HAKAN YILMAZ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARININ DEPOLAMA SÜRECİNİN İMMÜNMODÜLATUVAR ETKİLERİ

Hakan YILMAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2023

T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARININ DEPOLAMA SÜRECİNİN İMMÜNMODÜLATUVAR ETKİLERİ

Hakan YILMAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum ‘’ERİTROSİT SÜSPANSİYONLARININ DEPOLAMA SÜRECİNİN İMMÜNMODÜLATUVAR ETKİLERİ’’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Hakan YILMAZ
07.01.2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

25/01/2023

Adı Soyadı: Hakan YILMAZ
Anabilim Dalı: İmmünoloji
Tez Konusu: Eritrosit süspansiyonlarının depolama sürecinin immünmodülatuvar etkileri

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
ETİK BEYANI.....II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....III
İÇİNDEKİLER.....IV
TÜRKÇE ÖZET.....VI
İNGİLİZCE ÖZET.....VII
1. GİRİŞ.....1
2. GENEL BİLGİLER.....3
2.1. Hematopoez.....3
2.2. Kanın Bileşenleri ve İşlevleri.....4
2.2.1. Plazma.....5
2.2.1.1. Albüminler.....5
2.2.1.2. Globülinler.....5
2.2.1.3. Fibrinojen.....6
2.2.2. Eritrositler.....6
2.2.2.1. Eritrositlerin İmmün Sistem ile İlişkisi.....7
2.2.3. Trombositler.....9
2.2.4. Nötrofiller.....10
2.2.5. Eozinofiller.....10
2.2.6. Bazofiller.....11
2.2.7. Monositler.....11
2.2.8. Lenfositler.....12
2.3. Kan Bileşenlerinin Elde Edilmesi ve Saklanması.....12
2.4. Transfüzyon.....15
2.4.1. Transfüzyon Reaksiyonları.....15
2.4.1.1. Akut Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu.....16
2.4.1.2. Geç Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu.....17
2.4.1.3. Febril Non-Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu.....17
2.4.1.4. Alerjik Transfüzyon Reaksiyonu.....18
2.4.1.5. Transfüzyonla İlişkili Graft Versus Host Hastalığı.....18
2.4.1.6. Transfüzyonla İlişkili Akut Akciğer Hasarı.....19
2.4.1.7. Transfüzyon ile İlişkili İmmünmodülasyon ve Olası mekanizmaları.....19
2.5. T Hücre.....23
2.5.1. T Hücrelerin Aktivasyonu.....24
2.5.2. T Hücre Alt Grupları.....26
2.5.2.1. Th1 Hücreler.....27
2.5.2.2. Th2 Hücreler.....28
2.5.2.3. Th9 Hücreler.....28
2.5.2.4. Th17 Hücreler.....29
2.5.2.5. Th22 hücreler.....29
2.5.2.6. T_{reg} Hücreler.....29
2.5.2.7. $CD8^+$ Sitotoksik T hücre.....30
2.5.2.7.1. Tc1 hücreler.....30
2.5.2.7.2. Tc2 hücreler.....31

2.5.2.7.3. Tc9 hücreler.....31
2.5.2.7.4. Tc17 hücreler.....31
2.5.2.7.5. Tc22 hücreler.....32
2.5.2.7.6. Tc düzenleyici hücreler ($CD8^+$ T_{reg}) 32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....33
3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler.....33
3.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler.....34
3.3. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması.....35
3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PKMNH) İzolasyonu.....37
3.5. Hücre Sayımı.....38
3.6. T Hücrelerin İmmünofenotiplendirmesi ve Canlılık Analizi.....39
3.7. PKMNH'lerin CFSE ile İşaretlenip T Hücrelerin Proliferasyon Becerisinin Akım Sitometre ile Analizinin Yapılması.....41
3.8. T Hücre Aktivasyon Belirteçlerinin Akım Sitometrik Analizi.....43
3.9. MTT Yöntemi ile Canlılık Analizleri.....45
4. BULGULAR.....47
4.1. T Hücrelerin Canlılık Sonuçları.....47
4.2. T Hücrelerin Proliferasyon Sonuçları.....49
4.3. T Hücre Aktivasyon Sonuçları.....51
4.4. MTT Analiz Sonuçları.....53
4.5. Bağışçı kan değerlerinin depolama süresindeki değişimleri.....57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....61
6. KAYNAKLAR.....66
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....79
8. EKLER.....80
9. TEŞEKKÜR.....82
10. ÖZGEÇMİŞ.....83

TÜRKÇE ÖZET

Allojeneik kan transfüzyonu sonucunda alıcıda meydana gelen reaksiyonların en önemlilerinden biri transfüzyonla ilişkili immün modülasyondur (TRIM). Kanın depolama süresi, allojeneik lökositler ve daha birçok etkenin TRIM'e neden olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda TRIM gelişimine yönelik yeni bilgiler elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda üç adet bağışçıdan alınan tam kanlardan eritrosit süspansiyonları (ES) elde edildi. ES'lerin 0, 7, 14, 21 ve 42. depolama günlerinde torbalardan alınan kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreleri (PKMNH) izole edildi. $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon, aktivasyon ve canlılık düzeylerindeki değişimler akım sitometre cihazı yardımıyla değerlendirildi. Ayrıca bir kişiden EDTA'lı tüpe alınan 30 mL kandan PKMNH'leri ve granülositler izole edildi. Kanın depolama sürecinde kullanılan CPD ve SAG-M solüsyonlarının bu hücrelerin canlılığına olan etkisi incelendi.

Sonuç olarak 21. günden sonra ES içindeki T hücre canlılığının ilk günlere oranla azaldığı ve 42. güne gelindiğinde ölü T hücre oranının %90'ların üzerine çıktığı belirlendi. 21 ve 42. günlerde CD3 hücre düzeyinin %0,1-%0,2'lere düştüğü görüldü. T hücrelerin poliferasyon yeteneğinin 14. günden sonra en alt seviyeye indiği görüldü. Ayrıca ES'ler elde edildikten sonra 18 saat içinde aktivasyon belirteç (CD25, CD69, CD154) düzeylerinin azalmaya başladığı belirlenmiştir. CPD ve SAG-M solüsyonlarının ayrı ayrı uygulanmasının PKMNH ve granülositlerin canlılığını azalttığı, ancak transfüzyonu simüle eden konsantrasyonlar olan %12 CPD ve %88 SAG-M karışımının canlılığa etkisi olmadığı, sadece PKMNH'lerine 10 μL'lik konsantrasyonda pozitif etki yaptıkları görülmüştür.

21 ve 42. günlerde, depolanan ES'lerin TRIM'e neden olabileceği düşünülmüştür. Ancak daha fazla kişi ve farklı yöntemler kullanılarak alıcıdaki etkilerinin görülebilmesi için ek çalışma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: İmmünoloji, İmmünmodülasyon, Transfüzyon, TRIM, T hücre

İNGİLİZCE ÖZET

Immunomodulatory Effects of the Storage Process of Erythrocyte Suspensions

One of the most important reactions that occur in the recipient as a result of allogeneic blood transfusion is transfusion-associated immune modulation (TRIM). The storage time of blood, allogeneic leukocytes and many other factors is thought to cause TRIM. Our study, it is aimed to obtain new information about the development of TRIM.

In our study, erythrocyte suspensions (ES) were obtained from whole blood donated by three donors. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples taken from bags on storage days 0, 7, 14, 21, and 42 of ESs. Changes in proliferation, activation, and viability of $CD3^+$, $CD4^+$, and $CD8^+$ T cells were evaluated by flow cytometry. In addition, PBMCs and granulocytes were isolated from 30 mL of blood collected in EDTA tube from one individual. The effect of CPD and SAG-M solutions used in the blood storage process on the viability of these cells was investigated.

As a result, it was determined that the T cell viability in ES decreased after the 21st day compared to the first days, and the rate of dead T cells increased above 90% by the 42nd day. It was observed that CD3 cell level decreased to 0,1%-0,2% on the 21st and 42nd days. It was observed that the proliferation ability of T cells decreased to the lowest level after the 14th day. In addition, it was determined that activation marker (CD25, CD69, CD154) levels started to decrease within 18 hours after ESs were obtained. It has been observed that the separate application of CPD and SAG-M solutions reduces the viability of PBMC and granulocytes, but the concentrations simulating the transfusion, 12% CPD and 88% SAG-M mixture, have no effect on viability, and they also has been observed a positive effect on PBMC at a concentration of 10 µL.

On days 21 and 42, it was thought that stored ES could cause TRIM. However, additional studies are required to see the effects on the recipient by using more people and different methods.

Keywords: Immunology, Immune modulation, Transfusion, TRIM, T cell

1. GİRİŞ

Kan transfüzyonu hayat kurtaran tıbbi uygulamalardan biri olsa da bazı durumlarda allojeneik kan transfüzyonu (AKT) sonucunda alıcının immün sisteminde bazı değişiklikler meydana gelebilmektedir. Transfüzyonun ciddi komplikasyonlarından biri olan transfüzyonla ilişkili immün modülasyon (Transfusion Related Immune Modulation; TRIM), AKT sonrasında alıcının immün sisteminin işleyişindeki birtakım değişiklikleri ve bunların transfüzyon alıcısına olan etkilerini tanımlamaktadır. TRIM ilk kez 1973 yılında, böbrek nakli bekleyen hastalara yapılan transfüzyonların greft ömrü üzerindeki olumlu etkilerinin gözlemlenmesiyle tanımlanmıştır (Opelz, Sengar, Mickey & Terasaki, 1973). Daha sonraları ise küratif cerrahi öncesi AKT alan hastalarda tümör büyümesinin ve metastaz gelişiminin hızlandığı bildirilmiş ve AKT ile kanser nüksü arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür. AKT'nin bu etkilerinin gözlenmesi ile birlikte transfüzyonun, alıcının immün sistemi üzerindeki etkilerinin incelenmesi ilgi çekici bir alan haline gelmiştir (Gantt, 1981).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda AKT'nin kanser nüksleri, ameliyat sonrası bakteriyel enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve latent enfeksiyonların reaktivasyonu gibi çok sayıda klinik tablo ile ilişkisi incelenmiş ancak bu görüşler randomize kontrollü çalışmalarla desteklenememiştir. Yapılan bir çalışmada spontan abortusları olan kadınlara gebelik öncesi eşlerinden alınan lenfositlerin verilmesi ile abortusun azaldığını (Mowbray ve ark., 1985), Crohn hastalığı nedeni ile ameliyat edilen ve bu sıradada AKT alan hastalarda ise Crohn hastalığı nüks sıklığının almayanlara oranla çok daha az olduğu belirlenmiştir (Peters, Fry, Fleshman, & Kodner, 1989) daha sonra bunlara benzer çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmaların sonucunda AKT sonrası ortaya çıkan bu klinik bulgulara neden olabilecek bazı immünolojik değişiklikler ortaya konulmuştur. Bu değişikliklere, yardımcı T hücre sayısında, T hücre yanıtında, doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücre fonksiyonunda ve CD4/CD8 T hücre oranında azalma örnek olarak gösterilebilir. Bunların dışında antijen sunum özelliğinin yetersiz kalması, geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarının azalması, lenfosit blastogenezinin baskılanması, IL-2 ve IFN-γ üretimi ile monosit/makrofaj fagositik fonksiyonlarının azalması da ortayaçıkan

değişikliklere örnek olarak verilebilir (Blajchman, & Bordin, 1994; Brunson, & Alexander, 1990).

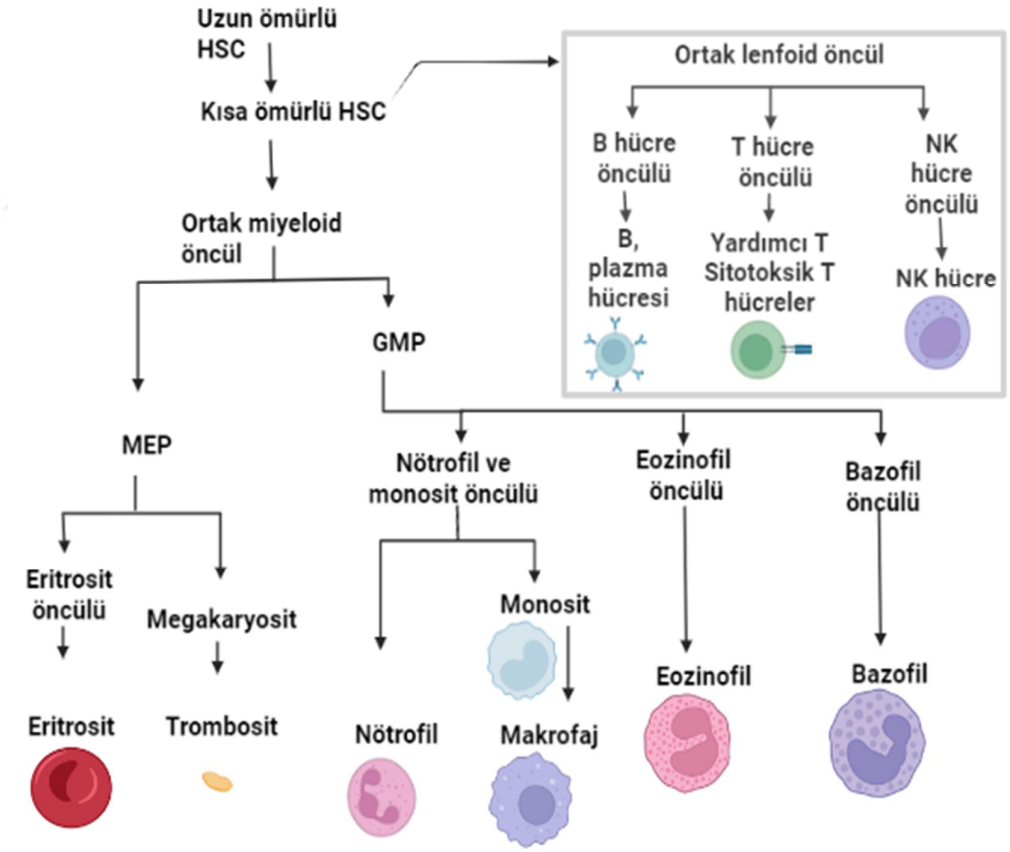
Bu bulgulara istinaden yapılan bazı çalışmalar sonucunda AKT alıcısında görülen immünolojik değişikliklerin ve TRIM fenomeninin nedeni olarak birtakım süreçler ve biyolojik yapılar hedef gösterilmiştir. Bunlardan en önemlisi de bağışçıdan geçen allojeneik lökositler veya bunlardan salınan birtakım mediyatörler (Bordin, Heddle, & Blajchman, 1994) ile eritrosit süspansiyonu (ES) depolama süresi ve depolama koşullarıdır (Mynster, Dybkjoer, Kronborg, & Nielsen, 1998).

Bu çalışma ile ES içinde bulunan $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon, canlılık ve aktivasyon düzeylerinde depolama süresi/koşullarının etkisiyle meydana gelecek değişiklikleri incelemek ve TRIM'i açıklamaya destek olacak yeni bilgilere ulaşmak amaçlanmıştır. Depolama süreci boyunca bu hücrelerde meydana gelen değişimlerin yanı sıra ES depolamada kullanılan ek solüsyonların ve eritrositlerin, periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMNH) ve granülosit hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri de değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Tüm kan hücreleri, bunların öncüllerini (progenitörlerini) meydana getirebilen ve farklılaşmamış hücreler olan pluripotent hematopoietik kök hücreler adı verilen hücre popülasyonundan türemiştir. Bir pluripotent kök hücre bölündüğünde, iki yavru hücresi ya pluripotent kök hücreler olarak kalır ya da belirli bir gelişimsel yola bağlanır. Şekil 1'de gösterildiği gibi ilk dallanma, ya T, B, NK gibi lenfositleri oluşturan lenfoid kök hücreleri ya da diğer tüm çeşitlerin ataları olan miyeloid kök hücreleri meydana getirir (Hatton, Hay, & Keeling, 2017).

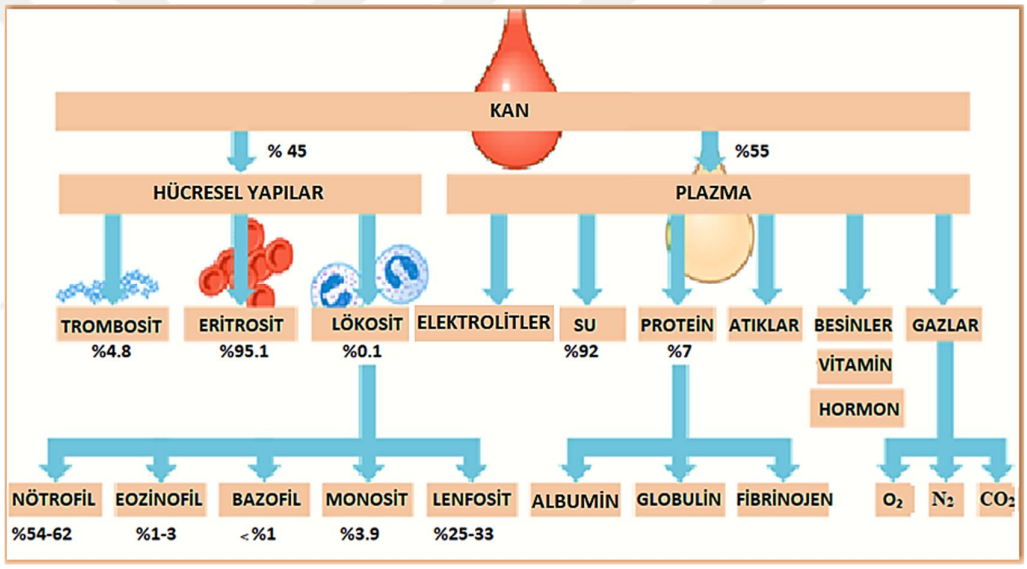


Şekil 1. Hematopoez sürecinin şematik gösterimi. HSC*, hematopoietic stem cell:* hematopoetik kök hücre*;* GMP*, granulocyte-macrophage progenitor:* granülosit-makrofaj öncülü; MEP*, megakaryocyte erythroid progenitor;* megakaryosit/eritroid öncülü NK*, natural killer;* doğal katil. Hatton ve ark., (2017)'dan biorender.com kullanılarak modifiye edilmiştir.

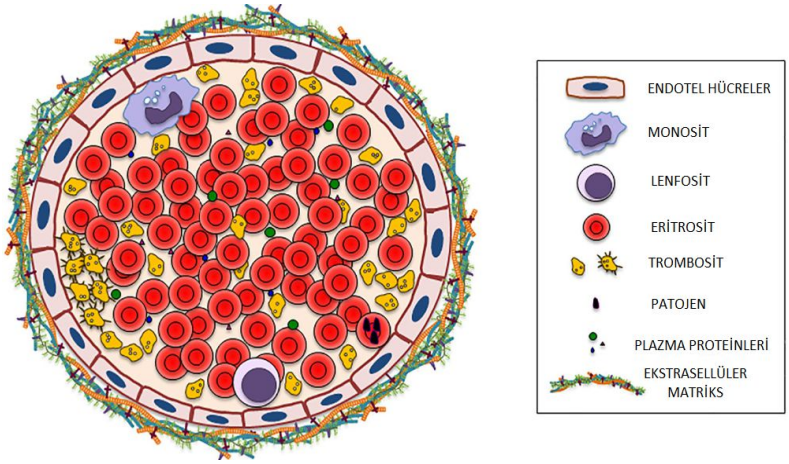
2.2. Kanın Bileşenleri ve İşlevleri

Kan; damar ağının içinde dolaşan, akıcı plazma ile eritrosit, lökosit ve trombosit gibi hücre tiplerinden meydana gelmiş ve oksijen (O_2), besin maddeleri, hormon, vitamin gibi yapıları dokulara taşıyıp aynı zamanda ortaya çıkan karbondioksit ve atık maddeleri de vücuttan uzaklaştıran, pıhtılaşmayı sağlayan, hücresel ve humoral bağışıklıkta görev alan yaşamsal bir sıvıdır (Türk, 2021).

Şekil 2'de gösterildiği gibi kan şekilli elemanlar ve sıvısal kısımdan oluşmakta ve bunların herbiri kendi içinde farklı yapılar ihtiva etmektedir. Şekil 3'te ise damar yapısı ve içerinindeki bazı hücre tipleri gösterilmiştir.



Şekil 2. Kanın sıvısal ve şekilli elemanları (Shier, Butler, & Lewis, 2012)'den esinlenilmiştir.



Şekil 3. Damar bölümü ve içerisindeki bazı hücreleri, plazma proteinlerini, bakterileri ve hücre dışı matrisi gösterir. Pretini ve ark., (2019)'dan esinlenilmiştir.

2.2.1. Plazma

Plazma, suda çözünmüş çok sayıda organik ve inorganik maddeler ile birlikte, fibrinojen ve pıhtılaşmaya katılan diğer proteinlerden oluşur. Ayrıca besinler, metabolik atık ürünleri, hormonlar ve Na, K, CI gibi çeşitli mineral ve elektrolitler plazmanın içeriğini oluşturmaktadır. Bunlar ozmotik basınç üzerinde büyük rol oynayarak hücre dışı sıvının kılcal damarlarla emilmesini kolaylaştırırlar.

Plazmada en bol bulunan yapı plazma proteinleridir. Plazma proteinlerinin konsantrasyonu düştükçe ozmotik basınç da düşerek sıvının interstisyel boşluklarda birikmesine neden olur böylece dokular şişer ve ödem oluşur. Ağırlık olarak plazmada çözünen maddelerin çoğunu oluşturan bu yapılar albuminler, globulinler ve fibrinojen olmak üzere üç geniş gruba ayrılmaktadır (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

2.2.1.1. Albuminler

Albüminler plazma proteinlerinin yapı olarak en küçüğüdür ancak %60'şını oluştururlar. Karaciğerde sentezlenen albuminler fazla miktarda olmaları ve suyu kılcal damarlarda tutma gibi özelliklerinden dolayı plazmanın ozmotik basıncının önemli bir belirleyicisidirler. Böylece, diğer plazma proteinleri ile birlikte kan ve dokular arasındaki su hareketini düzenlemeye yardımcı olurlar (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

2.2.1.2. Globulinler

Plazma proteinlerinin yaklaşık %36'sını oluşturan globulinler, alfa, beta ve gama-globulinler olarak alt gruplara ayrılabilirler. Alfa ve beta-globulinler lipitlerin ve yağda çözünen vitaminlerin taşınması da dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahiptirler ve karaciğerde sentezlenirler. Bir tür antikor olan gama-globulinler ise lenfatik dokularda üretilirler (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

2.2.1.3. Fibrinojen

Karaciğerde sentezlenen ve plazma proteinlerinin yaklaşık %4'ünü oluşturan fibrinojen ise kan pıhtılaşmasında işlev görür ve plazma proteinlerinin en büyüğüdür (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

2.2.2. Eritrositler

Kemik iliğinin, özellikle de kırmızı kemik iliğinin yumuşak iç kısmında üretilen eritrositlerin ana işlevi gaz taşınmasıdır; akciğerler tarafından alınan oksijeni ve hücreler tarafından üretilen karbondioksiti taşımaktadırlar. Eritrositlerin oksijen taşıma işlevi içerisinde bulunan hemoglobin moleküllerindeki demir atomlarına bağlanarak gerçekleşmektedir. Bikonkav bir disk şeklindedirler ve şekil ile boyutlarının (7 μm çap) eritrositlere kazandırdığı yüksek yüzey-alan-hacim oranı sayesinde taşınacak olan oksijen ve karbondioksit hücrenin içine veya hücreden dışarıya hızla difüze olmaktadır (Pretini ve ark., 2019; Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

Eritrositler gelişim ile birlikte çekirdeklerini ve organellerini, yani protein sentezi mekanizmalarını kaybederler. Bu nedenle ne kendilerini çoğaltabilirler ne de normal yapılarını çok uzun süre koruyabilirler. Bundan dolayı bir eritrositin ortalama ömrü yaklaşık 120 gündür (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014). Sağlıklı bir yetişkinde saniyede 2 milyon yeni eritrosit kemik iliğinden dolaşıma girerken aynı zamanda yaklaşık 2 milyon eritrosit de yok edilir (Higgins, 2015). Hasarlı veya ölmekte olan eritrositlerin yıkımı normal olarak dalakta ve karaciğerde meydana gelir. Eski eritrositler yok edilirken, demirleri plazmaya salınır ve transferrin adı verilen demir taşıyan bir plazma proteinine bağlanırlar. Transferrin, bu demirlerin neredeyse tamamını yeni eritrositlere dahil edilmek üzere kemik iliğine iletir. Böylelikle eritrositlerdeki demir atomlarının yeniden dolaşımı sağlanır (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

2.2.2.1. Eritrositlerin İmmün Sistem ile İlişkisi

Lökosit, monosit, granülositler dışında kalan kanın diğer hücrelerinin (eritrosit veya trombositler gibi) bağışıklık sisteminin genel aktivitesine katkıda bulunmayacağı zannedilir. Ancak, eritrositlere dair yapılan araştırmaların tümü, durumun böyle olmadığını düşündürmektedir. Bu araştırmalardan yola çıkarak eritrositlerin enflamatuar durumlara dahil olması ve diğer hücreler ile arasındaki spesifik etkileşimi üzerine çalışılmaya başlanmıştır. Bu çalışmaların çoğu da eritrositlerin bağışıklık hücrelerinin işlevini değiştirmede oynadığı role odaklanmıştır (Karsten, & Herbert, 2020). Yapılan çalışmalarda kan transfüzyonlarının immün düzenleyici aktivitesinden sorumlu mekanizmalar hala belirsiz olsa da, eritrositlerin T ve B hücrelerinin immünolojik parametrelerini düzenleyebileceği gösterilmiştir (Arosa, Pereira, & Fonseca, 2004). Bu işlevleri hücre hücre teması veya sitokinler, kemokinler gibi aracılarla gerçekleştirebilirler. Ancak eritrositlerin sitokin ve kemokinlerle olan bağlantısına dair sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde eritrositlerin lizatında 45'e kadar farklı sitokin olduğu keşfedilmiştir (Karsten, Breen, & Herbert, 2018). Başka bir çalışmada ise sağlıklı bireylerin eritrosit lizatlarında IL-33 tanımlanmıştır (Wei & ark., 2015). IL-33 özellikle ölmekte olan veya ölü hücrelerden salınan bir nükleer proteindir. Bu yüzden çekirdeksiz bir hücre olan eritrositlerdeki varlığı beklenmedik bir durumdur. Wei ve ark. yaptıkları çalışma ile IL-33'ün eritroid progenitör hücrelerde eksprese edildiğini, böylelikle bu proteinin hücrelerde çekirdekli olduklarından beri mevcut olduğunu belirlemişlerdir. IL-33'ün salınımının Th2 sitokinlerinin salgılanmasını uyardığı ve alerjik enflamasyonu uyarmada anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Bu da eritrositlerin immün sistemi etkileme yollarından biridir (Karsten, & Herbert, 2020).

Diğer taraftan eritrositler mikropartikül üretirler. Üretim miktarı da eritrositler yaşlandıkça ve depolama süresi arttıkça daha da artış gösterir (Said, Rogers, & Doctor, 2018). Bu mikropartiküllerin de çeşitli hücreleri, sitokinleri etkilediği belirlenmiştir (Danesh ve ark., 2014; Sadallah, Eken, & Schifferli, 2008).

Bunların dışında eritrositlerin immün sistem hücre veya süreçlerine çeşitli yollarla etki edebileceği gösterilmiştir. Bu alanda yapılan çalışmaların birinde, eritrositlerin, taze izole edilmiş T hücreler üzerindeki etkisi in vitro olarak

araştırılmıştır. Sonuç olarak T hücrelerin uyarılarak sağlıklı ve taze otolog eritrositlerle muamele edilmesinin, T hücre aktivitesini önemli ölçüde değiştirdiği bildirilmiştir (Fonseca, Porto, Uchida, & Arosa, 2001). Daha sonra bu etkiler eritrosit lizatlarının kullanımı, enflamatuvar durumda olan kişilerin eritrositlerinin kullanımı (Profumo ve ark., 2011) ve eritrosit T hücre temasının kesilmesi ile (long ve ark., 2014) kültür ortamında tekrar edilmiştir. Ancak taze, sağlıklı ve T hücrelerle temas halinde olan eritrosit kültürü ile benzer sonuçlar elde edilememiştir (Karsten, & Herbert, 2020).

Araştırmacılar eritrositlerin, daha fazla çoğalmaları için T hücrelerini uyardığını ve T hücreleri için apoptoza karşı koruyucu olduğunu keşfetmişlerdir. Bununla ilişkili olarak da insan $CD3^+$ T hücrelerinin, aktivasyondan 30 dakika sonra hücre içi ROS ürettiği ve eritrositlerin de $CD3^+$ T hücrelerin ROS üretimine karşı koyarak apoptozu inhibe edip bu yolla da T hücre bölünmesini desteklediği gösterilmiştir (Fonseca ve ark., 2001).

Bunlarla birlikte eritrositlerin diğer hücreler üzerindeki etkisine dair çalışmalar mevcuttur. 1980'lerde yapılan iki çalışma ile, periferik kan lenfosit kültürlerinde insan, fare veya koyun eritrositlerinin varlığının, lenfosit proliferasyonu, sitokin salgılanması, antikor sentezi ve doğal öldürücü hücre aktivitesi ve T, B hücre aktivitelerini etkilediğini bildirilmiştir (Nowaczyk, & Skopińska-Rózewska, 1981; Yannelli ve ark., 1988). Farklı klinik ortamlarda ise B hücre sayılarını ve immünoglobulin sekresyonunu da etkilediği gösterilmiştir (Giacchino ve ark., 1982; Akbar, Giardina, Hilgartner, & Grady, 1985). Bu çalışmalardan sonra da Virella ve ark. otolog eritrositlerin B hücresi aktivitesi üzerindeki etkisini araştırıp immünoglobülinlerin ve proinflamatuar sitokin IFN-ɣ'nın salgılanmasında önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir (Virella ve ark., 1988). Ayrıca eritrositlerin diğer immün sistem hücreleri ile olan etkileşimini gösteren başka bir çalışmada ise sağlıklı donörlerden alınan eritrositlerin dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve bu süreçte IL-12 salgılanmasını kısıtladığı gösterilmiştir. Bunun, dendritik hücrelerin aşırı uyarımını ve in vivo proinflamatuar sitokinlerin hiper salınımını kontrol etmek için meydana gelmiş bir mekanizma olduğu öne sürülmüştür. Bunun dışında doğal öldürücü (NK) hücrelerin, eritrositlerin varlığında tümör hücrelerine karşı daha sitotoksik olduğu da gösterilmiştir (Karsten, & Herbert, 2020).

Eritrositler oksijen ve karbondioksit taşımak, diğer hücreler ile çeşitli etkileşimler kurmak ve homeostaz ile kan akış dağılımını sağlamalarının dışında doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde de yer alırlar (Minasyan, 2018). Bu işlevlerini de kan dolaşımındaki bakterilerin temizlenmesi yoluyla yaparlar. Bu süreci ise oksitoz ile gerçekleştirmektedirler. Oksitoz, kan akışıyla hareket eden bakterilerin sürtünme ile elektik yüklendiği ve sonuç olarak eritrositlere doğru çekildiği anlamına gelmektedir (Minasyan, 2016). Bu temas, oksijenin oksihemoglobinden eritrosit yüzeyine salınmasına ve böylece bakterilerin öldürülmesine neden olur. Daha sonra triboelektrik yükü azalır ve bakteriler eritrositlerin yüzeyinden yıkanarak karaciğerde veya dalakta sindirilir (Minasyan, 2018).

Eritrositler immün sistem hücreleriyle çeşitli etkileşimlere girmelerinin yanında çeşitli parazitler için konak görevi üstlenerek onların immün hücrelerden kaçışına da aracılık etmiş olurlar. Sıtma parazitleri, eritrositlerin içinde çoğalarak, gelişir ve hemoglobini hemozoin olarak bilinen kristallere dönüştürerek sindirebilirler (Parroche ve ark. 2007). Bu mekanizmayı aynı zamanda, eritrositlere bağlanarak viral enfektiviteyi zenginleştiren HIV-1 virionları ve Zika virüsü de kullanmakta ve bunlar da eritrositlerin içinde saklanabilmektedirler (Beck ve ark. 2009). Bu nedenle eritrositlere bağlanan veya eritrositlerce içselleştirilen patojenler konakçı için hem avantajlı hem de dezavantajlı duruma gelebilmektedirler (Anderson, Brodsky, & Mangalmurti, 2018; Baum, Ward, & Conway, 2002; Morera, & MacKenzie, 2011).

2.2.3. Trombositler

Trombositler oldukça küçük, çekirdeksiz megakaryosit parçalarıdır. Ortalama hacimleri 7.5 fl ve boyutları 1-4 μm olan trombositler eritrositlerden ortalama 14 kat daha küçük bir yapıya sahiptirler (Sola-Visner, Saxonhouse, & Brown, 2008). Sağlıklı bir insan kanındaki trombosit sayısı $150\text{-}450\times10^9$/L arasında değişmektedir. 7-10 gün yaşayan trombositlerin 1/3'ü ana depo organları olan dalakta, 2/3'ü ise dolaşımda bulunmaktadır ve böylece primer hemostazda ve pıhtılaşma mekanizmasında görev almaktadırlar (Emmons ve ark., 1996; Sola-Visner ve ark., 2008).

Bazı hastalıklarda trambosit transfüzyonuna ihtiyaç duyulmaktadır ve her an ulaşılabilmesi mümkün olmadığı için depolanırlar. Oda sıcaklığında

depolandıklarından dolayı bakteriyel kontaminasyon riskleri yüksektir bu nedenle saklama süreleri beş gündür. Beş gün sonunda trombositler canlılığının %20-25'ini kaybetmektedirler. Depolama sürecinde trombositlerin canlılığını korumak için oksijen alışverişini sağlayabilecek şekilde üretilmiş olan torbalar kullanılır ve belirli devirde sürekli çalkalanırlar (Örüç, & Yenicesu, 2016).

2.2.4. Nötrofiller

Nötral boya ile açık mor görünen ince sitoplazmik granüllere sahiptir. Daha yaşlı bir nötrofilin çekirdeği lobludur ve iki ila beş segmentten oluşur, bu nedenle bu hücrelere bazen segmentler denilmektedir. Çekirdekleri C şeklinde olduğundan daha genç nötrofillere bantlar da denir. Yarılanma ömürleri ise kısadır bu nedenle nötrofiller ile ilgili tesler genellikle taze kandan çalışılırlar ayrıca tipik bir kan örneğindeki lökositlerin %54-62'sini oluşturmaktadır (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

Enfeksiyonla savaşmak ve doku homeostazını korumak için ilk savunma hattı olan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin polimorfonükleer granülositleridir (Mestas, & Hughes, 2004) ve antimikrobiyal bileşikler, serin proteazlar, lizozim, defensinler, metaloproteazlar ve oksidatif hasara aracılık eden sitotoksik faktörlerin içerisinde depolandığı granülleri içerirler. Başlıca işlevleri de, degranülasyon, fagositoz ve hücre dışı tuzaklarının (miyeloperoksidaz, elastaz ve defensinler gibi proteinler) salınmasıdır (Amulic, Cazalet, Hayes, Metzler, & Zychlinsky, 2012).

2.2.5. Eozinofiller

Asidik eosin boyasında koyu kırmızı görünen düzgün boyutlu sitoplazmik granüllere sahiptirler. Çekirdeğin genellikle yalnızca iki lobu vardır. Eozinofiller, dolaşımdaki toplam lökosit sayısının %1-3'ünü oluştururlar (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014). Helmint reaksiyonlarında önem arzetmektedirler ve enfektif helmint larvalarına yapışıp onları öldürebilirler. Ölü veya ölmekte olan parazitlerin etrafındaki eozinofil granül protein birikimi, enfekte hastalardan alınan doku biyopsilerinde de gösterilmiştir (Klion, Ackerman, & Bochner, 2020). Ayrıca

eozinofillerin varlığının insanlarda mantar enfeksiyonunda koruyucu olduğunu düşünülürken, yayılmış veya daha şiddetli mantar hastalığı ile ilişkili olduğu da görülmektedir (Harley, & Blaser, 1994).

2.2.6. Bazofiller

Çekirdeklerinin boyutu ve şekli bakımından eozinofillere benzer, ancak koyu maviye dönüşen daha az sayıda, daha düzensiz şekilli sitoplazmik granüller bulundururlar. Bazofiller genellikle dolaşımdaki lökositlerin %1'inden daha azını oluşturmaktadırlar (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014). Azınlık olmalarının yanında çok önemliler ve esas olarak aşırı duyarlılık ve anafilaktik reaksiyonlarda yer alan dolaşımdaki kan granülositleridirler (Karasuyama, Mukai, Tsujimura, & Obata, 2009; Schroeder, 2009).

2.2.7. Monositler

Monositler genellikle kırmızı kemik iliğinden kaynaklanırlar. En büyük kan hücreleri olan monositler, eritrositlerden iki ila üç kat daha büyüktür. Çekirdeklerinin şekli değişiklik gösterir, bunlar yuvarlak, böbrek şeklinde, oval veya loblu olabilirler.

Genellikle bir kan örneğindeki lökositlerin %3-9'unu oluştururlar ve birkaç hafta hatta aylarca yaşarlar (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014).

Monositler, viral, bakteriyel, fungal veya paraziter enfeksiyonlara karşı tepkiler sağlayan bağışıklık sisteminin doğal koluna aittir (Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008; Saha, & Geissmann, 2011). İşlevleri arasında fagositoz yoluyla patojenlerin öldürülmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS), nitrik oksit (NO), miyeloperoksidaz ve enflamatuar sitokinlerin üretimi yer almaktadır (Saha, & Geissmann, 2011). Spesifik koşullar altında monositler, kanser ve bulaşıcı ve otoimmün hastalıklar sırasında T hücresi tepkilerini uyarabilir veya inhibe edebilir. Aynı zamanda doku onarımı ve neovaskülarizasyonda da yer alırlar (Nahrendorf 2007).

2.2.8. Lenfositler

Lenfositler genellikle eritrositlerden biraz daha büyüktür. Tipik bir lenfosit, ince bir sitoplazma kenarı ile çevrelenmiş geniş, yuvarlak bir çekirdeğe sahiptir. Bu hücreler dolaşımdaki lökositlerin %25-33'ünü oluştururken yıllarca yaşayabilmektedirler (Shier ve ark., 2012; Widmaier ve ark., 2014). Lenfositler T, B ve NK olarak sınıflandırılabilirler. T hücreler ve alt grupları hücre aracılı immünitede enfeksiyonlarla mücadelede ve B hücrelere antikor üretiminde yardım etmek gibi süreçlerde rol almaktadırlar. B hücreler ise antikor üretirler ve humoral immün yanıtta hücre dışı mikroorganizmaların ve mikrobiyal etmenlerin ortadan kaldırılmasına aracılık etmektedirler. NK hücreleri de sitotoksik etkileri sayesinde enfekte hücrelerin ve enfeksiyon ajanlarının ortadan kaldırılmasını sağlamaktadırlar (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2018).

2.3. Kan Bileşenlerinin Elde Edilmesi ve Saklanması

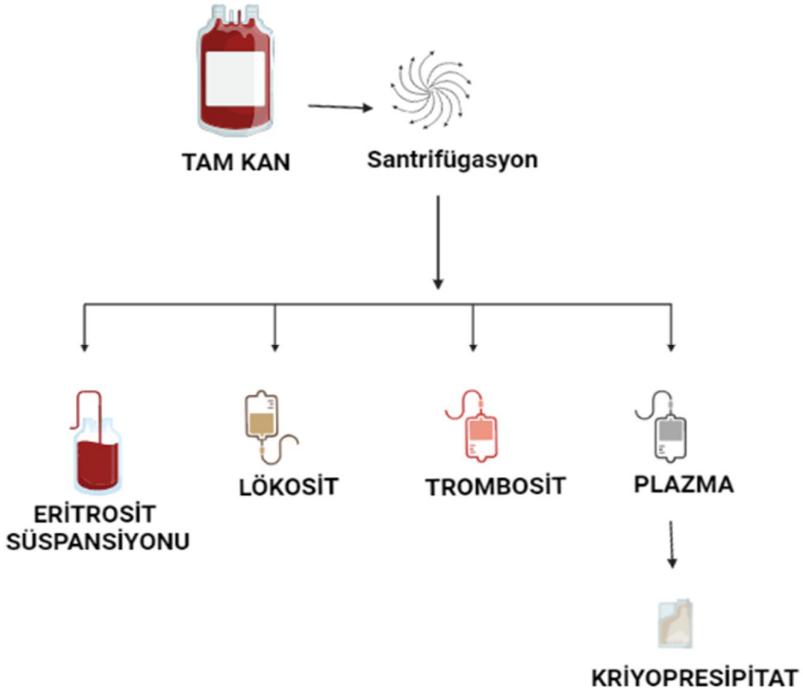
Kan transfüzyonu sadece gerekli durumlarda tam kan olarak yapılmaktadır. Bunun dışında kan bileşenleri ayrı ayrı elde edilerek saklanmakta veya gerekli olan kan bileşeni hastalara transfüze edilmektedir. Bileşenlerine ayrıldığında elde edilen kan ürünleri kullanıldığı takdirde birden fazla hastanın farklı ihtiyaçlarını karşılamakta, ayrıca kanın bileşenlerine ayrılması sayesinde de tek bileşene ihtiyaç duyan hastaya gereksiz volüm yüklenmesinin önüne geçilmektedir. Kanın bileşenlerine ayrıştırılarak kullanılması tedavi başarısını artırırken yan etkilerini de azaltmaktadır. Ayrıca bu şekilde elde edilen kan ürünleri daha uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Sağlıklı bir donörden alınan tam kandan, eritrosit, trombosit süspansiyonları, taze donmuş plazma ve kriyopresipitat gibi kan bileşenleri elde edilir ve gerekli koşullarda saklanarak klinik olarak kullanıma sunulur (Heper ve ark., 2022; Örüç, & Yenicesu, 2016).

Günümüzde direkt tedavi veya ileriki tedavi süreçleri için depolama amacıyla kan bileşenlerinin elde edilmesinde 2 yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri aferez diğeri ise santrifügasyondur.

Aferez kanın bir bileşeninin alınıp, geriye kalan kısmının donöre geri verilmesi işlemidir. Aferez için santrifüj, filtrasyon ve adsorpsiyon teknikleri kullanılmaktadır. Aferez ile periferik kök hücre, granülosit, lenfosit, trombosit ürünleri elde edilebilmekte ve bu sayede bileşen değişimi ve immünoterapi tedavileri uygulanabilmektedir (Heper ve ark., 2022; Örüç, & Yenicesu, 2016).

Santrifügasyon işleminde, bağışçıdan tam kan alındıktan sonra kan torbası santrifüj edilmektedir. Bu sayede tam kan bileşenlerine ayrıştırılmaktadır. Kan satrifüj edildiğinde alta çöken bölümden ES elde edilir. Ortada kalan kısım buffy coat ve en üstte kalan kısım ise taze plazma olarak ayrışmaktadır. Buffy coat'un yeniden ayrıştırılmasıyla trombosit süspansiyonu elde edilir. Taze plazma saklanmak üzere dondurulduğunda ise taze donmuş plazma adını alır. Kriyopresipitat ürünü de taze plazma'dan elde edilmektedir (Heper ve ark., 2022; Örüç, & Yenicesu, 2016).

Yeni tip santrifüj sistemlerinde tam kan torbası tam otomatik cihazlar ile santrifüj edilmektedir. Bunun sonucunda kanın bütün bileşenleri birbirinden ayrılarak ana torbaya bağlı olan torbalara steril koşullarda aktarılır. Tam kan ve tam kandan elde edilen kan bileşenleri Şekil 4'de gösterilmiştir.

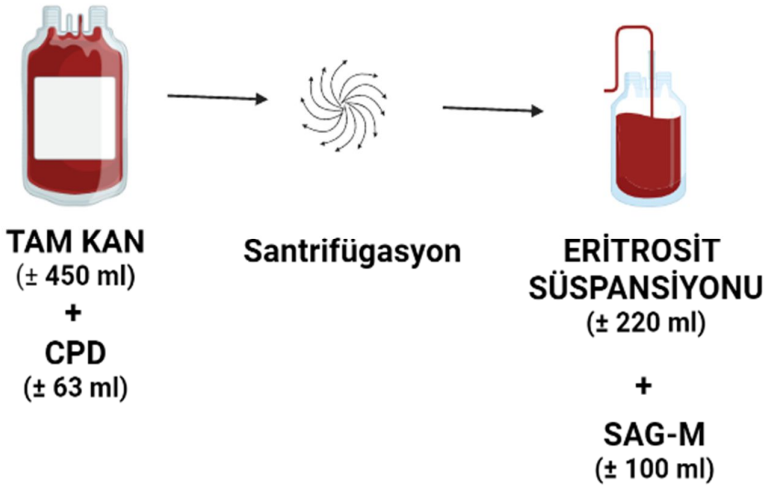


Şekil 4. Tam kandan santrifüj sonrası elde edilen kan bileşenlerinin temsili görüntüsü (biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur).

Kanın saklama süresini artırmak için değişik antikoagülan ve koruyucu sıvı kombinasyonları denenmiştir. Genellikle CPDA-1 (*Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine*) ACD (*Acid-Citrate-Dextrose*) ve CPD (*Citrate-Phosphate-Dextrose*) kullanılmaktadır. Ayrıca şekil 5'te gösterildiği gibi CPD içeren torbalardaki ES'lere SAG-M (Salin-sodyum klorür, Adenin, Glukoz, Mannitol) eklenerek depolama süresi uzatılmaktadır. Bunların dışında, ülkemizde pek kullanılmayan, Adsol, Nutricel, Optisol, MAP ve PAGGSM gibi ek solüsyonlar da mevcuttur. Bu depolama işlemleri için ek solüsyonlar ürünlere farklı raf ömrü kazandırmaktadır. Bunlar;

- ACD ve CPD 21 gün,
- CPDA-1 35 gün,
- SAG-M ise 42 gündür

Trombositler ise gaz geçiren trombosit torbaları kullanılarak oda sıcaklığında 5 gün boyunca depolanabilmektedirler. Taze donmuş plazma, kriyopresipitat ve kriyopresipitatı alınmış olan plazma ise -18 °C ile -25 °C arasında da 3 ay depolanabilirken, -25 °C'den daha soğuk koşullarda 36 ay boyunca depolanabilmektedirler (Heper ve ark., 2022; Örüç, & Yenicesu, 2016).

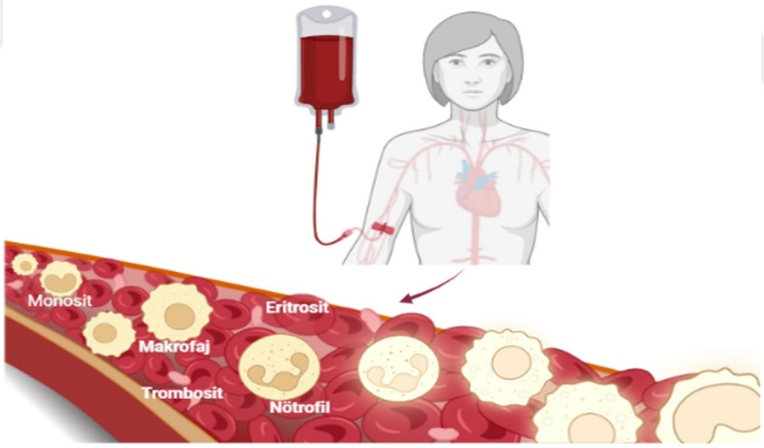


Şekil 5. Kanın ek solüsyonlar ile korunması (biorender.com ile oluşturulmuştur).

2.4. Transfüzyon

Kan transfüzyonu, şekil 6' da gösterildiği gibi ihtiyacı olan hastaya tam kan ya da kan bileşenlerinin damar yoluyla verilmesidir. Özel bir doku transplantasyonu olarak tanımlanan kan transfüzyonu 20. yüzyılın başında kan grubu antijenlerinin ve tipleme yöntemlerinin keşfedilmesi ile tıpta uygulama alanına dahil olmuştur. Daha sonra tıp alanında meydana gelen gelişmelerle ve kan bileşenleriyle tedavi konusunda da çeşitli ilerlemelerin yaşanmasıyla beraber kan transfüzyonu rutin olarak kullanılır hale gelmiştir (Örüç, & Yenicesu, 2016).

Transfüzyona ihtiyaç duyulmasının başlıca nedenleri olarak kan değişimi, eritrosit, trombosit, lökosit, pıhtılaşma faktörlerindeki eksiklikleri tamamlamak ve kan volümünü yerine koymak, dokulara oksijen transportunu daha düzenli şekilde sağlamak, kanama ve koagülasyon bozukluklarını düzeltmek olarak sayılabilir (Eder, & Chambers, 2007).



Şekil 6. Kan transfüzyonu alan kişinin temsili görüntüsü (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

2.4.1. Transfüzyon Reaksiyonları

Transfüzyon reaksiyonları ve komplikasyonları, transfüzyon sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilen istenmeyen etkilerdir. Bu reaksiyonların bazıları hafif olabilirken, bazıları ölümle sonuçlanabilmektedir. Transfüzyon reaksiyonları için immünolojik ve non-immünolojik veya akut ya da geç reaksiyonlar gibi çeşitli sınıflandırma tipleri kullanılmaktadır (Heper ve ark., 2022; Örüç, Yenicesu, & 2016). Başlıca transfüzyon reaksiyonları;

- Akut Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu
- Geç Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu
- Febril Non-Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu
- Alerjik Transfüzyon Reaksiyonu
- Transfüzyonla İlişkili Akut Akciğer Hasarı
- Transfüzyonla İlişkili Graft Versus Host Hastalığı
- Transfüzyon İle İlişkili İmmünmodülasyon
- Bakteriyel, viral, fungal ve prion enfeksyonları

(Heper & ark., 2022; Örüç, & Yenicesu, 2016).

2.4.1.1. Akut Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu

Alıcıya ABO grubu uygun olmayan eritrositlerin transfüze edilmesi sonucunda alıcının plazmasında bulunan IgM grubu doğal izohemaglütininlerin (Anti-A, Anti-B, Anti-A,B) damar içi alanda, vericinin eritrositlerini kompleman aracılığı ile hemolize uğratması sonucunda meydana gelmektedir. Kompleman aktivasyonunun sonucunda, komplemanın C5'ten sonraki yolaklarının etkinleşmesi sonucunda membran atak kompleksi oluşmakta ve bu da eritrositlerin membran bütünlüğünü bozarak hemolize uğramalarına neden olmaktadır. Bu aşamada aktive olan kompleman proteinleri (C3, C5) eritrositlere nonspesifik olarak bağlandığından dolayı sadece transfüze edilen ve alıcıyla uygun olmayan eritrositler değil hastanın kendi eritrositleri de hemolize uğramaktadır. Bu olaylar sonucunda kişide bulantı, kızarıklık, iğne giriş bölgesinde ağrı, titreme ile beraber yükselen ateş, göğüste sıkışma hissi, bel, sırt ağrısı, hipotansiyon, böbreklerin zarar görmesi nedeniyle idrar çıkışının azalması (oligüri, anüri), şok ve damar içindeki yoğun phtılaşmadan dolayı yaygın kanamalar meydana gelmektedir. Akut Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonundan (AHTR) süphelenildiğinde kişiden alınacak kanın plazmasında hemolize bağlı kırmızı renk tespit edilebilmektedir veya hemolizin diğer belirteçleri olan LDH, haptoglobin, bilirubin gibi parametrelere bakılabilir (Heper ve ark., 2022).

2.4.1.2. Geç Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu

Transfüzyondan sonraki 2-10 gün içinde hemoglobinde beklenen artışın olmaması veya hemoglobinin düşmesi, ateş, hafif sarılığın (5-7. günlerde) meydana gelmesi ile karakterizedir.

Kan transfüzyonu sırasında alıcıya ABO ve Rh uygunluğu olan kan verilse de, kendisine yabancı olan ve çok sayıda antijen içeren minör kan gruplarına sahip olan eritrositlerin transfüze edilebileceği de unutulmamalıdır. Bu yabancı eritrosit antijenlerinin antikor oluşturma yetisine ve hastanın immün sistemine bağlı olarak minör kan grubu antijenlerinin bazılarına karşı hastada antikor gelişimi ortaya çıkar (alloantikor). Böylelikle IgG ile kaplanmış olan eritrositler, karaciğer ve dalakta bulunan makrofajlar tarafından fagosite edilirler bu sayede hemoliz damar içinde gerçekleşmemiş olur. Kompleman aktivasyonunun sınırlı miktarda olması ve hemolizin damar içerisinde gerçekleşmemesi sayesinde de AHTR'deki organ hasarı ve şok ile sonuçlanan sistemik enflamatuvar yanıt geç hemolitik transfüzyon reaksiyonunda (GHTR) ortaya çıkmaz (Heper ve ark., 2022).

2.4.1.3. Febril Non-Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu

Eritrositlerin hemolizine bağlı olmayan ve kan verilmesini takiben 2 saat içinde hastada vücut sıcaklığının 1 °C ve daha fazla artmasına neden olan ateşli transfüzyon reaksiyonudur. Febril Non-Hemolitik Transfüzyon Reaksiyonu (FNHTR) görülme oranı kan ürününün türüne, lökositten arındırılmalarına ve hastanın kan alma sıklığına göre değişir. Üründeki lökositler ve lökositlerden salınan sitokinlerle doğrudan ilişkilendirilmiştir. Eritrosit transfüzyonlarının %0,5-6'sında görülürken trombosit transfüzyonları alanlarda FNHTR %1-38 oranında artmaktadır.

Buffy-coat uzaklaştırılmış olan eritrosit süspansiyonlarında ise ateş görülme oranları belirgin olarak azalmıştır. FNHTR'yi önlemedeki en etkili yöntem lökosit filtrasyonu olarak görülmektedir (Heddle, 1999; Heper ve ark., 2022).

2.4.1.4. Alerjik Transfüzyon Reaksiyonu

Bu reaksiyonlar, transfüzyonların %1-3'ünde oluşmaktadır. Çoğunlukla ürtiker, kaşıntı ve deri döküsü tarzındaki belirtilerin oluşması ile kendini göstermektedir. Fakat bazen bronkospazm, anjionörotik ödem ve anaflaktik şok ile de açığa çıkabilmektedir. Alerjik reaksiyonların plazma proteinlerinden ve plazmada bulunan ilaç, gıda ve diğer maddelere karşı oluşabilecek duyarlılıktan dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Anaflaktik reaksiyon ise sıklıkla IgA eksikliği olan ve anti-IgA geliştirmiş alıcılarda oluşmaktadır (Delaney ve ark., 2016; Heper ve ark., 2022).

2.4.1.5. Transfüzyonla İlişkili Graft Versus Host Hastalığı

Nadir olmakla beraber mortalitesi son derece yüksek olan transfüzyonla ilişkili graft versus host hastalığının (Tİ-GVHH) nedeni bağışçı lenfositlerinin (bağışçının T lenfositleri) alıcıya yerleşip, çoğalması ve dokularını harap etmesidir (Dwyre, & Holland, 2008; Heper ve ark., 2022). Normalde immun sistemi yeterli derecede çalışan bir alıcıda, bağışçıdan geçen T lenfositler, alıcıya yabancı olan doku antijenlerini taşıdıklarından dolayı yok edilirler. Ancak alıcıda bunu yapamayacak derecede bir immün yetmezlik mevcutsa, bağışçının T hücreleri alıcının dokularına ve özellikle de kemik iliğine yerleşerek (engraftman) çoğalır ve bu nedenle alıcının dokularını yabancı olarak algılayıp tahrip etmeye başlar. Tİ-GVHH riski; transfüze edilecek olan kan bileşenindeki lenfositlerin miktarına ve canlılığına, alıcıdaki immünsupresyonun varlığı veya yoğunluğuna ve bağışçı ile alıcı arasındaki HLA antijenlerinin benzerliğinin derecesine bağlıdır. Doku ve organ transplantasyonlarından sonra da GVHH gelişebilmesine rağmen transfüzyonla ilişkili olan GVHH çok daha ağır seyreder. Organ transplantasyonu ile ortak olarak transfüzyonda gelişen GVHH'de de gastrointesinal sistem, karaciğer ve cilt tutulumu meydana gelmektedir. Ancak Tİ-GVHH'de en önemli fark, kemik iliği tutulumunun oluşmasıdır. Bunun sonucunda da ağır seyreden nötropeni, trombositopeni ve anemi görülmektedir (Dwyre, & Holland, 2008).

Bunların önüne geçebilmek adına transfüze edilecek olan bileşenin içindeki lenfositlerin çoğalma yeteneğini yok edecek dozda gama ışınlaması yapılmaktadır. Bu

lenfositler fonksiyonel olarak aktivitesini korusa da çoğalamadıklarından dolayı alıcının dokularını infiltre edemeyecek ve TİGVHH meydana gelmeyecektir. Bu uygulama ile risk grubunda yer alan hastalara yapılacak transfüzyonlar için eritrosit, granülosit ve trombosit süspansiyonları ışınlanarak hastalara transfüze edilmektedir (Dwyre, & Holland, 2008; Heper ve ark., 2022; Rühl, Bein, & Sachs, 2009).

2.4.1.6. Transfüzyonla İlişkili Akut Akciğer Hasarı

Sıklıkla TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury) şeklinde adlandırılmaktadır. Kan bileşeni alırken veya aldıktan sonraki 6 saat içerisinde solunum sıkıntısı gelişen bir alıcıda, hipoksi bulgularının ve iki taraflı akciğer infiltratlarının bulunması TRALI'nı düşündürmelidir. Bağışçıdan gelen lökosit antikorlarının (anti-HLA ve human nötrofil antikorlar) alıcı lökositleri ile reaksiyona girdikten sonra, pulmoner mikro dolaşımda damar geçirgenliğini bozan lökosit agregatları oluşturması ile TRALI meydana gelmektedir. Çalışmalar plazması fazla olan bileşenlerin plazması az olanlara göre 5-8 kat daha fazla TRALI riski oluşturduğunu göstermektedir. Dolayısıyla donmuş plazmanın TRALI riski daha fazladır. Ayrıca çok fazla doğum yapmış olan kadınların kan bağışı yapmalarının TRALI olasılığını arttırdığını saptanmıştır, bununla ilintili olarakta İngiltere'de erkek bağışçıların plazmalarının transfüzyon için tercih edilmeye başlanması sonucunda da TRALI insidansında belirgin bir düşüş gözlenmiştir (Chapman, 2009; Heper & ark., 2022; Müller, van Stein, Binnekade, van Rhenen, & Vlaar, 2015; Schmickl, 2015).

2.4.1.7. Transfüzyon ile İlişkili İmmünmodülasyon ve Olası Mekanizmaları

TRIM, allojeneik kan transfüzyonu sonucunda alıcının immün sisteminde meydana gelen değişiklikleri ve bu değişikliklerin sonuçlarını tanımlamaktadır (Bal, & Oral, 2016). Daha önce de belirtildiği gibi TRIM;

- Kanser nükslerinde artış meydana gelmesi,
- Crohn hastalığının nüks hızının azalması,
- Greft ömrünün uzaması,
- Tekrarlayan düşük sıklığının azalması,

• Ameliyat sonrasında meydana gelen bakteriyel enfeksiyon sıklığının artması,

• Kısa dönem mortalite olasılığında bir artış meydana gelmesi

• Bazı latent enfeksiyonların yeniden aktivite kazanması gibi birçok duruma yol açabilmektedir (Vamvakas, & Blajchman, 2007; Bilgin, & Brand, 2008).

Ortaya çıkan sonuçlara bakılarak TRIM etkisinin, kan bileşeni içerisinde bulunan lökositler, depolanma sürecinde bileşen içerisinde biriken biyolojik yanıt düzenleyiciler ve immünolojik mediyatörler (BYD-İM) veya allojeneik plazmada bulunan çözünür HLA (çHLA)'lar aracılığıyla meydana gelebileceği öne sörülmektedir (Vamvakas, & Blajchman, 2007).

Çoğu kişi tarafından ES transfüzyonunu takip eden olumsuz olayların nedeninin, depolama sırasında bir dizi enflamatuar protein salgılayan lökositler olduğu varsayılmaktadır (Karsten, & Herbert, 2020) ve bununla ilintili olarak allojeneik MNH'lerin özel yöntemler kullanılarak kan bileşeni içinden uzaklaştırılmadıkları sürece transfüzyon ile alıcıya geçerek TRIM etkisinin oluşumuna katıldıklarını gösteren çalışmalar bu öngörüyü desteklemektedir (Blajchman, Bardossy, Carmen, Sastry, & Singal, 1993; Bordin, Heddle, & Blajchman, 1994). Benzer şekilde BYD-İM'lerin depolanma süresine bağlı olarak süpernatan içerisinde birikerek TRIM gelişimine katıldıklarını ve ES süpernatanında biriken çHLA-1'lerin immünsüpresyona yol açtığını gösteren yayınlarda bu öngörüye destek sağlayan çalışmalara örnek gösterilebilirler (Baumgartner, Silliman, Moore, Banerjee, & McCarter, 2009; Ghio, 1999; Nielsen, 1996).

Hem lökositleri hem de onlardan salınan sitokinleri içerecek bir ES'nin transfüzyonunun zararlı bir bağışıklık reaksiyonuna neden olabileceği düşünüldüğünden dolayı 1990'ların sonlarında, Kanada ve birkaç Batı Avrupa ülkesi, depolama öncesi filtrasyon yaparak hücresel kan bileşenlerinden lökosit azaltımını uygulamaya koydu daha sonraları ise lökositten arındırılmış kanın transfüzyonda kullanımı yaygınlaşmıştır (Vamvakas, & Blajchman, 2007).

Lökosit azaltımı depolama öncesi lökosit azaltımı ve depolama sonrası lökosit azaltımı olarak iki şekilde yapılmaktadır ancak depolama öncesi lökosit azaltımı kan bileşenleri hazırlanırken yapıldığından dolayı lökositlerin depolanma süreci boyunca immünmediyatörleri salgılaması ve bu mediyatörlerin ürün içinde birikimi engellenmiş olur. Depolama öncesi lökosit azaltımının ES içindeki sitokin düzeyini

azalttığı, zarar verici ve immünomodülatör etkileri engellediği yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (Shanwell, Kristiansson, Remberger, & Ringdén, 1997; Hodge, Nairn, Holmes, Reynolds, & Hodge, 2007).

Depolama sonrası lökosit azaltım işlemi ise ES transfüzyon amacıyla alıcıya gönderilmeden hemen önce veya hasta başında lökosit filtrelerinden geçirilerek yapılır. Bu yolla transfüzyon sırasında alıcıya geçen lökositler azaltılabilir ancak depolanma süreci boyunca ES içinde bulunan lökositlerden salınarak ES'nin içinde birikecek olan mediyatörler işlemin etkinliğinin azalmasına neden olabilirler (Örüç, & Yenicesu, 2016).

Lökosit azaltmanın kanıtlanmış faydaları arasında hemolitik olmayan ateşli transfüzyon reasyonlarının ve HLA alloimmünizasyonunun önlenmesi ile sitomegalovirüs enfeksiyonunun transfüzyon ile iletiminin önüne geçilmesi yer almaktadır (Simon, & Morris, 2009). Ancak lökoredüksiyon ile immünmodülatuvar bazı etkilerin engellenebildiğini gösteren çalışmaların (Bilgin ve ark., 2011; Blumberg ve ark., 2007; Friese, Sperry, Phelan, & Gentilello, 2008; Hébert ve ark. 2003; van de Watering ve ark., 1998) yanısıra engellenemediğini gösteren çalışmalar (Phelan, Sperry, & Friese, 2006; Vamvakas & Blajchman, 2000, 2007) da mevcuttur.

Şu anda, ES kullanımdan önce 42 güne kadar +4 °C'de depolanabilmektedir ve depolamanın da TRIM lezyonlarına neden olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (Hess, 2006). Bu çalışmalardan bazıları depolanan kanın sitokin salınımı konusuna odaklanmış ve sitokin salınımının torba içerisindeki hücreleri ve alıcıyı etkileyebileceğini göstermiştir (Chudziak ve ark., 2009; Weisbach, Wanke, Zingsem, Zimmermann, & Eckstein, 1999). Bu nedenle, ES transfüzyonu ile meydana gelebilecek reaksiyonların çoğunun nedeni hakkında çok şey bilinmesine rağmen, uzun süreli saklama sırasında eritrositlerde meydana gelen deformasyonlardan dolayı değişime uğramış bu hücrelerin bir tedavi aracı olarak kullanılmasına ilişkin tartışmalar devam etmektedir (Glynn, 2010). Daha eski (deforme olmuş) ES'lerin transfüzyonu ile olumsuz olayların meydana gelmesi arasında korelasyon bildiren birçok çalışma varken (Hod ve ark., 2010; Karam ve ark., 2010) depolama süresinin hiçbir etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Patterson ve ark., 2015).

Depolama sırasında eritrositlere tam olarak ne olduğunu belirlemek için birçok analiz yapılmıştır. Bu hücrelerin morfolojisinin saklama süresince büyük ölçüde

değiştiği ve hemolize daha duyarlı oldukları bilinmektedir (Barshtein ve ark., 2014). Ayrıca, bu hücrelerin depolama sırasında oksidatif hasara uğradığını ve yaşlanmış eritrosit niteliği almaya başladığını öne süren bir dizi çalışma da bulunmaktadır (Kriebardis ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada transfüzyondan önce ES depolamak için kullanılan koşullara benzer şekilde 4 °C'de uzun süreli saklama sırasında eritrositlerin glikokaliksinde bozulmalar gözlemlenmiştir (Halbhuber, Gliesing, Stibenz, & Makovitzky, 1984; Neu, Sowemimo-Coker, & Meiselman, 2003).

Allojenik kan transfüzyonu, bilinmeyen bir mekanizma ile transfüze edilen alıcılarda immünosupresyonada aracılık etmektedir. $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ düzenleyici T hücreleri (Treg) travma mağdurlarında, kanser hastalarında ve transplant alıcılarında immünosupresyonda merkezi bir role sahiplerdir. Transfüzyonla ilişkili immünosupresyonun kısmen T_{reg}'lerin indüklenmesinin aracılık ettiğini ve bu indüksiyonun depolama öncesi lökoredüksyonla ve depolama süresiyle azalabileceği varsayılarak yapılan bir çalışma, paketlenmiş ES süpernatanının spesifik olarak $CD25^+$ $Foxp3^+$ $CD4^+$ olan T_{reg} hücrelerini indüklediğini ancak bu indüksiyonun depolama süresi veya lökosit azaltma ile değişmediğini göstermektedir. (Baumgartner, Silliman, Moore, Banerjee, & McCarter, 2009).

Gafter ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir deney, kan transfüzyonlarının neden olduğu immünosupresyondan sorumlu mekanizmalara ışık tutmuştur. Bu çalışmada, kan transfüzyonu sonrası son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda immünolojik parametreler incelenmiştir. Kan transfüzyonundan sonraki dört saat içinde periferik kan monositleri tarafından prostaglandin E2 (PGE2) sekresyonunun artışı ve periferik kanda baskılayıcı fenotipte $CD8^+$ T hücresi popülasyonunun ortaya çıktığını göstermişlerdir. Ayrıca $CD8^+$ T hücreleri çoğalıp transfüzyondan dört gün sonra zirveye ulaştığı, $CD4^+$ T hücrelerinin ise azalma eğiliminde olduğu bulunmuştur (Gafter, Kalechman, & Sredni, 1992). Yapılan çalışmalara bakılınca PGE2'nin baskılayıcı $CD8^+$ T hücrelerini indükleyebilen (Chouaib, Chatenoud, Klatzmann, & Fradelizi, 1984; Fischer, Le Deist, Durandy, & Griscelli, 1985) ve $CD4^+$ T hücrelerinin de Th2 benzeri bir fenotipte gelişmesini sağlayan lipit aracısı olduğu görülmektedir (Claas, Roelen, van Rood, & Brand, 2001; Fast, 1996; Gafter, Kalechman, & Sredni, 1996).

Bunların dışında TRIM'a neden olabilecek yapılar olarak ekstrasellüler veziküller (EV) ve eksozomlardan da şüphelenilmektedir. EV ve eksozomların depolama süreci boyunca değişimleri veya bunların bazı immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri kısıtlı da olsa incelenmiştir. Depolama süresi uzun olan kanı alan hastalarda transfüzyonun, immünomodülasyona katkıda bulunabileceği ve EV'lerin transfüzyon alıcılarında immün modülasyonun kilit aracıları olabileceği de ileri sürülmüştür (Azarov ve ark., 2011; Baek ve ark., 2012; Högman, & Meryman, 1999; Gladwin, & Kim-Shapiro, 2009; Vamvakas, & Blajchman, 2007).

Danesh ve ark. (2014) yapmış olduğu bir çalışmada ES içerisindeki eksozomların TNF-α üretimini indüklediğini göstermiştir. EV'ler ise T hücresi, B hücresi, monosit ve NK hücre popülasyonlarının sağkalımını belli bir dereceye kadar arttırmıştır. EV'ler PHA stimülasyonu ve monosit varlığında $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin proliferasyonunu da arttırmıştır (Danesh ve ark., 2014).

TRIM'in nedenine yönelik bütün bu çalışmalar ile ortaya konulan farklı yaklaşımlar ve sonuçlara bakılınca, depolama süresi ve lökosit azaltımının yanısıra TRIM'in nedeni olabilecek diğer hücresel veya mekanizmasal etkilere dair daha fazla karşılaştırmalı çalışma yapılmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

2.5. T Hücre

T hücreler kemik iliğinde üretildikten sonra gelişim ve seçilim alanları olan timusa göç etmektedirler. Burada bulunan naif T hücreler yabancı antijenlere yanıt verebilen ve kendi antijenlerine karşı tolerans sağlamalarına aracılık eden bir seçilimden geçerler. Kendi antijenlerine yanıt veren veya yabancı antijenlere yanıtsız kalan T hücreler elimine edilir. Seçilim işleminin sonunda sağlıklı T hücreler $CD4^+$, $CD8^+$ ve T_{reg} gibi alt populasyonlara ayrılırlar ve timustan dolaşıma çıkarlar (Germain, 2002; Klein, Kyewski, Allen, & Hogquist, 2014; Kondo, Takada, & Takahama, 2017).

Bağışıklık tepkilerinin, homeostazın ve hafızanın oluşturulması ve sürdürülmesi T hücrelerine bağlıdır. T hücreleri, patojenlerden, tümörlerden ve çevreden çeşitli antijenleri tanıma potansiyeline sahip bir reseptör ifade eder ve ayrıca immünolojik hafızayı ve kendi kendine toleransı sürdürür. Ancak T hücreleri birçok enflamatuar ve otoimmün hastalığın da ana itici güçleri olarak da rol oynamaktadırlar (Kumar, Connors, & Farber, 2018).

İlk yıllarda, insanlar birçok antijenle ilk kez karşılaştıklarında, T hücreleri birden çok akut enfeksiyon için patojen temizliğine aracılık eder, hafıza tepkileri geliştirir ve zararsız yabancı antijenlere karşı tolerans oluşturur. Çocukluktan sonra, T hücre bölünmesi daha az akut enfeksiyon ve azaltılmış bellek üretimi ile daha kararlıdır. Onlarca yıllık yetişkin yaşamı boyunca, T hücreleri, kronik enfeksiyonları kontrol ederek, kanser hücrelerini izleyerek ve uygun immün regülasyonu sürdürerek dokularda homeostazı korur. Son olarak, ileri yaşta T hücresi işlevinde bir düşüş ve buna karşılık gelen enfeksiyon, kanser ve otoimmüniteye karşı artan bir duyarlılık vardır (Goronzy & Weyand, 2017; Saule ve ark., 2006).

2.5.1. T Hücrelerin Aktivasyonu

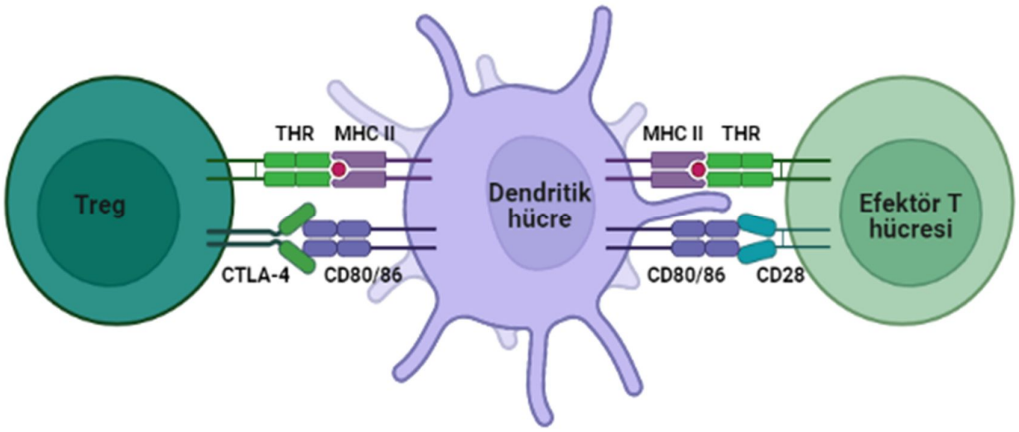
T hücreler, T hücresi reseptörüne (THR) antijenin bağlanması ve sinyal iletimi ile aktifleşirler. Bunlar çözünür antijenlere karşı reaksiyon gösteren B hücrelerinin aksine, antijen sunan hücrelerin yüzeylerinde sunulan peptidlerle uyarılırlar. Antijen sunan hücrelerce alınan antijenik yapılar bu hücrelerin içerisinde işlenerek küçük peptitler haline getirilir ve major histokompatibilite kompleksinin (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) protein oluğuna bağlanarak hücre yüzeyinde sergilenirler. Antijenik peptidin aminoasitleri ve MHC molekülünün residüleri THR için ligant görevi görmektedir. Böylece Peptid-MHC kompleksinin THR'ne bağlanması sonucunda T hücre aktivasyonuna yol açacak bir dizi biyokimyasal olay tetiklenir. (Abbas ve ark., 2018).

Antijen sunan hücrelerde (ASH) MHC I ve MHC II olmak üzere iki ayrı MHC yapısı bulunmaktadır. Eksojen antijenik yapıların sunulmasında MHC II görev almaktadır. Ayrıca MHC II $CD4^+$ T hücrelerine antijen sunumu yapmaktadır (Abbas ve ark., 2018; Bryant, Lennon-Duménil, Fiebiger, Lagaudrière-Gesbert, & Ploegh, 2002). Endojen antijenik yapıların, özellikle virüsle enfekte hücrelerdeki antijen sunma görevini ise MHC I yapmaktadır ve bu da antijeni $CD8^+$ T hücrelere sunmaktadır (Abbas ve ark., 2018; Hewitt, 2003).

Antijen sunum çeşitliliği üç farklı MHC sınıf I alleli (HLA A, B, C) ve sınıf II allelinin (HLA DR, DP, DQ) ekspresyonu ile arttırılır. MHC sınıf-I ve sınıf-II antijenleri profesyonel antijen sunucu hücrelerde bulunur ve T hücre reseptörü ile

etkileşime girerek bu hücrelere ilk sinyalin iletilmesini sağlar (Abbas ve ark., 2018). Ancak T hücre aktivasyonu için THR ve eş-uyaran reseptörü aracılığı ile olmak üzere iki sinyale birden gereksinim duyulmaktadır. Bu eş uyaran yapılarından en çok bilineni CD28 yüzey proteinidir. Şekil 7'de gösterildiği gibi antijen sunumu sırasında CD28 eş-uyaranı ile T hücrenin aktive olması ve proliferasyonu gerçekleşirken, eş-uyaran CTLA-4 olunca T_{reg} fenotipli hücre oluşup T hücre supresyona yönlendirilmektedir. CD28, THR uyarımlı yolakları, özellikle de fosfotidilinositol-3 kinazı aktifleştirir. Eğer CD28 sinyali olmazsa THR ile MHC bağlanması T hücrelerinde anerji adı verilen bozuk fonksiyonel duruma yol açar ve T hücreleri kendisine sunulan antijenik yapıya karşı yanıtsız kalır (Salomon, & Bluestone, 2001).

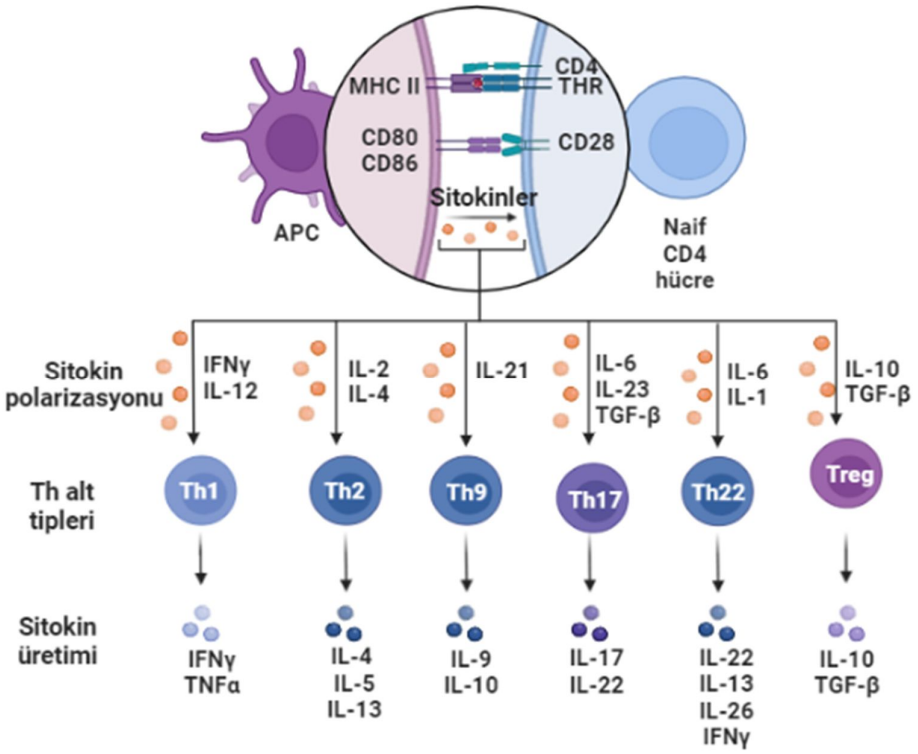
T hücre yüzeyinde ifade edilen CD25, CD69 ve CD154 ise T hücrelerin aktivasyonu ile artış gösteren yüzey belirteçleridir (Shipkova, & Wieland, 2012).
Bu belirteçlerden CD25, IL-2 için oluşan reseptör kompleksinin alt-birimlerinden birtanesidir. T hücrelerin erken aktivasyon dönemlerinde ifade edilir ve uzun süre hücrelerin yüzeyinde kalır. CD25 reseptörü $CD4^+$ T_{reg}'lerin üzerinde de görülmektedir (Sun, Wu, & Yi, 2012; Suto ve ark., 2001). CD69 ise T hücrelerin yüzeyinde en erken aktivasyon belirteci olarak ifade edilmektedir (Borrego, Robertson, Ritz, Peña, & Solana, 1999). CD154 (CD40L) de aktivasyonu sonucunda ifade edilirken, özellikle yardımcı T hücrelerin yüzeyinde belirmektedir ve bu belirtecin ifadesi genellikle kısa süreli ve geçicidir. CD40 reseptörü taşıyan ve CD154 ile aktifleşen makrofajlar, B hücreler ve endotel hücrelerinin etkinliğini artırmaktadırlar. CD154 ile aktive olan bu hücrelerin CD80, CD86 ve HLADR ekspresyon düzeylerinde de artışlar görülmektedir (Grewal, & Flavell, 1998; Xu, & Song, 2004).



Şekil 7. T hücrelerin Dendritik hücrelerin antijen sunması ile proliferasyon veya supresyona yönlendirilmesi. MHC II, *major histocompatibility complex:* majör histokompatibilite kompleksi; THR, t hücre reseptörü; CD, *cluster of differentiation:* farklılaşma kümesi; Treg, *t regulatory cell:* düzenleyici t hücresi; CTLA-4, *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4:* sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 4. Abbas ve ark. (2018)'dan esinlenilerek (biorender.com ile oluşturulmuştur).

2.5.2. T Hücre Alt Grupları

$CD4^+$ T hücreleri, patojenlere karşı düzenlenmiş etkili bir bağışıklık tepkisi elde etmede çok önemli olan adaptif bağışıklık sisteminin benzersiz bir dalını temsil eder ve bunların düzgün çalışması hayatta kalmak için büyük önem taşır. Şekil 8'de gösterildiği gibi T hücreler farklı sitokinler sayesinde fenotiplere ayrılırlar. Böylece hem doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin hemde adaptif bağışıklık hücrelerinin fonksiyonlarını modüle ederler (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012). Ancak şekil 8' de gösterilenlerin dışında yeni yeni keşfedilen T hücre alt grupları da mevcuttur.



Şekil 8. T hücre alt grupları ve sitokin üretimi. MHC II, *major histocompatibility complex:* majör histokompatibilite kompleksi: THR, t hücre reseptörü; CD, *cluster of differentiation:* farklılaşma kümesi; APC, *antigen presenting cell:* antijen sunan hücre; IFNy, *interferon gamma;* interferon gama; IL, *interleukin:* interlökin; Th, *T helper:* yardımcı T; TNF-α, *tumor necrosis factor-a:* tümör nekröz faktör; TGF- β, *transforming growth factor-beta:* transforme edici büyüme faktörü beta (bioender.com kullanılarak oluşturulmuştur).

2.5.2.1. Th1 Hücreler

Th1 (t *helper*; t yardımcı) hücreler $CD8^+$ T hücrelerini, NK hücreleri ve makrofajları aktifleştirerek hücre içi patojenlerle karşı şavaşmaktadır. Ayrıca Th1 hücreleri B hücrelerinden IgG2a antikor üretimi için immunglobulin sınıf dönüşümünü uyarır bu sayede virüs ve hücre dışı bakterilerin vücut içerisinden temizlenmesini de sağlar. Th1 farklılaşmasındaki en önemli sitokinler IFN-γ ve IL-12'dir. IFN-γ doğal immün sistem hücrelerinden salgılanarak sinyal iletici ve transkripsiyon 1 aktivatörünü (STAT1) aktifleştirerek T-bet'i düzenler ve Th1 farklılaşmasını güçlendirir. Aktif ASH ve diğer immün sistem hücrelerinden üretilen IL-12 ise IFN-γ üretimini güçlendirir. T-bet Th1 farklılaşma ve fonksiyonları ile ilişkili anahtar transkripsiyon faktörüdür. T-bet eksik T hücreleri Th1 hücrelerine farklılaşamaz. Efektör Th1 hücreleri IFN-γ, TNF−α gibi proinflamatuvar sitokinler üreterek CD8+ T

hücreleri, NK hücreleri ve makrofajları uyarırlar. Bu nedenle Th1 fonksiyonları dengelenmezse inflamatuvar hastalıklar ve doku hasarı ortaya çıkabilir (Williams, & Bevan, 2007).

2.5.2.2. Th2 Hücreler

Th2 hücreler hücre dışı parazitlere karşı immün yanıtta kritik role sahiptirler ve IL-4, -5 ve -13'ün üretiminden sorumludurlar. Paraziter enfeksiyonların giriş yeri olan deri, akciğer ve bağırsaklardaki epitelyal hücreler parazit ürünlerini tanıyarak timik stromal lenfoprotein, IL-4, IL-25 ve IL-33 dahil Th2 tipi sitokinleri üretir. Bu sitokinler doğal immün sistem hücrelerini örneğin bazofil ve dendritik hücreleri etkiler veya doğrudan naif T hücrelerinin Th2'ye farklılaşmasını sağlar. IL-4 reseptörü ile etkileşerek STAT6'yı aktifleştirir. STAT6 aktivasyonu nükleer translokasyon ve GATA3 denilen transkripsiyon faktörünün indüksiyonunu güçlendirir. GATA3 Th2 hücrelerinin farklılaşmasında başlıca düzenleyicidir. GATA3 IL-4, -5, -13'ü kodlayan genleri de kapsayan Th2 lokusuna bağlanarak ve aktifleştirerek Th2 sitokin üretimini düzenler. GATA3 fonksiyonu bozulduğunda Th2 farklılaşması gerçekleşmez. Fare çalışmaları THR'ün peptid ligandlarına afinitesi azaldığında azalan uyarımın Th2 hücre farklılaşmasına yol açtığını gösterdi. Eş-uyarımdaki farklılıklarda Th2 yolağına farklılaşmayı etkiler. CD28 veya CD80/86 eksik farelerde Th2 cevabı da bozuktur. Olgun Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-4, antijenle karşılaşma sonrası daha fazla naif T hücresinin Th2 hücresine farklılaşmasını teşvik etmektedir. Th2 hücrelerinden üretilen IL-5 eozinofilleri toplar ve Th2 kaynaklı IL-13 de aşırı duyarlılığının artışına neden olur. Aşırı Th2 yanıtı alerji ve havayolu duyarlılığı ile ilişkilidir (Wan, & Flavell, 2009).

2.5.2.3. Th9 Hücreler

Yardımcı T hücrelerinin yeni üyesidir ve yüksek miktarda IL-9 ve IL-10 üretiminden sorumludurlar. Th2 hücrelerine benzer olsalarda IL-9 üretimi ile onlardan ayrılırlar. Th9 hücrelerinin helmintlere karşı gösterilen ilk yanıtta etkili olduğu düşünülmektedir (Dardalhon ve ark., 2008).

2.5.2.4. Th17 Hücreler

IL-17 üreten hücreler hücre dışı bakteriyel ve fungal enfeksiyonların kontrolünde önemli role sahiptirler. Aşırı yanıtlılık durumunda kaldıkları zaman psoriasis, romatoid artrit ve crohn hastalığı gibi otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadırlar ve IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinler üretirler. IL-23, Th17 hücreler için önemli bir düzenleyici görevi üstlenmektedir. İnsanlarda IL-6, IL-1 veya IL-23 Th17 farklılaşması farklılaşma için yeterli olmaktadır (Wan, & Flavell, 2009).

2.5.2.5. Th22 Hücreler

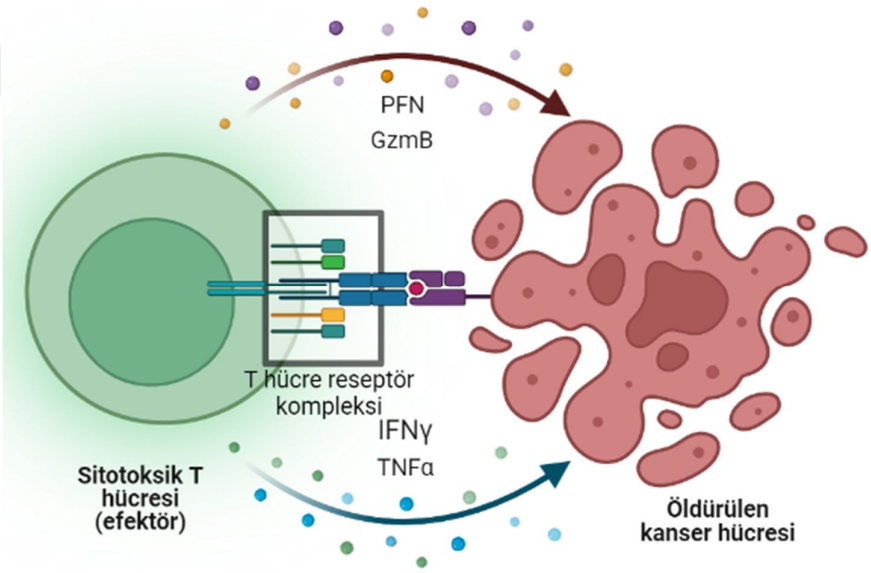
Th22 hücreleri CD4+ T hücrelerinin son yıllarda keşfedilen yeni bir alt tiplerinden biridir. Th22 hücreleri yüzeylerinde CCR4, CCR6 ve CCR10 kemokin reseptörlerini eksprese ederler ve major sitokini IL-22 olaması ile birlikte, IL-13, IL-26 ve TNF-α da salgılarlar. Diğer CD4 alt gruplarının aksine IL-17, IL-4 ve IFN-y salgılamazlar., IL-1ß, TNF-α ve IL-6 tarafından indüklenen CD4+ T hücreleri Th22'ye farklılaşır. İnflamatuar bağırsak hastalığı, alerjik astım, sistemik skleroz ve romatoid artrit gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda IL-22'nin üretiminin arttığı görülmüştür. Ancak hastalığın evresi ile ilşkili olarak hem koruyucu hem de patojenik olabilirler (Gong, Zhan, Liang, He & Cui, 2021; Jia, & Wu, 2014).

2.5.2.6. T_{reg} Hücreler

$CD4^+$ T hücrelerinin önemli bir alt grubu oluşturan T_{reg}'ler peptid-MHC kompleksi ve eş-uyaran varlığında uyarılan aktif T hücrelerinin çoğalmasını ve sitokin üretimini baskılarlar. Treg'ler iki şekilde ortaya çıkarlar. Doğal T_{reg} (nT_{reg}) timustaki gelişim aşamaları sırasında fonksiyon kazanır, indüklenebilir T_{reg} (iT_{reg}) ise periferde naif $CD4^+$ T hücrelerin farklılaşma aşamasında gelişmektedir. Hem nT_{reg} hem de iT_{reg} transkripsiyon faktörü Foxp3'ün ekspresyonu ve bununla birlikte CD25 yüzey ekspresyonu ile karakterizedirler. T_{reg}'ler immün regülasyon özelliklerini IL-10 ve TGF-β gibi baskılayıcı sitokinlerin salınımı, IL-2'nin lokal konsantrasyonunun ortadan kaldırılması ile gerçekleştirirler (Sakaguchi, 2004).

2.5.2.7. $CD8^+$ Sitotoksik T Hücre

$CD8^+$ sitotoksik T lenfositler (STL) patojenle enfekte veya malign dönüşüme uğramış konak hücrelerini öldürürler. STL ile hedef hücre arasında immünolojik sinaps benzeri bir yapı meydana gelmektedir. Şekil 9'da gösterildiği gibi STL özelleşmiş granüller içerir ve bu granüllerini doğrudan hücre teması ile ortama salar. Bu granüller modifiye lizozomlar olup perforin, granzim ve granulozin gibi efektör proteinleri içerirler. Perforin hedef hücrenin sitozolüne granzimlerin geçişini kolaylaştırır. STL IFN-γ, TNF−α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN-γ, viral replikasyonu baskıladığı gibi aynı zamanda MHC I ekspresyonunu tetikler ve STL üzerinde THR uyarımı yeteneğini arttırır. Ayrıca makrofajların aktivasyonu için TNF−α ile sinerjik bir etki göstermektedir (Williams, & Bevan, 2007).



Şekil 9. Sitotoksit T hücrelerin tümör hücresini öldürmesi. PFN: perforin, GzmB: granzim B, IFN*: interferon gamma:* interferon gama, *TNFα: tumor necrosis factor-a:* tümör nekröz faktör- a (biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur).

2.5.2.7.1. Tc1 Hücreler

IL-12 ile uyarılan Tc1 hücreler (t *cytotoxic*; t sitotoksik) sitotoksik aktivite gösterir ve tümör hücrelerini ve hücre içi patojenleri barındıran hücreleri öldürür (Croft, Carter, Swain, & Dutton, 1994). İşlevsel olarak Tc1 hücreleri, yüksek, granzim

B, IFN-γ ve TNF-α seviyeleri ve IL-4, IL-9 ve IL-17 sitokinlerinin düşük ekspresyonu ile tanımlanırlar (Mittrücker, Visekruna, & Huber, 2014).

2.5.2.7.2. Tc2 Hücreler

Azalan IFN-γ üretimi ile birlikte IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi tip II sitokinleri üretmeleri ile bilinirler (Mingari ve ark., 1984; Mittrücker ve ark., 2014; Seder ve ark., 1992). Tc2 hücreleri ayrıca yüksek seviyelerde granzim B ifade eder ve güçlü sitotoksik etki gösterir (Kemp & Ronchese, 2001). Bu hücrelerin, IgE üretimini ve eozinofiller gibi patojenik hücrelerin toplanmasını teşvik edebilen bol miktarda tip II sitokin salgıladığı göz önüne alındığında, Tc2'ler, özellikle solunum yollarında alerji tepkilerine aracılık etmede önemli bir role sahiptir (Hilvering ve ark., 2018; Schaller, Lundy, Huffnagle & Lukacs, 2005).

2.5.2.7.3. Tc9 Hücreler

Daha yakın zamanda açıklanan Tc alt tiplerinden biri olan, IL-9 üreten ancak nispeten az IFN-y üreten Tc9 hücrelerdir (Lu ve ark., 2014; Visekruna ve ark., 2013). Tc1 ve Tc2 hücrelerinden farklı olarak, Tc9 hücreleri, kısmen, sınırlı granzim B üretimlerine bağlı olarak zayıf sitotoksik fonksiyon gösterirler (Visekruna ve ark., 2013). Tc9 hücrelerinin biyolojik önemi şu anda belirsizdir. Bununla birlikte, ince bağırsakta (Chang ve ark., 2013) atopik dermatit lezyonlarında (Visekruna ve ark., 2013) ve astımlı hastaların kanında (Wang, Cheng, Chen & Lin, 2016) Tc9 hücreleri tespit edilmiştir burada hastalığın ilerlemesini teşvik ettikleri düşünülmektedir.

2.5.2.7.4. Tc17 Hücreler

Düşük seviyelerde granzim B ifade eder ve zayıf sitolitik fonksiyona sahiptir (Huber ve ark., 2009). Tc17 hücreleri için IL-23R, CD38, CD86, CD101, CD103 ve CCR6 dahil olmak üzere birkaç yüzey belirteci tanımlanmıştır (St Paul ve ark., 2020; Huber ve ark., 2009; Yen ve ark., 2009; Singh, Zhang, Foley, Hedrick, & Farber, 2008). İnsan cilt dokusunda (Linehan ve ark., 2018; Naik ve ark., 2015) ve tümör mikro çevresinde (Kryczek ve ark., 2007) tespit edilmiştir. Bazı mantar patojenlerine

karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (Nanjappa, Heninger, Wüthrich, Gasper, & Klein, 2012).

2.5.2.7.5. Tc22 Hücreler

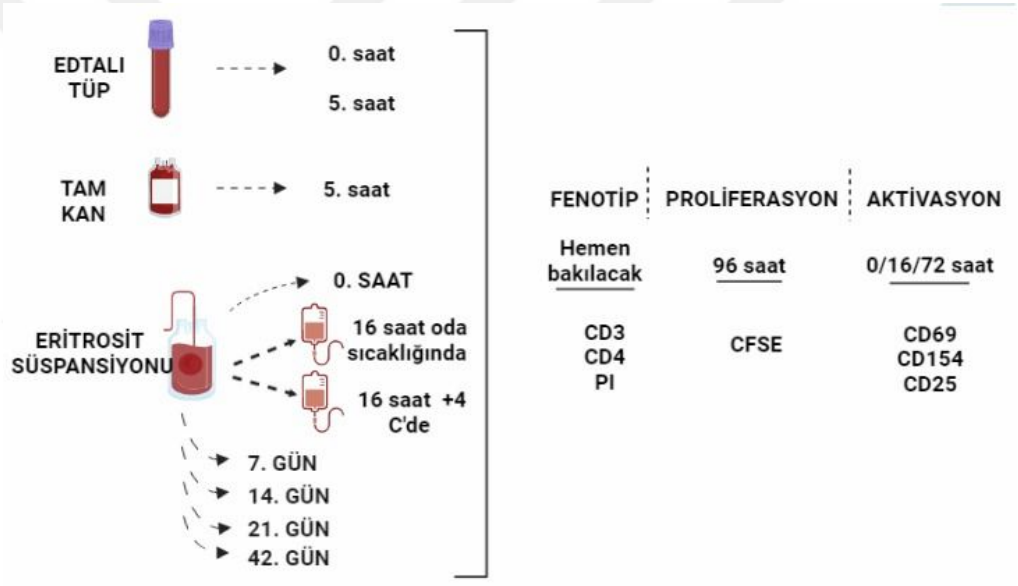
$CD8^+$ T hücrelerinin IL-22 üreten bir alt kümesi olan Tc22 hücrelerinin biyolojik önemine tam olarak tanımlanmamıştır (Res ve ark., 2010). Atopik dermatit ve sedef hastalığı gibi iltihaplı lezyonlarda tespit edilmiştirlerdir (Nograles ve ark., 2009; Res ve ark., 2010).

2.5.2.7.6. Tc Düzenleyici Hücreler ($CD8^+$ T_{reg})

Düzenleyici $CD8^+$ T hücreler inhibitör sitokinleri salgılayarak lenfosit fonksiyonlarını baskılarlar. Bu sayede otoimmün hastalıkların gelişimini engellemektedirler. Bu hücreler genel olarak CD45RO ve Foxp3 ifade ederken CD28, CD62L ve CD122 ifade etmezler (Yu ve ark., 2018; Zhou, Yang, Tian, & Wang, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 02 Haziran 2021 tarihli, 2021-7/33 nolu kararı sonucu alınmış izin sonrasında gerçekleştirilmiştir. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi'nde ulusal kan bağış kriterlerine uygun 3 kişiden birer ünite kan (~450 ml) bağışı, ayrıca aynı 3 kişiden 2 şer adet 10'ar ml EDTA'lı tüpe alınan kan çalışmamıza ait teslerde deneysel materyal olarak kullanılmış ve deneysel çalışmalar sırasında şekil 10'daki şema takip edilmiştir.



Şekil 10. Kanın depolama süresi boyunca yapılan testlerde bu şema takip edilmiştir. (biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur).

3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Bu tez kapsamında çeşitli kimyasallar ve biyolojik malzemeler kullanılmıştır. Bu malzemeler, ait oldukları firmalar ve ülkeleri aşağıda sıralanmıştır.

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya); Fötal Buzağı Serumu (FBS) (Biowest, Fransa); Penisilin-Streptomisin (Biowest, Fransa); RPMI 1640 (Biowest, Fransa); Ficoll 1.077g/mL (Capricorn Scientific, Almanya); Ficoll 1.119g/mL (SİGMA, ABD); Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE)

(Biolegend, ABD); FACS Flow Cell Wash (BD, ABD); Propidium İodide çözeltisi (Biolegend, ABD); Anti insan CD3 (klon: UCHT1) monoklonal antikor (mAb) (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD3 (klon: UCHT1) monoklonal antikor (mAb) (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD4 (klon:SK3) mAb (BD, ABD); Anti insan CD25 (Klon: 2A3) mAb (BD, ABD); Anti insan CD69 (klon:L78) mAb (BD, ABD); Anti insan CD154 (klon:TRAP1) mAb (BD, ABD); Fitohemagulutenin (PHA) (SİGMA, ABD); Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (SİGMA, ABD); Sodyum dodesil sülfat (SDS) (SİGMA, ABD), Tripan mavisi (Sigma, ABD)

3.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

PBS Çözeltisi: Steril PBS tablet 1000 mL dH_2O'ya eklenerek (1X) partikül kalmayacak şekilde manyetik karıştırıcıda çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi. Daha sonra oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

Tam RPMI 1640 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine steril alanda son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde de penisilin/streptomisin eklenerek iyice karışması sağlandı ve +4°C'de saklandı.

Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) Çözeltisi: Hazır olarak alınan CFSE tuzunun (50µg) üzerine 18 µl DMSO eklenerek çözüldü ve -86°C'de saklandı.

Tripan Mavisi Çözeltisi: Steril ortamda tartım işleminin sonrasında 1X PBS yardımıyla 0.4'lük çözelti hazırlandı ve 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromür Çözeltisi: Hazır olarak alınan MTT steril koşullarda tartıldı ve 5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 1X steril PBS ile çözülerek 4°C'de ve karanlıkta muhafaza edildi. Final konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde deneylerde kullanıldı.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)/Dimetilformamid (DMF) Solüsyonu: Saflık yüzdesi ≥99 olan DMF, dH2O ile %45 v/v olacak şekilde seyreltildi. Daha sonra SDS tartılarak %45'lik DMF'nin içinde konsantrasyonu %23 olacak şekilde çözdürüldü. Hidroklorik asit (HCl) veya sodyum hidroksit (NaOH) ilavesi ile pH=4.7'ye ayarlandı. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

3.3. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması

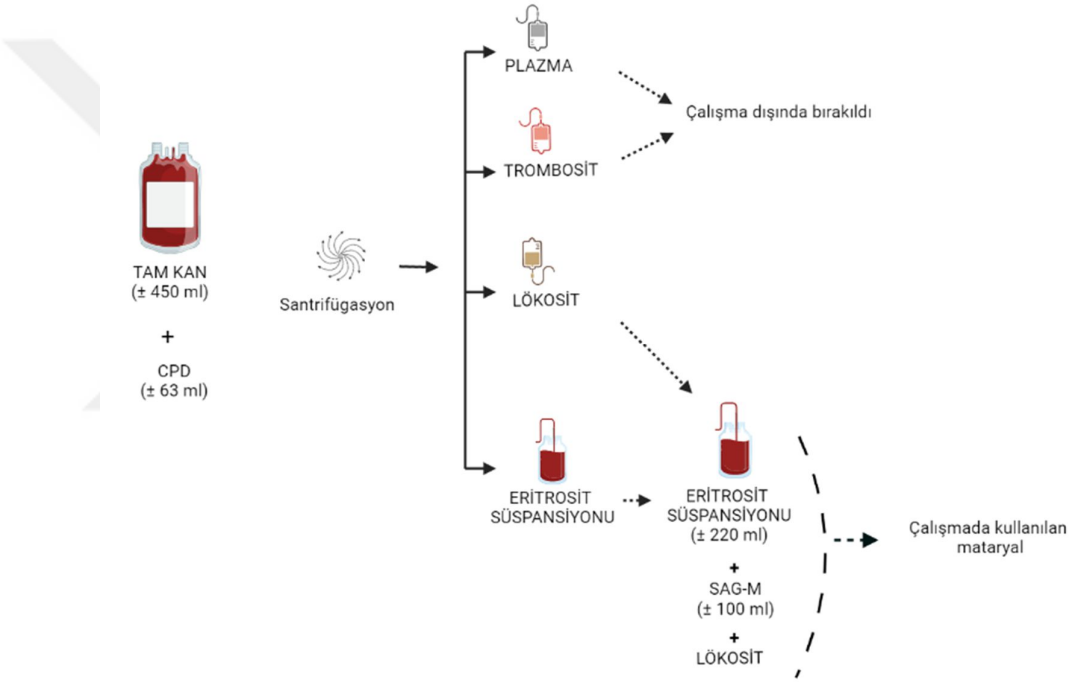
Çalışmamızda ulusal kan bağış kriterlerine uygun olan bağışçıların Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi'nde alınan kanları kullanılmıştır.

Şekil 11'de gösterildiği gibi ünite kan bağışı yapan sağlıklı bağışçı grubu 35,3 yaş ortalamasına sahip n=3 (3 erkek) kişiden oluşturulmuştur. MTT testi için de 26 yaşında n=1 (kadın) kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Bunlara ek olarak da yine MTT testinde kullanılmak üzere 35,3 yaş ortalamasındaki (3 erkek) bağışçılara ait eritrositler kullanılmıştır.



Şekil 11. Bağışçıdan kan alınma aşaması

Çalışma için EDTA'lı tüplere alınan kanlar ile gerekli tesler BUÜ Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarı'nda hemen çalışılmıştır. Aynı kişilerden kan torbasına alınan 1 ünite (~450 ml) kan ise 4-6 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra Reveos (TERUMO BCT, ABD) tam otomatik santrifüj cihazında santrifüjlenerek şekil 12'deki gibi eritrosit, lökosit, trombosit ve plazmaları ayrı torbalara otomatik olarak bölünmüştür. Plazma ve trombositler çalışma dışında bırakılıp lökositler şekil 13'deki steril hortum birleştirme cihazı (Terumo, ABD) kullanılarak tekrar eritrosit torbasının içerisine eklenmiştir.



Şekil 12. Bağışçılardan alınan kanın santrifügasyonla kullanıma uygun hale getirilme aşaması. (biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur)

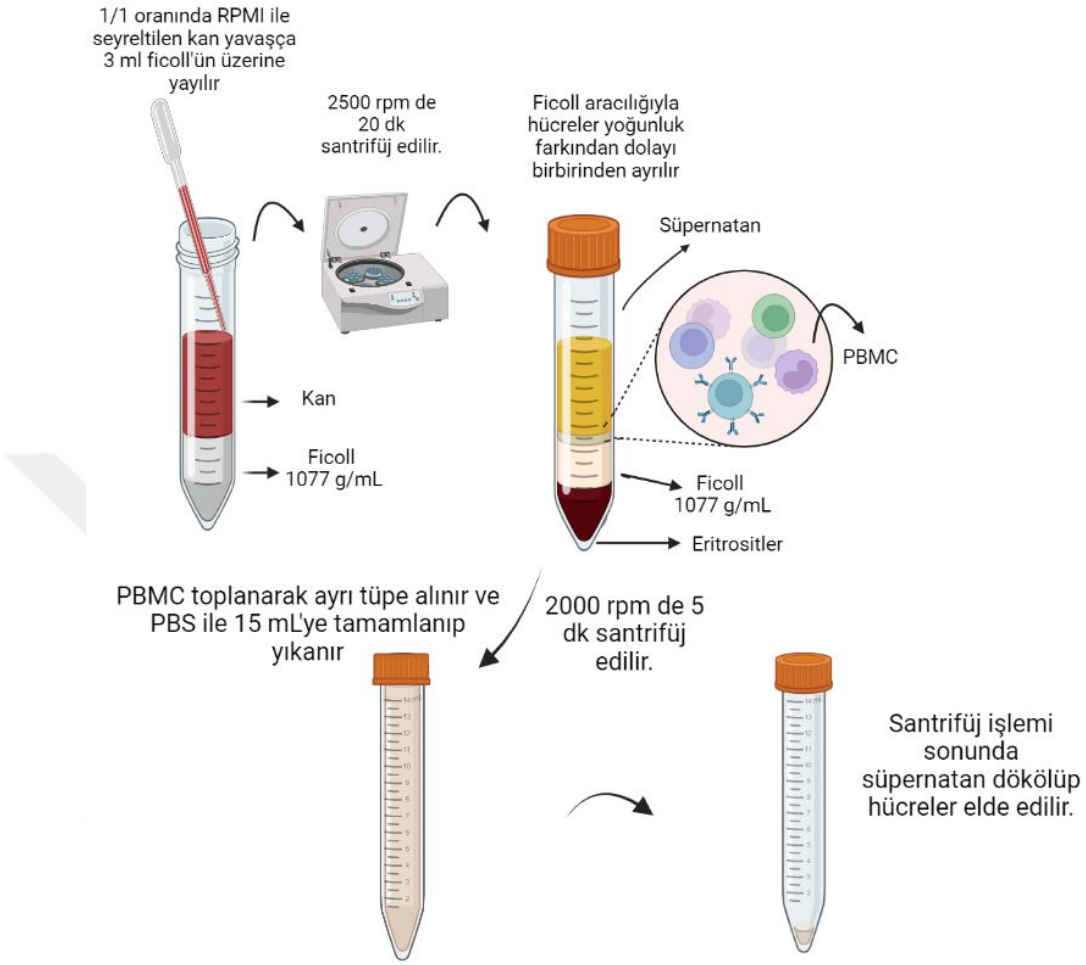
Daha sonra kan torbaları saklama koşullarına uygun olarak BUÜ Tıp fakültesi Hastanesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi'ndeki titreşimsiz +4° C'ye ayarlı dolaplarda çalışma günü gelene kadar muhafaza edilmiştir. Çalışma yapılacak olan kan torbalarından şekil 13'deki gibi steril hortum birleştirme cihazı yardımıyla örnek alınıp kalan kanlar tekrar dolaba kaldırılmıştır. Alınan örnekler ile ilgili testler ise Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 13. ES'nin hortum birleştirme cihazıyla küçük torbalara steril koşulda aktarımı.

3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PKMNH) İzolasyonu

Kan bağışçılarından EDTA'lı tüplere alınan kan ve kan torbalarına alınıp küçük torbalara aktarılan kanlar şekil 14'te gösterildiği gibi 1:1 oranında RPMI 1640 ile seyreltildi. Bu sırada 15ml'lik falcon tüpün dibine 3mL Ficoll (1.077 g/ml) koyulup seyreltilmiş olan periferik kan veya ES çok yavaş bir biçimde Ficoll'ün üzerine yayıldı. Yayılan kan sallamadan dikkatlice santrifüje koyulup 2500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda Ficoll ile süpernatan arasında kalan ve bulutsu bir görüntü oluşturan PKMNH'ler eritrositlerin alınmamasına dikkat edilerek pastör pipeti yardımı ile toplandı. Toplanan hücreler 15ml'lik falcon tüpün içine alındı ve üzerine 15 ml olacak şekilde 1X PBS eklenip 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Santrifüjden çıkan falkon tüpün içindeki süpernatan atıldı ve hücreler alde edildi.



Şekil 14. Tam kandan PKMNH izolasyonu (biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur).

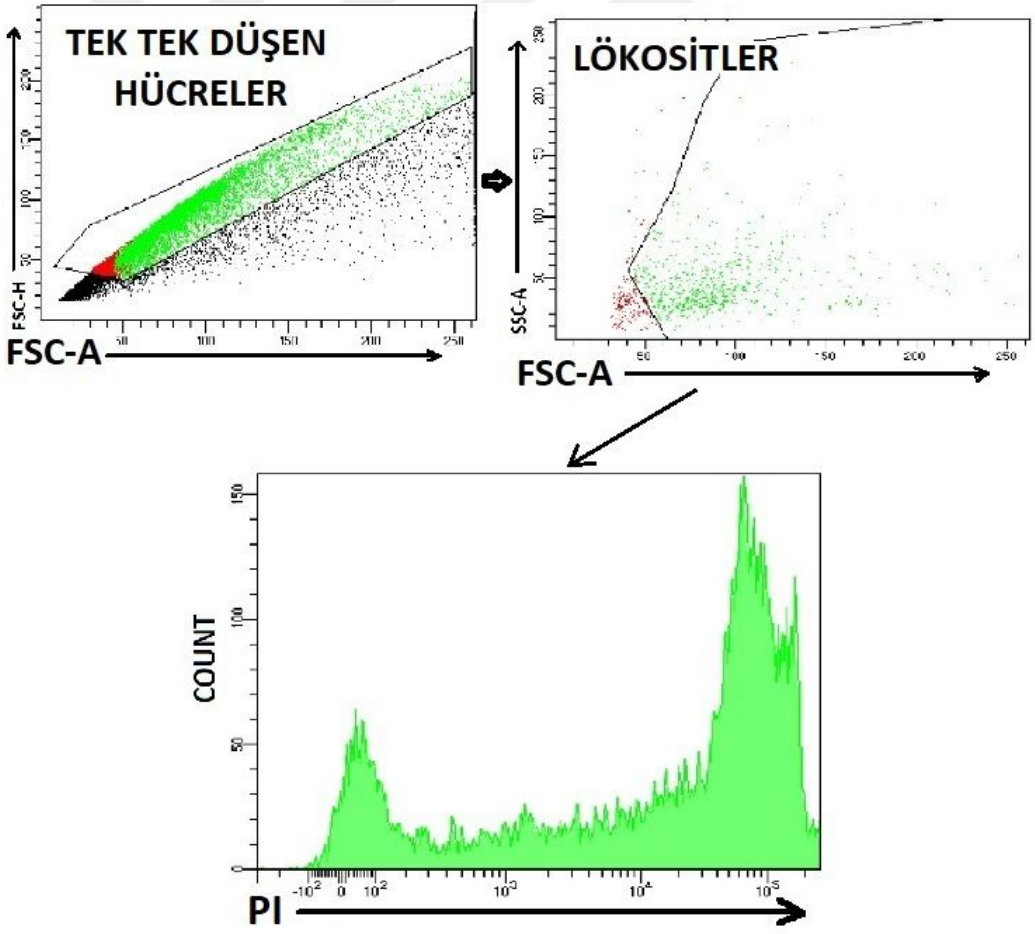
3.5. Hücre Sayımı

Tam RPMI ortamında bulunan hücreler pipetaj yapılarak iyice süspanse hale getirildi. Bu hücre süspansiyonunun içerisinden 10 µL alınarak eppendorf tüpün içerisinde 10 µL tripan mavisi çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışım Thoma lamı üzerine pipetlendi ve lam-lamel arasında yayılması sağlandı. Her sayım işlemi için Thoma lamı üzerindeki 4 alan rastgele seçildi ve bu bölgelere karşılık gelen canlı hücreler sayılarak aritmetik ortalaması alındı. Kullanılan Thoma lamının sayım haznesindeki karelerin boyutu 0,1 mm x 0,1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık yani yükseklik ise yine 0,1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin aritmetik ortalaması on ile çarpıldı. Elde edilen değer, sulandırma katsayısı olan iki ile ve

sayılan 4 kareden dolayı 4 ile çarpıldı ve daha sonra mL başına düşen hücre sayısını bulmak için 1000 ile çarpıldı. Sonuç olarak 1 mL hacimdeki hücre sayısı bulundu. Tripan mavisi ölü hücreleri boyadığı için Thoma lamında boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edilip sayıldı ve hesaplamalar buna göre yapıldı.

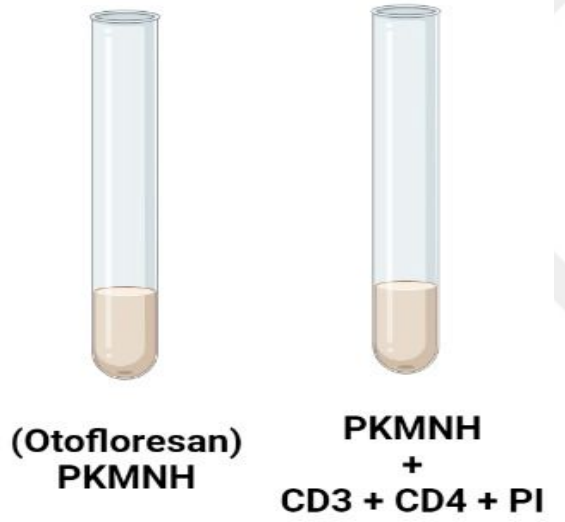
3.6. T Hücrelerin İmmünofenotiplendirmesi ve Canlılık Analizi

ES'nin saklama süresince yapılan testlerde saklama süresinin sonlarına doğru gerçekleştirilen proliferasyon analizlerinde hücrelerin aşırı ölüm nedeniyle prolifere olmadığı saptandı. Bu nedenle bazı adımlarda hücreler PI ile boyanıp şekil 15'deki gibi kapılanarak canlı-ölü hücre oranına bakıldı. %65'ten fazla ölüm varsa proliferasyon ve aktivasyon analizleri yapılmadı.



Şekil 15. Hücrelerin kapılanması ve %65' ten fazlasının ölümünü gösteren temsili şekil.

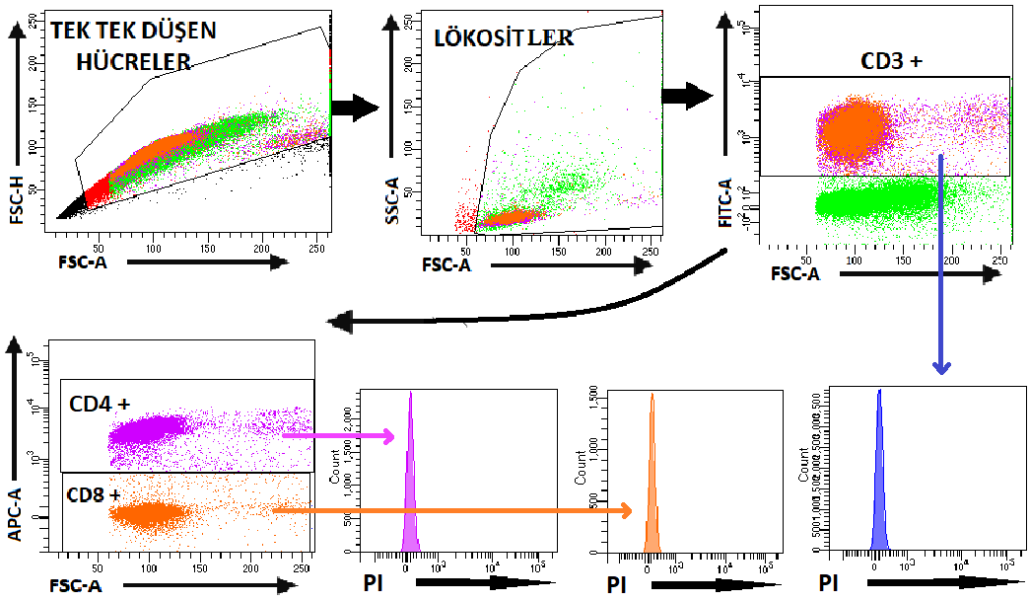
Çalışmalar bağışçılardan torbalara alınan ve santrifüj işlemi sonunda dopalamaya hazır hale getirilip +4º C'de saklanan kanlar ve bağışçıdan EDTA'lı tüpe alınan kanlar ile yapılmıştır. Torbalardan, günü gelen çalışma için hortum birleştirme cihazı yardımıyla steril olarak 15 ml ES alınmıştır. Hem ES hemde EDTA'lı tüpteki kan ayrı ayrı Ficoll'e (1.077 g/mL) yayılarak PKMNH elde edildi. Elde edilen PKMNH 100'er µl olacak şekilde şekil 16'daki gibi hazırlanan akım sitometri tüplerine dağıtıldı. Üzerlerine anti-insan CD3 ve CD4 belirteçlerine karşı üretilmiş monoklonal antikorlar uygun konsantrasyonlarda eklendi. Akım sitometre tüpleri vortekslendikten sonra +4° C'de 40 dk inkübe edildi.



Şekil 16. T hücrelerin immünofenotiplendirmesi ve canlılık analizi için hazırlanması. PKMNH, periferik kan mononükleer hücreleri; CD, *cluster of diferantation*: farklılaşma kümesi; PI, *propidium iodide*: propidyum iyodür (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 2mL PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatan ile birlikte bağlanmayan antikorlar da uzaklaştırıldı. Daha sonra akım sitometre tüpüne 1µl PI (Propidyum İodür) eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmesinin ardından 150 µl PBS içinde süspanse edilerek BD FACS ARIA III (BD, ABD) akım sitometri cihazında analiz edildi. İlk olarak bu belirteçlerle işaretlenmiş pozitif hücrelerin içinden tek tek düşen hücreler kapılandı. Sonrasında tek tek düşen hücrelerin içinden lökositler kapılandı. İmmunfenotiplendirme için $CD3^+$ olduğu belirlenen hücrelerin $CD4^+$ ve $CD8^+$ olan alt popülasyonları kapılandı. Şekil 17'de gösterildiği gibi yapılan kapılama stratejilerinin ardından antikorların konjuge edildiği florokromları gösteren PI

pozitif olan $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ (T hücreler) hücreler FacsDiva (BD, ABD) programı kullanılarak değerlendirildi.

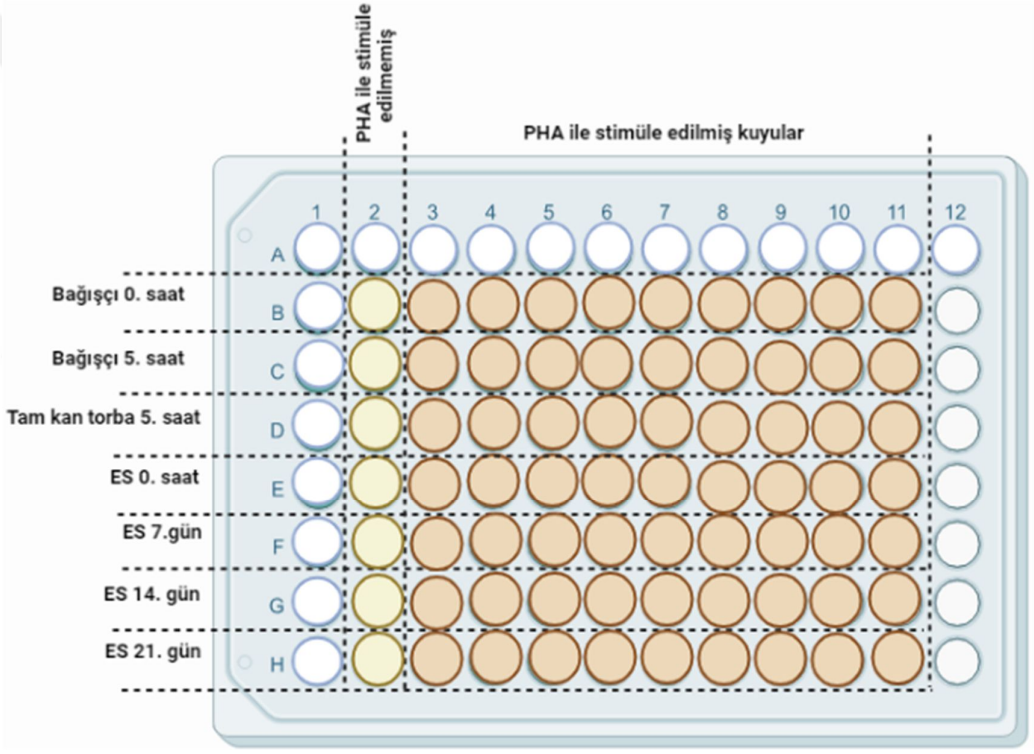


Şekil 17. T Hücrelerin akım sitometri ile immüno fenotiplendirmesi ve canlılık analizinin temsili görüntüsü

3.7. PKMNH'lerin CFSE ile İşaretlenip T Hücrelerin Proliferasyon Becerisinin Akım Sitometre ile Analizinin Yapılması

Periferik kan Ficoll'e (1.077 g/mL) yayıldı. Gradiyent santrufuj ayrımlama yöntemi ile PKMNH'ler ayrımlandı (bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi). Hücreler 1mL tam RPMI 1640 besiyeri ile yeniden süspanse edildi. Hücrelerin içinden 10µl alınıp 0,2 mL'lik eppendorf tüpüne koyuldu ve üzerine de 10 µl tripan mavisi eklenerek karıştırıldı. Bu tüpün içerisinden 10 µl alınıp thoma lamına damlatılarak hücreler sayıldı. Sonraki tüm işlemler CFSE'nin ışıktan etkilenmemesi için karanlık ortamda gerçekleştirildi. Çıkan hücre sayısına göre hesaplama yapıldıktan sonra $2X10^6$ PKMNH ayrı bir falkon tüpüne alınarak üzerine 0.2 µl CFSE eklendi ve hafifçe vortekslendi. İnkubasyon 15 dk boyunca 37° C sıcaklık ve %5 CO_2'li ortamda devam ettirildi. İnkübasyon sonunda direkt 5mL soğuk tam RPMI 1640 eklenerek, 5 dk buz içerisine gömüldü. İnkübasyon karanlıkta devam ettirildi ve inkübasyon sonrasında hücreler hızlıca +4° C'ye ayarlanmış olan santrifüje koyulup 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatan uzaklaştırılıp hücrelerin üzerine tekrar 5 mL soğuk tam RPMI 1640 eklendi ve santrifüje koyulup +4° C ve 2000 rpm'de 5 dk

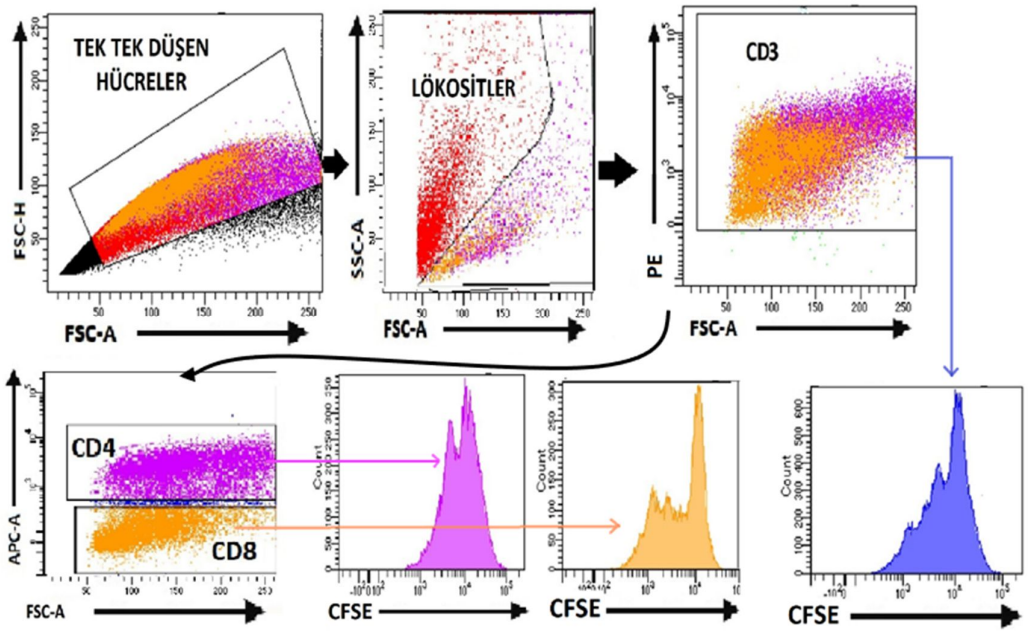
santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sırasında tam RPMI 1640 kullanılması ile birlikte hücrelere bağlanmayan serbest CFSE'nin inaktive edilmesi sağlandı. Santrifüj sonrasında süpernatan dökülerek 2 mL hacimde 2.000.000 hücre olacak şekilde tam RPMI 1640 ile süspanse edildi. Daha sonra PHA ile uyarım yapılmayacak olan kuyu için 200 µl hücre alınarak V-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. Kalan hücrelerin üzerine 100.000 hücre başına 1 µl olacak şekilde PHA koyuldu pipetaj yapılarak karışmaları sağlandı. PHA ile uyarılan hücreler de aynı kültür kabına her kuyuya 200 µl olacak şekilde ekildi. Hazırlanan kültür kuyuları 96 saat boyunca 37° C sıcaklık ve %5 CO_2'de inkübatöre bırakıldı (Şekil 18).



Şekil 18. PKMNH'nin Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) ile işaretlenip kültür kuyularına ekimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

96 saatlik inkübasyonun sonunda kuyulardaki hücreler akım sitometre tüplerine toplandı ve üzerlerine 2 mL PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatan atıldı. Daha sonra hücreler 100µl PBS'de süspanse edildi. Hücreler üzerlerine 2.5 µl CD3 ve 1 µl CD4 insan monoklonal antikorları pipetlenerek işaretlendi. Akım sitometre tüplerindeki hücreler karanlıkta 40 dk, +4° C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra akım sitometre tüplerine 2mL

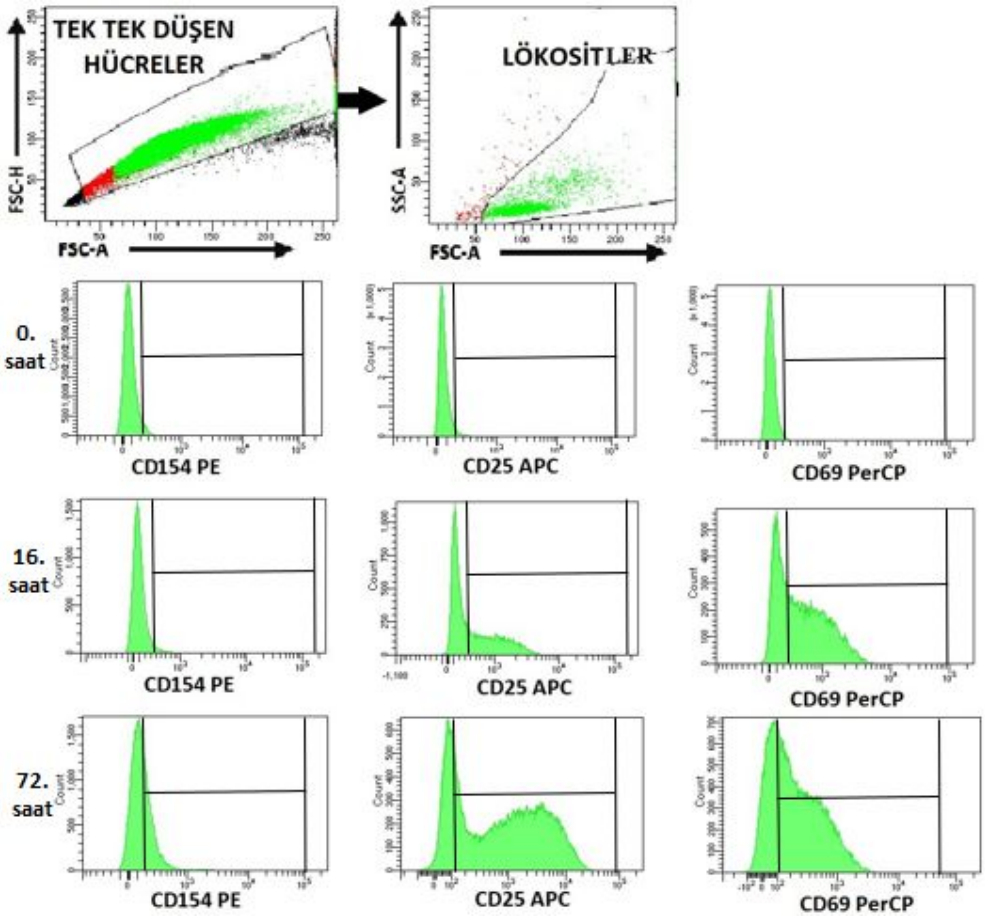
PBS eklendi ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda hücreler 250 µl PBS ile süspanse edilerek BD FACS ARIA III akım sitometri cihazında değerlendirildi (Şekil 19). Kapılama strajesinde önce tek tek duşen hücrelerin içinden lökositlerin olduğu alan kapılandı. Lökositlerin içinden $CD3^+$ olan hücreler kapılandı. İmmunfenotiplendirme için $CD3^+$ olduğu belirlenen hücrelerin $CD4^+$ ve $CD8^+$ olan alt popülasyonları kapılandı.



Şekil 19. PKMNH'nin Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) ile işaretlendikten sonra T hücrelerin proliferasyon becerisinin akım sitometre ile analizinin yapılması.

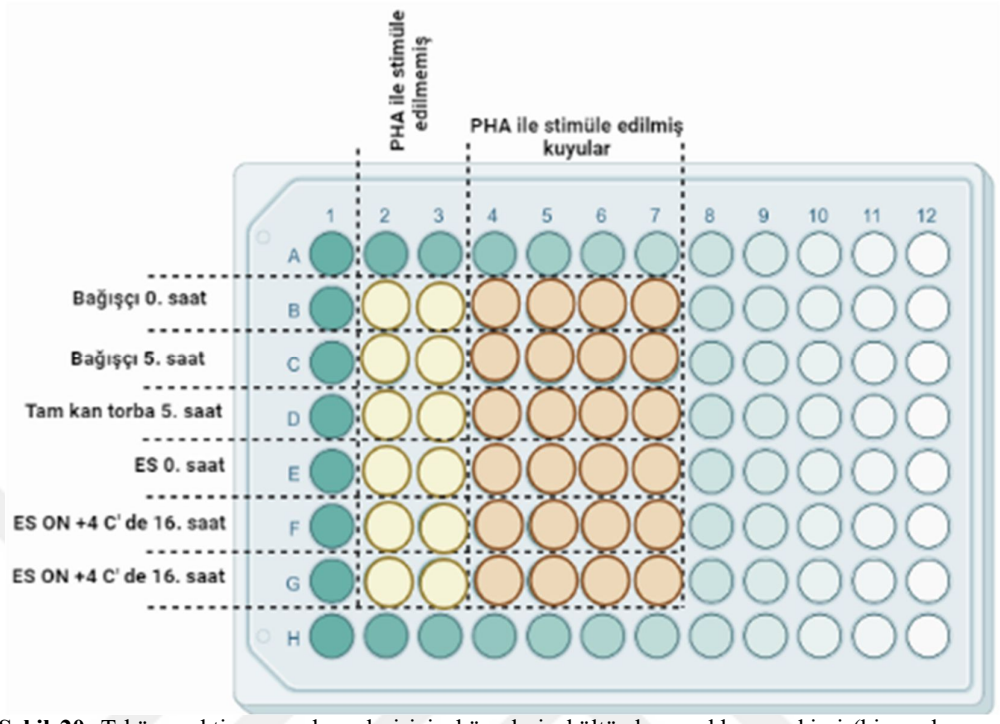
3.8. T Hücre Aktivasyon Belirteçlerinin Akım Sitometrik Analizi

Kanın Ficoll'e (1.077 g/mL) yayılmasıyla elde edilen PKMNH thoma lamında sayıldı ve 1.200.000 hücre alınarak farklı falkon tüpe aktarıldı ve hücreler tam RPMI ile 1.2 mL' ye tamamlandı. Sıfırıncı saat aktivasyon için noncomplate RPMI ile süspanse edilen hücreler aşağıda da anlatılacağı gibi gerekli antikorlar ile işaretlenip BD FACS ARIA III akım sitometre cihazında FacsDiva programı kullanılarak şekil 21'deki gibi kapılanıp değerlendirildi.



Şekil 21. T hücre aktivasyon belirteçleri olan CD25, CD69 ve CD154'ün akım sitometride temsili kapılaması (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

16 ve 72. saat aktivasyon belirteçleri için ise PHA uyarımı yapılmayacak olan kuyu için 200 µl hücre alınıp V-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. Kalan hücrelerin üzerine 100.000 hücre başına 1µl olacak şekilde PHA eklenip yavaşça pipetaj yapılıp karışmaları sağlandı. PHA uyarımı yapılan hücreler de alınarak her kuyuda 200µl olacak biçimde V-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabına pipetlendi. Sonuçta şekil 20'deki gibi kuyu düzeni oluşturuldu ve bunun ardından kültür kapları 37° C sıcaklık ve %5 CO_2'de inkübatöre koyuldu.



Şekil 20. T hücre aktivasyon deneyleri için hücrelerin kültür kuyucuklarına ekimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

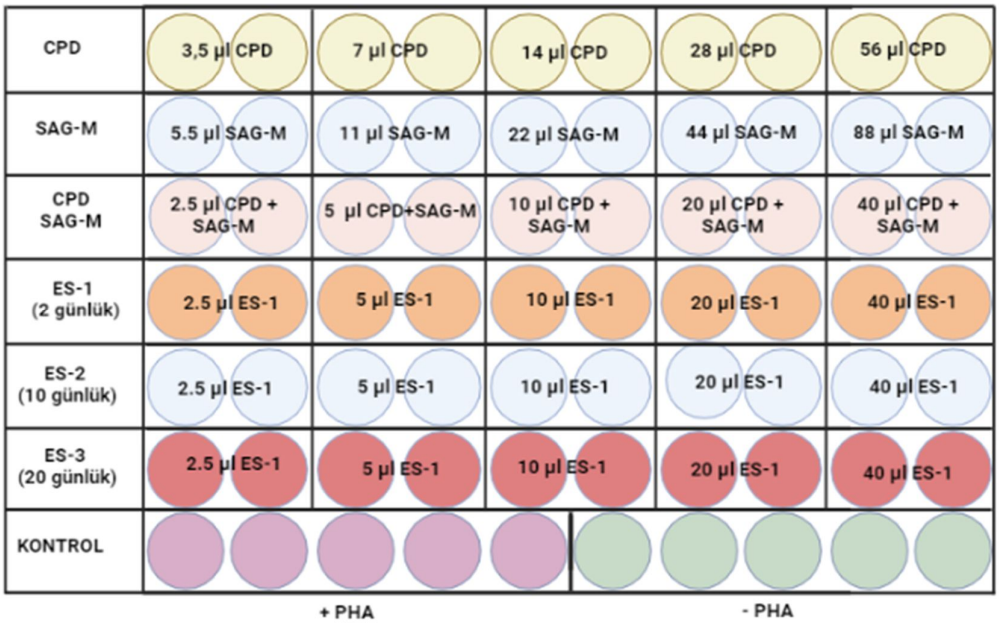
İnkübatördeki hücreler 16 ve 72. saatlerde kuyulardan alınarak etiketlenmiş olan akım sitometre tüplerine koyuldu. Tüplerin üzerlerine 2mL PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra hücreler 100µl PBS ile süspanse edildi. Hücreler 1 µl CD25, 2.5 µl CD69 ve 2.5 µl CD154 insan monoklonal antikorları ile işaretlendi. Daha sonra da 40 dk, +4° C ve karanlıkta inkübasyon sürecine bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüplere 2 mL PBS eklendi ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. İşlem sonunda hücreler 250µl PBS ile süspanse edilerek BD FACS ARIA III akım sitometre cihazında FacsDiva programı kullanılarak şekil 21'deki gibi kapılanıp değerlendirmesi yapıldı.

3.9. MTT Yöntemi ile Canlılık Analizleri

MTT analizinde CPD ve SAG-M solüsyonlarının ve eritrositlerin PKMNH ve granülosit hücrelerin canlılığına olan etkisi incelendi. Sağlıklı bireylerin kanlarının PKMNH ve granülosit fazı Ficoll 1077 g/mL ve Ficoll 1119 g/mL kullanılarak steril ortamda izole edildi. Buna paralel olarak ES'larını saklamak ve canlılığın sürdürülmesi için kullanılan CPD ve SAG-M solüsyonları hem ayrı ayrı

hem de karışım olarak (%12 CPD, %88 SAG-M) hazırlandı. Ayrıca farklı depolama günlerine sahip eritrositler ana torbalardan steril hortum birleştirme cihazı yardımıyla küçük torbalara aktarıldı ve bu şekilde kullanıldı.

Bu aşama için izole edilen PKMNH ve granülosit hücreler her kuyuda 200.000 adet olacak şekilde dağıtıldı. Şekil 22'deki şemada olduğu gibi kuyu düzeni oluşturularak farklı dozlardaki ek solüsyonlar ve eritrositler son hacim 100 µl olacak şekilde cRPMI ile dilüe edildi. Daha sonra PKMNH'leri ve granülositlerin üzerine pipetlendi ve bu kültür kapları 72 saat boyunca 37° C sıcaklık ve %5 CO_2'de inkübatöre koyuldu. Bu test PKMNH'leri ve granülositler için ayrı kültür kaplarında gerçekleştirildi.



Şekil 22. MTT kültür kuyularının düzeni. Biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur.

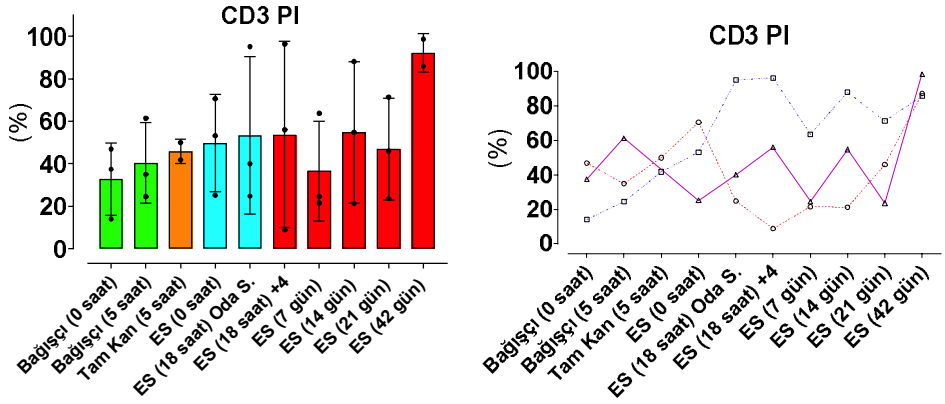
72 saatin sonunda kuyulara 25 µl MTT solüsyonu eklenerek 24 saaat buyunca 37° C sıcaklık ve %5 CO_2'de inkübatöre koyuldu. İnkübasyon sonunda kuyularda oluşan formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak için bütün kuyulara 80 µl SDS-DMF eklendi. Dört saat daha inkübatörde bekletildikten sonra ek solüsyonların ve eritrositlerin farklı konsantrasyonlarının PBMNH ve granülositlerin canlılığı üzerindeki etkileri spektro fotometre cihazı ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

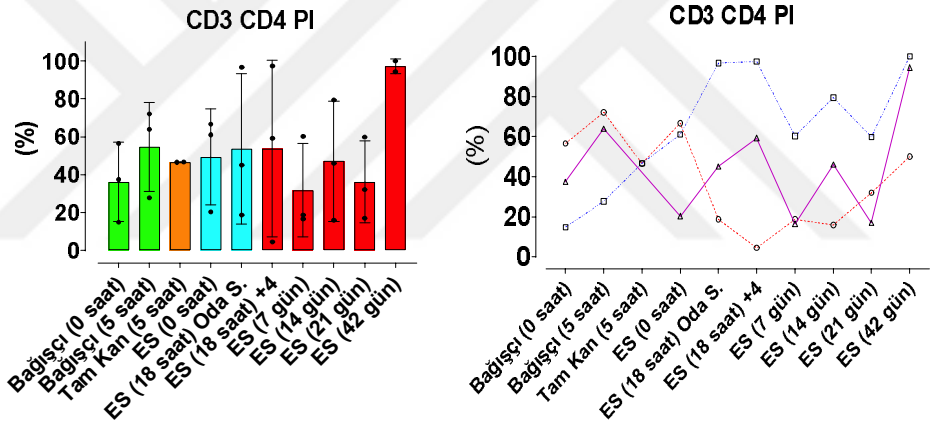
4.1. T Hücrelerin Canlılık Sonuçları

Şekil 23, 24 ve 25'te PI pozitif olan hücreler yani ölü hücrelerin oranları gösterilmiştir. $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin canlılık sonuçlarına bakıldığında bağışçılardan EDTA'lı tüpe alınan kanların 0. saatlerinde canlılık oranının CD3+, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin her biri için EDTA'lı tüp 5. saat örneklerine oranla daha yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Ancak tam kan torba 5. saat örnekleriyle aynı anda alınmasına rağmen EDTA'lı tüp 5. saat örneklerinin $CD3^+$ ve $CD8^+$ T hücre canlılığı daha yüksek $CD4^+$ canlılığı ise daha düşük seviyededir. Daha sonra 5. saat tam kan torba örnekleri santrifüj edilip ES haline geldiğinde ES 0. saatinde ki $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin canlılığının tam kan torba örneklerine göre azaldığı görülmektedir.

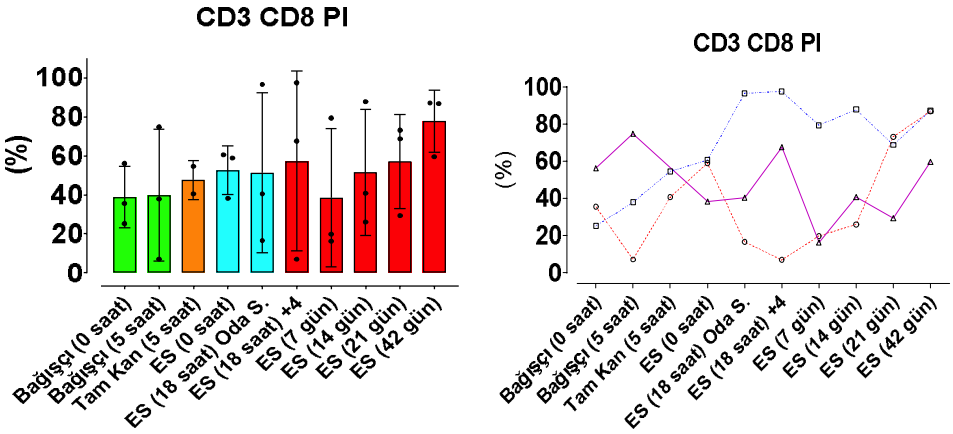
ES torbalarından steril hortum kapatma cihazı ile küçük torbalara alınıp oda sıcaklığında ve +4 °C 18 saat bekletilerek $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin canlılığına bakıldı. Sonuçlar ES 0. saat örnekleriyle karşılaştırıldığında oda sıcaklığında ve +4 C° de bekletilen $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin canlılığının arttığı görüldü. Daha sonra ES 7. gün örneklerinde yapılan analizlerde $CD3^+$ $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin her birinin canlılık oranının arttığı, 14. günde tekrar azaldığı ve 21. günde de $CD8^+$ T hücreler hariç tekrar arttığı görülüyor. Ancak 21 günde ve 42. günde akım sitometri analizlerinde $CD3^+$ kapısına düşen hücre oranının çok düşük seviyelere indiği görüldü. 42. güne gelindiğinde neredeyse canlı $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre kalmadığı ve $CD3^+$ kapısına düşen hücre oranının %0,1-0,2 civarına indiği görüldü. Medyan değerleri böyleyken kişisel bazda bakıldığı zaman PI pozitif olan CD 3, 4 ve 8 belirteçlerinde farklar görülmekte. Bu farkaların nedeni yaş ve immün sistem ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 23. CD3 T hücrelerin PI pozitiflik oranları (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ve error barları ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).



Şekil 24. CD4 T hücrelerin PI pozitiflik oranları (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ve error barları ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).



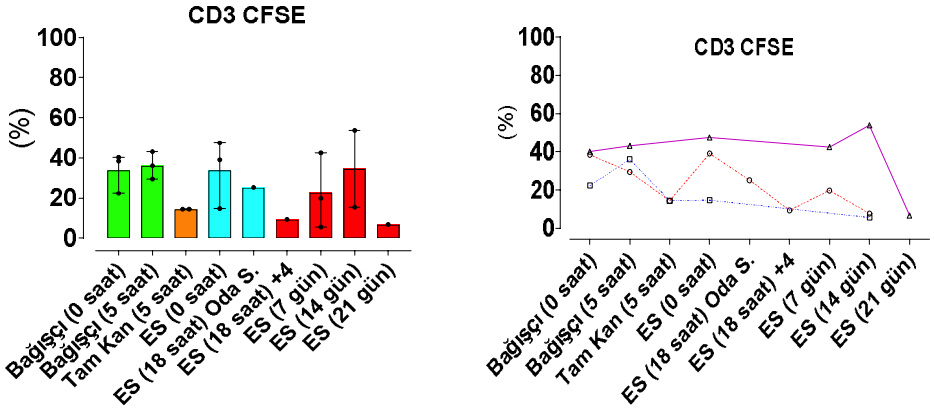
Şekil 25. CD8 T hücrelerin PI pozitiflik oranları (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ve error barları ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).

4.2. T Hücrelerin Proliferasyon Sonuçları

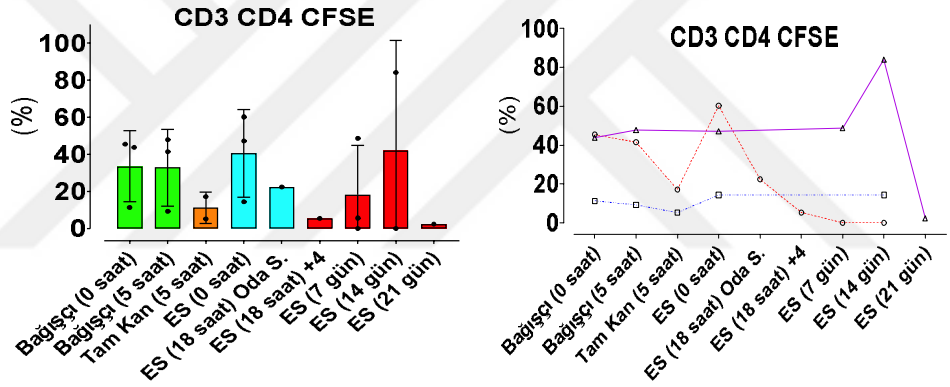
CFSE ile işaretlenip akım sitometre cihazında değerlendirilen $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon özelliğine bakıldığında (şekil 26, 27 ve 28) EDTA'lı tüp örneklerinin 0. saatleri ve 5. saatleri arasında $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreler arasında çok büyük farklılık görülmedi. Ancak EDTA'lı tüp 5. saat örnekleriyle aynı anda alınmasına rağmen tam kan torba 5. saat örneklerinin $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre proliferasyon düzeylerinin daha düşük seviyede olduğu görüldü. Daha sonra 5 saat oda sıcaklığında bekletilip santrifüj edilerek ES elde edildi. ES 0. saatindeki $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon düzeyleri tam kan torba 5. saat örneklerine oranla daha yüksektir.

ES torbalarından steril hortum kapatma cihazı ile küçük torbalara alınıp oda sıcaklığında ve +4 C° 18 saat bekletilen örneklerdeki $CD3^+$ ve $CD4^+$ T hücrelerinin proliferasyon düzeyleri ES 0. saate göre azalırken $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon düzeyi ES 0. saat örnekleriyle yakın seviyededir. Ayrıca bu örnekler birbiri ile kıyaslanınca, oda sıcaklığında bekletilen örneklerin proliferasyon düzeylerinin +4 C° de bekletilen örneklere göre yüksek olduğu görülmektedir.

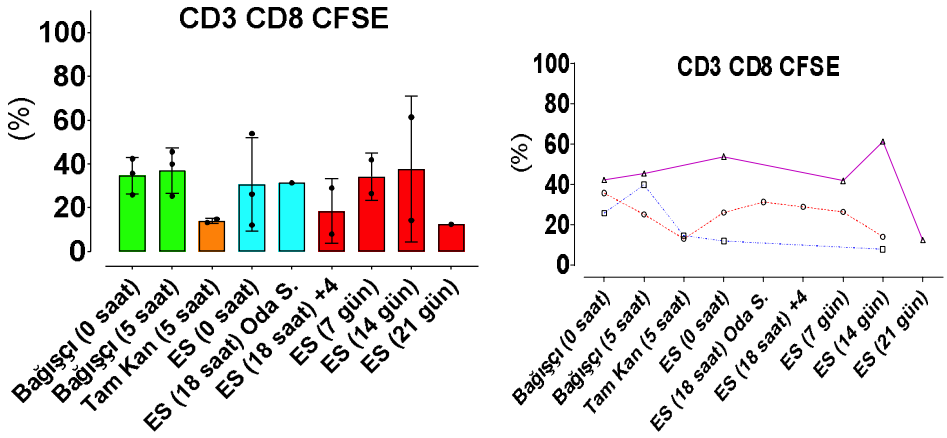
ES 7. Günde $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon düzeyleri ES 0. gün örneklerine oranla azalmaktadır. Daha sonra 14. günde artan proliferasyon oranları 21. günde tekrar azalmaktadır. 21. gün örneklerinde azalan $CD3^+$ hücre oranı ve hücrelerin proliferayon yeteneğinin en düşük seviyelere ulaşmasından dolayı, ayrıca 42. gün örneklerindeki canlılığın çok düşük ve CD3 kapısındaki hücre oranının da %0,1-0,2 seviyelerine gerilemesinden dolayı proliferasyon testi çalışılmadı. Medyan değerleri böyleyken kişisel bazda proliferasyon sonuçlarında ortaya çıkan farkların nedeninin yaş ve immün sistem ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 26. CD3, T hücrelerin depolama boyunca değişen proliferasyon oranları ve kan bağışçıları arasında kıyaslanması (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).



Şekil 27. CD4, T hücrelerin depolama boyunca değişen proliferasyon oranları ve kan bağışçıları arasında kıyaslanması (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).



Şekil 28. CD3, T hücrelerin depolama boyunca değişen proliferasyon oranları ve kan bağışçıları arasında kıyaslanması (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).

4.3. T Hücre Aktivasyon Sonuçları

$CD3^+$ T hücrelerin CD25, CD69 ve CD154 aktivasyon belirteçlerine bakıldığında (şekil 29, 30 ve 31) bağışçılardan alınan EDTA'lı tüp 0. saatlerinin 0, 16 ve 72. saatlerindeki aktivasyon belirteçlerinde CD25 CD69 ve CD 154'ün sıfırıncı saatten 72 saate doğru gidildikçe arttığı görülmektedir.

EDTA'lı tüp 5. saat örneklerinde ise 0, 16 ve 72. saatler boyunca CD25 ve CD154'ün artışta olduğu CD69'un ise sıfırıncı saatten 16 saate doğru arttığı 72 saatte ise düştüğü görülmektedir.

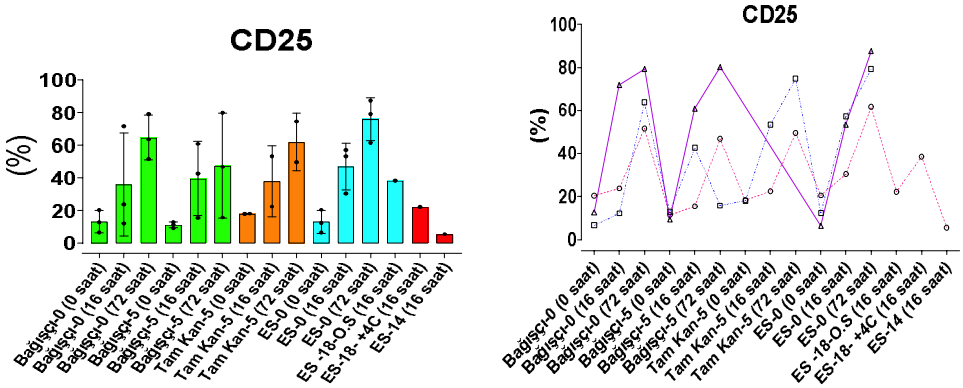
Tam kan örneklerine bakıldığında ise CD25 0. saatten 72 saate doğru sürekli bir artış göstermekte CD69 0. saatten 16. saate doğru artıp daha sonra 72. saatte küçük bir azalma göstermekte CD 154 ise 0. saatten 16. saate doğru azalıp daha sonra 72. saatte tekrar artmaktadır.

ES 0. Saatinde ise CD25 0. saatten 72. Saate doğru sürekli artarken CD69 0. saatten 16. saate doğru artıp 72. saatte azalmakta, CD154 0. Saatten 72. saate kadar sürekli bir artış göstermektedir

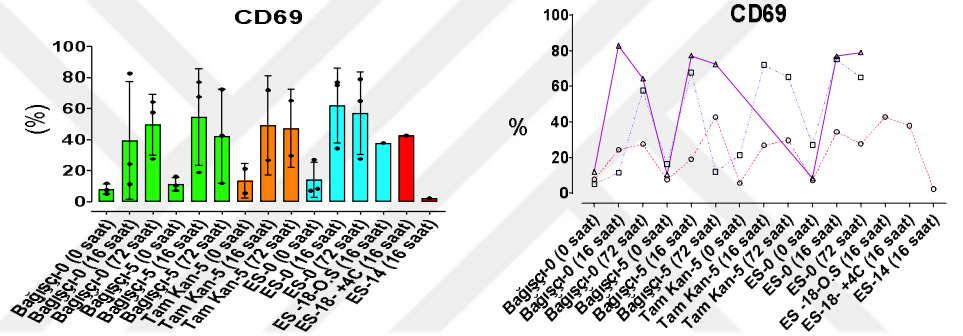
ES torbalarından steril hortum kapatma cihazı ile küçük torbalara alınıp oda sıcaklığında ve +4 C° 18 saat bekletilen örneklere bakıldığında ise oda sıcaklığında bekletilen kanın 16. saat CD25 düzeyi normal seviyelerde gözükmekte ancak 72 saatte bu hücrelerin PI pozitiflik oranı %65'den fazla olduğu için değerlendirme yapılmadı. CD69 düzeyleri ise yine 16. saatinde normal seviyelere yakın gözükmektedir. 72 saatte ise bu hücrelerin PI pozitiflik oranı %65'den fazla olduğu için değerlendirme yapılmadı. CD154 seviyesi de 16. saatte diğer koşullara yakın seviyede gözükürken 72 saatte ölüm oranının %65'ten fazla olmasından dolayı değerlendirilmedi.

Bağışçıların bir tanesinde depolamanın 14. gününde $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin canlılık oranı yüksek olduğundan dolayı aktivasyon belirteçlerine bakıldı. 16. saatte CD25, CD69 ve CD154 oranlarının o güne kadar ki en düşük seviyede olduğu görüldü. 72 saatte ise ölüm oranının %65'ten fazla olması nedeniyle değerlendirilme yapılmadı.

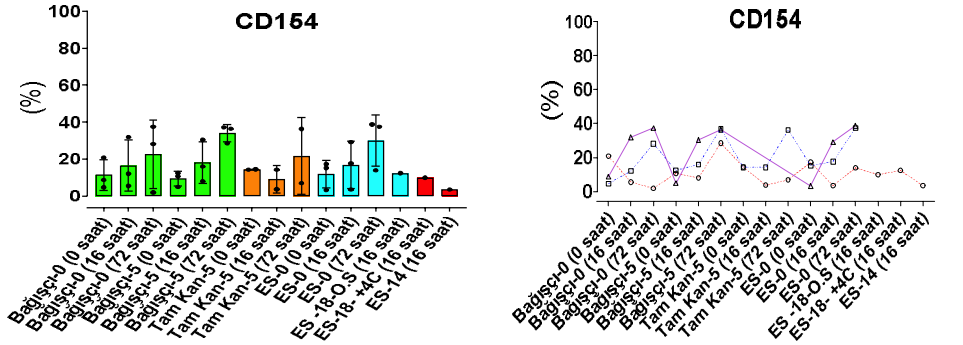
Medyan değerleri böyleyken kişisel bazda bakıldığı zaman aktivasyon belirteçlerinde farklar görülmekte. Bu da yaş ve immün sistem ile ilgili olabileceği düşünülmektedir



Şekil 29. CD 25 aktivasyon belirtecinin depolama boyunca değişen oranları ve kan bağışçıları arasında kıyaslanması (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).



Şekil 30. CD 69 aktivasyon belirtecinin depolama boyunca değişen oranları ve kan bağışçıları arasında kıyaslanması (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).



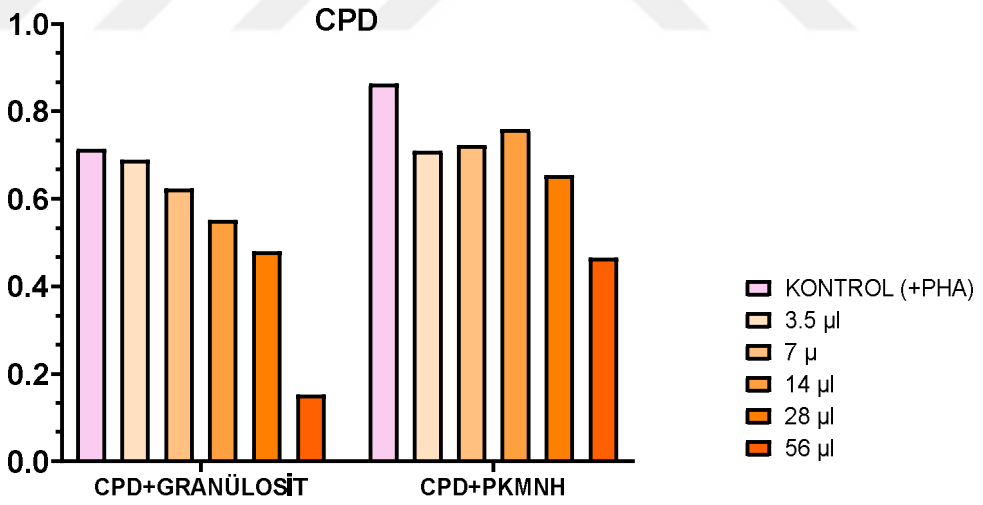
Şekil 31. CD 154 aktivasyon belirtecinin depolama boyunca değişen oranları ve kan bağışçıları arasında kıyaslanması (Soldaki grafikte sonuçlar medyan değerleri ile birlikte topluca verilirken sağdaki grafikte bireysel bazda verilmiştir).

4.4. MTT Analiz Sonuçları

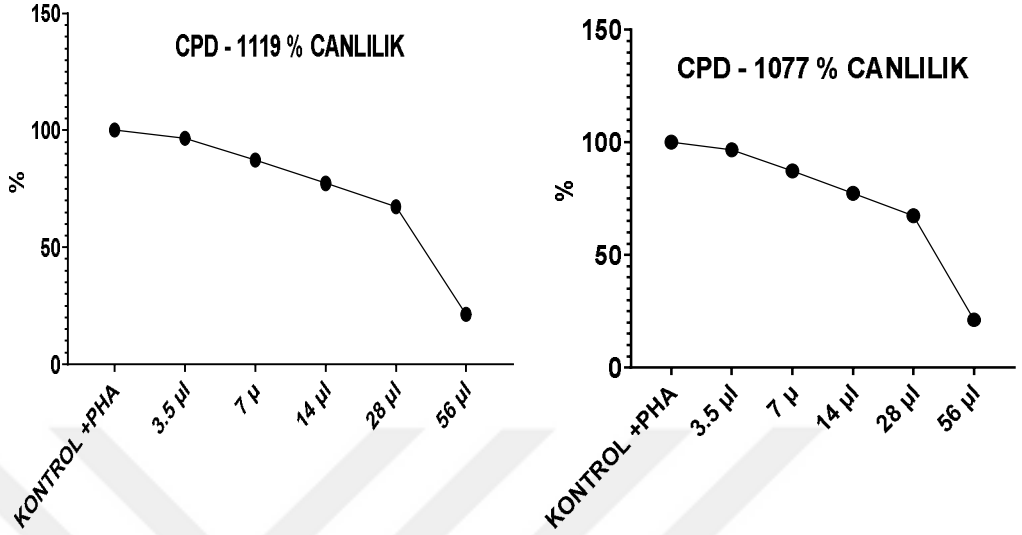
MTT testi kanın saklama süresi boyunca hücrelerin canlılığını muhafaza etmek için kan torbalarına koyulan CPD ve SAG-M solüsyonlarının ve eritrositlerin PKMNH ve granülosit hücrelerin canlılığına olan etkisini analiz etmek için yapıldı. Çalışmamızda CPD ve SAG-M solüsyonlarının farklı dozları ve %12 CPD, %88 SAG-M karışımını kullanıldı.

Sonuçlara bakılınca (şekil 32-33) CPD solüsyonunun granülosit (1119) canlılığı üzerindeki etkisi doz arttıkça azalıyor ve hücrelerin en düşük dozdan en yüksek doza kadar kontrolden daha düşük canlılık oranına sahip olduğu görülmektedir.

CPD solüsyonunun PKMNH (1077) canlılığı üzerindeki etkisine baktığımızda da (şekil 34, 35) kontrol grubuna oranla düşük seviyelerde kaldığı görülmekte. Ancak 14 µl dozda canlılığın en yüksek olduğunu, doz arttıkça buradan sonra canlılığın azaldığını görülmektedir.



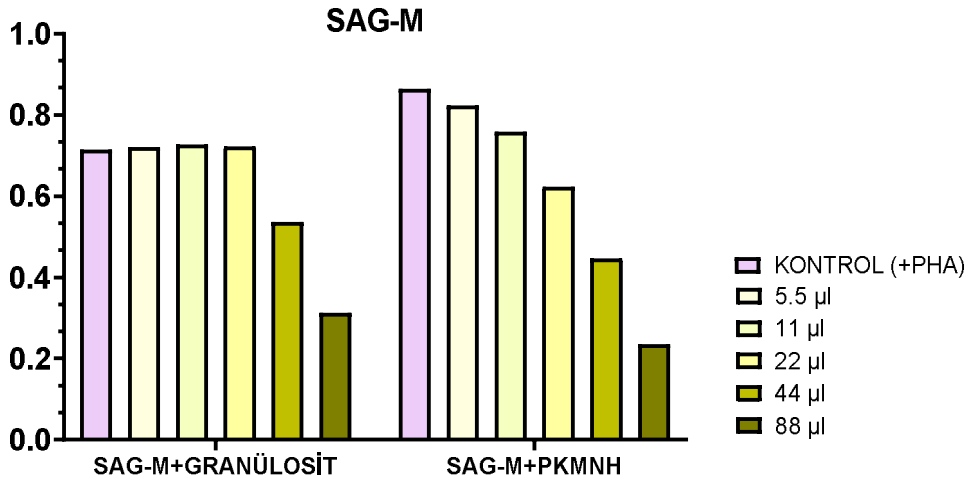
Şekil 32. CPD'nin granülositler ve PKMNH gruplarının canlılığı üzerindeki etkisi.



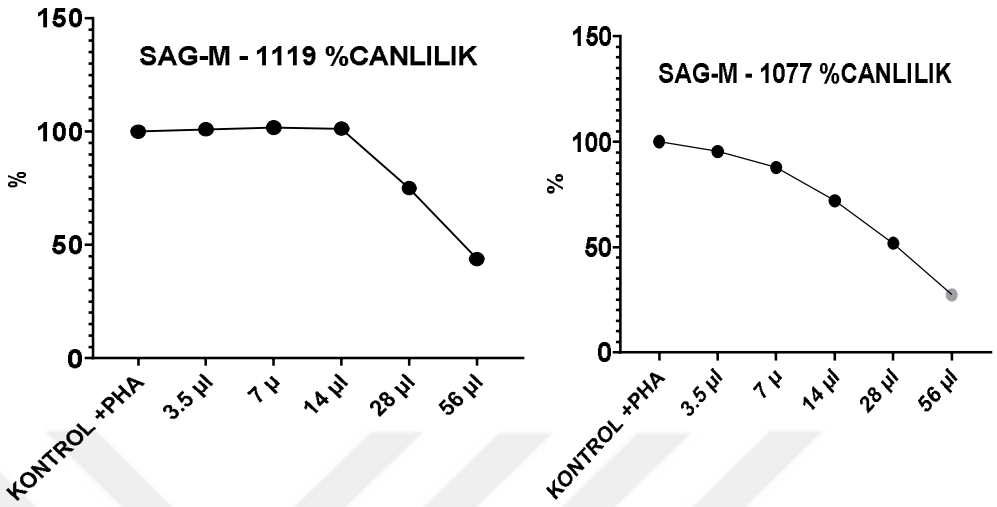
Şekil 33. CPD'un PKMNH ve granülosit gruplarının canlılığı üzerindeki etkisi (% değişim grafiği).

SAG-M solüsyonunun granülosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisine bakıldığında (şekil 34, 35) ilk 3 dozda kontrol grubuyla yakın ve daha fazla canlılık oranına sahipken daha sonra artan doza bağlı olarak canlılık oranın azaldığını görülmektedir.

SAG-M solüsyonunun PKMNH üzerindeki etkisine bakıldığında da (şekil 34, 35) artan doza bağlı olarak canlılık oranın azaldığını ve her zaman kontrol grubunun altında olduğunu görülmektedir.



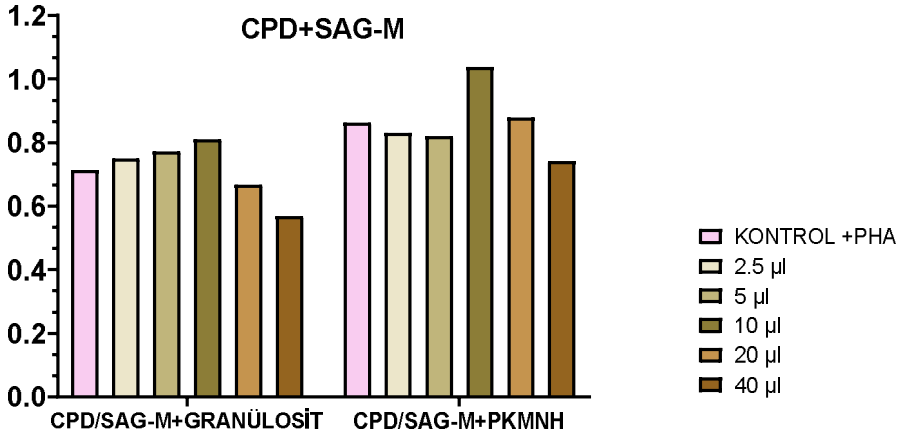
Şekil 34. SAG-M'in granülositler ve PKMNH gruplarının canlılığı üzerindeki etkisi.



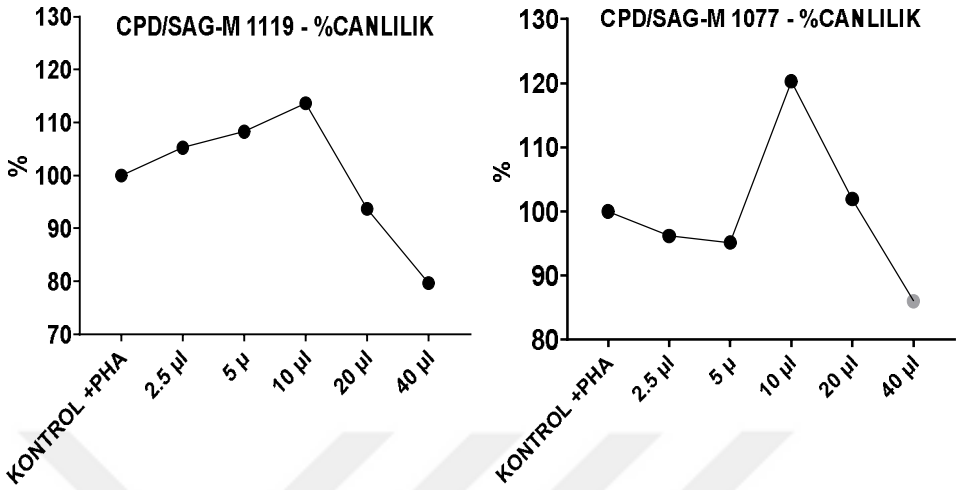
Şekil 35. SAG-M'in PKMNH ve granülosit hücre gruplarının canlılığı üzerindeki etkisi (% değişim grafiği).

CPD ve SAG-M karışımının granülosit hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisine bakıldığında (şekil 36, 37) kontrol grubuna oranla bir artış mevcut ve transfüzyonda kullanılan miktara göre simüle ettiğimiz 10 µl'lik dozda canlılık kontrol grubunun üzerinde ve en yüksek seviyededir.

CPD ve SAG-M karışımının PKMNH canlılığı üzerindeki etkisine bakıldığında da (şekil 36, 37) ilk önce kontrol grubuna yakın bir canlılık oranına sahipken transfüzyonda kullanılan miktara göre simüle ettiğimiz 10 µl'lik dozda canlılık kontrol grubunu da geçerek en yüksek seviyeye çıkıyor daha sonra doz arttıkça canlılığın düştüğü görmektedir.

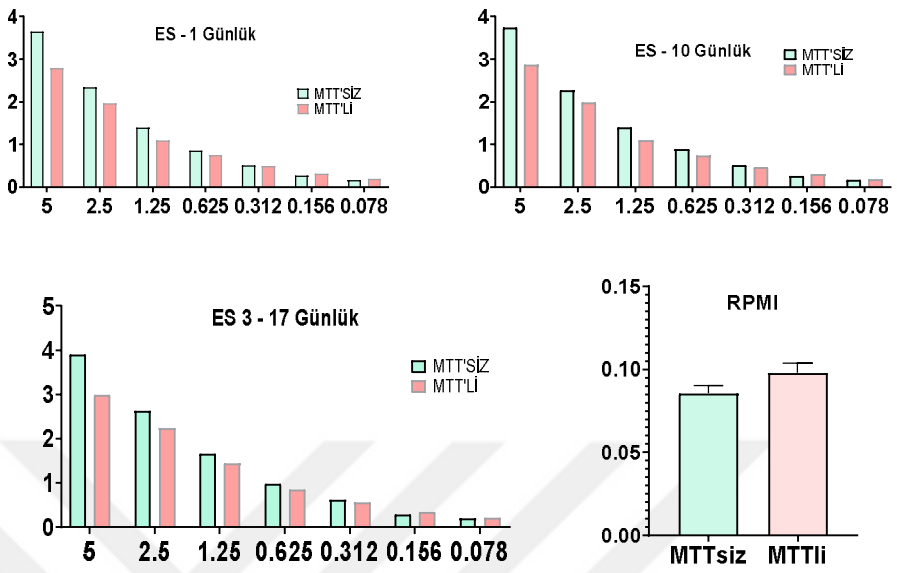


Şekil 36. CPD+SAG- PKMNH ve granülosit hücre gruplarının canlılığı üzerindeki etkisi.



Şekil 37. CPD+SAG-M'un PKMNH ve granülosit hücre gruplarının canlılığı üzerindeki etkisi (% değişim grafiği).

Eritrositlerin granülositler ve PKMNH'lerin canlılığına olan etkisini incelemek için eritrositler ile bu hücreler hültür ortamında inkübe edildi daha sonra MTT eklendi ve SDS-DMF ile formazan kristalleri çözülüp spektrofotometre ile analiz edildi. Ancak spektrofotometre de eritrositlerin kendi renginden dolayı yaptığı ışımaların yüksek olması ve doğru sonuçların saptanamamasından dolayı şekil 38'deki gibi düşük dozlarda dilüe edilerek yapılan çalışmada MTT eklenerek ve eklenmeden değerlendirildi. Sonuçta MTT eklenmeyen kuyularda değerlerin daha yüksek olduğu, MTT eklenen kuyularda ise daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu çalışma uygun eritrosit dozajı ve buna uygun PKMNH ve granülosit hücre sayısı hesaplanarak devam edecektir.



Şekil 38. Farklı saklama günlerine ailt ES'larının ve RPMI'ın MTT'li ve MTT'siz dilüsyonu.

4.5. Bağışçı kan değerlerinin depolama süresindeki değişimleri

Bağışçılardan EDTA'lı tüpe alınan ve torbalara alınıp saklanan kanların çalışma günü geldiğinde 3 mL örnek alınıp kan sayım cihazı ile hemogram değerlerine bakıldı. Bu sayede kanın saklama süresi boyunca tablo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)'da bulunan parametrelerdeki değişimler değerlendirilmiştir.

TABLO 1. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki lökosit dağılımı

	B1_WBC (10e3/ul)	B2_WBC (10e3/ul)	B3_WBC (10e3/ul)
EDTALI TÜP 0. SAAT	7,1	7,9	7,9
EDTALI TÜP 5. SAAT		7,3	7,9
TAM KAN TORBA 5. SAAT	6,7		6,8
ES 0. SAAT	8,8	7,8	8,0
ES ON RT	8,1	7,4	7,6
ES ON +4	8,1	7,9	8,4
ES 7. GÜN	4,9	1,4	6,6
ES 14. GÜN	1,5	1,0	0,2
ES 21. GÜN	2,0	0,8	8,9
ES 42. GÜN	3,6	0,7	4,1

TABLO 2. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki nötrofil dağılımı

	B1_NEU	B2_NEU	B3_NEU	B1_NEU(%)	B2_NEU(%)	B3_NEU(%)
EDTALI TÜP 0. SAAT	4,6	5,1	5,0	64,9	64,2	62,3
EDTALI TÜP 5. SAAT		4,8	4,9		65,0	61,6
TAM KAN TORBA 5. SAAT	4,2		4,4	62,3		65,3
ES 0. SAAT	6,4	6,1	5,8	73,4	77,6	73,2
ES ON RT	5,9	5,7	5,7	73,4	76,9	73,9
ES ON +4	6,1	6,2	6,1	75,6	78,6	72,4
ES 7. GÜN	2,7	0,2	2,8	55,2	13,1	42,8
ES 14. GÜN	0,1	0,0	0,0	6,5	4,3	16,7
ES 21. GÜN	0,1	0,0	5,0	6,1	4,7	56,5
ES 42. GÜN	0,2	0,1	0,1	5,4	7,2	3,4

TABLO 3. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki lenfosit dağılımı

	B1_LYM	B2_LYM	B3_LYM	B1_LYM(%)	B2_LYM(%)	B3_LYM(%)
EDTALI TÜP 0. SAAT	1,6	2,1	2,3	22,7	26,2	28,6
EDTALI TÜP 5. SAAT		2,0	2,3		27,2	29,5
TAM KAN TORBA 5. SAAT	1,8		1,8	26,5		26,5
ES 0. SAAT	1,3	1,2	1,6	14,7	14,9	20,2
ES ON RT	1,3	1,2	1,5	15,6	16,6	19,3
ES ON +4	1,1	1,2	1,7	14,0	14,8	19,8
ES 7. GÜN	1,4	1,2	3,2	28,4	81,1	48,6
ES 14. GÜN	1,2	0,9	0,2	81,2	91,2	74,4
ES 21. GÜN	1,7	0,7	2,8	85,7	90,2	31,0
ES 42. GÜN	3,3	0,6	3,9	92,3	89,9	94,7

TABLO 4. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki monosit dağılımı

	B1_MONO	B2_MONO	B3_MONO	B1_MONO(%)	B2_MONO(%)	B3_MONO(%)
EDTALI TÜP 0. SAAT	0,6	0,6	0,6	8,7	7,7	8,1
EDTALI TÜP 5. SAAT		0,4	0,6		6,1	8,1
TAM KAN TORBA 5. SAAT	0,5		0,5	8,0		7,6
ES 0. SAAT	0,7	0,5	0,4	8,2	6,1	5,6
ES ON RT	0,6	0,4	0,5	7,5	5,4	6,5
ES ON +4	0,5	0,4	0,4	5,8	4,6	5,0
ES 7. GÜN	0,4	0,0	0,2	7,5	1,8	3,1
ES 14. GÜN	0,0	0,0	0,0	1,5	1,7	6,9
ES 21. GÜN	0,0	0,0	0,8	0,7	1,4	8,6
ES 42. GÜN	0,0	0,0	0,0	0,3	0,8	0,5

TABLO 5. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki eozinofil dağılımı

	B1_EOS	B2_EOS	B3_EOS	B1_EOS(%)	B2_EOS(%)	B3_EOS(%)
EDTALI TÜP 0. SAAT	0,155	0,108	0,000	2,190	1,370	0,000
EDTALI TÜP 5. SAAT		0,076	0,016		1,040	0,204
TAM KAN TORBA 5. SAAT	0,125		0,006	1,870		0,085
ES 0. SAAT	0,246	0,080	0,005	2,810	1,030	0,058
ES ON RT	0,203	0,069	0,001	2,520	0,935	0,015
ES ON +4	0,216	0,089	0,083	2,670	1,130	0,988
ES 7. GÜN	0,189	0,026	0,015	3,860	1,800	0,225
ES 14. GÜN	0,091	0,012	0,001	5,960	1,210	0,493
ES 21. GÜN	0,066	0,002	0,244	3,300	0,285	2,750
ES 42. GÜN	0,059	0,006	0,007	1,640	0,920	0,165

TABLO 6. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki bazofil dağılımı

	B1_BASO	B2_BASO	B3_BASO	B1_BASO(%)	B2_BASO(%)	B3_BASO(%)
EDTALI TÜP 0. SAAT	0,11	0,05	0,07	1,50	0,63	0,91
EDTALI TÜP 5. SAAT		0,05	0,05		0,69	0,60
TAM KAN TORBA 5. SAAT	0,10		0,04	1,43		0,52
ES 0. SAAT	0,10	0,03	0,07	1,09	0,34	0,84
ES ON RT	0,08	0,01	0,02	0,94	0,16	0,26
ES ON +4	0,16	0,07	0,15	1,93	0,88	1,81
ES 7. GÜN	0,25	0,03	0,35	5,14	2,21	5,22
ES 14. GÜN	0,07	0,02	0,00	4,88	1,65	1,48
ES 21. GÜN	0,07	0,03	0,10	3,41	3,42	1,13
ES 42. GÜN	0,01	0,01	0,05	0,37	1,23	1,27

TABLO 7. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki eritrosit dağılımı

	B1_RBC(10e3/ul)	B2_RBC(10e3/ul)	B3_RBC(10e3/ul)
EDTALI TÜP 0. SAAT	4.83	5.29	5.78
EDTALI TÜP 5. SAAT		5.23	5.76
TAM KAN TORBA 5. SAAT	3.71		4.9
ES 0. SAAT	6.86	6.98	7.41
ES ON RT	6.68	6.41	-
ES ON +4	6.72	6.91	-
ES 7. GÜN	6.68	6.56	-
ES 14. GÜN	6.75	6.86	-
ES 21. GÜN	7.07	6.87	5.61
ES 42. GÜN	6.99	6.84	-

TABLO 8. Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki hemoglobin dağılımı

	B1_HGB(g/dl)	B2_HGB(g/dl)	B3_HGB(g/dl)
EDTALI TÜP 0. SAAT	14.2	15.7	16.3
EDTALI TÜP 5. SAAT		15.7	16.5
TAM KAN TORBA 5. SAAT	11.1		14.5
ES 0. SAAT	19.8	20.4	21.8
ES ON RT	19.3	18.8	22.4
ES ON +4	19.6	20.3	22.7
ES 7. GÜN	19.6	19.5	22.3
ES 14. GÜN	19.6	20	22.7
ES 21. GÜN	19.9	19.6	14.5
ES 42. GÜN	19.9	19.5	22.4

TABLO 9 Depolama süresi boyunca bağışçılar arasındaki trombosit dağılımı

	B1_PLT(10e3/ul)	B2_PLT(10e3/ul)	B3_PLT(10e3/ul)
EDTALI TÜP 0. SAAT	208,0	201,0	208,0
EDTALI TÜP 5. SAAT		186,0	205,0
TAM KAN TORBA 5. SAAT	98,8		160,0
ES 0. SAAT	28,8	35,6	38,0
ES ON RT	33,6	40,0	61,1
ES ON +4	26,7	30,9	46,2
ES 7. GÜN	32,0	22,1	29,6
ES 14. GÜN	17,5	23,1	21,9
ES 21. GÜN	20,4	27,0	278,0
ES 42. GÜN	47,0	58,7	53,8

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Transfüzyon sonrasında alıcıda karşımıza çıkan en önemli rekasiyonlardan birisi TRIM'dir. Bu fenomenin depolama süresince meydana gelen bir dizi hücresel değişimlerden (Mynster, ve ark., 1998) ya da allojeneik lökositler ve bunlardan salınan mediyatörlerden (Bordin, Heddle, & Blajchman, 1994) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, depolama sürecindeki $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin fonksiyonel değişimleri ve eritrosit süspansiyonlarının saklanmasında kulanılan solüsyonların özellikle T lenfositler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Yapılan öncül çalışmalarda $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin canlılık sonuçlarına bakılmış ve kişiler arasında depolama süresi boyunca canlılık bakımından farklılıklar olduğu görülmüştür. Bunun kişiler arasındaki bireysel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. T hücrelerdeki ölüm oranının depolama süresinin 42. gününde çok yüksek seviyelere çıktığı hatta akım sitometrik analizler sonucunda CD3 kapısındaki hücre oranının %0,1-%0,2'lere kadar düşdüğü görülmektedir. Bu hücre oranları 21. günde de benzer bulunmuştur. Ancak, depolamanın ilk günlerinde canlılık ve CD3+ hücre oranı 42. güne oranla daha yüksektir.

$CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin proliferasyon sonuçlarına bakıldığında ise dağılım olarak orantılı olmasa da depolamanın 21. gününde proliferasyon bağışçıların birinde en düşük seviyeye ulaşmaktadır. Diğer iki bağışçıda ise 14. günde proliferasyon yeteneği en düşük seviyeye inmektedir. Çalışmamızda 21. günde CD3 kapısındaki hücre oranları çok düşük olmasına rağmen proliferasyon deneyi yapılmış ve bu hücrelerin prolifere olmadığı görüldüğü için 42. günde proliferasyon analizi yapılmamıştır.

Bağışçılar karşılaştırılacak olursa aralarındaki yaş gibi bireysel farklılıkları da gözönünde bulundurmak gereklidir. Nitekim yapılan bir çalışmada yaş artışı ile T hücre proliferatif yeteneğinde bir kayıp, IL-2 sentezinde ve salımında azalmayla birlikte T hücresinin IL-2 reseptörünü ifade etme kabiliyetinde bir düşüş meydana geldiği gösterilmiştir. T hücrelerin bu fonksiyon kaybının temelindeki en büyük etmen, spesifik uyarıcı sinyallerin T hücre zarına bağlanması ile ortaya çıkan aktivasyon sinyallerine cevap verememesidir (Song ve ark., 1993). Çalışmamızda yaşın proliferasyon yeteneği üzerinde olumsuz etkisinin olabilmesi söz konusudur. Ancak,

bunun için daha fazla gönüllü bağışçının yer aldığı geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yaş ve bireysel immün sistem farklılıklarının dışında diğer bir sebep, depolama süreci boyunca $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin canlılığının eritrositler tarafından etkilenmesi ve eritrositlerin hücrelerin ölümüne yol açması olabilir. Yapılan bir çalışmada eritrositlerin T hücreler üzerindeki olumsuz etkisini belgelenmiştir (Karsten, & Herbert, 2020). Bu çalışmada, T hücrelerini uyararak ve onları taze otolog eritrositlerle muamele etmenin aktivitelerini önemli ölçüde değiştirdiği ortaya konulmuştur. Eritrositlerle muamele edilmemiş kontrol grubunda T hücre proliferasonunun uyarıldığı ve bu hücrelerin apoptoza karşı korunduğu gösterilmiştir. Depolamanın ilk günlerinde eritrositler T hücreleri üzerinde proliferasyon ve canlılık açısından olumlu etkilere sahipken depolamanın son günlerinde bu etkiler tersine dönüyor olabilir. Nitekim başka bir çalışmada, eritrositlerin T hücre proliferasyonu ve bu hücrelerin hayatta kalmasına olan etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda membran yapısı ve işlevselliği bozulmamış olan eritrositlerin ve eritrosit/T hücre temasının T hücre proliferasyonu ve canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. Aktive edilmiş T hücrelerinin ve eritrositlerin kültür ortamında gözenekli zarlarla birbirinden ayrılması veya eritrosit lizatları ile yapılan kültürler sonucunda T hücre canlılık ve proliferasyonunda artış görülmemiştir. Bu da T hücrelerin eritrositler tarafından proliferasyonunun ve işlevselliğinin desteklenmesi için hücre hücre teması ve eritrositlerin yapısal olarak sağlıklı olması gerekltiğini göstermiştir. Yine bu çalışma ile insan $CD3^+$ T hücrelerinin, aktivasyondan 30 dakika sonra T hücrelerinin apoptozu ile ilişkili hücre içi ROS ürettiği ve eritrositlerin $CD3^+$ T hücrelerin ROS üretimine karşı koyarak apoptozunu inhibe edip bu yolla T hücresi bölünmesini desteklediği gösterilmiştir (Fonseca, Porto, Uchida, & Arosa, 2001). Bu çalışmalar depolamanın ilk günlerinde canlılık ve proliferasyonun daha yüksek, son günlerinde ise daha dülşük olamasını açıklıyor olabilir.

ES transfüzyonu ile meydana gelebilecek reaksiyonların çoğunun nedeni hakkında çok şey bilinmesine rağmen, uzun süreli saklama sırasında eritrositlerde meydana gelen deformasyonlardan dolayı değişime uğramış bu hücrelerin bir tedavi aracı olarak kullanılması tartışma konusudur (Glynn, 2010). Deforme olmuş ES'lerin transfüzyonu ile olumsuz olayların meydana gelmesi arasında korelasyon bildiren bir

çok çalışma varken (Hod ve ark., 2010; Karam ve ark., 2010) saklama süresinin hiçbir etkisinin olmadığını bildiren çalışma da bulunmaktadır (Patterson ve ark., 2015).

Depolama sırasında eritrositlere tam olarak ne olduğunu belirlemek için yapılan bir çalışmada bu hücrelerin morfolojisinin saklama süresince büyük ölçüde değiştiği, ve hemolize daha duyarlı oldukları ortaya koyulmuştur (Barshtein ve ark., 2014). Ayrıca, bu hücrelerin depolama sırasında oksidatif hasara uğradığını ve yaşlanmış eritrosit niteliği almaya başladığını öne süren bir dizi rapor bulunmaktadır (Kriebardis ve ark., 2008). Başka bir çalışmada ise transfüzyondan önce ES depolamak için kullanılan koşullara benzer şekilde +4°C'de uzun süreli saklama sırasında eritrositlerin glikokaliksinde bozulmalar gözlemlenmiştir (Halbhuber, Gliesing, Stibenz, & Makovitzky, 1984; Neu, Sowemimo-Coker, & Meiselman, 2003). Yaptığımız deneyler esnasında da ES depolama süresi arttıkça eritrositlerin hemoliz oranının buna paralel olarak arttığı, özellikle 21 ve 42. günlerde muhtemelen glikokaliksindeki bozulmalardan sonra açığa çıkan yapıların PKMNH izolasyonu sırasında bu hücrelerle agrege olduğu gözlenmiştir. Bu hemolize uğramış eritrositlerden salınan yapılar da depolama sürecinde T hücrelerini olumsuz etkiliyor olabilir. Nitekim yapılan bir çalışmada depolama sırasında hemolize uğrayan eritrositlerin IL-33 salgıladığı tespit edilmiştir. IL-33 salınımın TH_2 sitokinlerinin salgılanmasını uyardığı ve alerjik enflamasyonu teşvik etmede anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir. Eritrositlerin hemolizi sonucunda, bu sitokinin kanın çözünür fraksiyonuna katılması söz konusu olabilmektedir (Karsten, & Herbert, 2020). Bu da depolama sırasında eritrositlerin T hücrelerini farklı fenotipe çevirebileceğini ve bu yolla da alıcıyı etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Bütün bunların yanında saklama süresi boyunca canlılıktaki bu dalgalanmaların nedeni T hücrelerin preapoptotik sürece girerek PI pozitif olarak gözükmesi olabilir. Bu yüzden daha ileri çalışmalarımızda T hücrelerin canlılık analizleri Annexin V PI kiti ile yapılarak hücrelerin apoptotik ve nekrotik olanları birbirinden ayırt edilmeye çalışılması planlanmıştır.

ES depolama sürecinde depolama için kullanılan CPD ve SAG-M solüsyonlarının da immün sistem hücreleri üzerinde çeşitli etkileri mevcut olabilir. Bu nedenden dolayı kan torbalarının içerisindeki CPD, SAG-M ve eritrositler diğer hücre gruplarınının canlılığını saklama koşulları boyunca etkiliyor olabilir. Bu düşünce ile

CPD ve SAG-M ile eritrositlerin PKMNH ve granülosit hücrelerin canlılığı üzerindeki etkilerine bakmak için MTT testi yapılmıştır.

CPD ve SAG-M ayrı ayrı kullanıldığında doza bağlı olarak PKMNH ve granülosit hücrelerin canlılığının azaldığı ve daima kontrol grubunun altında olduğu görüldü. Transfüzyonda kullanılan oran ile uyumlu olarak CPD+SAG-M karışımının ise hem PKMNH ve granülosit hücrelerinin canlılılık seviyesini kontrol grubunun da üzerine çıkararak maksimum düzeye ulaştırdığı gözlemlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada da sadece CPD varlığında ES'nin monosit fonksiyonunu diğer ilave solüsyonlarla depolanan ES'lerden daha fazla baskıladığı gösterilmiştir (Muszynski ve ark., 2012). Çalışmamızda deneyler bağışçılardan izole edilen PKMNH ve granülosit hücrelerinin 72 saat boyunca CPD ve SAG-M solüsyonları ile inkübe edilerek üzerine MTT solüsyonu eklenip 24 saat bekletilmesinin ardından SDS-DMF eklenip 4 saat sonra spekrofotometre cihazında okutulması ile sonuçlanmıştır. Ancak, kanın saklama süresi 42 gündür ve bu testlerin ileriki depolama günleri için de yapılmaya ihtiyacı vardır. Böylece ek solüsyonlarla inkübasyon süresinin bu hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri daha sağlıklı analiz edilebilir.

Depolama koşulları boyunca T lenfosit aktivasyon belirteçleri olan CD25, CD69 ve CD154 de her koşulun 0. 16. ve 72. saatinde değerlendirilmiştir. Bağışçılardan EDTA'lı tüpe alınan kanlarda 0, 16 ve 72. saatlerinde CD25 CD69 ve CD 154 ifadelerine bakılmış ve sıfırıncı saatten 72 saate doğru gidildikçe bu belirteçlerin ifadelerinin arttığı görülmüştür. Ancak, erken aktivasyon belirteci olan CD154 ifadesi ilk saatlerde artmış, CD25 ve CD69 ifadesindeki artışlar ise daha sonraki saatlerde görülmüştür. Diğer koşullarda da medyan değerlerine bakılınca artıp azalmalar mevcuttur. Ancak, bağışçı seçimini hormonal düzensizlikler gibi farklı koşullardan etkilenmemek için sadece erkeklerden seçmemize rağmen bu kişiler arasında aktivasyon belirteçlerinin de çok fark olduğu görülmüştür. Bunların daha doğru analiz edilmesi için daha fazla bireyin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmaya ihtiyaç duyulduğu açıkça görülmektedir. Kişisel farklılıklar, yaş, T hücrelerinin uyarana yanıt verme veya T hücreye eksik sinyal sağlama gibi parametreler görülen değişken sonuçlarının nedeni olabilir.

Çalışmamız sırasında bazı teknik problemlerle de karşılaşılmış ve gözlediğimiz teknik problemleri çözmek üzere deney tasarımlarında düzenlemeler

yapılmıştır. Bunlardan birisi deneylerimiz sırasında RPMI'nın ışımasının da spektrofotometre ile algılandığının saptanmasıdır. Bunun üzerine sadece RPMI kullanıldığında elde edilen OD değeri, hücrelerin spektrofotometrik sonuçlarından çıkartılarak elde edilen sonuçlar daha doğru analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Ayrıca, bu çalışma sırasında düz tabanlı 96'lık kültür kampları kullanılmıştır. Bu kültür kapları hücrelerin birbiriyle olan iletişimini azaltıp proliferasyon ve aktivasyon becerisini negatif yönde etkiliyor olabilir. Bu nedenle yaptığımız deneyler ileriki çalışmalarda v tabanlı kültür kapları ile tekrar edilip fark olup olmadığı analiz edilecektir. Bunun için de spektrofotometre cihazında okutulmadan önce düz tabanlı kültür kaplarına koyulup öyle analiz edilecektir. Çünkü spektrofotometre cihazı tabandan okuma yaptığından dolayı düz tabanlı kültür kabı kullanmak daha doğru olacaktır.

Eritrositlerin PKMNH ve granülosit hücrelerin canlılığı üzerindeki etkilerini saptamak için yapılan deneyler sonucunda eritrositlerin renginden dolayı yaptığı ışımalar spektrofotometre cihazında mor renk gibi algılandığı için yüksek sonuç verdiği ve yüksek miktarda eritrosit eklenen kuyularda ise spekrofotometre cihazının saptayabileceği üst sınırıda geçtiği görülmüştür. Bu nedenle eritrositler daha fazla dilüe edilerek spektrofotometre cihazında üst sınırı geçmeyecek uygun bir dozu saptamak ve eritrositlerin ham ışımalarını bularak doğru sonuca ulaşmak için deneyler tekrarlanmıştır. Karar verilen doza uygun hücre sayısı hesaplanarak bu deney aşaması tekrar edilip eritrositlerin PKMNH ve granülosit hücrelerin canlılığı üzerindeki etkilerine bakılacaktır.

Örneklem sayısının azlığı, kişisel farklar ve farklı parametrelerin çalışılmasından dolayı istatistiksel analiz yapılamamıştır. Bu nedenle sonuçlar medyan değerleri ile ve kişisel bazda değerlendirilmiştir. Ancak ileriki çalışmalarda bağışçı sayısının arttırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma depolama süresinin artışı ile T hücre canlılığının ve proliferasyon yeteneğinin azaldığını göstermekte ve bu yönüyle de transfüzyon immünolojisine genel bir bakış sunmaktaktır.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai S. (2018). Cellular and molecular immunology. (9th edition) (pp. 225-236 and 117-177) Philadelphia: Elsevier

Akbar, A.N., Giardina, P.J., Hilgartner, M.W., & Grady, R.W. (1985). Immunological abnormalities in thalassaemia major. I. A transfusion-related increase in circulating cytoplasmic immunoglobulin-positive cells. *Clinical and experimental immunology*, 62(2), 397–404. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1577434/

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of immunology*, 30, 459–489. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942

Anderson, H.L., Brodsky, I.E., & Mangalmurti, N. S. (2018). The Evolving Erythrocyte: Red Blood Cells as Modulators of Innate Immunity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 201(5), 1343–1351. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800565

Arosa, F.A., Pereira, C.F., & Fonseca, A.M. (2004). Red blood cells as modulators of T cell growth and survival. *Current pharmaceutical design*, 10(2), 191–201. https://doi.org/10.2174/1381612043453432

Azarov, I., Liu, C., Reynolds, H., Tsekouras, Z., Lee, J. S., Gladwin, M. T., & Kim-Shapiro, D. B. (2011). Mechanisms of slower nitric oxide uptake by red blood cells and other hemoglobin-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 286(38), 33567–33579. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228650

Baek, J. H., D'Agnillo, F., Vallelian, F., Pereira, C. P., Williams, M. C., Jia, Y., … & Buehler, P. W. (2012). Hemoglobin-driven pathophysiology is an in vivo consequence of the red blood cell storage lesion that can be attenuated in guinea pigs by haptoglobin therapy. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1444–1458. https://doi.org/10.1172/JCI59770

Barshtein, G., Gural, A., Manny, N., Zelig, O., Yedgar, S., & Arbell, D. (2014). Storage-induced damage to red blood cell mechanical properties can be only partially reversed by rejuvenation. *Transfusion medicine and hemotherap*: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie, 41(3), 197–204. https://doi.org/10.1159/000357986

Baum, J., Ward, R.H., & Conway, D.J. (2002). Natural selection on the erythrocyte surface. *Molecular biology and evolution*, 19(3), 223–229. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004075

Baumgartner, J. M., Silliman, C. C., Moore, E. E., Banerjee, A., & McCarter, M. D. (2009). Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. *Journal of the American College of Surgeons*, 208(1), 110–119. https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.08.012

Beck, Z., Brown, B.K., Wieczorek, L., Peachman, K.K., Matyas, G.R., Polonis, V.R., … Alving, C.R. (2009). Human erythrocytes selectively bind and enrich

infectious HIV-1 virions. *PloS one*, 4(12), e8297. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008297

Bilgin, Y. M., van de Watering, L. M., Versteegh, M. I., van Oers, M. H., Vamvakas, E. C., & Brand, A. (2011). Postoperative complications associated with transfusion of platelets and plasma in cardiac surgery. *Transfusion*, 51(12), 2603–2610. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03200.x

Bilgin, Y.M., & Brand, A. (2008). Transfusion-related immunomodulation: a second hit in an inflammatory cascade? *Vox sanguinis*, 95(4), 261–271. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01100.x

Blajchman, M.A., Bardossy, L., Carmen, R., Sastry, A., & Singal, D.P. (1993). Allogeneic blood transfusion-induced enhancement of tumor growth: two animal models showing amelioration by leukodepletion and passive transfer using spleen cells. *Blood*, 81(7), 1880–1882. https://doi.org/10.1182/blood.V81.7.1880.1880

Blajchman, M.A., Bordin, J.O. (1994) Mechanisms of transfusionassociated immunosuppression. *Curr Opin Hematol*; 1:457-61. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9371323/

Blumberg, N., Zhao, H., Wang, H., Messing, S.P., Heal, J.M., & Lyman, G.H. (2007). The intention-to-treat principle in clinical trials and meta-analyses of leukoreduced blood transfusions in surgical patients. *Transfusion*, 47. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01158.x

Bordin, J.O., Heddle, N.M., & Blajchman, M.A. (1994). Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood*, 84(6), 1703–1721. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8080981/

Borrego, F., Robertson, M. J., Ritz, J., Peña, J., & Solana, R. (1999). CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*, 97(1), 159–165. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00738.x

Brunson, M.E., Alexander, J.W. (1990) Mechanisms of transfusioninduced immunosuppression. *Transfusion*; 30:651-8. doi: 10.1046/j.1537-2995.1990.30790385527.x.

Bryant P. W., Lennon-Duménil A. M., Fiebiger E., Lagaudrière-Gesbert C., Ploegh H. L., 2002. Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Adv Immunol*.80:71-114. doi: 10.1016/s0065-2776(02)80013-x.

Chang, S. Y., Song, J. H., Guleng, B., Cotoner, C. A., Arihiro, S., Zhao, Y., Chiang, H. S., … & Reinecker, H. C. (2013). Circulatory antigen processing by mucosal dendritic cells controls CD8(+) T cell activation. *Immunity*, *38*(1), 153–165. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.018

Chapman, C.E., Stainsby, D., Jones, H., Love, E., Massey, E., Win, N., … Serious Hazards of Transfusion Steering Group, (2009). Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion*, 49(3), 440–452. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01948.x

Chouaib, S., Chatenoud, L., Klatzmann, D., & Fradelizi, D. (1984). The mechanisms of inhibition of human IL 2 production. II. PGE2 induction of suppressor T lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 132(4), 1851–1857. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6230395/

Chudziak, D., Sireis, W., Pfeiffer, H. U., Henschler, R., Seifried, E., & Bönig, H. (2009). Accumulation of soluble inflammatory mediators between blood donation and pre-storage leucocyte depletion. *Vox sanguinis*, 96(2), 163–166. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01132.x

Claas, F. H., Roelen, D. L., van Rood, J. J., & Brand, A. (2001). Modulation of the alloimmune response by blood transfusions. Transfusion clinique et biologique: *journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, 8(3), 315–317. https://doi.org/10.1016/s1246-7820(01)00122-7

Croft, M., Carter, L., Swain, S. L., & Dutton, R. W. (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *The Journal of experimental medicine*, *180*(5), 1715–1728. https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1715

Danesh, A., Inglis, H. C., Jackman, R. P., Wu, S., Deng, X., Muench, M. O., … Norris, P. J. (2014). Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood*, 123(5), 687–696. https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-530469

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., Khoury, S., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology*, *9*(12), 1347–1355. https://doi.org/10.1038/ni.1677

Delaney, M., Wendel, S., Bercovitz, R.S., Cid, J., Cohn, C., Dunbar, … Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative, (2016). Transfusion reactions: prevention, diagnosis, and treatment. *Lancet (London, England)*, 388(10061), 2825–2836. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01313-6

Dwyre, D.M., & Holland, P.V. (2008). Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Vox sanguinis*, 95(2), 85–93. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01073.x

Eder, A.F., & Chambers, L.A. (2007). Noninfectious complications of blood transfusion. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(5), 708–718. https://doi.org/10.5858/2007-131-708-NCOBT

Emmons, R.V., Reid, D.M., Cohen, R.L., Meng, G., Young, N.S., Dunbar, C.E., & Shulman, N.R. (1996). Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood*, 87(10), 4068–4071. https://doi.org/10.1182/blood.V87.10.4068.bloodjournal87104068

Fasano, R., & Luban, N.L. (2008). Blood component therapy. *Pediatric clinics of North America*, 55(2), 421–ix. https://doi.org/10.1016/j.pcl.2008.01.006

Fast L. D. (1996). Recipient CD8+ cells are responsible for the rapid elimination of allogeneic donor lymphoid cells. *Journal of immunology*, 157(11), 4805–4810. https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.11.4805

Fischer, A., Le Deist, F., Durandy, A., & Griscelli, C. (1985). Separation of a population of human T lymphocytes that bind prostaglandin E2 and exert a suppressor activity. *Journal of immunology*, 134 2, 815-9. https://doi.org/10.4049/jimmunol.134.2.815

Fonseca, A.M., Porto, G., Uchida, K., & Arosa, F.A. (2001). Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes. *Blood*, 97(10), 3152–3160. https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.3152

Ford J. (2013). Red blood cell morphology. *International journal of laboratory hematology*, 35(3), 351–357. https://doi.org/10.1111/ijlh.12082

Friese, R. S., Sperry, J. L., Phelan, H. A., & Gentilello, L. M. (2008). The use of leukoreduced red blood cell products is associated with fewer infectious complications in trauma patients. *American journal of surgery*, 196(1), 56–61. https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2007.08.063

Gafter, U., Kalechman, Y., & Sredni, B. (1992). Induction of a subpopulation of suppressor cells by a single blood transfusion. *Kidney international*, 41(1), 143–148. https://doi.org/10.1038/ki.1992.19

Gafter, U., Kalechman, Y., & Sredni, B. (1996). Blood transfusion enhances production of T-helper-2 cytokines and transforming growth factor beta in humans. *Clinical science*, 91(4), 519–523. https://doi.org/10.1042/cs0910519

Gantt CL. (1981) Red blood cells for cancer patients. *Lancet*; 2:363. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)90673-5

Germain R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. Nature reviews. *Immunology*, 2(5), 309–322. https://doi.org/10.1038/nri798

Ghio, M., Contini, P., Mazzei, C., Brenci, S., Barberis, G., Filaci, G., … Puppo, F. (1999). Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions. *Blood*, 93(5), 1770–1777. https://doi.org/10.1182/blood.V93.5.1770

Giacchino, F., Alloatti, S., Quarello, F., Bosticardo, G.M., Giraudo, G., & Piccoli, G. (1982). The immunological state in chronic renal insufficiency. *The International journal of artificial organs*, 5(4), 237–242. https://doi.org/10.1177/039139888200500406

Gladwin, M. T., & Kim-Shapiro, D. B. (2009). Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis. *Current opinion in hematology*, 16(6), 515–523. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833157f4

Glynn S. A. (2010). The red blood cell storage lesion: a method to the madness. *Transfusion*, 50(6), 1164–1169. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02674.x

Gong, J., Zhan, H., Liang, Y., He, Q., & Cui, D. (2021). Role of Th22 Cells in Human Viral Diseases. *Frontiers in medicine*, *8*, 708140. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.708140

Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2017). Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity*, 46(3), 364–378. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.010

Grewal, I. S., & Flavell, R. A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annual review of immunology*, 16, 111–135. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.111

Halbhuber, K. J., Gliesing, M., Stibenz, D., & Makovitzky, J. (1984). Topo-optical investigations of the human erythrocyte glycocalyx-age related changes. *Histochemistry*, 81(2), 187–193. https://doi.org/10.1007/BF00490116

Haldun Bal, Haluk Barbaros Oral, (2016). Transfusion-Related Immunomodulation. *Turk J Immunol*, 4(3): 37-46. DOI: 10.5606/tji.2016.525

Harley, W.B., & Blaser, M.J. (1994). Disseminated coccidioidomycosis associated with extreme eosinophilia. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious *Diseases Society of America*, 18(4), 627–629. https://doi.org/10.1093/clinids/18.4.627

Hatton, C., Hay, D., & Keeling, D. (2017). Haematology lecture notes (10th edition) in (pp. 1-2). Hoboken: John Wiley & Sons.

Hébert, P. C., Fergusson, D., Blajchman, M. A., Wells, G. A., Kmetic, A., Coyle, D., … Leukoreduction Study Investigators (2003). Clinical outcomes following institution of the Canadian universal leukoreduction program for red blood cell transfusions. *JAMA*, 289(15), 1941–1949. https://doi.org/10.1001/jama.289.15.1941

Heddle N.M. (1999). Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Current opinion in hematology*, 6(6), 420–426. https://doi.org/10.1097/00062752-199911000-00012

Heper, Y., Uluhan, R. & Pelit, N. (2022). Ulusal kan merkezleri ve transfüzyon tıbbı kurs kitabı (s. 50-83) Antalya: Kuşaklar matbaa. https://kmtd.org.tr/web/wp-content/uploads/yayinlar-pdf/25_temel_kurs_kitabi_2022_1_ilanli.pdf

Hess J. R. (2006). An update on solutions for red cell storage. *Vox sanguinis*, 91(1), 13–19. https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x

Hewitt E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163–169. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x

Higgins, J.M. (2015). Red blood cell population dynamics. *Clinics in laboratory medicine*, 35(1), 43–57. https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.002

Hilvering, B., Hinks, T. S. C., Stöger, L., Marchi, E., Salimi, M., Shrimanker, R., Liu, W., … Xue, L. (2018). Synergistic activation of pro-inflammatory type-2 $CD8^+$ T lymphocytes by lipid mediators in severe eosinophilic asthma. *Mucosal immunology*, *11*(5), 1408–1419. https://doi.org/10.1038/s41385-018-0049-9

Hod, E. A., Zhang, N., Sokol, S. A., Wojczyk, B. S., Francis, R. O., Ansaldi, D., … Spitalnik, S. L. (2010). Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood*, 115(21), 4284–4292. https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-245001

Hodge, G., Nairn, J., Holmes, M., Reynolds, P.N., & Hodge, S. (2007). Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clinical and experimental immunology*, 150(1), 22–29. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03451.x

Högman, C. F., & Meryman, H. T. (1999). Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfusion medicine reviews*, 13(4), 275–296. https://doi.org/10.1016/s0887-7963(99)80058-3

Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., … & Lohoff, M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European journal of immunology*, *39*(7), 1716–1725. https://doi.org/10.1002/eji.200939412

Huisjes, R., Bogdanova, A., van Solinge, W.W., Schiffelers, R.M., Kaestner, L., & van Wijk, R. (2018). Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. *Frontiers in physiology*, 9, 656. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656

Jia, L., & Wu, C. (2014). The biology and functions of Th22 cells. *Advances in experimental medicine and biology*, *841*, 209–230. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9487-9_8

Karam, O., Tucci, M., Bateman, S. T., Ducruet, T., Spinella, P. C., Randolph, A. G., & Lacroix, J. (2010). Association between length of storage of red blood cell units and outcome of critically ill children: a prospective observational study. *Critical care (London, England)*, 14(2), R57. https://doi.org/10.1186/cc8953

Karasuyama, H., Mukai, K., Tsujimura, Y., & Obata, K. (2009). Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature reviews. Immunology*, 9(1), 9–13. https://doi.org/10.1038/nri2458

Karsten, E., & Herbert, B. R. (2020). The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating immune cells. *Blood reviews*, 41, 100644. https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100644

Karsten, E., Breen, E. & Herbert, B. R. (2018). Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines. *Scientific Report.* 8, 3101. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21387-w

Kemp, R. A., & Ronchese, F. (2001). Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(11), 6497–6502. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6497

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature reviews. Immunology*, *14*(6), 377–391. https://doi.org/10.1038/nri3667

Klion A. D., Ackerman S. J., & Bochner B. S. (2020). Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease. *Annu Rev Pathol*. 24;15:179-209. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032756.

Kondo, K., Takada, K., & Takahama, Y. (2017). Antigen processing and presentation in the thymus: implications for T cell repertoire selection. *Current opinion in immunology*, 46, 53–57. https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.014

Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., & Papassideri, I. S. (2008). RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. Transfusion, 48(9), 1943–1953. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01794.x

Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Altuwaijri, S., Szeliga, W., Kolls, J., Chang, A., & Zou, W. (2007). Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(11), 6730–6733. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6730

Kumar B. V., Connors T. J., Farber D. L., (2018) Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 20;48(2): 202-213. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.007.

Linehan, J. L., Harrison, O. J., Han, S. J., Byrd, A. L., Vujkovic-Cvijin, I., Villarino, A. V., Sen, S. K., Shaik, J., … & Belkaid, Y. (2018). Non-classical Immunity Controls Microbiota Impact on Skin Immunity and Tissue Repair. *Cell*, *172*(4), 784–796.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.033

Long, K., Meier, C., Bernard, A., Williams, D., Davenport, D., & Woodward, J. (2014). T-cell suppression by red blood cells is dependent on intact cells and is a consequence of blood bank processing. *Transfusion*, *54*(5), 1340–1347. https://doi.org/10.1111/trf.12472

Lu, Y., Hong, B., Li, H., Zheng, Y., Zhang, M., Wang, S., Qian, J., & Yi, Q. (2014). Tumor-specific IL-9-producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(6), 2265–2270. https://doi.org/10.1073/pnas.1317431111

Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). $CD4^+$T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 925135. https://doi.org/10.1155/2012/925135

Mestas, J., & Hughes, C.W.C. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *Journal of immunology*, 172(5): 2731–2738. https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731

Minasyan H., (2016). Mechanisms and pathways for the clearance of bacteria from blood circulation in health and disease. Pathophysiology: *the official journal of the International Society for Pathophysiology*, 23(2), 61–66. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.03.001

Minasyan H., (2018). Phagocytosis and oxycytosis: two arms of human innate immunity. *Immunologic research*, 66(2), 271–280. https://doi.org/10.1007/s12026-018-8988-5

Mingari, M. C., Moretta, A., Maggi, E., Pantaleo, G., Gerosa, F., Romagnani, S., & Moretta, L. (1984). Frequent coexpression of cytolytic activity and lymphokine production among human T lymphocytes. Production of B cell growth factor and interleukin 2 by T8+ and T4+ cytolytic clones. *European journal of immunology*, *14*(11), 1066–1069. https://doi.org/10.1002/eji.1830141121

Mittrücker, H. W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of $CD8^+$ T cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *62*(6), 449–458. https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y

Morera, D., & MacKenzie, S.A. (2011). Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Veterinary research*, 42(1), 89. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-89

Müller, M.C., van Stein, D., Binnekade, J.M., van Rhenen, D.J., & Vlaar, A.P. (2015). Low-risk transfusion-related acute lung injury donor strategies and the impact on the onset of transfusion-related acute lung injury: a meta-analysis. *Transfusion*, 55(1), 164–175. https://doi.org/10.1111/trf.12816

Muszynski, J., Nateri, J., Nicol, K., Greathouse, K., Hanson, L., & Hall, M. (2012). Immunosuppressive effects of red blood cells on monocytes are related to both storage time and storage solution. *Transfusion*, 52(4), 794–802. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03348.x

Mynster, T, Dybkjoer, E, Kronborg, G, Nielsen, H.J. (2003) Immunomodulating effect of blood transfusion: is storage time important? *Vox Sang*; 74:176-81. https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1998.7430176.x

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., … Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine*, 204(12), 3037–3047. https://doi.org/10.1084/jem.20070885

Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J. L., Han, S. J., Harrison, O. J., Wilhelm, C., Conlan, S., … & Belkaid, Y. (2015). Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature*, *520*(7545), 104–108. https://doi.org/10.1038/nature14052

Nanjappa, S. G., Heninger, E., Wüthrich, M., Gasper, D. J., & Klein, B. S. (2012). Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4+ T cells. *PLoS pathogens*, *8*(7), e1002771. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002771

Neu, B., Sowemimo-Coker, S. O., & Meiselman, H. J. (2003). Cell-cell affinity of senescent human erythrocytes. *Biophysical journal*, 85(1), 75–84. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74456-7

Nielsen, H.J., Reimert, C.M., Pedersen, A.N., Brünner, N., Edvardsen, L., Dybkjaer, E., … Skov, P.S. (1996). Time-dependent, spontaneous release of white cell- and platelet-derived bioactive substances from stored human blood. *Transfusion*, 36(11-12), 960–965. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1996.36111297091738.x

Nograles, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., … & Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *123*(6), 1244–52.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.03.041

Nowaczyk, M., & Skopińska-Rózewska, E. (1981). The influence of autologous erythrocytes on active T-cells rosetting with sheep red blood cells and on DNA synthesis. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 29(3), 391–396. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6975089/

Opelz, G., Sengar, D. P., Mickey, M. R., & Terasaki, P. I. (1973). Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplantation proceedings*, 5(1), 253–259. DOI:10.1056/NEJM197810122991503

Örüç, N., Yenicesu,İ. (2016). Ulusal kan ve kan bileşenleri hazırlama, kullanım ve kalite güvencesi rehberi (s. 200-216). https://shgmkanhizmetleridb.saglik.gov.tr/Eklenti/36313/0/kan-ve-kan-bilesen-rehb-tr-9-mayis-2016-revpdf.pdf

Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., … Golenbock, D.T. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1919–1924. https://doi.org/10.1073/pnas.0608745104

Patterson, J. A., Irving, D. O., Isbister, J. P., Morris, J. M., Mayson, E., Roberts, C. L., & Ford, J. B. (2015). Age of blood and adverse outcomes in a maternity population. *Transfusion*, 55(11), 2730–2737. https://doi.org/10.1111/trf.13230

Peters, W. R., Fry, R. D., Fleshman, J. W., & Kodner, I. J. (1989). Multiple blood transfusions reduce the recurrence rate of Crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum*, 32(9), 749–753. https://doi.org/10.1007/BF02562122

Phelan, H. A., Sperry, J. L., & Friese, R. S. (2007). Leukoreduction before red blood cell transfusion has no impact on mortality in trauma patients. *The Journal of surgical research*, 138(1), 32–36. https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.048

Pretini, V., Koenen, M.H., Kaestner, L., Fens, M.H.A.M., Schiffelers, R.M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in physiology*, 10, 945. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945

Profumo, E., Buttari, B., Petrone, L., Straface, E., Gambardella, L., Pietraforte, D., Genuini, I., ... & Riganò, R. (2011). Redox imbalance of red blood cells impacts T lymphocyte homeostasis: implication in carotid atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*, *106*(6), 1117–1126. https://doi.org/10.1160/TH11-02-0110

Res, P. C., Piskin, G., de Boer, O. J., van der Loos, C. M., Teeling, P., Bos, J. D., & Teunissen, M. B. (2010). Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PloS one*, *5*(11), e14108. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014108

Rühl, H., Bein, G., & Sachs, U.J. (2009). Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion medicine reviews*, 23(1), 62–71. https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2008.09.006

Sadallah, S., Eken, C., & Schifferli, J. A. (2008). Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties. *Journal of leukocyte biology*, *84*(5), 1316–1325. https://doi.org/10.1189/jlb.0108013

Saha, P., & Geissmann, F. (2011). Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunology and cell biology*, 89(1), 2–4. https://doi.org/10.1038/icb.2010.130

Said, A.S., Rogers, S.C., & Doctor, A. (2018). Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions. *Frontiers in physiology*, 8, 1120. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01120

Sakaguchi S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, *22*, 531–562. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122

Salomon, B., & Bluestone, J. A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual review of immunology*, *19*, 225–252. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.225

Saule, P., Trauet, J., Dutriez, V., Lekeux, V., Dessaint, J. P., & Labalette, M. (2006). Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mechanisms of ageing and development*, 127(3), 274–281. https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.11.001

Schaller, M. A., Lundy, S. K., Huffnagle, G. B., & Lukacs, N. W. (2005). CD8+ T cell contributions to allergen induced pulmonary inflammation and airway hyperreactivity. *European journal of immunology*, *35*(7), 2061–2070. https://doi.org/10.1002/eji.200425715

Schmickl, C.N., Mastrobuoni, S., Filippidis, F.T., Shah, S., Radic, J., Murad, M.H., … Gajic, O. (2015). Male-predominant plasma transfusion strategy for preventing transfusion-related acute lung injury: a systematic review. *Critical care medicine*, 43(1), 205–225. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000675

Schroeder, J.T. (2009). Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Advances in immunology*, 101, 123–161. https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01004-3

Seder, R. A., Boulay, J. L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben-Sasson, S. Z., Le Gros, G., & Paul, W. E. (1992). CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *148*(6), 1652–1656. doi:10.1093/intimm/dxh188

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., & Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology*, 26, 421–452. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326

Shanwell, A., Kristiansson, M., Remberger, M., & Ringdén, O. (1997). Generation of cytokines in red cell concentrates during storage is prevented by prestorage white cell reduction. *Transfusion*, 37(7), 678–684. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37797369441.x

Shier, H., Butler, j. & Lewis, R. (2012). Hole's essentials of human anatomy & physiology (12th edition) in (pp. 319-336) New York: The McGraw-Hill Companies.

Shipkova, M., & Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(17-18), 1338–1349. https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.006

Simon, H., & Morris A.B. (2009). Transfusion-related immunosuppression. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10(5), 231-234. https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2009.01.017.

Singh, S. P., Zhang, H. H., Foley, J. F., Hedrick, M. N., & Farber, J. M. (2008). Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(1), 214–221. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.214

Sola-Visner, M., Saxonhouse, M.A., & Brown, R.E. (2008). Neonatal thrombocytopenia: what we do and don't know. *Early human development*, 84(8), 499–506. https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2008.06.004

Song, L., Kim, Y. H., Chopra, R. K., Proust, J. J., Nagel, J. E., Nordin, A. A., & Adler, W. H. (1993). Age-related effects in T cell activation and proliferation. *Experimental gerontology*, 28(4-5), 313–321. https://doi.org/10.1016/0531-5565(93)90058-l

St Paul, M., Saibil, S. D., Lien, S. C., Han, S., Sayad, A., Mulder, D. T., Garcia-Batres, … & Ohashi, P. S. (2020). IL6 Induces an $IL22^+$ $CD8^+$ T-cell Subset with Potent Antitumor Function. *Cancer immunology research*, *8*(3), 321–333. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0521

Sun, L., Wu, J., & Yi, S. (2012). Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. *Transplant immunology*, 26(2-3), 71–80. https://doi.org/10.1016/j.trim.2011.10.005

Suto, A., Nakajima, H., Kagami, S. I., Suzuki, K., Saito, Y., & Iwamoto, I. (2001). Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(4), 680–687. https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.4.2010170

Türk, M. (2021). Eritrosit süspansiyonu transfüzyon uygulamalarının değerlendirilmesi [Yayınlanmış tıpta uzmanlık tezi, T.C. sağlık bilimleri üniversitesi istanbul ümraniye eğitim ve araştırma hastanesi çocuk sağlığı ve hastalıkları kliniği] Erişim adresi: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Vamvakas, E. C., & Blajchman, M. A. (2000). Prestorage versus poststorage white cell reduction for the prevention of the deleterious immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusion. *Transfusion medicine reviews*, 14(1), 23–33.

https://doi.org/10.1016/s0887-7963(00)80113-3

Vamvakas, E. C., & Blajchman, M. A. (2007). Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood reviews*, 21(6), 327–348. https://doi.org/10.1016/j.blre.2007.07.003

van de Watering, L.M., Hermans, J., Houbiers, J.G., van den Broek, P.J., Bouter, H., Boer, F., … Brand, A. (1998). Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation*, 97(6), 562–568. https://doi.org/10.1161/01.cir.97.6.562

Viallat, A., & Abkarian, M., (2014). Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *International journal of laboratory hematology*, 36(3), 237–243. https://doi.org/10.1111/ijlh.12233

Virella, G., Rugeles, M.T., Hyman, B., La Via, M., Goust, J.M., Frankis, M., & Bierer, B.E., (1988). The interaction of CD2 with its LFA-3 ligand expressed by autologous erythrocytes results in enhancement of B cell responses. *Cellular immunology*, 116(2), 308–319. https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90233-x

Visekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., Raifer, H., … & Huber, M. (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *European journal of immunology*, *43*(3), 606–618. https://doi.org/10.1002/eji.201242825

Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2009). How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *Journal of molecular cell biology*, *1*(1), 20–36. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp001

Wang, W., Cheng, Z. S., Chen, Y. F., & Lin, Y. H. (2016). Increased circulating IL-9-producing $CD8^+$ T cells are associated with eosinophilia and high FeNO in allergic asthmatics. *Experimental and therapeutic medicine*, *12*(6), 4055–4060. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3870

Wei, J., Zhao, J., Schrott, V., Zhang, Y., Gladwin, M., Bullock, G., & Zhao, Y. (2015). Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, *63*(6), 806–810. https://doi.org/10.1097/JIM.0000000000000213

Weisbach, V., Wanke, C., Zingsem, J., Zimmermann, R., & Eckstein, R. (1999). Cytokine generation in whole blood, leukocyte-depleted and temporarily warmed red blood cell concentrates. *Vox sanguinis*, 76(2), 100–106. https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1999.7620100.x

Widmaier, E., Raff, H. & Strang, K. (2014). Vander's human physiology: Vander's human physiology the mechanisms of body function (11^{th} edition) in (pp. 428-438). New York: The McGraw-Hill Companies.

Williams, M. A., & Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology*, *25*, 171–192. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548

Xu, Y., & Song, G. (2004). The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *Journal of biomedical science*, 11(4), 426–438. https://doi.org/10.1007/BF02256091

Yannelli, J.R., Thurman, G. B., Mrowca-Bastin, A., Pennington, C. S., West, W. H., & Oldham, R.K. (1988). Enhancement of human lymphokine-activated killer cell cytolysis and a method for increasing lymphokine-activated killer cell yields to cancer patients. *Cancer research*, 48(20), 5696–5700. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1423-0410.1999.7620100.x

Yen, H. R., Harris, T. J., Wada, S., Grosso, J. F., Getnet, D., Goldberg, M. V., Liang, K. L., … & Drake, C. G. (2009). Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(11), 7161–7168. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900368

Yu, Y., Ma, X., Gong, R., Zhu, J., Wei, L., & Yao, J. (2018). Recent advances in $CD8^+$ regulatory T cell research. *Oncology letters*, *15*(6), 8187–8194. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8378

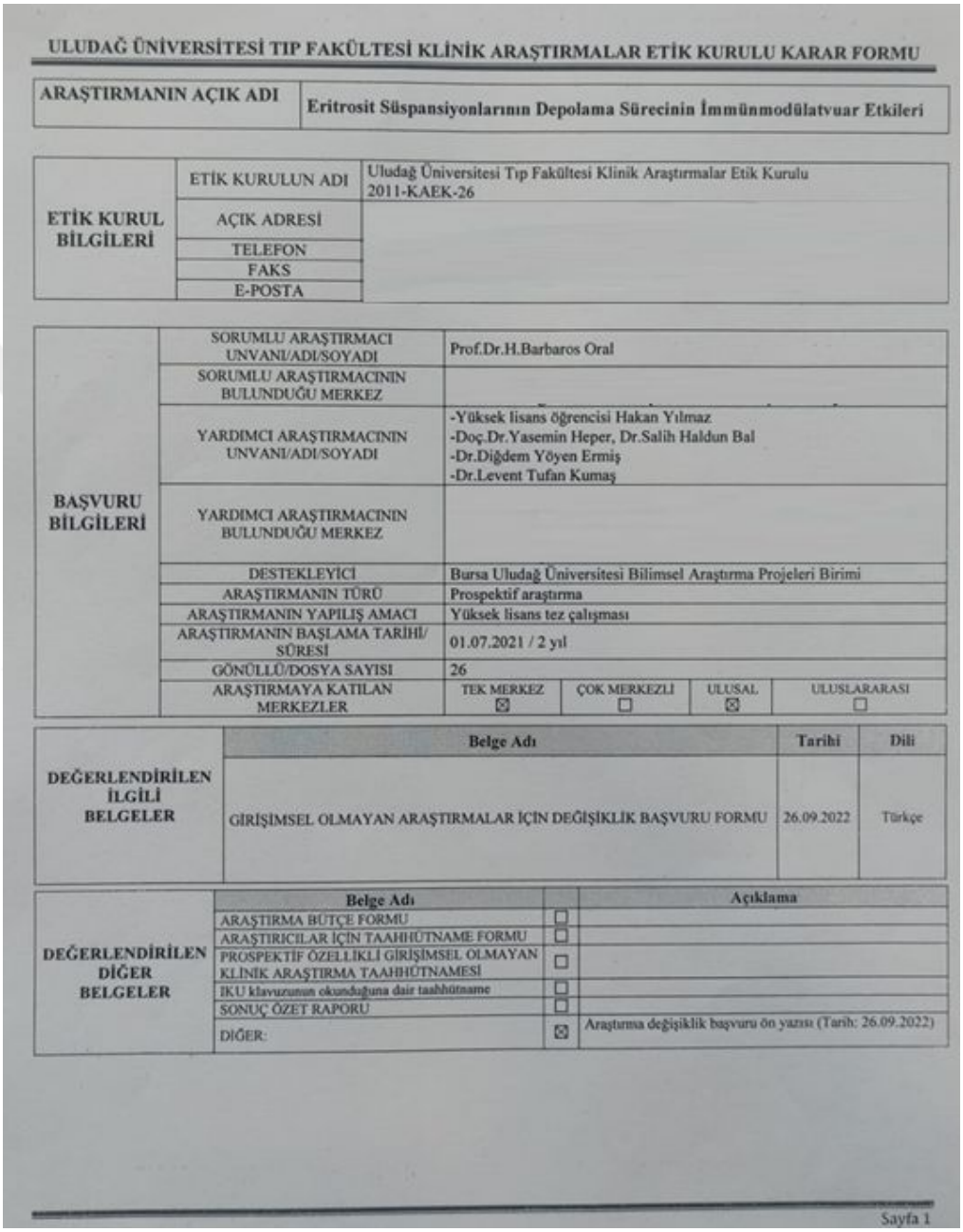
Zhou, H., Yang, J., Tian, J., & Wang, S. (2021). $CD8^+$ T Lymphocytes: Crucial Players in Sjögren's Syndrome. *Frontiers in immunology*, *11*, 602823. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.602823

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AHTR	Akut hemolitik transfüzyon reaksiyonu
ASH	Antijen sunan hücre
CD	Farklılaşma kümesi
CI	Klor
CPD	Sitrat fosfat dekstroz
ES	Eritrosit süspansiyonu
FNHTR	Febril non-hemolitik transfüzyon reaksiyonu
HSC	Hematopoetik kök hücre
GHTR	Geç hemolitik transfüzyon reaksiyonu
IFNg	İnterferon gamma
IL	İnterlökin
K	Potasyum
MDP	Makrofaj dendritik hücre öncülü
MEP	Megakaryosit-eritroid öncül hücre
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromür
Na	Sodyum
NK	Doğal öldürücü hücre
PD1	Programlanmış ölüm proteini 1
SAG-M	Salin adenin glikoz mannitol
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
THR	T hücre reseptörü
Tİ-GVHH	Transfüzyonla ilişkili graft versus host hastalığı
TNF-a	Tümör nekröz faktör
TRALI	Transfüzyonla ilişkili akut akciğer hasarı
Treg	Düzenleyici T hücre
TRIM	Transfüzyonla ilişkili immünmodülasyon

8. EKLER

Etik kurul kararı



ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eritrosit Süspansiyonlarının Depolama Sürecinin İmmünmodülatvuar Etkileri

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	AÇIK ADRESİ	
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.H.Barbaros Oral			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ				
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	-Yüksek lisans öğrencisi Hakan Yılmaz -Doç.Dr.Yasemin Heper, Dr.Salih Haldun Bal -Dr.Diğdem Yöyen Ermiş -Dr.Levent Tufan Kumaş			
	YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ				
	DESTEKLEYİCİ	Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Prospektif araştırma			
	ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI	Yüksek lisans tez çalışması			
	ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ	01.07.2021 / 2 yıl			
	GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI	26			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN DEĞİŞİKLİK BAŞVURU FORMU	26.09.2022	Türkçe

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	☐	
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	☐	
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAMESİ	☐	
	İKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	☐	
	SONUÇ ÖZET RAPORU	☐	
	DİĞER:	☒	Araştırma değişiklik başvuru ön yazısı (Tarih: 26.09.2022)

Sayfa 1

Etik kurul kararı devamı

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eritrosit Süspansiyonlarının Depolama Sürecinin İmmünmodülatvuar Etkileri

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2022-16/70 Tarih: 08 Kasım 2022

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 02 Haziran 2021 tarih ve 2021-7/33 nolu kararı ile uygun bulunan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırmada yapılan değişikliğin **uygun** bulunduğuna oybirliği ile karar verildi.

Yapılan değişiklik:
-Çalışmada Prof.Dr.H.Barbaro Oral ile birlikte sorumlu araştırmacı olarak yer alan Doç.Dr.Yasemin Heper'in yardımcı araştırmacı olarak görev alması

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐
Prof.Dr.M.Sertaç YILMAZ Üye	Farmakoloji		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐
Prof.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐
Prof.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐
Prof.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı		E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒
Prof.Dr.Özen ÖZ GÜL Üye	İç Hastalıkları Endokr ve Metab.		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya		E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐
Av. Ahmet BAYRAM	Hukuk		E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐
Ayşe ŞEN Üye	Sağlık meslegi mensubu olmayan üye		E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐

* Toplantıda Bulunma

Sayfa 2

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek bilimsel bilgi birikimi gerekse hayat tecrübesi ile her zaman örnek bir kişiliği olan, öğrencisi olmaktan büyük gurur duyduğum ama benim için hepsinden daha da önemlisi iyi bir insan olduğuna emin olduğum, tanıştığımızdan beri geçen üç yılda kimsenin kalbini kırdığına şahit olmadığım, insanlara karşı saygılı ve tevazu sahibi olmasıyla da bendeki değeri daha çok artan danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumun belirlenmesinde, hayata geçmesinde büyük emeği olan, yol gösteren ve desteğini hiç bir şekilde esirgemeyen her zaman bir abi edasıyla yaklaşan Sayın Dr. Öğr. Üyesi S. Haldun BAL hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim ile ilgili deneysel süreçlerde bilgisinden çok fazla istifade ettiğim, her konuda sohbet edilebilecek nadide insanlardan olan, her türlü bilgisini ve tecrübesini bizimle paylaşan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerimizden Sayın Prof. Dr. Ferah BUDAK hocama öğrenim hayatımdaki katkılarından ve sıcak yaklaşımından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana yardımda bulunan sevgili arkadaşlarım Fatma DOMBAZ-ÖZBEY, Gözde ARSLAN, Erkan ERMİŞ, Batuhan YAĞCIOĞLU ve İmmünoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğrenci arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederek hepsini çok sevdiğimi ve onları tanımaktan dolayı çok mutlu olduğumu belirtmek isterim.

Tezimin örneklerinin alınma ve işlenme süreçlerinde çok fazla katkıları olan Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi'nin değerli çalışanlarına ve kan bağışı yaparak bu çalışmanın yapılmasına vesile olan değerli bağışçılara da teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisansa başladığım günden mezun olduğum güne kadar bana karşı hep sıcakkanlı davranan yaklaşık iki yıl beraber çalışma fırsatı bulduğum ve her biri benim için çok değerli olan ve bilgilerinden istifade ettiğim İmmünoloji ve Doku Tipleme Laboratuvarlarında çalışan arkadaşalarım ile abi ve ablalarıma bilhassa değerli Figen AYMAK ablama çok teşekkür ederim.

En çok teşekkür etmek istediğim ve bunu en fazla hakeden kişiler olan bana her zaman güvendiklerini bildiğim, diğer kardeşlerim gibi benimde para kazanmaktan ziyade iyi insan olmamızı önceleyen ve karşılarına her ne statüde çıkarsam çıkayım tutumlarında farklılık olmayacak olan canım ailem ve kardeşlerim ile onlardan ayrı olduğum süre zarfında onları aratmayan tüm dost ve akrabalarıma çok teşekkür ederim. İyiki varsınız sizlerin varlığı benim için bir şükür vesilesi.

Hakan YILMAZ
07.01.2023

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hakan Yılmaz

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İ.Ö) (2012-2018)

Yüksek Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp-İmmünoloji Anabilim Dalı (2020-Halen)

Projeler

"Melanom antijenlerine spesifik T hücresi reseptörleri ile modifiye edilen Doğal Öldürücü hücrelerin kanser aşısı olarak geliştirilmesi" adlı TUBİTAK 1003 projesinde bursiyer.

Uluslararası Kongre-Poster Sunum

Yılmaz H., Bal S.H., Dombaz-Özbey F., Arslan G., Kumaş L.T., Yöyen-Ermiş D., Heper Y., Oral H.B., The Modulatory Effect of Storage Time of Red Blood Cell Concentrates on The T Lymphocytes. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V), 20-22 October 2022

Karacay M., Yılmaz H., Aras M., Çelik E., Korucu D.B., Yazıcı s., Başkan E.B., Türkkan E., Adım Ş.B., Yöyen-Ermiş D., Sütlü T., Oral H.B., Determination of The Tumor-associated Antigens in Cutaneus Melanoma. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V), 20-22 October 2022

Ulusal Kongre-Sözlü Sunum

Yılmaz H., Bal S.H., Dombaz-Özbey F., Arslan G., Kumaş L.T., Yöyen-Ermiş D., Heper Y., Oral H.B., Eritrosit Süspansiyonlarının Depolama Süresi ve Koşullarının İmmünmodülatuvar Etkileri. XV. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, 30 Kasım - 04 Aralık 2022