0,9	3,7	4,6	26,1	1,1	27,2
4	3,3	1,2	4,5	9,6	0,4	10,0
5	5,8	6,3	12,1	12,3	6,2	18,5
6	1,2	5,7	6,9	2,8	3,8	6,6
7	1,9	1,3	3,2	1,5	0,6	2,1
8	0,5	4,6	5,1	1,2	0,7	1,9
9	0,1	2,9	3	3,9	1,4	5,3
10	2,8	2,6	5,4	2,4	0,9	3,3
11	1,4	1,5	2,9	2,7	2,2	4,9
12	22,3	8,6	30,9	12,8	2,0	14,8
13	3,4	2,9	6,3	2,1	1,3	3,4
14	1,2	1,2	2,4	6,6	5,8	12,4
15	2,9	1,9	4,8	19,6	0,2	19,8
16	0,9	1,0	1,9	1,7	0,6	2,3
Ortalama	3,4	3,2	6,6	8,3	1,7	10,0

* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Tablo 25: AML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Nanog analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- Nanog+	CD34+ CD38+ Nanog+	CD34+ Nanog+	CD34- CD38- Nanog+	CD34- CD38+ Nanog+	CD34- Nanog+
1	0,1	0,6	0,7	0,3	0,9	1,2
2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
3	0,1	8,0	8,1	0,4	0,1	0,5
4	3,3	8,2	11,5	1,0	2,9	3,9
5	0,4	6,8	7,2	0,5	10,1	10,6
6	1,0	3,0	4,0	1,9	1,0	2,9
7	1,8	34,7	36,5	34,4	3,4	37,8
8	0,1	0,8	0,9	0,2	0,5	0,7
9	0,4	0,4	0,8	5,3	2,5	7,8
10	62,5	2,9	65,4	74,3	6,7	81
11	8,6	41,4	50,0	8,6	76,0	84,6
12	9,0	7,7	16,7	0,1	0,3	0,4
13	1,1	4,8	5,9	0,3	1,5	1,8
14	1,8	6,5	8,3	0,4	0,7	1,1
15	6,0	22,3	28,3	0,6	0,6	1,2
16	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2
17	6,1	14,2	20,3	0,1	0,2	0,3
18	0,1	0,4	0,5	1,2	0,1	1,3
19	0,4	0,7	1,1	5,3	3,4	8,7
20	2,9	1,9	4,8	1,2	0,2	1,4
Ortalama	5,3	8,3	13,6	6,8	5,6	12,4

* Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Tablo 26: KML grubuna ait hücrelerde akım sitometrik Nanog analiz sonuçları.

Olgu no.	CD34+ CD38- Nanog+	CD34+ CD38+ Nanog+	CD34+ Nanog+	CD34- CD38- Nanog+	CD34- CD38+ Nanog+	CD34- Nanog+
1	0,4	0,2	0,6	0,9	0,1	1,0
2	1,8	0,1	1,9	2,0	0,1	2,1
3	4,6	4,6	9,2	0,4	0,1	0,5
4	2,8	3,7	6,5	5,0	1,2	6,2
5	0,2	0,4	0,6	1,1	2,2	3,3
6	0,2	0,6	0,8	4,8	1,7	6,5
7	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,5
8	0,6	0,4	1,0	2,8	0,6	3,4
9	0,6	0,2	0,8	0,5	0,1	0,6
10	0,0	0,5	0,5	4,0	4,6	8,6
11	1,0	1,0	2,0	1,3	0,2	1,5
12	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2
13	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
14	6,7	2,9	9,6	3,7	0,9	4,6
15	4,6	1,2	5,8	1,7	0,1	1,8
16	0,4	0,1	0,5	0,2	0,1	0,3
17	0,2	0,1	0,3	0,4	0,1	0,5
18	4,4	4,3	8,7	1,3	1,2	2,5
19	6,5	4,6	11,1	3,1	2,3	5,4
20	0,1	1,5	1,6	0,3	0,1	0,4
Ortalama	1,8	1,3	3,1	1,7	0,8	2,5

*Sonuçlar yüzde (%) değer olarak ifade edilmektedir.

Sağlıklı kontrol, AML ve KML hasta gruplarına ait akım sitometrik Oct.4 ekspresyon sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 27). FAB sınıflamasına göre AML alt gruplarının Oct-4 ekspresyon ortalamaları ise Tablo 28’de verilmiştir.

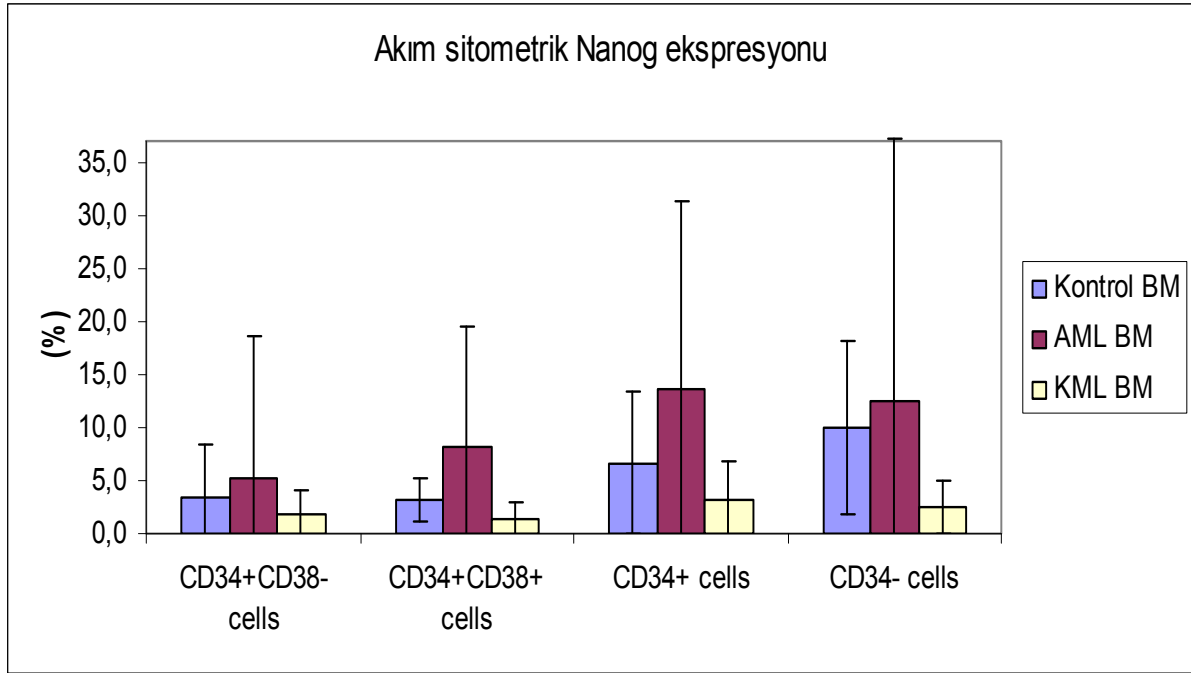
Tablo 27: Kontrol, AML ve KML hasta gruplarına ait hücre bölüntülerinde, Nanog ekspresyonun akım sitometrik analiz ortalamaları:

Grup		CD34+ CD38- Nanog+	CD34+ CD38+ Nanog+	CD34+ NANOG+	CD34- CD38- Nanog+	CD34- CD38+ Nanog+	CD34- NANOG+
Kontrol grubu	Ortalama	3,3688	3,2438	6,6125	8,2688	1,7375	10,0063
	Sayı	16	16	16	16	16	16
	Std. Sapma	5,24363	2,15065	6,90844	8,31815	1,90329	8,39535
AML grubu	Ortalama	5,3000	8,2750	13,5750	6,8150	5,5650	12,3800
	Sayı	20	20	20	20	20	20
	Std. Sapma	13,76720	11,63565	18,22612	17,64233	16,77508	25,51189
KML grubu	Ortalama	1,7700	1,3350	3,1050	1,7050	,7950	2,5000
	Sayı	20	20	20	20	20	20
	Std. Sapma	2,28798	1,67089	3,78855	1,62496	1,16415	2,52336
Total	Ortalama	3,4875	4,3589	7,8464	5,4054	2,7679	8,1732
	Sayı	56	56	56	56	56	56
	Std. Sapma	8,77807	7,63282	12,38075	11,63584	10,16059	16,29048

Tablo 28: AML hasta alt gruplarına ait hücre bölüntülerinde, Nanog ekspresyonun akım sitometrik analiz ortalamaları:

AML alt grupları		CD34+ CD38- Nanog+	CD34+ CD38+Nano g+	CD34+ NANOG+	CD34- NANOG+
M0,1 (Undiferansiye)	Ortalama	10,4143	5,8857	16,3000	15,1857
	Sayı	7	7	7	7
	Std. Sapma	23,07773	4,92762	22,65899	29,30315
M2-7 (Diferansiye)	Ortalama	2,5462	9,5615	12,1077	10,8692
	Sayı	13	13	13	13
	Std. Sapma	3,21471	14,03926	16,20465	24,37459

Sağlıklı kontrol, AML ve KML kemik iliği örneklerine ait CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerdeki Nanog ekspresyonu için yapılan akım sitometrik analiz sonuçları Şekil 31’de özetlenmektedir.



Şekil 31: Kontrol, AML ve KML hücre örneklerinde akım sitometrik Nanog ekspresyonu.

AML grubunda;

- CD34⁻ hücre fraksiyonunda kontrole göre Nanog ekspresyonu daha yüksek olarak saptandı (p=0,017). AML ve AML[^]'nin alt gruplarındaki hücreler arasında Nanog ekspresyonu bakımından herhangi bir fark saptanmadı.
- Yine AML'nin CD34⁺CD38⁺ ve CD34⁻ hücrelerinde Nanog ekspresyonu KML'ye göre daha yüksek bulundu (p=0,004 ve p=0,034)
- AML M1 alt grubunda Nanog ekspresyonu bakımından fark gözlenmedi.

KML grubunda ise;

- Genel anlamda kontrole göre Nanog ekspresyonu daha düşük olarak saptandı.
- Özellikle CD34⁺CD38⁺, CD34⁺ ve CD34⁻ hücre fraksiyonlarında kontrole göre Nanog ekspresyonu daha düşüktü (p=0,002; p=0,012 ve p=0,001).

5. TARTIŞMA

Lösemiler, hematopoietik hücrelerin malign transformasyonu sonucu ortaya çıkan neoplazmaların heterojen bir grubudur (88). Hematopoietik progenitör hücrelerin belli bir evrede farklılaşmasının bozulması ve tek bir klona ait hücrelerin anormal çoğalması sonucu gelişmektedir. Lösemi hastalarında myeloid ya da lenfoid hücreler tek başına malign bir klonu oluşturmaktadır (2). Lösemi gelişimi için çoğunlukla kabul edilen hipotez; kendisini yenileyebilme ve birçok hematopoietik hücre serilerine farklılaşabilme yeteneğine sahip pluripotent HKH'lerde transformasyonun oluşmasıdır (2,3). Fenotipik olarak kanser hücreleri self-renewal, sınırsız çoğalma, başlangıç farklılaşma ve sağ kalım gibi özellikleri bakımından pre-implantasyon embriyonik kök hücrelerine benzerlikler göstermektedir. Bu benzerlikler embriyonik dönemde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerinin epigenetik değişiklikler sonucu kanser hücrelerinde yeniden eksprese edilebileceğini akla getirmektedir. Oct-4, Nanog ve Rex-1 geliştirmekte olan insan ve fare embriyolarında içsel hücre kitlesini oluşturan pluripotent EKH'lerde eksprese edilen transkripsiyon faktörleridir. EKH'ler trofoektoderm ve primitif endoderme farklılaşmaya başladığında ise primordial germ hücreleri ile sınırlı hale gelmektedir (36). Bununla birlikte, son zamanlarda göbek kordon kanından elde edilen hücrelerde (18,89,90), çeşitli erişkin kök hücrelerde (12,49,91,92) ve kanser hücrelerinde (15,93-95) EKH transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları rapor edilmiştir. Kanser gelişiminde yapısal ve sayısal kromozom anomalileri ve mutasyonların yanı sıra, son gözlemler hematolojik malignitelerinde içinde olduğu karsinogenezde epigenetik değişikliklerin önemli rol oynadığını göstermektedir. Günümüze kadar erişkin kemik iliğinde EKH transkripsiyon faktörlerini eksprese eden çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin varlığı tanımlanmış olmasına rağmen (14,96) lökomogenez sürecinde bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ve rolleri bilinmemektedir.

Bu çalışmada, sağlıklı kontrol, AML ve KML'li hasta örneklerinden elde edilen CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺ ve CD34⁻ hücre gruplarında erken embriyonik transkripsiyon faktörlerinin (Oct-4, Nanog ve Rex-1) ekspresyon profillerini RT-PCR ve akım sitometrik analiz tekniklerini kullanarak çalıştık.

Bizim çalışmamızda, sağlıklı kontrol, AML ve KML örneklerinden elde edilen CD34 pozitif hücre örneklerinde Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonları bazı vakalarda negatiflik gösterdiğini saptadık. İlginç olarak CD34⁻ hücre fraksiyonunda ise tüm örneklerde ekspresyon gözlemlendi. CD34⁻ fraksiyondaki bu ekspresyon CD34⁺’liği göstermeyen hematopoietik kök hücreler ya da hematopoietik kök hücreler dışında ayrı bir kök hücre fraksiyonu ile açıklanabilir. Hematopoietik hücrelerin stromal hücrelere adezyonunda regülatör olarak görev yapan CD34 antijeni, HKH ve hematopoietik öncü hücreleri izole etmek ve karakterize etmek için en yaygın kullanılan spesifik bir gösterge olmasına rağmen CD34⁺ hücreler heterojen bir hücre topluluğundan oluşmaktadır (97,98). Yapılan çalışmalarda, normal kemik iliğindeki CD34^{parlak}, CD38^{negatif/zayıf}, HLA.DR⁻, CD90⁺ hücre popülasyonunun % 35-75’nin CD133 antijenini eksprese ettiği gösterilmiştir (89,99). İlaveten bu hücrelerin önemli bölümünde CD117 (c-kit) pozitifdir (100,101). Bugün için CD133 sadece hematopoietik hücrelerde değil aynı zamanda non.hematopoietik dokularda primitif kök ve progenitör hücrelerin izolasyonu ve tanımlanması için önemli bir gösterge olarak bakılmaktadır.

CD34⁻ hücre fraksiyondaki Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonları, kemik iliğinde primitif CD34⁻Lin⁻ hücre alt grubu ile ilişkili olabilir. NOD/SCD farelerde CD34⁻ insan hematopoietik kök hücrelerin yeniden hücre popülasyonu oluşturabilme yeteneğine sahip olduklarının gösterilmesi verilerimizi desteklemektedir (102,103). Paralel olarak kemik iliği-kökenli multipotent erişkin progenitör hücre (MAPC), multilineage-uyarılabilir hücreler (MİAMİ) ile MKH’lerin CD34, CD44, CD45 ve CD117 ekspresyonu açısından yine negatif oldukları ve embriyonik faktörleri eksprese ettikleri bildirilmektedir (13,49,96,104,105). Ancak insan MKH’leri ve tümör hücre hatlarında Oct-4 ekspresyonu ile ilgili farklı çalışmada söz konusudur (17). Bunun nedeni ise bu hücrelerin çok sayıda fenotipik özelliğe sahip olması ve izole etmede kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanabilir.

Hematolojik maligniteler, en çok çalışılan kanser modeli olmasına rağmen lösemi başlatan kök hücre (lösemik kök hücre) tanımlanması ve özellikleri konusunda tartışmalar devam etmektedir. Başlangıç çalışmaları, lösemik kök hücrenin primer olarak lösemik hücre klonunun CD34⁺CD38⁻ içinde bulunduğunu göstermektedir (106,107). Normal HKH’lerde olduğu gibi lösemik kök hücrelerde SCİD farelerde yeniden lösemi oluşturabilme kapasiteleri değerlendirilerek tanımlanmaktadır.

Bizim sonuçlarımız, AML ve KML hastalarından izole edilen CD34⁺CD38⁻ ile CD34⁺CD38⁺ hücre fraksiyonlarında EKH transkripsiyon faktörlerinin (Oct-4, Nanog ve Rex-1) eksprese edildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, beklenenin aksine ekspresyonun daha çok CD34⁻ hücrelerde olduğu gözlemlendi. Her ne kadar lösemik kök hücre olarak CD34⁺CD38⁻ hücreler tanımlanmasına rağmen, gerçekte CD34⁺CD38⁺ hücrelerinde lösemik kök hücre olduğu son çalışmalarda belirtilmektedir (108). Bu hücrelerin NOD/SCİD farelerde lösemi oluşturamamasının nedeni engraftment'da CD38 antikoruna karşı inhibitör etkisinin gelişmesi gösterilmektedir. Yine paralel olarak son yayınlarda, CD34⁺CD38⁻CD19⁺ ile CD34⁺CD38⁺CD19⁺ hücre gruplarının NOD/SCİD farelerde self-renewal kapasiteye sahip lösemi-başlatan hücreler olduğu yer almaktadır (109).

Daha önce normal HKH için tanımlanan CD34⁺, CD38⁻, HLA.DR⁻ ve CD71⁻ gibi yüzey markırlarının lösemi kök hücrelerinde de eksprese edildiği çeşitli gruplar tarafından rapor edilmiştir. İlaveten CD90⁺, Thy.1⁺ ve c-kit^{+/-} gibi bazı yüzey antijenlerini eksprese ettiği bildirilmektedir (110,111). HKH'den farklı olarak AML kök hücrelerinde yine CD33 ve CD123 pozitifdir (112).

Bütün çalışma örneklerinden elde ettiğimiz CD34 negatif hücre fraksiyonunda erken EKH transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu belirlendi. Sağlıklı kontrollere göre normalize edilmiş rölatif kantitasyon oranı sonuçlarımız, yine ilginç olarak lösemi örneklerinde Oct-4, Nanog ve Rex-1 ekspresyonlarının düşük olduğu saptandı. Bununla birlikte, FAB sınıflamasına göre daha immatür özelliklere sahip AML M1 fenotipinde ise gerek kontrollerden gerekse de diğer lösemi tiplerinden istatistiksel olarak yüksek bulundu. Renal hücre karsinomunda yapılan benzer çalışmada, insan kök hücre göstergesi olan Rex-1'in rölatif ekspresyon seviyesinin normal dokudan daha düşük olduğu gösterilmiştir (113).

Akım sitometrik analiz sonuçlarımızda gerçek zamanlı RT-PCR verilerimizi desteklemektedir ve CD34⁻ hücre fraksiyonlarında Oct-4 ekspresyonu daha yüksek bulundu. Nanog ekspresyonları bakımından ise sağlıklı kontrol ve KML hasta grubuna ait CD34⁻ hücre fraksiyonlarında Nanog ekspresyonu benzer şekildeydi. AML grubuna ait hücre fraksiyonları arasında ise fark görülmedi. AML hastalarından elde edilen CD34⁻ hücre fraksiyonunda Oct-4 ekspresyon yüzdesi kontrolle kıyaslandığında moleküler sonuçlara paralel olarak düşük bulundu. EKH yüzey belirteci SSEA.4 ekspresyonu ise gözlenmedi.

Çeşitli kanser hücrelerinde ve kanser hücre hatlarında erken EKH belirteçlerinin eksprese edildiği ve bunun yüzyılın başında Rudolph Virchow ve Julius Cohnheim gibi patologlar tarafından önerilen (68,69) “kanser-kök-hücre hipotezi” kanserin uykudaki embriyonik doku kalıntılarının aktivasyonundan kaynaklandığı hipotezini desteklemektedir. Bazı lösemilerin lösemik kök hücre klonundan kaynaklandığı bilinmektedir. Ancak KML ve AML'nin M1 dışındaki alt grubunda bu lösemik transformasyon HKH'e göre biraz daha diferansiye olmuş myeloid öncü hücrelerde meydana geldiği düşünülmektedir. Bu örneklerde ekspresyonun daha düşük olması, hemotopoietik kök hücrelerin myeloid progenitör hücrelere farklılaşması sonucu HKH havuzunun azaldığını düşündürmektedir. Bununla birlikte M1 fenotipinde lösemik dönüşümün daha primitif hücrelerde meydana geldiğini akla getirmektedir. Çeşitli gruplar tarafından bildirilen veriler $CD45^+CD34^+CD38^-Lin^-$ eksprese eden HKH'lerin olasılıkla $CD45^+CD34^+CD38^-Lin^-$ hücrelerden daha az matür olduğu şeklindedir (114,115).

Moleküler özellikler AML M1 fenotipinin daha primitif fonksiyona sahip hücreler olduğunun bir kanıtını sağlamaktadır. Elde edilen veriler doğrultusunda bu çalışma ileri analizlere katkıda bulunacağı, özellikle henüz fonksiyonları bilinmeyen genlerin self-renewal'da önemli rol oynayıp-oynamadığının araştırılmasına ışık tutacaktır. İleriye yönelik olarak bu transkripsiyon faktörlerinin özellikle AML M1 grubunda prognostik öneminin araştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır.

Lösemi kök hücre biyolojisindeki bilgilerimiz önemli gelişmelerle devam etmektedir. Spesifik olarak AML ve KML'de kök hücre popülasyonunu hedefleyen potansiyel yeni tedaviler önem kazanmaktadır. Çalışmalar, lösemik kök hücre yada kanser kök hücreyi spesifik olarak hedefleyen ajanları tanımlamanın lösemi ve kök hücre orijinli solid tümörlerin tam olarak tedavi etmek için olasılıkla esas olduğunu akla getirmektedir. Ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu lösemi grubunda ve hücre hatlarında hedefe yönelik tedavi ve bu moleküllerin inhibisyonunun etkisinin araştırılması doğru bir yaklaşım olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tablo 29: Sağlıklı kontrol, AML ve KML olgularına ait hücre fraksiyonlarında Oct-4, Nanog ve Rex-1 gen ifadesinin analiz sonuçları.

Hücre Fraksiyonları	Sağlıklı kontroller (n:13)			AML hasta grubu (n:20)			KML hasta grubu (n:13)		
	Oct-4	Nanog	Rex-1	Oct-4	Nanog	Rex-1	Oct-4	Nanog	Rex-1
CD34+CD38-	8/12	0/12	0/12	13/20	14/20	12/20	7/15	3/15	3/15
CD34+CD38-	7/13	8/13	8/13	16/19	16/19	15/19	8/17	11/17	3/17
CD34- hücre	13/13	13/13	13/13	20/20	20/20	20/20	18/18	14/18	11/18

Açıklama: Oranlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde housekeeping gende (β 2-mikroglobulin) band gözlenmesine göre değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, insan kaynaklı erişkin kemik iliğinin EKH transkripsiyon faktörlerini eksprese eden pluripotent özellikte kök hücreleri de içeren heterojen bir hücre topluluğundan oluştuğu düşünülmektedir. Son zamanlarda, fare kemik iliği ile yapılan çalışmalarda Oct-4, Nanog ve Rex-1 gibi pluripotent kök hücre markırlarını eksprese eden nadir hücre topluluğu izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda bunu destekler niteliktedir. Çalışma verilerimiz, EKH transkripsiyon faktörlerinin CD34 pozitif hücrelerden ziyade CD34 negatif hücre fraksiyonunda daha fazla eksprese edildiğini ve bu fraksiyonda CD34- fenotipte daha primitif hücrelerin olduğu düşünülmektedir.

EKH transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerini kıyaslandığında ise minimal matürasyon özelliğine sahip AML M1 fenotipine ait CD34 negatif hücrelerde Oct-4 ve Nanog ekspresyonlarının yüksek bulunması lösemik transformasyon basamağının daha öncü hücrelerde olduğunu desteklemektedir. Lösemi örneklerinden elde edilen hücre fraksiyonlarında EKH transkripsiyon faktörlerinin araştırılması açısından öncü çalışmalardan biri olan bu çalışmanın devamında, hasta sayısının artırılarak EKH transkripsiyon faktörlerinin prognostik öneminin araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Paralel olarak lösemi başlatan hücrelerin tanımlanması ve özelliklerinin belirlenmesine yönelik araştırmalara devam edilmesinin yararlı olacağı öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. In: Williams Hematology, Eds: Beutler E, Lichtman MA, Coller BC, Kipps TJ, New York: McGraw-Hill Co., 1995; 272-98.
2. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100(suppl.1): 11842-9.
3. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. Oncogene. 2004; 23: 7164-77.
4. Björn Steffen, Carsten Müller-Tidow, Joachim Schwable, et al. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. Crit Rev Oncol Hematol. 2005; 56: 195-221.
5. Shivdasani RA and Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. Blood. 1996; 87(10): 4025-39.
6. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science. 1997; 278(7): 1059-64.
7. Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U, Tenen DG. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. Blood. 2005; 106(5): 1519-24.
8. Till JE. Stem cells in differentiation and neoplasia. J Cell Physiol 1982; 1suppl: 3-11.
9. Potter VR. Phenotypic diversity in experimental hepatoma: the concept of partially blocked ontogeny. Br J Cancer 1978; 38: 1-23.
10. Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. Oncogene. 2001; 20; 8085-91.
11. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernashek G, et al. Oct.4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Hum Reprod. 2003; 18: 1489-93.
12. Tai MH, Chang CC, Olson LK, Trosko JE. Oct-4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis. 2005; 26(2): 495-502.
13. Kucia M, Reza R, Jala VR, Dawn B, et al. Bone marrow as a home heterogenous populations of non-hematopoietic stem cells. Leukemia 2005; 19; 1118-27.

14. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4(+) stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857-69.
15. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65: 5506-11.
16. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Bahrami AR. Oct-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer.
17. Mueller T, Luetzkendorf J, Neger K, Schmoll HJ, et al. Analysis of OCT4 expression in an extended panel of human tumor cell lines from multiple entities and in human mesenchymal stem cells. *Cee Mol Life Sci.* 2009; 66: 495-503.
18. Ball N, Reisner K, Jahr H, Bohle RM, et al. Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood. *Thromb Haemost* 2004; 92: 767-75.
19. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. *Hematology* 2002; 1: 369-391.
20. Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood* 2005; 19: 29-38.
21. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vitro. *Nature Med* 2000; 6 1229-1234.
22. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.* 1999; 5(12): 1410-2.
23. Lowell S. Stem cells show their potential. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 210-211.
24. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001; 19(3): 193-204. Review.
25. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282: 1145-47.
26. Rossant J. Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells* 2001; 19: 477-82.
27. Merok JR, Sherley JL. Breaching the Kinetic Barrier to In Vitro Somatic Stem Cell Propagation. *J Biomed Biotechnol.* 2001; 1(1): 25-27.
28. Enver T, Soneji S, Joshi C, et al. Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3129-40.

29. Bioani M, Schöler HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 872-84.
30. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 803-16.
31. Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, et al. Specific knockdown of Oct-4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 2004; 22: 659-68.
32. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-56.
33. Avery S, Innis K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 729-40.
34. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379-91.
35. Hanna LA, Foreman RK, Tarasenko IA, Kessler DS, et al. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev* 2002; 16: 2650-2661.
36. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24: 372-76.
37. Ovitt CE and Schöler HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(11): 1021-31.
38. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, et al. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113(5): 631-42.
39. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genetics* 2006; 3: 431-40.
40. Pesce M, Gross MK, Scholer HR. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 1998; 20: 722-32.

41. Adjaye J, Bolton V, Monk M. Developmental expression of specific genes detected in high-quality cDNA libraries from single human preimplantation embryos. *Gene* 1999; 237: 373-83.
42. Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 403-15.
43. Herr W, Cleary M. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 1995; 9: 1679-93.
44. Stepchenko AG, Polyanovsky OL. The interaction of Oct proteins with DNA. *Mol Biol* 1996; 30: 503-13.
45. Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research* 2002; 12: 321-29.
46. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113: 643-55.
47. Constantinescu S. Stemness, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells.
48. Hosler BA, La Rosa GJ, Grippo JF, Gudas LJ. *Mol Cell Biol.* 1989; 9: 5623-29.
49. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.
50. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, et al. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem.* 2006; 281: 23319-25.
51. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, et al. The new stem cell biology: something for everyone. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 2003; 56: 86-96.
52. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-93.
53. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 67-73.
54. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-95.
55. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003; 101: 2999-3001.

56. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, et al. Identification of hemangioblast in postnatal life. *Blood* 2002; 100: 3202-8.
57. Bailey AS, Fleming WH. Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. *Exp Hematol* 2003; 31: 987-93.
58. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, et al. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 2004; 103: 13-19.
59. Forrai A, Robb L. The hemangioblast between blood and vessels. *Cell Cycle* 2003; 2: 86-90.
60. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98: 2615-25.
61. Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 1323-30.
62. Szilvassy S, Hoffman R. Enriched hematopoietic stem cells; basic biology and clinical utility. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995; 1: 3-17.
63. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* 1963; 62: 327-36.
64. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. Preface to the first edition in: *Hematopoietic cell transplantation*. Second edition. Blackwell Science Publication, Massachusetts, USA 1999.
65. Peichev M, Najjyer AJ, Pereira D, Zhu Z, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95(3): 952-58.
66. Gonzalez R, Maki CB, Pacchiarotti J, Csontos S, et al. Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 362(2): 491-7.
67. Rogers I, Yamanaka N, Bielecki R, Wong CJ, et al. Identification and analysis of in vitro cultured CD45-positive cells capable of multi-lineage differentiation. *Exp Cell Res*. 2007; 313(9): 1839-52.
68. Virchow R. Editorial. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 1855; 3, 23.
69. Cohnheim, J. Ueber entzündung und eiterung. *Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* 1867; 40: 1-79.

70. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
71. Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med. Oncol.* 1998; 15: 20-26.
72. Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progression. *Int. Rev. Cytol.* 1998; 177: 1-56.
73. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
74. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
75. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63: 5821-28.
76. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
77. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 7011-7021.
78. Perez-Losada J, Balmain A. Stem cell hierarchy in skin cancer. *Nature Rev. Cancer* 2003; 3: 434-443.
79. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7274-82.
80. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 3983-88.
81. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-58.
82. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000; 14: 1777-84.
83. Wang JCY and Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology* 2005; 15: 494-501.
84. Nowell P and Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497.

85. Baikie AG, Court-Brown WM, Buckton KE, Harnden DG, et al. A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukemia. *Nature* 1960; 188: 1165-66.
86. Balint B, Ivanovic Z, Petakov M, et al. The cryopreservation protocol optimal for progenitor recovery is not optimal for preservation of marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 613619.
87. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (suppl.97): 77.
88. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci A.S., Root R.K. (1991) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13th edition. McGraw-Hill, Inc.
89. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in longterm culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998; 16: 387-396.
90. Gonzalez R, Maki CB, Pacchiarotti J, Csontos S, et al. Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 19;362(2):491-7.
91. Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J and Prockop DJ. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood* 2004; 103: 1647-1652.
92. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007; 110: 3438-3446.
93. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Bahrami AR. Oct-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1598-02.
94. Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human ESC genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 2255-65.
95. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, et al. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochemical and Biophysical Res Communications*, 2009 (383): 157-162.


96. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Ratajczak J, et al. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: purification from adult organs, characterization, and biological significance. *Stem Cell Rev.* 2008; 4(2): 89-99.
97. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *Journal of Immunology* 1984; 133: 157-165.
98. Andrews RG, Singer JW and Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *The Journal of Experimental Medicine* 1989; 169: 1721-1731.
99. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-12.
100. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, et al. Isolation and characterization of human CD34(-) Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood.* 2000; 95(9): 2813-20.
101. Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, Horie Y, et al. In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells.* 2000;18(3):196-203.
102. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, et al. Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood* 1999; 94(12): 4053-9.
103. Glimm H, Eisterer W, Lee K, Cashman J, et al. Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice. *J Clin Invest.* 2001; 107(2): 199-206.
104. Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7178-7187.
105. Jordan CT. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:708-712.
106. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; v3(7): v730-7.
107. Sutherland HJ, Blair A, Zapf RW. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 1996; 87(11): 4754-61.

108. Gudgin E, Huntly B. Acute myeloid leukemia biology and leukemia stem cells. EHA education program for the 14.th congress of the European Hematology Association, June 4-7 2009.
109. Kong Y, Yoshida S, Saito Y, Doi T, et al. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia* 2008; 22(6): 1207-13.
110. Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Acute myeloid leukaemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34+/CD71-/HLA-DR-. *Blood* 1998; 92: 4325-35.
111. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000; 14: 1777-1784.
112. Hauswirth AW, Florian S, Printz D, Sotlar K, et al. Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+ AML stem cells. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37: 73-82.
113. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, et al. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 113(5): 643-655.
114. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, et al. A newly discovered class of hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998; 4: 1038-45.
115. Wang J, Kimura T, Asada R, et al. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34⁺ cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 2003; 101: 2924-31.

EK.1: ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 06.06.2008/ 247

<p><u>Etik Kurul Üyeleri</u> Prof.Dr.Taner ÇAMSARI Prof.Dr.Tunç ALKIN Prof.Dr.Mustafa SEÇİL Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK Doç.Dr.Murat DUMAN Doç.Dr.Güven ASLAN Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN Yunus KARSLI</p> <p><u>Etik Kurul Başkanı</u> Prof.Dr.Taner ÇAMSARI</p> <p><u>Etik Kurul Sekreteri</u> Hatice İĞCİ</p>	<p>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,</p> <p>Etik Kurulumuzun 05 Haziran 2008 tarih ve 23/13/2008 no.lu toplantısında; 221/2006 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Doktora Programı öğrencilerinden Halil ATEŞ'in sorumlu olduğu "Lösemik Kök Hücrelerde Erken Embriyonik Kök Hücre Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonunun Araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.</p> <p>Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p>Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.</p> <p> Prof. Dr.Taner ÇAMSARI Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurul Başkanı</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tel: 0232 412 22 54

EK.2: GÖNÜLLÜBİLGİLENDİRME FORMU

Yakınmakta olduğunuz hastalığın kesin tanısı ve varsa olası alt grubunu belirlemek amacıyla kemik iliği aspirasyonunun yapılmasını kabul etmiş bulunmaktasınız. Doktorunuz bu işlem için sizi bilgilendirdi. Bu amaçla incelenmek üzere sternum (halk arasında iman tahtası kemiği olarak da bilinir) ya da leğen kemiğinin sırtta bakan yüzünden 2-2,5 ml kemik iliği aspirasyon örneğiniz alınacaktır. Sizden alınan bu aspirasyon örneğinden hastalığınızın tanısı ve sınıflaması yapılacaktır. Gerekli tanısal işlemlerinizi yaptıktan sonra artan kemik iliği örneğinizden araştırmada kullanılmak üzere kemik iliği hücrelerini ayırmayı ve erken embriyonik dönemde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerinin varlığını araştırmayı planlıyoruz.

Bu araştırma için size yapılacak kemik iliği aspirasyon yönteminizde bir farklılık olmayacak ve sizden fazladan kemik iliği örneği alınmayacaktır. Yine alınan örnek üzerinde tarafımızdan yapılacak olan incelemenin sizin planlanan tanı ve tedavinizde hiçbir olumsuz etkisi olmayacaktır. Artan kemik iliği örneğinizin bu çalışma amacıyla kullanılmasını kabul etmek tamamen sizin gönüllü kabulünüze ve onayınıza bağlıdır. Örneğinizin araştırmada kullanılmasını reddetme hakkına sahipsiniz. Eğer araştırma başladıktan sonra devam etmek istemezseniz de bu hakka sahipsiniz.

Araştırma giderleri size ve sosyal güvenlik kurumunuza yüklenmeyecektir. Çalışmadaki gönüllülerin sayısı sizinle birlikte 40 kişi olacaktır. Bu çalışma ile ilgili kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

EK.3: SAĞLIKLI KONTROLLER İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Kanser kök hücreleri birçok özellikleri (kendini yenileme, sınırsız çoğalabilme vb.) bakımından normal kök hücrelerle benzerlikler göstermektedir. Bu benzerliklerin hücre düzeyinde neler olduğu ve mekanizmaları tam olarak netlik kazanmamıştır.

Kemik iliğinde bulunan hücreler laboratuvar ortamında çeşitli deneylerde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı lösemi kök hücreleri ile kemik iliğinde bulunan normal kök hücrelerde erken embriyonik dönemdeki genlerin ekspresyonlarını karşılaştırmaktır. Böylece bu iki kök hücre arasındaki benzerlikleri/farklılıkları ortaya koyarak literatüre katkı sağlamayı ve ileride olası tedavi hedefleri olarak ışık tutabilmeyi hedeflemekteyiz.

Yakınmakta olduğunuz kalp-damar hastalığı için size yapılacak açık kalp ameliyatını kabul etmiş bulunmaktasınız. Doktorunuz bu işlem için sizi bilgilendirdi. Size uygulanacak açık kalp cerrahisi ameliyatında zaten açılacak olan sternum (halk arasında iman tahtası kemiği olarak da bilinir) kemiğinizden akıp gitmekte olan 5-6 ml kemik iliği toplanacaktır. Bu araştırma için ameliyat yönteminizde bir farklılık olmayacak ve bu işlem sırasında ve sonrasında ilave bir ağrı duymayacaksınız. Yine alınan örnek üzerinde tarafımızdan yapılacak olan incelemenin size planlanan tanı ve tedavinizde hiçbir olumsuz etkisi olmayacaktır. İlerideki yaşantınızda size bir yan etkisi bulunmayacaktır.

Kemik iliği örneğinizin bu çalışma amacıyla kullanılmasını kabul etmek tamamen sizin gönüllü kabulünüze ve onayınıza bağlıdır. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Eğer araştırma başladıktan sonra devam etmek istemezseniz de bu hakka sahipsiniz.

Araştırma giderleri size ve sosyal güvenlik kurumunuza yüklenmeyecektir. Çalışmadaki gönüllülerin sayısı sizinle birlikte 10 kişi olacaktır. Bu çalışma ile ilgili kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

EK.4: SOLÜSYONLAR

Posfatla-Tamponlanmış Tuz Solüsyonu (PBS)

8.0 g NaCl

0.18 g KCl

1,42 g Na₂HPO₄

0.24 g KH₂PO₄

800 ml distile suda çözüldü, pH 7.2'ye ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

0,22 µm'lik filtreden geçirildi.

2 mM EDTA'lı PBS

0.5844 g EDTA, 1 L PBS'e ilave edilerek hazırlandı.

% 0.5 FBS, EDTA'lı PBS

5 ml FBS 1 L EDTA'lı PBS'e ilave edilerek hazırlandı.

Tripan-Blue Solüsyonu:

0.04 g Trypan-blue stain 10 ml distile suda çözüldü.

3 ml Trypan blue solüsyonuna 19 ml PBS ilave edildi.

0.2 µm'lik filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Etidium Bromide (10 mg/ml)

100 g Ethidium bromide çeker ocakta tartıldı, 10 ml distile suda çözüldü.