



IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

Maternal ve Fetal Serum Örneklerinde Hematopoietik Sitokinler Olan Kök Hücre Faktör (Stem Cell Factor=SCF) ve Granülosit

Yazarlar : Öğrenci H. Yalım Akın, Pınar Yurdakul, Doruk C. Katlan, Gökçen Örgül, M.Sinan Beksaç, Meral Beksaç

Kurum : ANKARA ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞ - AMAÇ

İnsan hematopoietik kök hücreleri (HKH) ve bu hücrelerin proliferasyon ile diferansiyasyonunu düzenleyen sitokinler kemik iliği (Kİ), çevre kanında (PK) ve göbek kordon kanında (KK) bulunur. HKH naklinde kısa dönemli yapılanma sağlayan CD34+ HKH'lerin engrafman kapasitelerinin in vitro belirlenmesine yönelik kullanılan en yaygın yöntem Colony-Forming Unit (CFU) testleridir (Radke vd., 2013). CFU testleri, laboratuvar ortamında Kİ koşullarının yarı-katı besiyerinde taklit edilmesi ve ortama dışarıdan eklenen hematopoietik sitokinler aracılığıyla HKH'lerin proliferasyon ve farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi temeline dayanır. Bu testlerde kültür ortamına başlıca Stem Cell Factor (SCF), Granulocyte - Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte, Macrophage - Colony Stimulating Factor (GM-CSF) olmak üzere çeşitli sitokin kokteylleri eklenerek hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma süreçleri kontrol edilmektedir. Günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan sitokin kaynağı, rekombinant insan proteinleridir. Bu proteinler, standart özelliklere sahip olmaları, hassas konsantrasyonlarda kullanılabilmesi yönünden avantajlı olmakla beraber, çok düşük miktarların pahalı eldesi ve saklama koşullarının zorluğu açısından dezavantajlıdır (Tekkatte vd., 2011). Oysa günümüzde kullanılmayan, eldesi kolay, doğal otolog sitokin kaynakları bir seçenek olarak bu soruna çözüm oluşturabilir. Sınırlı sayıda araştırmada maternal ve fetal dolaşımında, amniyon sıvısında (AS) hematopoietik sitokinler ve interlökinlerin düzey analizi ile hematopoiezi etkileyecek yüksek düzeyde sitokin varlığı gösterilmiştir. Doğuma yaklaşan günlerde anne kanında sıklıkla gözlenen lökositoz da destekleyici bir bulgudur. Bu çalışma, gönüllü bağışçılardan elde edilen maternal plazma, KK plazma ve AS'deki, hematopoiezde kritik rol oynayan SCF ve G-CSF sitokin düzeylerinin serolojik yöntemlerle belirlendiği ve bu kaynakların in vitro KK koloni potansiyeline olan etkisinin araştırıldığı bir ön çalışmadır.

METOD

Çalışmada 25 gönüllü bağışçıdan KK, maternal kan ve AS örnekleri toplanmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı, sitokin düzeylerinin serolojik belirlenmesi amacıyla -20oC'de saklamaya alınmış, kalan örnekler ise bekletilmeksizin CFU-GM testlerinde kullanılmıştır.

KK mononükleer hücreleri (MNC), Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM) içerisinde, 1-5x10⁵ hücre/ml konsantrasyonda hazırlanarak, seri dilüsyonları yapılmış otolog KK plazması/maternal plazma/AS eklenen sitokinsiz MethoCult (StemCell Technologies) besiyerlerinde inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise aynı konsantrasyonda KK kaynaklı MNC, rutin kullanımda olan zengin besiyerine ekilmiştir. 370C'de, %5 CO₂liortamda 14 gün inkübasyon sonrası koloni sayımları gerçekleştirilmiştir.



IV. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRE BİLDİRİSİ

Saklanan örneklerdeki SCF ve G-CSF sitokin düzeyleri, 5 farklı dilüsyonda standart, pozitif ve negatif kontroller dahil edilerek human SCF ve G-CSF ELISA Kit (R&D Systems) ile üreticinin önerdiği protokol doğrultusunda belirlenecektir.

BULGULAR

CFU-GM koloni oluşturma testlerinde pozitif kontrol grubunda beklenildiği şekilde CFU-GM kolonileri oluşmuş, ancak KK plazması, maternal plazma ve AS'nin seri dilüsyonlar halinde uygulandığı hücre kültürlerinde koloni gözlenmemiştir.

KK, maternal plazma ve AS örneklerinde SCF ve G-CSF sitokin düzeyleri ELISA testi ile belirlenecek ve sonuçlar maternal kandaki lökosit konsantrasyonları ile karşılaştırmalı olarak poster sunumunda paylaşılacaktır.

SONUC

Belirlenen alternatif sitokin kaynaklarının CFU-GM testlerinde etkinliği olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç, bu kaynaklardaki sitokin karışımlarının granülosit-makrofaj serisi koloni stimülasyonunu inhibe ettiğini veya örneklerdeki hematopoietik sitokinlerin diğer enflamatuvar sitokinlere oranla daha düşük konsantrasyonlarda olduğunu düşündürmektedir.

Bu doğrultuda çalışmanın devamında KK plazması, maternal plazma ve AS'deki SCF ve G-CSF sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldığında en yüksek ve potent otolog sitokin kaynağının tespitini takiben hematopoietik sitokinlerin membran filtre yardımıyla konsantre edilerek HKH proliferasyonunda rekombinant sitokin kokteyllerine alternatif olarak kullanılması ve daha ekonomik ve etkin bir alternatif olarak rutin kullanıma girmesi hedeflenmektedir.

ANAHTAR KELİMELER

Kordon kanı, Maternal plazma, Amnion sıvısı, Hematopoietik stokinler,CFU