

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

**KORDON KANI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ İLE
ORTALAMA TROMBOSİT HACMİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gökçe ERCAN

YÜKSEK LİSANS

2021-ANTALYA

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

KORDON KANI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ İLE
ORTALAMA TROMBOSİT HACMİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gökçe ERCAN

YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent ÜNDAR

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne

Bu alışma, j¼rimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmm¼nohematoloji programında Y¼ksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Levent ÜNDAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Derya KIVRAK SALİM
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye : Dr.Öęr.Üyesi Orhan Kemal YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirtilen yukarıdaki j¼ri üyeleri tarafından uygun gör¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/.... / tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ
Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Gökçe Ercan

İmza

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Levent ÜNDAR

İmza

TEŞEKKÜR

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

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün değerli çalışanlarına, laboratuvar ve alt yapı destekleri için BabyLife Kordon Kanı Bankası ve İnsan Hücre-Doku Üretim Merkezi yönetim kuruluna, istatistiksel analizler için destek sağlayan sayın Ezgi Afşar Gür'e, üniversite hayatım boyunca bana kattıkları tüm bilgi birikimleri için Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi hocalarıma, çalışmalarımın tüm aşamalarında yanımda olup güç veren ve destek olan mesai arkadaşlarım sayın Fulden Duyar ve Züleyha İncirci' ye,

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve tezin yazılma aşamasında yardımlarını esirgemeyen, motivasyonumu hep en üst seviyede tutan merkez sorumlumuz Dr. Durmuş Burgucu' ya,

Manevi destek ve anlayışı ile çalışmalarımnda başarıma katkı sağlayan anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gökçe ERCAN

ÖZET

Amaç: Trombositler kan pıhtılaşmasında rol oynayan küçük kan hücreleridir ve inflamasyonda temel bir rol aldığı bilinmektedir. Ortalama trombosit hacmi (MPV), trombositlerin ortalama büyüklüğünü gösteren kantitatif bir ölçümdür. Trombosit fonksiyonunun ve aktivasyonunun bir göstergesidir. Kordon kanı önemli bir kök hücre kaynağıdır. Hematopoetik kök hücre (HSC), mezenkimal kök hücre (MSC) ve kordon kanı kök hücresi olmak üzere bünyesinde üç farklı tipte kök hücre barındırır. İnsan mezenkimal kök hücreleri kullanılarak yapılan hücresel tedaviler, çoklu terapötik etkilerine dayanılarak çeşitli hastalıkların tedavisi için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Kordon kanı bankacılığında ürünleri saklamadan önce hematopoetik potansi ve transplantasyon etkinliğini tahmin etmek için güvenilir ve kolay testlere ihtiyaç vardır. Ortalama trombosit hacminin total çekirdekli hücre (TNC) ve CD34 + hücre sayıları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ortalama trombosit hacmi ile kordon kanı mezenkimal kök hücresi arasında ilişki bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada kordon kanındaki mezenkimal kök hücre oranı ile ortalama trombosit hacmi arasındaki ilişki değerlendirildi.

Yöntem: Gönüllü gebelerden kordon kanı toplandı ortalama trombosit hacimleri ölçüldü daha sonra mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. İzole edilen hücrelerin flow sitometrik yöntem ile % mezenkimal kök hücre oranı belirlendi. İki değer arasındaki ilişki pearson kolerasyon testi SPSS 10 programı ile test edildi.

Bulgular: Bu çalışma kordon kanı mezenkimal kök hücreler ile ortalama trombosit hacmi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmadır.

Sonuç: Bu çalışma ile ortalama trombosit hacmi ile mezenkimal kök hücre arasında pozitif yönde bir kolerasyon olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kordon Kanı, Mezenkimal Kök Hücre, MPV

ABSTRACT

Objective: Platelets are small blood cells that play a role in blood coagulation and are known to play a fundamental role in inflammation. Mean platelet volume (MPV) is a quantitative measure of the average size of platelets. It is an indicator of platelet function and activation. Cord blood is an important source of stem cells. It contains three different types of stem cells: hematopoietic stem cell (HSC), mesenchymal stem cell (MSC) and cord blood stem cell. Cellular therapies using human mesenchymal stem cells have been extensively investigated for the treatment of various diseases based on their multiple therapeutic effects. Reliable and easy tests are needed to predict hematopoietic potency and transplantation efficacy before storing products in cord blood banking. It has been reported that mean platelet volume is associated with total nucleated cell (TNC) and CD34⁺ cell counts. However, it is not known whether there is a relationship between mean platelet volume and cord blood mesenchymal stem cells. In this study, the relationship between mesenchymal stem cell ratio in cord blood and mean platelet volume was evaluated.

Method: Cord blood was collected from volunteer pregnant women, mean platelet volumes were measured, and then mononuclear cell isolation was performed. The percentage of mesenchymal stem cells of the isolated cells was determined by flow cytometric method. The relationship between the two values was tested with the Pearson correlation test SPSS 10 program.

Results: This is the first study to reveal the relationship between cord blood mesenchymal stem cells and mean platelet volume.

Conclusion: In this study, it was revealed that there is a positive correlation between mean platelet volume and mesenchymal stem cell.

Key Words: Cord Blood, Mesenchymal Stem Cell, Mean Platelet Volume

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kordon Kanı Bankacılığı	3
2.2. Kordon Kanı	4
2.3. Mezenkimal Kök Hücreler	5
2.4. Megakaryopoesis	7
2.5. Trombositler ve Ortalama Trombosit Hacmi	7
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1. Çalışma Grubu	10
3.2. Hücre Sayımı	10
3.3. Mononükleer Hücre izolasyonu	11
3.4. Hücrelerin Monoklonal Antikorlarla İşaretlenmesi	11
3.5. Flow Sitometrik Analiz	12
3.6. Hücre Kültürü	12
3.7. İstatistik	12

4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	30
KAYNAKLAR	31
EKLER	37
Ek-1. Etik Kurul Onayı	
ÖZGEÇMİŞ	38

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Tüplere konulan moAb renk ve miktarları	11
Tablo 4.1. Çalışmaya katılan gönüllülerin özellikleri.	13
Tablo 4.2. Ortalama Trombosit Hacmi İle Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerin ihtiva ettiği Mezenkimal Kök Hücrelerin Oranın Arasındaki İlişki.	25
Tablo 4.3. PDW değeri İle Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerin ihtiva ettiği Mezenkimal Kök Hücrelerin Oranın Arasındaki İlişki.	26
Tablo 4.4. MPV ve RDW değerleri ile Mezenkimal Kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki.	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücre kaynakları.	5
Şekil 2.2. Megakaryopoiesis.	7
Şekil 2.3. Ortalama trombosit hacmi.	8
Şekil 4.1. Kordon dokusundan (umblical cord) primer kök hücre kültürü işlemi.	15
Şekil 4.2. Kordon dokusundan (umblical cord) primer kök hücre kültürü işlemi 2 ve 5. Hafta morfolojik görüntüleri (40x).	16
Şekil 4.3. Kordon dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri (CD73+CD105+CD44+CD45-CD34-).	17
Şekil 4.4. Kordon kanından MNC izolasyonu sonrası hücrelerin canlılık analizi flow sitometri histogramı.	18
Şekil 4.5. Kordon kanından MNC izolasyonu sonrası hücrelerin izotipik kontrol ile işaretlenmesi noktasal dağılımı.	18
Şekil 4.6. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri (CD73+CD105+CD44+CD45-CD34-).	19
Şekil 4.7. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri çift pozitif noktasal gösterim (CD73+CD105+/CD44+CD105+/CD73+CD44+).	20

Şekil 4.8. Kordon kanından elde edilen MNC’lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri sıralı gate gösterimi (CD44+CD105+/CD34-CD45-).	20
Şekil 4.9. Kordon kanından elde edilen MNC’lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri sıralı gate gösterimi (CD44+CD73+/CD34-CD45-).	21
Şekil 4.10. Kordon kanından elde edilen MNC’lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri sıralı gate gösterimi (CD105+CD73+/CD34-CD45-).	21
Şekil 4.11. Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD 105, CD44 ve CD73 antijenlerinin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) ortalama değerler.	22
Şekil 4.12. Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD 105, CD44 ve CD73 antijenlerin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) ortalama değerler.	22
Şekil 4.13. Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD 105, CD44 ve CD73 antijenlerinin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) in ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) örnek bazında değerler.	23

Şekil 4.14. Kordon kanı örnekleri ortalama trombosit hacim değerleri (her bir örnek için).	24
Şekil 4.15. Kordon kanı örnekleri PDW değerleri (her bir örnek için).	24
Şekil 4.16. Kordon kanı mezenkimal kök hücre değerleri (% MNC)	25



SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP	:Adenosine diphosphate
AML	:Akut Miyeloid Lösemili
APC	:Allophycocyanin
ATP	:Adenosine triphosphate
CD	:Cluster of Differentiation
CFU	:Colony Forming Unit
CMP	:Common Myeloid Progenitor
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	:Fetal bovine serum
FITC	:Fluorescein isothiocyate
GMP	:Good Manufacturing Practice
GVHD	:Graft-Versus-Host Disease
HKHN	:Hematopoetik Kök Hücre Nakli
HKH	:Hematopoetik Kök Hücre
HLA	:Human leucocyte antigen
MFI	:Mean Fluorescence İntensity
MHC	:Major Histocompatibility Complex
MNH	:Mononükleer Hücre
MPV	:Mean Platalet Volume
MSC	:Mesenchymal stem cell
PBS	:Fosfat tuz solüsyonu
PE	:Phycoerythrin
PDW	:Platelet Distribution Width
TF	:Transkripsiyon Faktörü
TNC	:Total Nucleated Cell



1. GİRİŞ

Trombositler kemik iliğinde bulunan megakaryositlerden köken alan çekirdeksiz hücrelerdir. Elektronik sayıcılar ile ortalama trombosit hacmi (MPV) ölçülür. Trombosit hacimlerinin bir histogramı ölçülerek elde edilir, normal periferik kan değeri ortalama 8,5 ila 9,0 femtolitredir. Normal sağlıklı kişilerde MPV, trombosit sayısı ile ters ancak doğrusal olmayan şekilde değişir. Akut lösemi, aplastik anemi veya ilaca bağlı kemik iliği hipoplazisi olan hastalar normal veya düşük MPV'ye sahipken, periferik trombosit yıkımı ve sağlıklı kemik iliği olanlarda (bağışıklık trombositopeni veya yaygın intravasküler pıhtılaşma gibi) yüksek bir MPV değeri görülür (Packham ve Mustard, 1986; Thompson ve Harker, 1983). Periferik kandan farklı olarak kordon kanında MPV değerleri 6-10 femtolitre aralığındadır (Vassilios ve ark., 2009).

Ortalama trombosit hacmi, trombosit fonksiyonunun ve aktivasyonunun bir göstergesidir. Son zamanlarda çok sayıda çalışmada ortalama trombosit hacmi farklı hastalıklarda araştırılmış ve sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Bu temelde ortalama trombosit hacminin teşhis amaçlı kullanılabileceği öne sürülmüştür (Mikko ve ark., 2008; Bramhoff ve ark., 2016). Patolojik durumlar dışında da ortalama trombosit hacminin bir belirteç olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar sınırlı sayıda da olsa devam etmektedir. Hematopoetik kök hücre elde edilmesinde iki önemli kaynak periferik hematopoetik kök hücre aferezi ve kordon kanıdır. Hematopoetik kök hücre toplanması ve ortalama trombosit hacmi arasında ilişki olduğu iddia edilmektedir (Bramhoff ve ark., 2016; Broxmeyer, 2016).

Kordon kanı hematopoetik kök hücre, mezenkimal kök hücre ve kordon kanı kök hücresi olmak üzere bünyesinde üç farklı tipte kök hücre barındırır. Allojenik hücresel tedavi için kullanışlı bir kaynak olarak kordon kanı ulaşılması ve saklanabilmesinden dolayı önemli tercih sebebidir. Bu özelliklere ek olarak anti-inflamatuar özellikleri, doğal oksijen taşıyıcısı olarak fetal hemoglobinin içermesi kordon kanını taransplantasyon dışında da kullanılabilesine olanak sağlamaktadır (Sumie ve ark., 2017). Toplam çekirdekli hücre (TNC) ve CD34+ hücre dozu, kordon kanı naklinden sonra nötrofil ve trombosit yamalanması ile ilişkilidir ve bu nedenle kordon kanı bankacılığında önemli birer hücresel

kalite kontrol parametresi olarak kabul edilir. Kordon kanı bankacılığında ürünleri saklamadan önce hematopoetik potensi ve transplantasyon etkinliğini tahmin etmek için güvenilir ve kolay testlere ihtiyaç vardır. Ortalama trombosit hacminin TNC ve CD34 + hücre sayıları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir, bu da MPV' nin hematopoietik potens ve transplantasyon sonuçlarının bir öngörücüsü olarak yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Wishwdeep ve ark., 2013).

İnsan mezenkimal kök hücreleri (MSC'ler) kullanılarak yapılan hücresel tedaviler, çoklu terapötik etkilerine dayanılarak çeşitli hastalıkların tedavisi için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Standart klinik uygulamalarda hematopoietik kök hücre nakli sonrasında GVHD tedavisi için MSC ürünü bulundurulması önemlidir. Kemik iliği ve kordon kanı MSC' lerin yaygın kullanılan kaynaklarıdır. Kök hücre kaynaklarının kolay elde edilebilir ve her an kullanıma hazır şekilde saklanması önemlidir. Kordon kanı bu açıdan diğer kaynaklara göre avantajlıdır. Çünkü invaziv prosedürler olmadan donörlerden elde edilebilir ve MSC' leri izole etmek için karmaşık prosedürler olmadan basit bir laboratuvar yöntemi kullanılabilir (Sumie ve ark., 2017).

Ortalama trombosit hacmi ile kordon kanı mezenkimal kök hücresi arasında ilişki bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Mezenkimal kök hücreler yenileyici ve tamir edici tıp uygulamalarında önemli bir yer tutmaktadır. Bu hücrelerin kordon kanı örneklerinde hücresel kalite kontrolünü tahmin etmeye yönelik hızlı ve güvenilir bir test bulunmamaktadır. Literatürdeki bu veriler ışığında kordon kanı mezenkimal kök hücre miktarı ile ortalama trombosit hacmi arasında bir ilişki olduğu, bu ilişki sayesinde kordon kanı bankacılığı alanında hücresel kalite kontrol amacı ile kullanılabilecek bir parametre olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

Çalışmanın Hipotezi (H1): Kordon kanı ortalama trombosit hacmi ile mezenkimal kök hücre miktarı arasında pozitif korelasyon vardır. Bu hipotezi test edebilmek için kordon kanlarının ortalama trombosit hacimleri otomatik hemoanalizör ile belirlendikten sonra immünofenotipleme ile flow sitometrik olarak mezenkimal kök hücreler değerlendirilmiştir. Bu iki değer arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kordon Kanı Bankacılığı

Kordon kanı hematopoetik kök hücre kaynağı olarak 1988 yılından günümüze başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Broxmeyer ve ark., 1989). İlk uygulama ve sonrasındaki dört farklı uygulama kordon kanının laboratuvar ortamında işlenip saklanmasını ve kanıta dayalı olarak bankalanabileceğini ortaya koymuştur (Wagner ve ark., 1992; Wagner ve ark., 1995). İlk verilerden sonra -196 °C de saklanan kanların kemik iliği nakli amacı ile kullanılabileceği ve bu amaçla kordon kanı bankalarının güvenli bir şekilde kurulabileceği ön görülmüş olup ilk kordon kanı bankası 1993 yılında New York da kurulmuştur (Dessels ve ark., 2018). Sonraki veriler uygun koşullarda alınan ve dondurularak saklanan kordon kanlarının 20 yıldan fazla biyolojik özelliklerini koruyarak saklanabileceğini ortaya koymuştur (Ballen ve ark., 2013). Kordon kanı bankacılık modelleri kamu (halk tipi) bankacılığı ve özel bankalar olmak üzere temel olarak ikiye ayrılır. Dünyada yüz adetten fazla banka bulunmaktadır. Bu bankalarda 800.000 ünitesi kamu, 4 milyon ünitesi özel tipte olmak üzere yaklaşık 5 milyon ünite kordon kanı saklanmaktadır (Mayani ve ark., 2020). Bankacılık modelinde ülkemize özgü modelin temeli 2005 yılında yayınlanan kordon kanı bankacılığı yönetmeliği ile tanımlanmış ve daha sonra ‘Türk Modeli Kordon Kanı Bankacılığı’ olarak literatüre geçmiştir (Brand ve ark., 2008; Burgucu, 2020; Burgucu, 2021). Türk Modelinde temel amaç özel bankaların belli bir miktar (%20’si kadar) allojenik kullanım için sağlık bakanlığının belirleyeceği hastalara nakil edilebilmesi için bedelsiz (işleme ve saklama bedeli talep etmeden) kordon kanı saklamasıdır. Allojenik amaçlı kullanmak üzere hematopoetik kök hücre kaynağı bulmak belirli bir zaman almaktadır. ABD’deki veriler mobilize periferik kan kaynaklı elde edilecekse 3-4 aylık bir süre, kordon kanı kaynaklı elde edilecekse ortalama 12 günlük bir süre gerektiğini rapor etmiştir. Kordon kanı bankaları çabuk ulaşılabilir raf ömrü olan ürünleri bünyesinde bulundurabilmesi yönüyle önemli avantajlar sağlamaktadır (Mayani ve ark., 2020). Kordon kanı bankacılığında başlangıç materyali yani kordon kanı toplanması ve saklanabilmesini belirleyen birçok parametre tanımlanmıştır. Özellikle kanın alındıktan sonra bankaya ulaştırılması aşamasında geçen süre önemlidir. Ülkemizde sağlık altyapısı ve lojistik destek birimleri tüm ülke genelinde etkili bir biçimde

çalışmaktadır. Bu sayede içinde bulunduğumuz kısıtlamalarında olduğu pandemi sürecinde bile kordon kanı bankacılığı faaliyetleri sorunsuz sürdürülebilmektedir (Burgucu D, 2020). Kordon kanı bankalarının performansını belirleyen önemli bir parametrede serbest bırakma oranlarıdır. Dünyada kabul görmüş kordon kanı bankacılık modelleri ile kordon kanı kaynaklı allojenik hematopoetik kök hücre nakli için havuz oluşturmak amaçlanmıştır. Allojenik kordon kanı havuzu allojenik nakillerde önemli bir yer tutmaktadır. Halkın ihtiyacını ya da talebini karşılamak için bankada tutulması gereken kordon kanı sayısı nüfusa göre değişkenlik gösterir buna bağlı olarak bankalar arasında serbest bırakma oranları da değişkenlik gösterir. Son verilere göre kamu bankalarında yıllık serbest bırakılan sayı 4100 ünitedir (Dessels ve ark., 2018). Özel bankalarda saklanan kanlardan ise yıllık 130 ünitesi serbest bırakılmaktadır. Ayrıca bünyesindeki sakladıkları kordon kanı sayıları bilinmemekle birlikte Mexico City, Besancon gibi bazı bankalar ve Tokyo kordon kanı bankası yüksek serbest bırakma oranları (envanterlerinin %10-16'sını) bildirmektedir (Mayani ve ark., 2020). Ülkemizde sağlık bakanlığından izinli faaliyet gösteren 10'a yakın banka bulunmaktadır fakat serbest bırakma oranları ile ilgili sadece özel bir merkezden yayınlanan sadece bir rapor bulunmaktadır (Burgucu, 2021). Bu çalışmada iki yıllık bir sürede alınan ve serbest bırakılan ürünler değerlendirilmiştir.

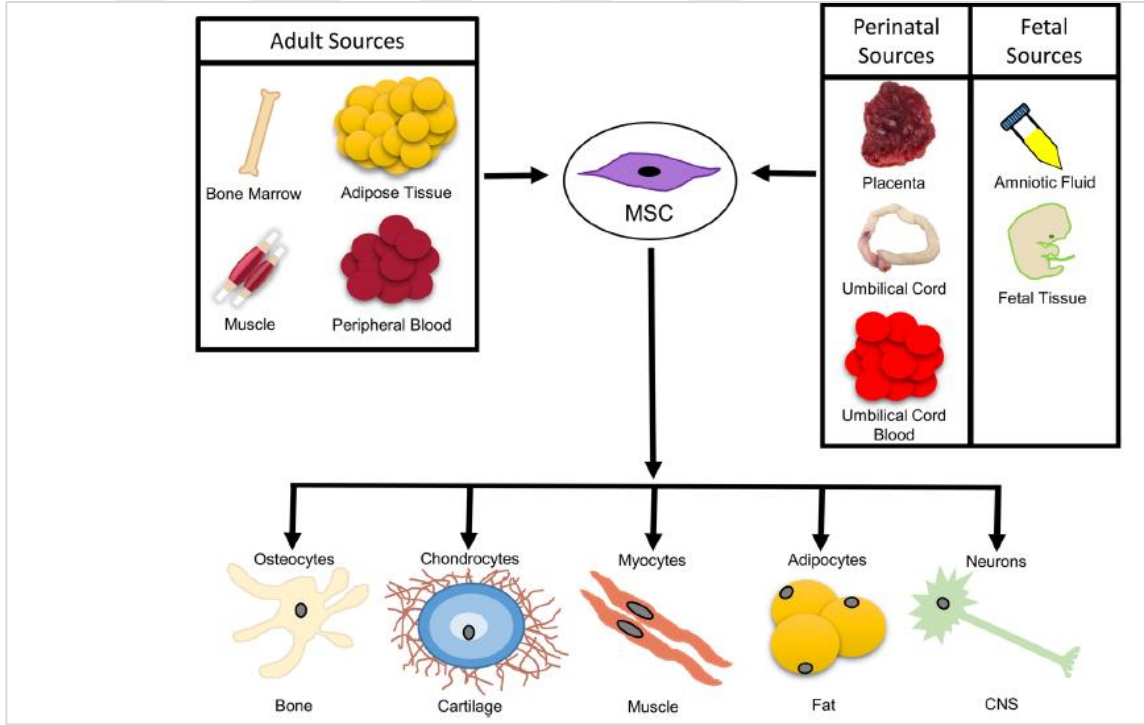
2.2. Kordon Kanı

Kordon kanı doğum anına kadar anne ve bebek arasında gaz ve besin alış verişini sağlayan plasentanın devamında 10 ila 50 cm uzunluğundaki kordon dokusu (umbilical cord) içinde bulunan kandır (Gluckman, 1995). Bireyden bireye değişmekle birlikte 20 ila 200 ml hacimlerde umbilical venden toplanabilmektedir (M-Reboredo ve ark., 2000). Kordon kanı özellikle hematopoetik kök hücre nakli ve rejeneratif tıpta kullanımı gibi diğer kullanım alanları ile birlikte tercih edilen bir kök hücre kaynağı olmuştur (Iafolla ve ark., 2014). Bünyesinde kemik iliği nakli tedavisinde kullanılan hematopoetik kök hücre ile rejeneratif tıp uygulamalarında sıklıkla kullanılan mezenkimal kök hücreyi barındırır. Kordon kanının kemik iliği naklinde ilk kez kullanıldığı 1988 yılından günümüze kadar 35.000 ünitenin üzerinde kordon kanı başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Broxmeyer, 2016). Kordon kanlarının alınması, transferi, işlenmesi ve dondurularak saklanması standartize

edilmiş protokollerle tanımlanmış olup kordon kanı kalitesini etkileyen faktörler üzerinde de çalışmalar bulunmaktadır (Burgucu, 2021).

2.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, plastik yüzeylere yapışabilen, CD73, CD90 ve CD105 gibi hücre yüzeyi antijenlerini ifade eden ve CD45, CD34, CD14 gibi hücre yüzeyi antijenlerini ise ekspres etmeyen, standart in vitro farklılaşma koşullarında osteoblast, adiposit ve kondroblast hücrelerine, ayrıca endotelyal, epitelyal, hepatosit ve nöral hücrelere farklılaşabilme yetenekleri olan hücrelerdir (Dominici ve ark., 2006; Oswald ve ark., 2004). Mezenkimal kök hücreler çok çeşitli yetişkin kaynaklardan izole edilebilmektedir (Şekil.2.1).



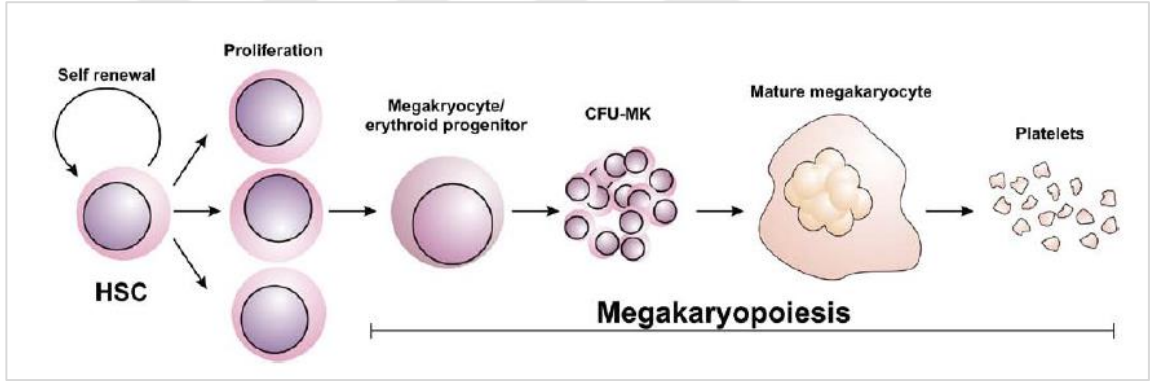
Şekil 2.1: Mezenkimal kök hücre kaynakları (Brown ve ark., 2019)

Farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH), farklılaşmamış olmaları, yüksek çoğalma kapasiteleri, kendini yenileyebilme yetenekleri ve çoklu farklılaşma potansiyelleri ile hasarlı dokuların tamirinde veya yeniden yapılandırılmasında kullanılan önemli kök hücre kaynağıdır (Oscar ve ark., 2015). Günümüzde klinik olarak daha çok yetişkin kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı hücreler

kullanılmakla birlikte kordon dokusu ve kordon kanıda mezenkimal kök hücre kaynağı olarak tercih edilmeye başlamıştır. Özellikle kordon dokusu doğumdan hemen sonra alınıp dondurularak saklanabildiği ve daha sonra primer kök hücre kültürü yapılabilirdiği için son dönem klinik çalışmalarda öncelikli tercih edilen kaynaklardandır (Burgucu, 2021). Mezenkimal kök hücreler düşük immünojenisite ve güçlü immünomodülasyon potansiyeli gösterir (Aggarwal ve Pittenger, 2005). Mezenkimal kök hücrelerin doku homeostazının sürdürülmesinde ve rejeneratif tıpta potansiyel uygulamaları vardır. Bu hücreler, kırık ve kemik onarımı, cilt yara iyileşmesi, nöronal rejenerasyon, kalp rejenerasyonu ve "homing" yeteneklerinden dolayı graft versus host hastalığı (GvHD) tedavisi dahil olmak üzere immün bozukluk tedavisi gibi klinik uygulamalarda başarıyla kullanılmıştır (Caplan, 2019). Bununla birlikte, farklı dokulardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin doğal özellikleri ve işlevi heterojendir (Zhongjun ve ark., 2019) bu nedenle çeşitli kaynaklardan elde edilip çoğaltılan (in-vitro) mezenkimal kök hücrelerin farklılıklarının daha derinlemesine anlaşılması, hastalık tedavisi için daha iyi seçimler yapmamıza yardımcı olacaktır.

2.4. Megakaryopoiesis

Megakaryositler kemik iliği hücre popülasyonunun %0,1' inden azını oluşturur. Trombosit oluşumu gelişimin son aşaması olan olgun megakaryositlerin sinüzoidal boşluklara serbest bırakılması ile karakterizedir. Her megakaryosit ortalama 9 gün boyunca dolaşan 1000 ila 1500 trombosit üretir. Trombosit üretimine iki düzeyde çözünebilir faktörlerin aracılık ettiği bilinmektedir. Birincisi kök hücre seviyesinde, ikincisi olgunlaşan megakaryositler üzerinde etki eder. CFU-Mega (koloni oluşturan birim-megakaryosit) olarak adlandırılan kan veya kemik iliği progenitörlerinden in-vitro megakaryositler büyütmek mümkündür (Dumoulin ve Capelle, 1983; Gewirtz, 1986). CFU-Mega'nın artan üretimi ile progenitör hücrelerin popülasyonu bölünerek daha fazla megakaryosit üretimi ile sonuçlanır (Şekil 2.2).

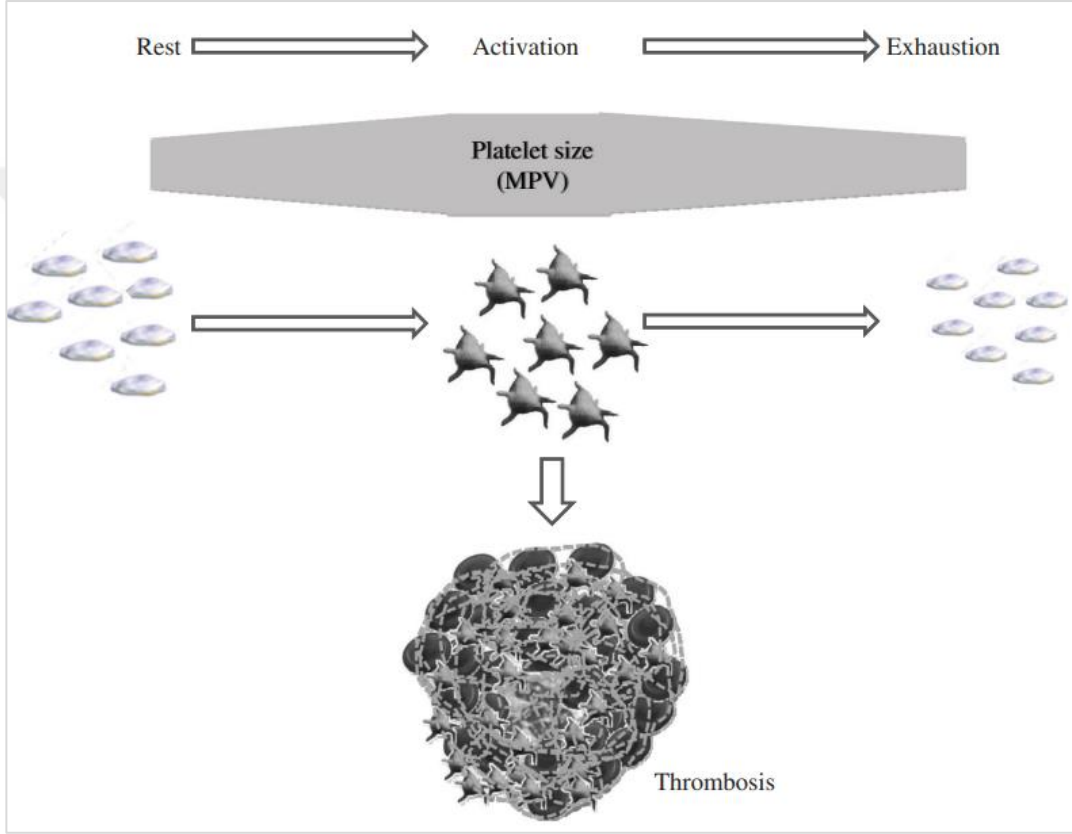


Şekil 2.2: Megakaryopoiesis (Geddis, 2010)

2.5. Trombositler ve Ortalama Trombosit Hacmi

Trombositler, vasküler ağacın bütünlüğünü koruyarak, pıhtılaşmanın ilk aşamasında trombosit tıkaçı üreterek ve pıhtılaşma kaskadının önemli bir bileşeni olan trombosit faktörü 3 üreterek işlev görür. Pıhtılaşma normal vasküler bütünlüğün bozulması ile başlar. Bu dolaşımdaki trombositleri subendotelyal kollajene ve faktör VIII'in multimerlerine (vonWillebrand faktörü) maruz bırakır. Bu durum trombositlerde morfolojik değişikliğe ve lokal olarak yapışmasına, yol açar. Pıhtılaşma sürecindeki ilk adımda şekil değişikliğine uğrama yeteneğinin önemli rolü bulunmaktadır (Holmsen, 1985; Murphey ve ark., 1982) (Şekil 2.3). Adenosindifosfat (ADP) ve trombin, aktive olmuş trombositlerden salınır ve trombosit agregasyonuna neden olan tromboksan A2 üretilir. Trombosit salınım reaksiyonu, alfa granüllerinden fibrinojen, vonWillebrand

faktörü, faktör V, trombosit faktörü 4 ve B-tromboglobulin ve yoğun cisimlerden serotonin, kalsiyum iyonları, ADP ve adenosintrifosfat (ATP) salgılanması ile devam eder. Bu şekilde trombosit tıpası oluşur. Daha sonra trombosit pıhtılaşma aktivitesi, esas olarak plazma pıhtılaşma faktörleri ile birlikte pıhtılaşma sekansındaki son adım olan fibrin pıhtı oluşumuna yol açan trombosit faktörü 3 yoluyla üretilir.



Şekil 2.3. Ortalama trombosit hacmi (Lippi ve ark.,2020)

Elektronik sayıcılar ile ortalama trombosit hacmi (MPV) ölçülür. Trombosit hacimlerinin bir histogramı ölçülerek elde edilir, normal periferik kan değeri ortalama 8,5 ila 9,0 femtolitredir. Normal sağlıklı kişilerde MPV, trombosit sayısı ile ters ancak doğrusal olmayan şekilde değişir. Akut lösemi, aplastik anemi veya ilaca bağlı kemik iliği hipoplazisi olan hastalar normal veya düşük MPV'ye sahipken, periferik trombosit yıkımı ve sağlıklı kemik iliği olanlarda (bağışıklık trombositopeni veya yaygın intravasküler pıhtılaşma gibi) yüksek bir MPV değeri görülür (Packham ve Mustard, 1986; Thompson ve Harker, 1983). Periferik kandan farklı olarak kordon kanında MPV değerleri 6-10 femtolitre aralığındadır (Vassilios ve ark., 2019). Trombositlerin, homeostaz ve trombotik

olaylarda uzun süredir bilinen rollerine ek olarak inflamasyonda temel bir rol oynadığı da bilinmektedir. Endotel hücreleri ve lökositlerle etkileşimi inflamasyona aracılık eder ve immün yanıt aktivitesini modüle eder. Pek çok arteriyel bozuklukta merkezi bir faktör olan trombosit aktivasyonu birden fazla yolla tetiklenebilir. Trombositler aktivasyon sonucu daha büyük bir şekil alır, agregasyona uğrar ve çeşitli aktif içerikleri serbest bırakır (Gasparyan ve ark., 2011).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Teknokent BabyLife kordon kanı bankasına başvuran 50 sağlıklı gebe dahil edildi. Çalışmada gebelere yönelik kontrol grubu yoktur. Helsinki Bildirgesi Kuralları gereği bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulmuş ve gerekli izinler alındı (Karar no: KAEK946-09.12.2020). Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylere aydınlatılmış onam formu okunarak bireylerin çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair imzaları alındı. Toplam 50 sağlıklı vajinal / sezeryan doğum gerçekleştikten sonra tıbbi atık olan kordon dokusunun anne tarafında kalan kısmı alt bölgesinden klempenip, batikon ile dezenfeksiyon işleminden sonra 45 derecelik açı ile umblikal vene girildi. Alım esnasında akım kontrol edilip kan akımı yavaşlayana kadar işlem devam ettirildi. Akım kesilince iğne venden çıkarılıp, çıkış noktasının üst kısmından tekrar klemplendi. Bu yöntemle toplamda 50 torba kordon kanı alındı ve alınan kan hücre izolasyonu için laboratuvara ulaştırıldı. Alınan örnekler kayıt altına alındıktan sonra transfer dezenfeksiyonu (torba dışından) yapılarak GMP laboratuvarına alındı. Hacim azaltma ve mononükleer hücre ayrıştırma işlemi gerçekleştirildi. Tüm laboratuvar uygulamaları, Akdeniz Üniversitesi Teknokent Ar Ge-2 binasında bulunan BabyLife kordon kanı bankası ve hücre-doku üretim merkezinde gerçekleştirildi. Tezin gerçekleştirilmesi aşamasında altyapı, cihaz, sarf malzeme ve antikor giderlerinin tamamı BabyLife kordon kanı bankası ve hücre-doku üretim merkezinin araştırma bütçesinden karşılandı.

3.2. Mononükleer Hücre (MNH) İzolasyonu

1. 15ml lik konik tüp içinde 3 ml histopaque 1077(Sigma- H8889) üzerine yavaşça 6 ml kordon kanı eklendi.
2. Daha sonra 1150 rpm'de 25 dakika santrifüj edilip dansite gradiyentiyle mononükleer hücreler ayrıştırıldı.
3. Elde edilen mononükleer hücreler 3 kez fosfat tamponlu tuz Çözültisi (PBS- Gibco™, pH 7.4 cat no: 10010002) ile yıkandı.
4. Hücre peleti 1 ml PBS içinde resüspanse edildi.

3.3. Hücre Sayımı ve MPV Ölçümü

Hücre sayımı Coulter (Coulter Electronics Ltd. England) marka otomatik tam kan sayımı cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. MPV değeri cihaz tarafından otomatik hesaplandı.

3.4. Hücrelerin Monoklonal Antikorlarla İşaretlenmesi

Flow sitometri tüplerine alınan hücreler Tablo.3.1.de belirtilen şekilde antikorlarla işaretlendi, 20 dk 25⁰ C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 defa 400 g de 5 dk santrifüj edilerek PBS (Gibco™, pH 7.4 cat no: 10010002) ile yıkandı. Aynı işlemler antikorların izotiplerinin bulunduğu tüpe de uygulandı. Canlılık ölçümü için 10 µl 7-AAD (BD catalog no: 559925) flurokromu kullanıldı.

Tablo.3.1. Tüplere konulan moAb renk ve miktarları

1.tüp	2.tüp	3.tüp
anti-IgG1- Alexa Fluor 647 10 µl [Biolegend – cat no: 400626]	Alexa Fluor 647- CD44 10 µL [Biolegend – cat no: 103018]	7-AAD 10 µl
anti-IgG2-PE 10 µl [Biolegend – cat no: 400522]	APC/Cyanine 7 – CD73 10 µL [Biolegend – cat no: 127232]	
anti-IgG1-APC/Cyanine 10 µl [Biolegend – cat no: 400422]	PE/Cy7 - CD105 10 µL [Biolegend – cat no: 120410]	
	CD45- FITC 10 µL [BD cat no:345808]	
	CD34- PE 10 µL [BD cat no:345802]	

3.5. Flow Sitometrik Analiz

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

3.6. Hücre Kültürü

Mezenkimal kök hücre immünofenotiplendirmesinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere kordon dokusundan primer kültür daha önce tanımlandığı gibi yapıldı (Burgucu, 2021). Özetle; kordon dokusu steril petri dish içinde bistüri ile yaklaşık 0,3-0,5 cm büyüklükte olacak şekilde parçalandı, parçalar %5 antibiyotik içeren PBS ile iki defa yıkandı. Daha sonra 10 dakika antibiyotikli solüsyonda oda ısısında bekletildi ve DMEM ile yıkandı. Yıkanan parçalar 10 cm çapındaki petri dishlere alındı. Primer kültür işleminin birinci basamağında 14 gün süre ile hücrelerin besiyerine göç edebilmesi için beklendi. Daha sonra primer kültür işlemi ile elde edilen hücreler 37⁰C de %5 CO₂ 'li ortamda, %10 fetal dana serumu (Thermo-cat no: A4766801) ve %1 penisilin/streptomisin (Thermo-cat no: 15140130) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM-Gibco cat no:41965-039) besi yeri içinde kültür işlemine devam edildi.

3.7. İstatistik

Değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilen değişkenler için $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Analizler SPSS programında yapılmıştır. Normal dağılım gösteren değerlerde Pearson korelasyon analizi, normal dağılım göstermeyen değerlerde Spirman's korelasyon analizi uygulanmıştır. Doğrulama (normallik) testlerinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. Değişkenlerimizin normal dağılmadığı durum $p < 0,05$ olduğunda kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grupları

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri; çalışmaya katılmayı kabul eden, 50 sağlıklı gebenin doğum sonrası tıbbi atık olan kordon kanlarından alındı.

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan gönüllülerin özellikleri.

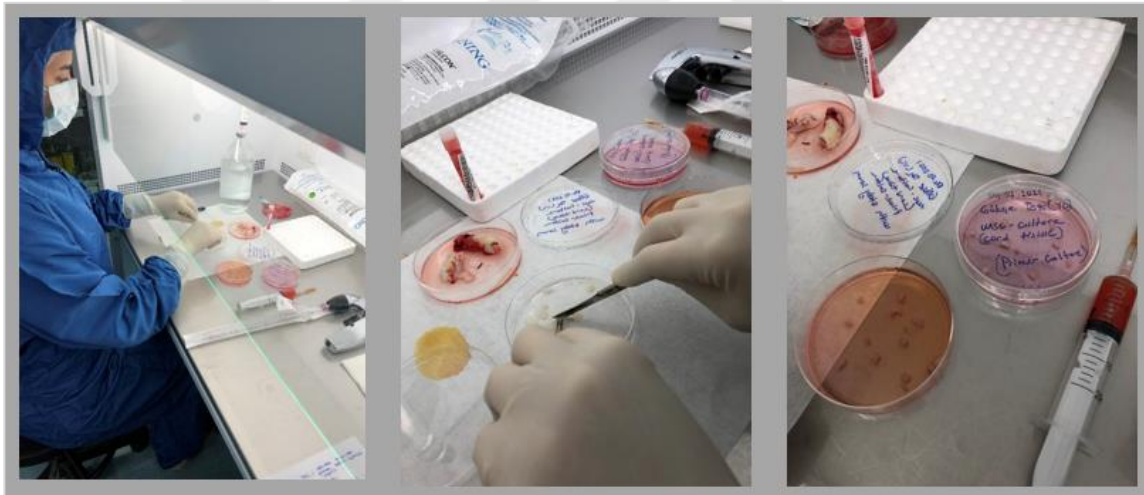
NO	ANNE YAŞI	DOĞUM ŞEKLİ ND/SC	TOPLAM ÇOCUK SAYISI
1	32	S/C	1
2	38	S/C	2
3	27	ND	1
4	43	S/C	3
5	34	S/C	2
6	37	S/C	1
7	33	S/C	1
8	33	ND	1
9	39	S/C	2
10	40	S/C	1
11	30	S/C	1
12	30	S/C	1
13	30	S/C	1
14	38	S/C	2
15	30	S/C	1
16	27	S/C	3
17	31	S/C	1
18	27	S/C	1
19	30	S/C	1

20	27	S/C	1
21	33	S/C	2
22	37	S/C	1
23	34	S/C	1
24	37	S/C	4
25	35	S/C	2
26	33	ND	1
27	33	ND	1
28	26	S/C	1
29	34	ND	1
30	33	ND	2
31	34	S/C	1
32	30	S/C	1
33	34	S/C	3
34	37	S/C	2
35	39	S/C	3
36	35	S/C	1
37	24	S/C	1
38	24	S/C	1
39	41	S/C	3
40	33	S/C	2
41	31	S/C	1
42	38	S/C	1
43	33	S/C	1
44	39	S/C	2
45	35	ND	1
46	34	S/C	1

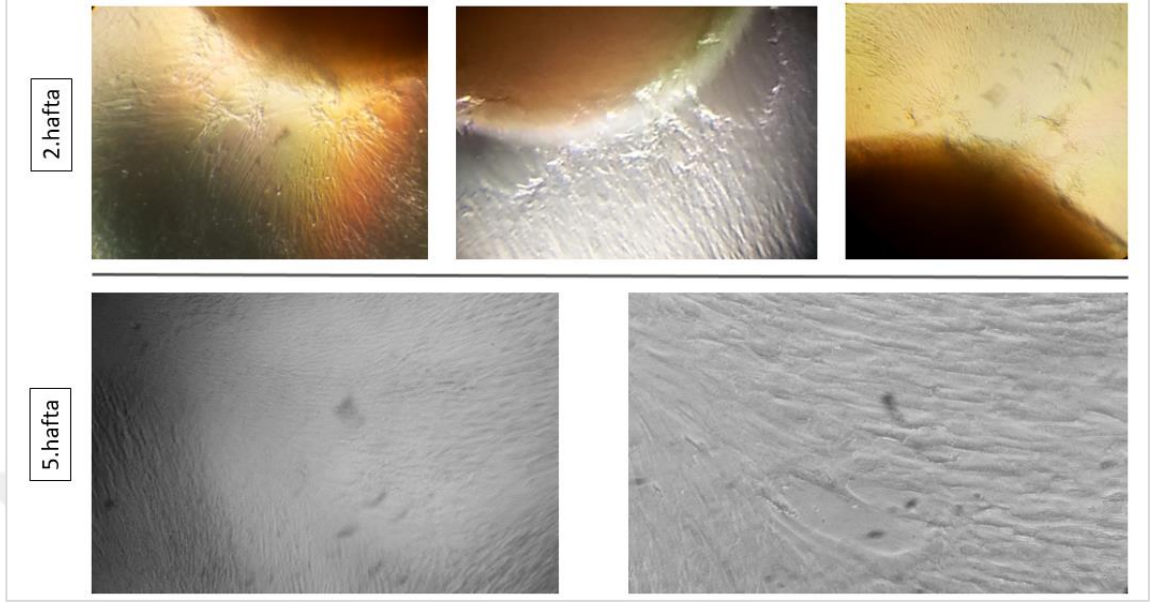
47	32	S/C	5
48	23	S/C	1
49	29	ND	2
50	39	S/C	6

4.2. Kordon Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve İmmünofenotiplendirilmesi

Kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin MNC izolasyonu sonrasında immünofenotiplendirme işlemi yapılması aşamasında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere, kordon dokudan primer kültür yapılarak mezenkimal kök hücre elde edildi. Doku parçaları önce 0,2-0,3 cm çapında küçük parçalara ayrıldı daha sonra besiyeri içinde 5 hafta süre ile 37°C de %5 CO₂ li inkübatörde inkübe edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2).

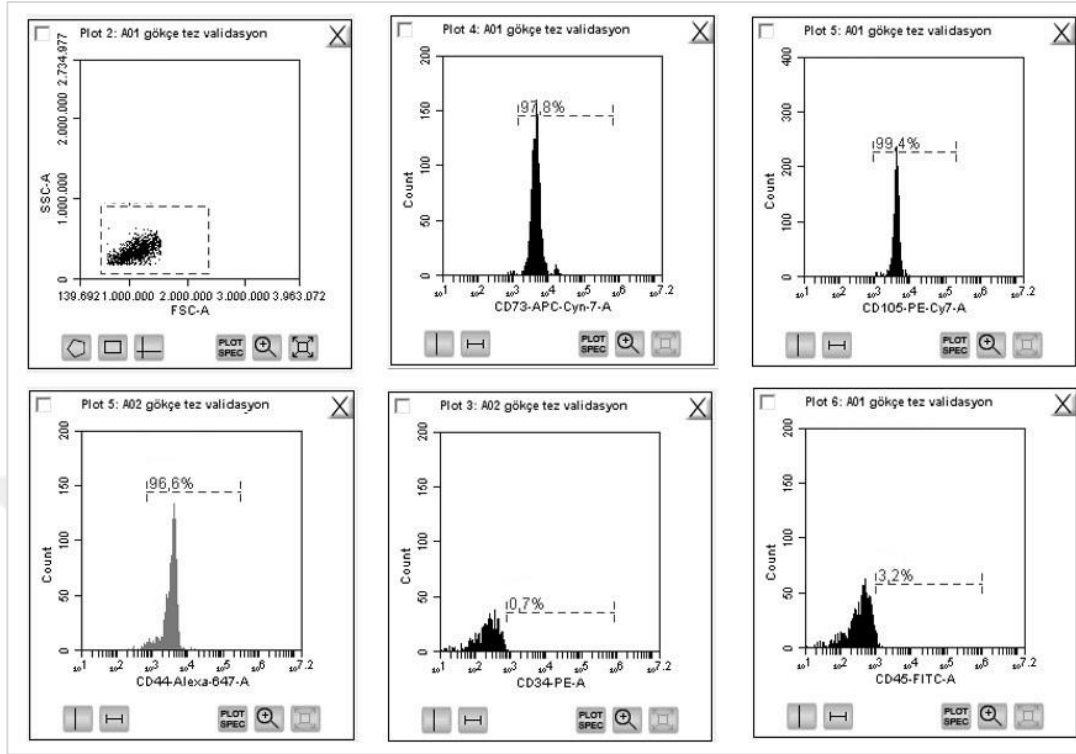


Şekil 4.1. Kordon dokusundan (umbilical cord) primer kök hücre kültürü işlemi.



Şekil 4.2. Kordon dokusundan (umbilical cord) primer kök hücre kültürü işlemi 2. ve 5. Hafta morfolojik görüntüleri (40x).

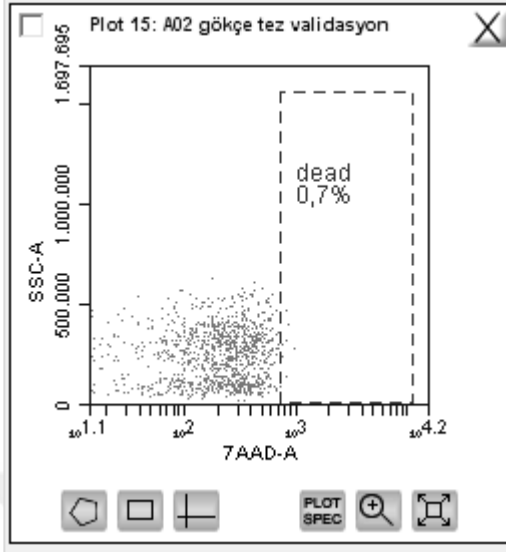
Kültür sonrası hücreler tripsinizasyon işlemi ile kültür flasklarından kaldırılıp yıkandıktan sonra mililitrede 5×10^5 olacak şekilde fizyolojik tampon içinde resüspanse edildi. Daha sonra flow sitometri ile immünofenotiplendirilmesi yapıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kordon dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin imm nfenotipik  zellikleri (CD73+CD105+CD44+CD45-CD34-).

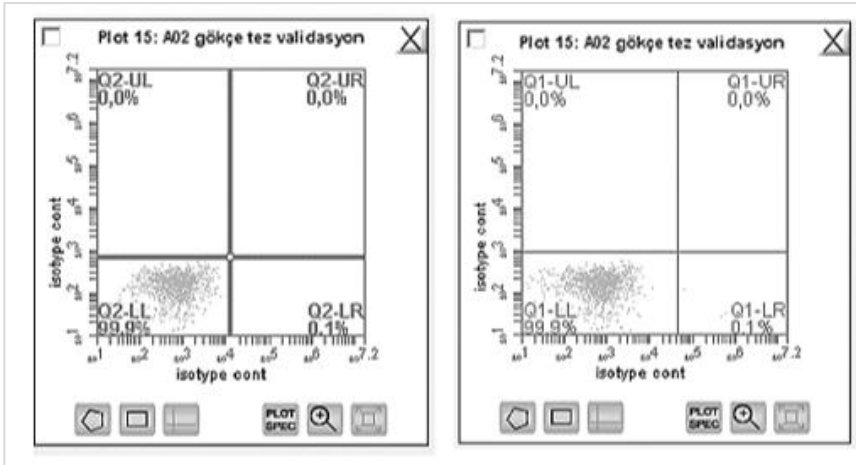
4.3. Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücrelerinin İmm nfenotipik  zellikleri

Kordon kanındaki mezenkimal kök hücrelerin oranını belirlemek için öncelikle mononükleer hücre izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra izole edilen mononükleer hücrelerin canlılık oranlarına bakıldı ( ekil 4.4). Canlılık oranı %95 ve üzerinde olan örnekler daha sonra mezenkimal kök hücre imm nfenotiplendirilmesi için çalışmaya dahil edildi.

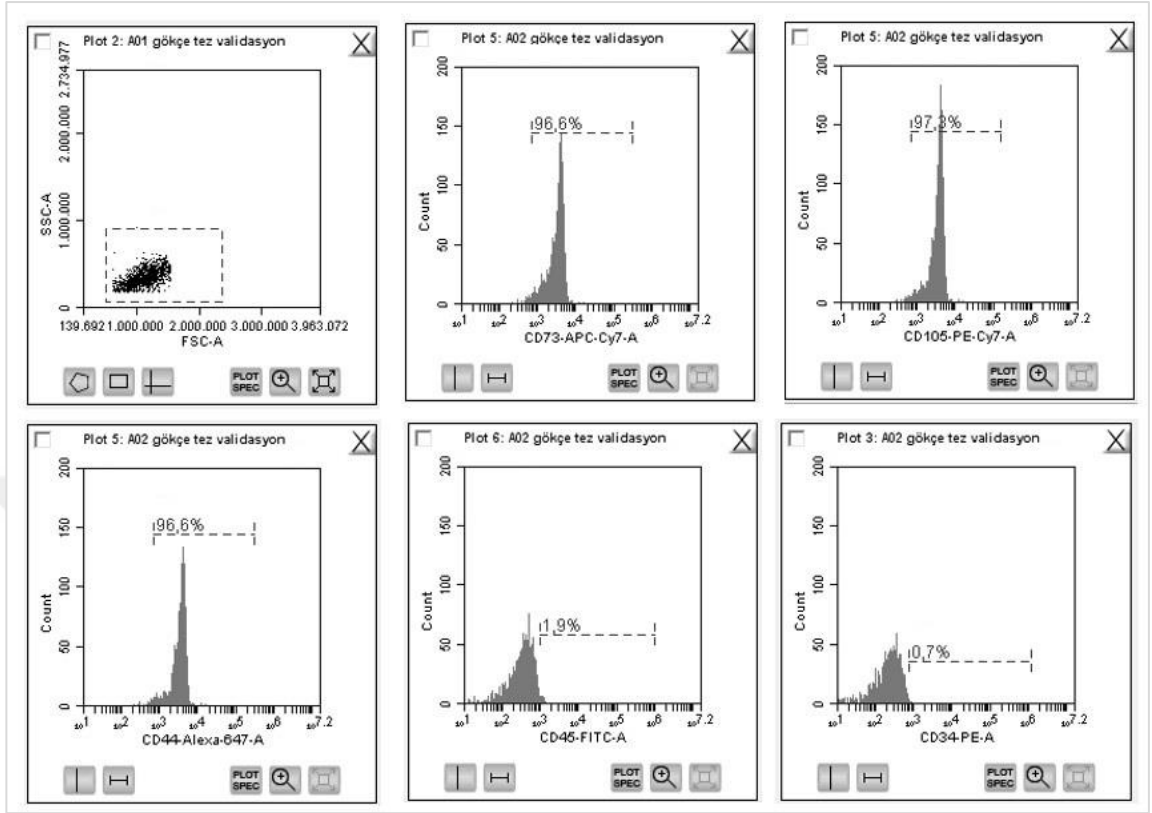


Şekil 4.4. Kordon kanından MNC izolasyonu sonrası hücrelerin canlılık analizi flow sitometri histogramı.

Çalışmaya dahil edilen örneklerin ihtiva ettiği mezenkimal kök hücreler % olarak tespit edildi. İzole edilen mononükleer hücrelerin ortalama $1 \pm 0,14$ oranında mezenkimal kök hücre belirteçlerini ifade ettiği tespit edildi. Ayrıca belirteçlerin ifade düzeyleri pozitif kontrol olarak kullandığımız kordon dokudan primer kültür ile elde ettiğimiz hücrelerle bezerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.6). Mononükleer hücreler içinde düşük bir orana sahip olan mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirmesini yaparken negatif kontrol olarak Tablo 3.1 de belirtilen izotipik kontroller kullanıldı (Şekil 4.5).

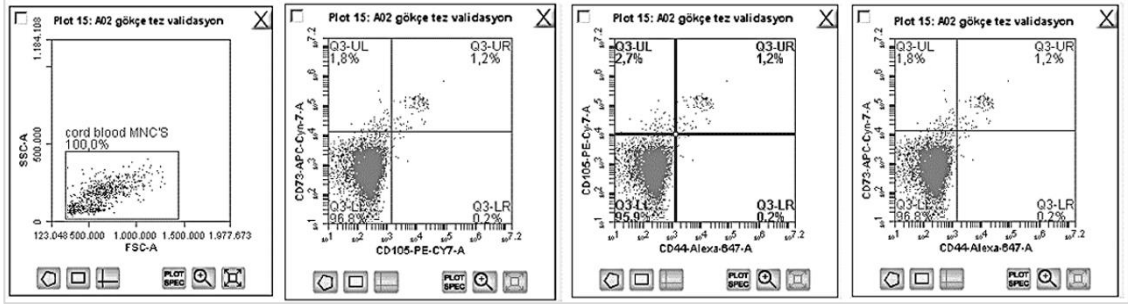


Şekil 4.5. Kordon kanından MNC izolasyonu sonrası hücrelerin izotipik kontrol ile işaretlenmesi noktasal dağılımı.

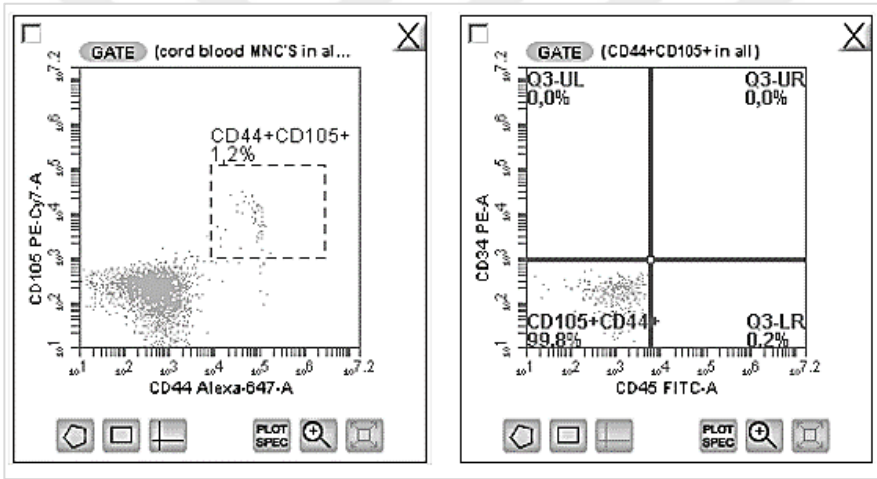


Şekil 4.6. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri (CD73+CD105+CD44+CD45-CD34-).

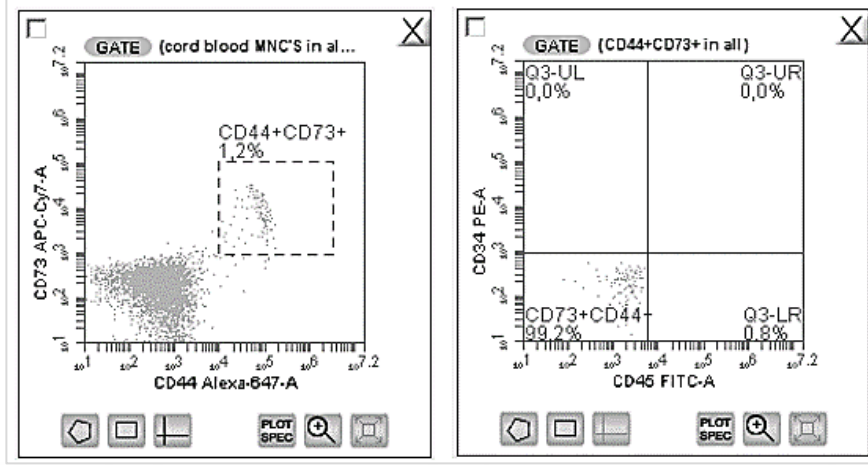
Flow sitometrik analiz sonrası şekil 4.6 da gösterilen histogram gösterimine ek olarak çift pozitif (CD73+ vs CD105+ /CD73+ vs CD44+/ CD44+ vs CD105+/ CD45-vs CD34-) ve çift negatif hücre popülasyonlarının gösterilmesi amacı ile noktasal ve sıralı gate gösterimi ile analizler tekrar edildi (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



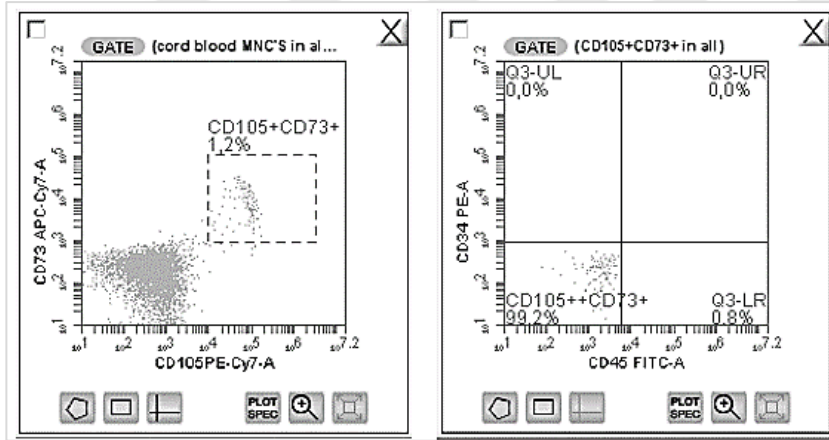
Şekil 4.7. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri çift pozitif noktasal gösterim (CD73+CD105+/CD44+CD105+/CD73+CD44+).



Şekil 4.8. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri sıralı gate gösterimi (CD44+CD105+/CD34-CD45-).

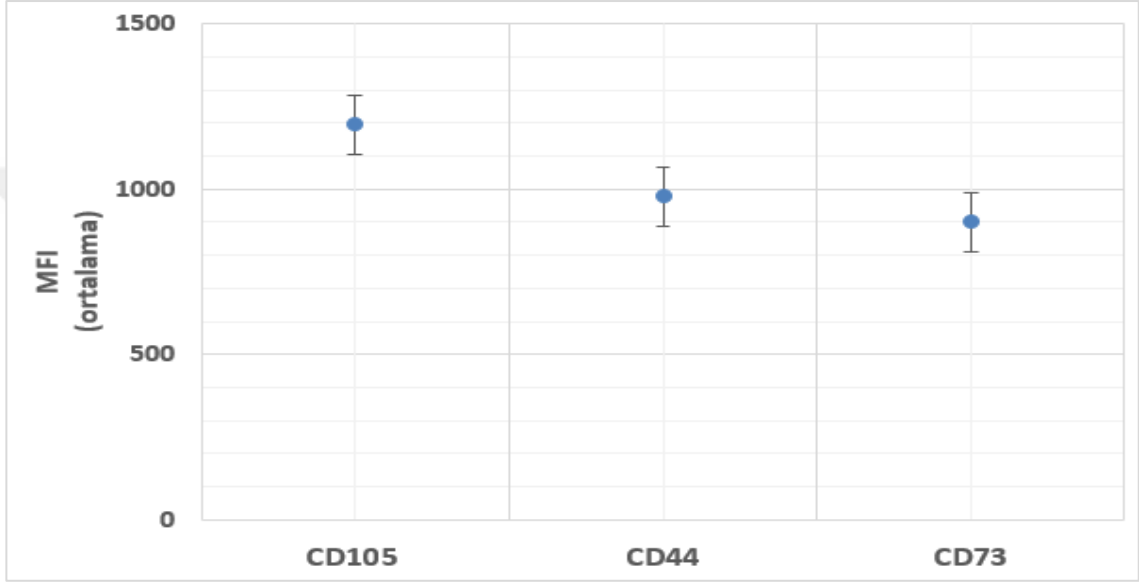


Şekil 4.9. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri sıralı gate gösterimi (CD44+CD73+/CD34-CD45-).

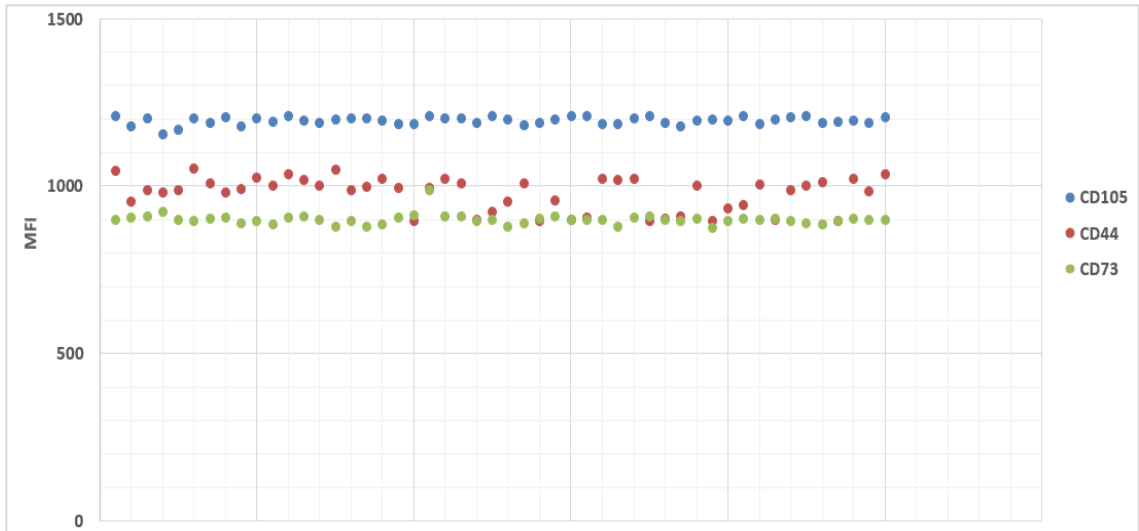


Şekil 4.10. Kordon kanından elde edilen MNC'lerde mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik özellikleri sıralı gate gösterimi (CD105+CD73+/CD34-CD45-).

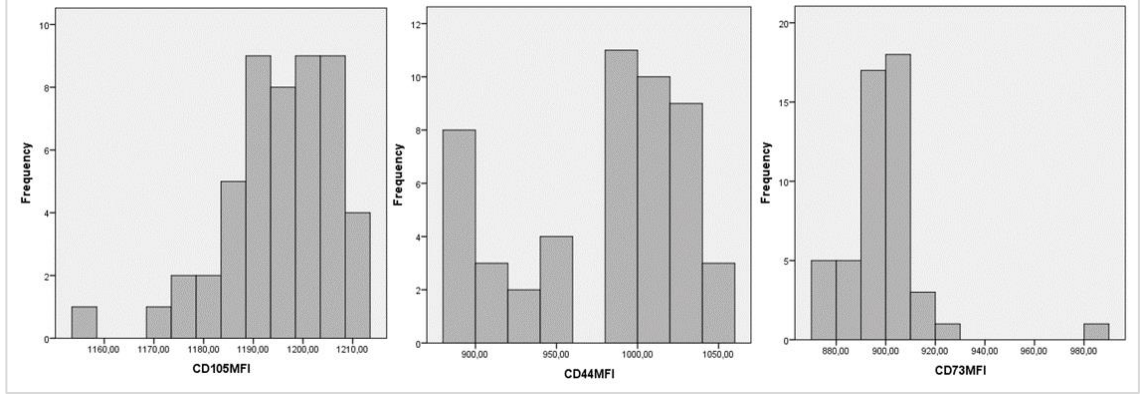
Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD105, CD44 ve CD73 antijenlerinin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) her bir kordon kanı için değerlendirildi. Ortalamaları (Şekil4.11.) ve her örnek bazında ki sonuçlar tespit edildi (Şekil 4.12.). Ayrıca normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk doğrulama testleri ile kontrol edildi (Şekil 4.13.).



Şekil:4.11. Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD 105, CD44 ve CD73 antijenlerinin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) ortalama değerler.



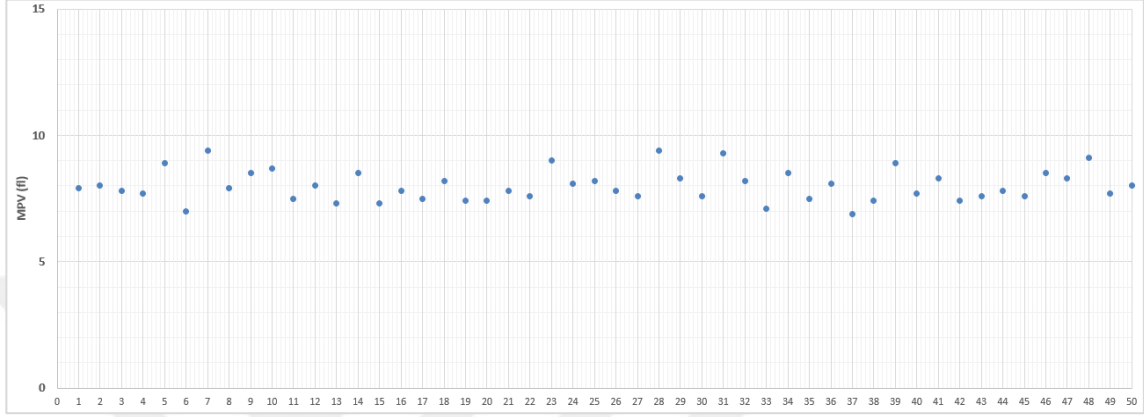
Şekil 4.12. Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD 105, CD44 ve CD73 antijenlerinin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI) örnek bazında değerler.



Şekil 4.13. Mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen CD105, CD44 ve CD73 antijenlerinin ortalama kanal (florosan) yoğunluğu (MFI). Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk doğrulama testleri sonrasında normal dağılıma uymadığı tespit edilmiştir (veriler histogram biçiminde gösterildiğinde çan eğrisi görüntüsü oluşmamıştır (CD105 MFI Ort:1195,26, Std. Dev.:11,37 CD44 MFI Ort: 977,52 Std. Dev. :49,50 CD73MFI Ort: 900,22 Std. Dev.: 15,94).

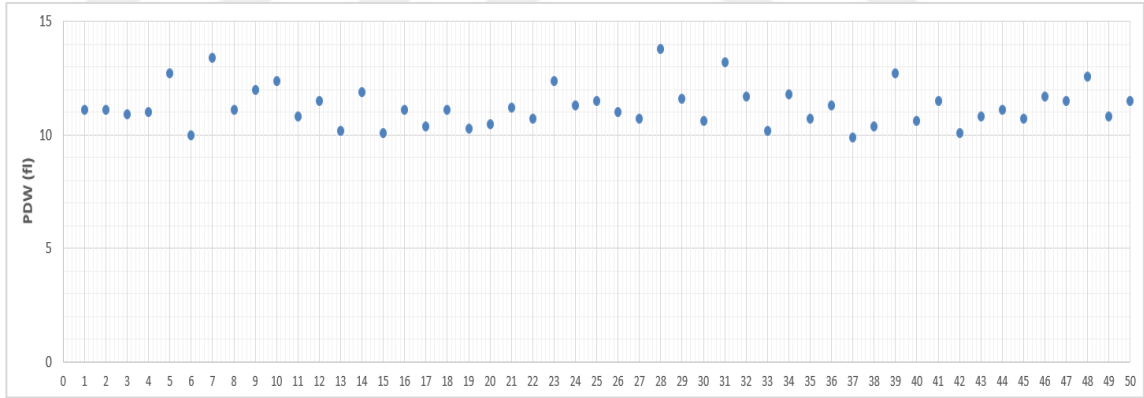
4.3. Kordon Kanı Örneklerinde Ortalama Trombosit Hacimleri ve PDW Değerleri

Ortalama trombosit hacimleri ortalama $8 \pm 0,61$ fl olarak tespit edildi. Örnek bazında MPV değerleri Şekil 4.14 de verilmiştir.



Şekil 4.14. Kordon kanı örnekleri ortalama trombosit hacim değerleri (her bir örnek için).

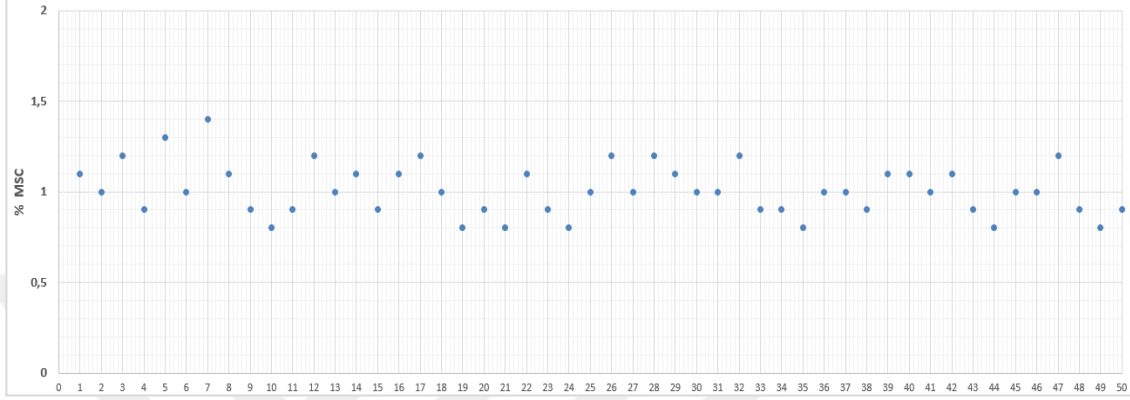
PDW değerleri ortalama $9,90 \pm 0,90$ fl olarak tespit edildi. Örnek bazında PDW değerleri Şekil 4.15’de verilmiştir.



Şekil 4.15. Kordon kanı örnekleri PDW değerleri (her bir örnek için).

4.4. Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Değerleri

Kordon kanı mononükleer hücrelerinden yapılan analizde % mezenkimal kök hücre değerleri Şekil 4.16’ da verilmiştir.



Şekil 4.16. Kordon kanı mezenkimal kök hücre değerleri (% MNC).

4.5. Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Değerleri (%) ile Ortalama Trombosit Hacmi Arasındaki İlişki

Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerdeki mezenkimal kök hücre oranı ile ilgili örneğin ortalama trombosit hacmi değeri arasındaki olası ilişki pearson kolerasyon testi ile incelendiğinde pozitif yönde zayıf ilişki oldu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Tablo4.2.).

Tablo 4.2: Ortalama Trombosit Hacmi ile Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerin ihtiva ettiği Mezenkimal Kök Hücrelerin oranı arasındaki ilişki (R değeri: 0.20-0.39 arasında ise düşük ilişki, +1, 00’ a yaklaştıkça iki değişken arasında aynı yöndeki ilişki artar. p-değeri 0.05’ten küçük bulunduğunda iki değişken arasında ilişki bulunmaktadır.)

MPV	MSC	
	R (Korelasyon katsayısı)	0,302
	P	0,033
	N	50

4.5. Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Değerleri (%) ile PDW Değeri Arasındaki İlişki

Kordon kanından elde edilen mononükleer hücrelerdeki mezenkimal kök hücre oranı ile ilgili örneğin PDW değeri arasındaki olası ilişki Spearman's kolerasyon testi ile incelendiğinde anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Tablo 4.3.: PDW değeri ile Kordon Kanı Mononükleer Hücrelerin ihtiva ettiği Mezenkimal Kök Hücrelerin oranı arasındaki ilişki (p-değeri 0.05'ten büyük bulunduğundan iki değişken arasında ilişki bulunmamaktadır.)

		MSC
PDW	R(Kolerasyon Katsayısı)	0,199
	P	0,165
	N	50

4.5. Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücre Belirteçlerinin (CD105, CD44, CD73) MFI Değerleri ile MPV ve PDW Değerleri Arasındaki İlişki

Mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD105, CD44 ve CD73'ün ekspresyon düzeyleri MFI olarak değerlendirildi. Daha sonra bu değerler ile MPV ve PDW değerleri arasında olası ilişki incelendi. Şekil 4.13'de gösterildiği gibi bu üç belirtecin ekspresyon düzeyleri normal dağılım göstermediği için olası ilişki Spearman's kolerasyon testi ile incelendi. Tablo 4.3'de kolerasyon katsayıları ve p değerleri verilmiştir.

Tablo 4.4: MPV ve RDW değerleri ile Mezenkimal Kök Hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki (p-değeri 0.05'ten büyük olduğundan değişkenler arasında ilişki bulunmamaktadır.)

		CD105MFI	CD44MFI	CD73MFI
MPV	r	0,036	-0,080	0,036
	p	0,804	0,579	0,805
PDW	r	0,040	-0,065	0,067
	p	0,783	0,652	0,644

5. TARTIŞMA

Trombosit aktivasyonunun bir belirleyicisi olan ortalama trombosit hacminin farklı klinik tablolarda rolü olabileceğine dair çok sayıda çalışma yapılmış olup aktivasyon göstergesi olarak kabul edilmektedir. Anabilim dalımızdan da farklı klinik bulgularla ilişkilendirildiği çok sayıda yayın yapılmıştır. Bu çalışmalar periferik kan örnekleri kullanılarak yapılmış olup ailesel akdeniz ateşi, hepatit b taşıyıcılığı, beyaz önlük hipertansifitesi, obez hastalarda kilo kaybı durumları, lipidemi gibi farklı patofizyolojik temellere dayanan durumlar olabildiği gibi malignitelite tedavisinde neoadjuvant kemoterapi sonrası prediktif bir marker olabileceği de ortaya konulmuştur (Çoban E. ve ark., 2005, 2008, 2010, Mutlu H. ve ark., 2016).

Çalışmamızdaki temel parametrelerden olan mezenkimal kök hücreler, mezodermal farklılaşma potansiyeli, stromal destek ve immünomodülasyon dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktiviteler taşıyan multipotent progenitör hücrelerdir. Bu hücre grubunun klinikte kullanılabilmesi için izolasyonları ve in-vitro çoğaltılmaları belirleyici basamaklardan olup trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin çoğaltımda rol alabildiği ortaya konulmuştur. In-vitro durumda trombosit- mezenkimal kök hücre ilişkisi bilinmekle birlikte in-vivo durumda nasıl bir ilişki yada asosiasyon olduğu tam olarak açıklanmamıştır (Reis M. ve ark., 2018, Stute, N. ve ark., 2014). Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanılmasında, hematopoetik kök hücre transplantasyonu sonrası graft-versus-host hastalığı (GVHD) ile mücadele, üzerinde çok çalışılan bir durumdur. Transplantasyon sonrası kalıcı trombositopeninin artan morbidite ve mortaliteye yol açtığı bilinmektedir (Zaja F. ve ark., 2011). GvHD tedavisi için Mezenkimal kök hücrelerin klinik etkinliğini gösteren ilk rapor 2004’ de yayınlandıktan sonra çok sayıda çalışma yapılmış olup sonrasında bu özelliğinden dolayı kullanımı birçok ülkede onaylanmıştır (Morata T.ve ark., 2020). Xiaohua ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise insan göbek kordonundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kronik refrakter immün trombositopenik purpura olan sınırlı sayıda hastada remisyon sağladığı gösterilmiştir (Xiaohua W. ve ark., 2017). Allojenik mezenkimal kök hücrelerin in vitro ve in vivo durumda, ITP hastaları üzerindeki etkisini değerlendiren bir başka çalışmada ITP hastalarından alınan periferik kan mononükleer hücrelerde, otoreaktif T ve B lenfositlerin

proliferasyonu dramatik bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler ayrıca, trombosit üretimini teşvik ederek ve canlı megakaryositlerin sayısını arttırmıştır. Ek olarak erken apoptozu azaltarak megakaryositlerin işlev bozukluklarını düzelttiği ve trombopoietin seviyesi önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Ma L. ve ark., 2012).

Mezenkimal kök hücreler ile trombositler arasında iki yönlü fakat mekanizması tam olarak açıklanmayan bir assosiasyon olduğu görülmektedir. Literatürdeki çalışmaların tamamına yakını erişkin dönem periferik kan trombositleri ile yapılan çalışmalar olup trombosit lizat ve in-vitro uygulamaları dışında, kordon kanı kaynaklı trombositlerle olan ilişki yada assosiasyona dair veri bulunmamaktadır.

Ortalama trombosit hacmi ile kordon kanı mezenkimal kök hücresi arasındaki olası asosiasyonu değerlendirdiğimiz çalışmamızda yüksek mezenkimal kök hücreye sahip olan örneklerdeki MPV değerlerinin de yüksek olduğunu ortaya koymuş bulunmaktayız. Bununla birlikte, mezenkimal kök hücre belirteçlerinin ekspresyon düzeyleri ve PDW değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığını da tespit etmiş olduk.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Kordon kanı örneklerinde ortalama trombosit hacmi değerleri ortalama 8 fl bulunmuştur.
2. Kordon kanı örneklerinden izole edilen mononükleer hücrelerin mezenkimal kök hücre oranı ortalama %1 olarak tespit edilmiştir.
3. Kordon kanı mezenkimal kök hücre oranı ile ortalama trombosit hacmi değerleri arasındaki assosiasyon değerlendirildiğinde pozitif yönlü bir kolerasyon tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

Atluri S, Manchikanti L, Hirsch JA. Expanded Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs) as a Therapeutic Strategy in Managing Critically Ill COVID-19 Patients: The Case for Compassionate Use. *Pain Physician* 2020;23(2): E71-E83.

Bramhoff A, Giers G, Blessing F, Wenzel F, Using the mean platelet volume MPV for the quality assessment of apheresis procedures, *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016;64(3):413-424.

Brand A, Rebulla P, Engelfriet CP, et al. Cord blood banking. *Vox Sang* 2008;95(4):335-348.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells.

Broxmeyer HE. Enhancing the efficacy of engraftment of cord blood for hematopoietic cell transplantation. *Transfus Apher Sci* 2016;54(3):364-372.

Burgucu D, Effect of short-term in vitro antibiotic administration into the human umbilical cord tissue on cfu count and mesenchymal stem cell immunophenotype, *Medicin Science [International Medical Journal]*, 2021;10(1), 98-100.

Burgucu D, Effect of smoking on the hematopoietic stem cell count in cord blood, *Ann Clin Anal Med* 2021;12(Suppl 1): S83-85.

Burgucu D, Rate of release in Turkish model cord blood banking: A single center experience, *Ann Clin Anal Med* 2021;12(5):498-500.

Burgucu D, The Effect of COVID-19 on Autologous Cord Blood and Cord Tissue Banking in Turkey: a Cross-Sectional and Retrospective Study, *New Trend in Medicine Science* 2020; 1(2), 90-93.

Carla Dessels, Marco Alessandrini, Michael Sean Pepper. Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape, *Stem Cells Translational Medicine* 2018;7:643–650.

Coban E.& Adanir H. (2008) Platelet activation in patients with Familial Mediterranean Fever, *Platelets*, 19:6, 405-408.

Coban E, Yazicioglu G, Avci A.& Ferhat Akcit (2005) The mean platelet volume in patients with essential and white coat hypertension, *Platelets*, 16:7, 435-438.

Coban E, Yilmaz A. & Sari R. (2007) The effect of weight loss on the mean platelet volume in obese patients, *Platelets*, 18:3, 212-216.

Demirbilek Y, Pehlivan Türk G, Özgüler ZÖ, Alp Oak E. COVID-19 outbreak control, example of ministry of health of Turkey. *Turk J Med Sci* 2020;50(L-1):489-494.

Dessels C, Alessandrini M, Pepper MS. Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape. *Stem Cells Transl Med* 2018;7(9):643-650.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8: 315-317.

Dumoulin-Lagrange M, Capelle C. Evaluation of automated platelet counters for the enumeration and sizing of platelets in the diagnosis and management of hemostatic problems, *Semin Thromb Hemost*. 1983 Oct;9(4):235-44.

Eisenstaedt R. Blood component therapy in the treatment of platelet disorders, *Semin Hematol*. 1986 Jan;23(1):1-7.

Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation, *CurrPharmDes*. 2011;17(1):47-58.

Gewirtz AM. Human megakaryocytopoiesis, *Semin Hematol*. 1986 Jan;23(1):27-42.

Gluckman E. Umbilical cord blood biology and transplantation. *Curr Opin Hematol* 1995;2(6) :413-416.

Guttridge MG, Soh TG, Belfield H, Sidders C, Watt SM. Storage time affects umbilical cord blood viability. *Transfusion* 2014;54(5):1278-1285.

Hal E. Broxmeyer, Enhancing the efficacy of engraftment of cord blood for hematopoietic cell transplantation, *Transfusion and Apheresis Science* 2016 Volume 54 (364-372).

Holmsen H. Platelet metabolism and activation, *Semin Hematol*. 1985 Jul;22(3):219-40.

Karen Ballen, Challenges in Umbilical Cord Blood Stem Cell Banking, *Stem Cell Reviews and Reports*. March 2010, Volume 6, Issue 1, pp 8–14.

Karpatkin S. Autoimmune thrombocytopenic purpura, *Semin Hematol*. 1985 Oct;22(4):260-88.

Lee HR, Park JS, Shin S, Roh EY, Yoon JH, Song EY, Kim BJ, Chang JY. Mean platelet volume reflect hematopoietic potency and correlated blood group o in cord blood from healthy newborn. *Biomed Res Int*. 2013;2013: 754169.

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH, Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1669-75.

Li Z, Hu X, Zhong JF, Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application, *Stem Cells Int*. 2019 Mar 6;2019:8106818.

Ma L, Zhou Z, Zhang D, Yang S, Wang J, Xue F, Yang Y, Yang R. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients. *Thromb Haemost.* 2012 May;107(5):937-50.

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

Michel G, Detrait M, Elsermans V, Faucher C, Hicheri Y, Ivanova-Derin R, Lemarie C, Sirvent A, Top I, Garnier F, Boulanger F, Michallet M, Yakoub-Agha I; SFGM-TC.

Mikko Eskola, Sari Rekunen, Pekka Aroviita, Sari Möttönen, Vilho Hiilesmaa, Susanna Sainio, and Riitta Kekomäki. Association of cord blood platelet characteristics and hematopoietic progenitor cells, *TRANSFUSION* Volume 48, May 2008.

Morata-Tarifa, C., Macías-Sánchez, M., Gutiérrez-Pizarraya, A. et al. Mesenchymal stromal cells for the prophylaxis and treatment of graft-versus-host disease—a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther* 11, 64 (2020).

Murphey S, Litwin S, Herring LM. et al. Indications for platelet transfusion in children with acute leukemia, *Am J Hematol.* 1982;12:347–56.

Murphy S, Litwin S, Herring LM, Koch P, Remischovsky J, Donaldson MH, Evans AE, Gardner FH. Indications for platelet transfusion in children with acute leukemia, *Am J Hematol.* 1982 Jun;12(4):347-56.

Mutlu H, et al. “Mean Platelet Volume as an Independent Predictive Marker for Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Locally Advanced Breast Cancer.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 17, no. 4, Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, June 2016, pp. 2089–2092.

Noris P, Melazzini F, Balduini CL. New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice? *Platelets*. 2016 Nov;27(7):607-612.

Packham MA, Mustard JF. The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis, *Semin Hematol*. 1986;23: 8–26.

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

Reis, M., McDonald, D., Nicholson, L. et al. Global phenotypic characterisation of human platelet lysate expanded MSCs by high-throughput flow cytometry. *Sci Rep* 8, 3907 (2018).

Stute, N. et al. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental hematology* 32, 1212–1225 (2004).

Thompson AR, Harker LA. Quantitative platelet disorders, In: *Manual of hemostasis and thrombosis*, 3d ed. Philadelphia: F. A. Davis, 1983;65–85.

Turhan O, Coban E., Inan D., Yalcin A. N, Increased mean platelet volume in chronic hepatitis B patients with inactive disease. *Med Sci Monit* 2010; 16(4): CR202-205.

Vassilios Katsares, ZissisPaparidis, EleniNikolaidou, Ilyana Karvounidou, Karina-Alina Ardelean, NestorasDrossas, NikolaosGrigoriadis, John Grigoriadis. Reference Ranges for Umbilical Cord Blood Hematological Values, *LABMEDICINE j* Volume 40 Number 7 j July 2009.

Wagner JE, Broxmeyer HE, Byrd RL, Zehnbaauer B, Schmeckpeper B, Shah N, et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood*. 1992;79: 1874–81.

Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*. 1995;346: 214–9.

Wang, Xiaohua et al. “Intravenous infusion umbilical cord-derived mesenchymal stem cell in primary immune thrombocytopenia: A two-year follow-up.” *Experimental and therapeutic medicine* vol. 13,5 (2017): 2255-2258.

Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord, *Stem Cell Rev* 2006;2:155-162.

Wishwdeep S. Dhillon, Lothe Pooja, Kristine Ward, Pamela A. Crilley, David Topolsky, and Michael Styler, Mean Platelet Volume Predicts Platelet Engraftment Post Hematopoietic Stem Cell Transplantation, *Blood* 2013 122:5507.

Zaja F, Geromin A, Patriarca F, et al. Prognostic significance of delayed thrombocytopenia after allogeneic stem cell transplant. *Am J Hematol*. 2011;86: 790-792.

EKLER

EK-1

Etik Kurul Onayı

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

2020

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
	ETİK KURUL KODU	2012-KAEK-20
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Levent ÜNDAR	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kordon Kanı Mezenkimal Kök Hücreleri ile Ortalama Trombosit Hacmi Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:KAEK- 946	Tarih: 09.12.2020
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gökçe	Uyruğu	T.C
Soyadı	Ercan	Tel no	
Doğum tarihi	17.07.1990	e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Cemile Hamdi Ongun Lisesi	2009
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü	2014
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü İç Hastalıkları İmmünohematoloji	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Teknokent-Babylife Kordon Kanı Bankası	2015-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	28,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: