

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ÇEŞİTLİ HEMATOPOETİK KAYNAKLARDAN
ÇOK KÜÇÜK EMBRİYONİK (VSEL) KÖK HÜCRELERİN
ELDE EDİLMESİ VE TANIMLANMASI**

DOLAY DAMLA ÇELİK

**DANIŞMAN
PROF. DR. SERAP ERDEM KURUCA**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Programında Dolay Damla ÇELİK tarafından hazırlanan Çeşitli Hematopoetik Kaynaklardan Çok Küçük Embriyonik (VSEL) Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Tanımlanması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

29 / 12 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.Sacit KARAMÜRSEL	İst.Tıp Fak. Fizyoloji A.D
2.Prof.Dr.Serap ERDEM-KURUCA	İst.Tıp Fak. Fizyoloji AD
3. Prof.Dr.Asiye NURTEN	İst.YeniY.Üniv.Tıp Fak. Fizyoloji AD
4.Prof.Dr.Zeynep KARAKAŞ	İst.Tıp Fak. Pediatrik Hem. A.D
5.Prof.Dr.Hüsniye BİRMAN	İst.Tıp Fak. Fizyoloji AD

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm saflalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

DOLAY DAMLA ÇELİK



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Fizyoloji kürsüsünde yüksek lisans eğitimim süresince asistanlığını yapma fırsatı yakaladığım, beni yetiştiren ve her zaman destekleyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serap Erdem Kuruca'ya,

Yüksek lisans tezimin bir kısım deneylerini yapabilmem için Yeditepe Üniversitesi'nde laboratuvar olanakları sağlayan, akış sitometri analizlerinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gülderen Yanıkkaya-Demirel'e,

Tezimde kullanmak üzere, kordon kanı materyalini almamda yardımcı olan Sayın Uzm. Dr. Zuhâl Çelebi Koçyıldız'a, aferez materyalinin toplanmasında yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı Aferez Ünitesi çalışanlarına, periferik kan materyalini almamda yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Kan Merkezi çalışanlarına,

Çalışmalarımızın gerçekleşmesi için olanak sağlayan ve yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sacit Karamürsel başta olmak üzere Fizyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Bana her türlü maddi, manevi desteği sağlayan ve her zaman yanımda olan annem Deniz Çelik'e ve babam Değer Çelik'e

En içten TEŞEKKÜRLERİMİ sunmayı bir borç biliyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35553

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	II
BEYAN.....	III
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	XII
ÖZET.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Kök Hücre Tanımı.....	4
2.2.Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	4
2.2.1.Fonksiyonlarına Göre Kök Hücreler.....	4
2.2.2.Elde Edildiği Kaynağa Göre Kök Hücreler.....	5
2.3.Kök Hücre Belirteçleri.....	7
2.3.1.Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri.....	7
2.3.1.1.Hücre Yüzey Belirteçleri.....	8
2.3.1.2.Transkripsiyon Belirteçleri ve Hedefleri.....	8
2.3.2. Hematopoetik Kök Hücre Belirteçleri.....	10
2.3.3.İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Belirteçleri.....	11
2.4.Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı.....	11
2.4.1. Hematopoetik Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı.....	11
2.4.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı.....	14
2.5.VSEL Kavramı.....	15
2.6.VSEL'ler Hakkında Bilinenler ve Bilinmeyenler.....	16
2.7.VSEL Belirteçleri.....	20
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	22

3.1.Gönüllü Bireyler.....	22
3.2.Kan Materyallerinin Alınması.....	24
3.2.1.Periferik Kanların Toplanması.....	24
3.2.2.Aferez Ürünün Toplanması.....	25
3.2.3.Kordon Kanlarının Toplanması.....	26
3.3.Hücre İzolasyonları.....	26
3.3.1.Fikol ile Hücre İzolasyonu.....	26
3.3.2.Eritrosit Lizisi ile İzolasyon.....	28
3.4.Akış Sitometri Ölçümleri.....	28
3.5.İmmünfloresan Boyama.....	30
3.6.Western Blot Yöntemi ile Protein Tayini.....	31
3.6.1.Örneklerin Hazırlanması.....	32
3.6.2.Protein Tayini (Bradford testi).....	32
3.6.3.SDS-PAGE Jel Dökümü.....	34
3.6.4.Elektroforez.....	36
3.6.5.Blotlama.....	37
3.6.6.Membranda İlgili Proteinin İşaretlenmesi.....	38
3.6.7.Görüntüleme.....	40
3.7.İstatistiksel Analiz.....	40
4.BULGULAR.....	41
4.1.Periferik Kan.....	41
4.1.1.Periferik Kanda Akış Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı.....	41
4.1.2.Western Blot Yöntemi ile Periferik Kandan VSEL Proteinlerinin Tayini....	45
4.1.3.Periferik Kanda VSEL Belirteçlerinin İmmünfloresan Boyamalar ile Gösterilmesi.....	48
4.2.Aferez Materyali.....	49
4.2.1.Aferez Materyelinde Akış Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı.....	49
4.2.2.Western Blot Yöntemi ile Aferez Materyalinden VSEL Proteinlerinin Tayini.....	52
4.2.3.Aferez Materyelinde VSEL Belirteçlerinin İmmünfloresan Boyamalar ile Gösterilmesi.....	55
4.3.Kordon Kanı.....	56
4.3.1.Kordon Kanında Akış Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı.....	56

4.3.2. Western Blot Yöntemi ile Kordon Kanından VSEL Proteinlerinin Tayini.....	58
4.3.3. Kordon Kanında VSEL Belirteçlerinin İmmü Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi.....	62
5. TARTIŞMA.....	63
KAYNAKLAR.....	73
EK 1: ETİK KURUL KARARI.....	81
EK 2: GÖNÜLLÜ ONAY FORMLARI.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	87

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: İnsan ve fare embriyonik kök hücrelerindeki belirteçlerin karşılaştırılması	10
Tablo 2.2: HKHT Endikasyonları	12
Tablo 2.3: Kök hücre çeşitlerine göre taşınan belirteçler	21
Tablo 3.1: Antikor listesi	29
Tablo 3.2: İmmünfloresan preparatlar ve antikorlar	31
Tablo 3.3: BSA Standartlar	33
Tablo 3.4: Akrilamid yüzdesine uygun polipeptid ağırlıkları	35
Tablo 3.5: Antikor dilusyonları	39
Tablo 4.1: Akış Sitometri ile sayılan hücrelerin yüzde cinsinden ortalamaları.....	44
Tablo 4.2: Akış Sitometri ile sayılan hücrelerin yüzde cinsinden ortalamaları.....	51
Tablo 4.3: Akış Sitometri ile sayılan hücrelerin yüzde cinsinden ortalamaları.....	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Fonksiyonlarına göre kök hücreler	5
Şekil 2.2: Kök hücrelerin sınıflandırılması	7
Şekil 2.3: VSEL hücrelerinin morfolojik yapısı	15
Şekil 3.1 Hücre izolasyon ve tanımlama yöntemleri	23
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan periferik kanlar	24
Şekil 3.3: Aferez ünitesi	25
Şekil 3.4: Fikol ile ayrılmış hücre katmanları	27
Şekil 3.5: Eritrosit katmanına uygulanan işlemler	28
Şekil 3.6: Bradford test standartları ve örnekler	33
Şekil 3.7: Örnekler yüklenmiş yürüyen jel görüntüsü	37
Şekil 3.8: Alkalın fosfataz substratıyla görüntülenen western blot membran.....	40
Şekil 4.1: Akış Sitometri Kapılama	42
Şekil 4.2: Periferik kanda VSEL belirteçlerini akış sitometri ile gösterilmesi	43
Şekil 4.3: Periferik kandan eritrosit lizisi ile elde edilen hücrelerde akış sitometri incelenmesi	44
Şekil 4.4: Periferik kan lizis katmanında VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi	45
Şekil 4.5: Periferik kan MNC katmanında VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi	46
Şekil 4.6: Periferik kan 5. katman hücreleri VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi	47
Şekil 4.7: Periferik kandan izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin immüno Floresan ile gösterilmesi	48
Şekil 4.8: Aferez materyalinde VSEL belirteçlerinin akış sitometri ile gösterilmesi.....	50
Şekil 4.9: Aferez materyalinden lizis ile elde edilen hücrelerde akış sitometri incelenmesi	51
Şekil 4.10: Aferez materyali lizis katmanında VSEL belirteçlerinin, western blot ile gösterilmesi	52
Şekil 4.11: Aferez materyali MNC katmanında VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi	53
Şekil 4.12: Aferez materyali 5. katmanda VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi.....	54

Şekil 4.13: Aferez materyalinde izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin immünfloresan ile gösterilmesi	55
Şekil 4.14: Kordon kanında VSEL belirteçlerini akış sitometri ile gösterilmesi	57
Şekil 4.15: Kordon kanından lizis ile elde edilen hücrelerde akış sitometri incelenmesi	58
Şekil 4.16 : Kordon kanı lizis katmanında VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi	59
Şekil 4.17 : Kordon kanı MNC katmanında VSEL belirteçlerinin western blot ile gösterilmesi	60
Şekil 4.18 : Kordon kanı 5. katman grubunda VSEL belirteçlerinin, western blot ile gösterilmesi	61
Şekil 4.19: Kordon kanından izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin immünfloresan ile gösterilmesi	62

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

μ: Mikro

AP: Alkalin Fosfataz

APS: Amonyum Persülfat

BSA: Bovine Serum Albumin

CXCR-4: CXC-Kemokin Reseptör 4

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EBMT: Avrupa Kemik İliği Transplantasyon Grubu

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EG: Embriyonik Germ Hücreler

EK: Embriyokarsinoma Hücreleri

EKH: Embriyonik Kök Hücreler

GVHH: Graft Versus Host Hastalığı

HKHT: Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu

HKH: Hematopoetik Kök Hücre

HLA: İnsan Histokompatibilite Kompleksi (Human Histocompatibility Locus)

H₃PO₄: Fosforik Asit

iPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

kDa: kilodalton

KHN: Kök Hücre Nakli

Kİ: Kemik İliği

KK: Kordon Kanı

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

Lin: Lineage (soy) Belirteçleri

mA: miliamper

MKH: Mezenkimal kök hücreler

MNH: Mononükleer Hücreler

Oct4: Octamer-Binding Transcription Factor 4

OSE: Ovaryum Yüzey Epiteli (Ovarian Surface Epithelium)

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PK: Periferik Kan

PKH: Pluripotent Kök Hücreler

PKPH: Periferik Kan Projenitör Hücreleri

PMSF: Phenylmethylsulfonyl Fluoride

PVDF: Poliviniliden Florid

Rex1: Reduced Expression Protein 1

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2

SSEA: Stage-Specific Embriyonik Antijenleri

TBST: Tris-Buffered Saline, Tween 20 ile

TEMED: Tetrametiletildiamin

TRA-2-54: Anti-Alkaline Phosphatase, Tissue Non-Specific Antibodies

Utf1: Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1

VSEL: Very Small Embryonic-Like

YKH: Yetişkin Kök Hücreler

ÖZET

Çelik, D.D. (2014). Çeşitli Hematopoetik Kaynaklardan Çok Küçük Embriyonik (VSEL) Kök Hücrelerin Elde Edilmesi Ve Tanımlanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Kök hücre (KH) nakli malin kan hastalıkları, kemik iliği (Kİ) yetmezlikleri ve doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde kullanılan yöntemdir. Bu amaçla daha çok Kİ, periferik kan progenitor hücreleri (PKPH) ve kordon kanı (KK) kullanılır. Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinin sahip olduğu pluripotansiyel özelliği bulunan yeni bir KH türü tanımlandı. Çok küçük embriyonik benzeri (VSEL) kök hücreler olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde periferik kan (PK), Kİ, KK ve bütün vücut dokularında bulunduğu iddia edilmektedir. Bu çalışmadaki amacımız VSEL kök hücrelerini çeşitli insan hematopoetik kaynakları kullanarak elde etmek ve tanımlamaktır. Kaynaklar olarak PK, KK ve aferez materyali kullanılmıştır. Donörlerden alınan materyaller, eritrosit lizis ve ficol gradient yöntemi ile hem mononükleer hemde eritrosit katmanındaki hücrelerden, VSEL hücreleri izole edilerek akış sitometri ve immünfloresan boyama ile NANOG, OCT4, SSEA-4 ve CXCR-4 embriyonal reseptörlerin varlığı incelenmiştir. Western blot yöntemiyle NANOG ve OCT4 proteinlerinin varlığı araştırılmıştır. Akış sitometri sonuçlarına göre debris katmanında, VSEL belirteci taşıyan hücre sayısı CD45- popülasyonuna göre daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen western ve immünfloresan sonuçlarına göre üç materyalde de yüksek miktarda OCT4 ve NANOG ekspresyonu görülmüştür. Aynı zamanda bu proteinlerin hücre içinde hem sitoplazmada hem de çekirdekde bulunduğu gösterilmiştir. Pluripotent kök hücre belirteci olarak bilinen bu proteinlerin yetişkin PK'da yüksek miktarda ekspresyonu bu proteinlerin farklılaşmış dokularda nasıl bir görev edindiği sorusunu gündeme getirmektedir. Ficol yöntemiyle izolasyon işlemlerinde KH kaybının yüksek miktarda olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular; PK, KK ve mobilize PK materyallerinde pluripotent belirteçler taşıyan yeni bir KH popülasyonu bulunduğu tezini güçlendirerek bu konuda yapılacak ileriye dönük klinik çalışmalar içinde temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çok küçük embriyonik benzeri (VSEL) kök hücreler, Kordon kanı, Aferez, Periferik kan, Pluripotent kök hücre belirteçleri

ABSTRACT

Celik, D.D. (2014). Characterization And Isolation Very Small Embryonic-Like (VSEL) Stem Cells Obtained From Various Human Hematopoietic Cell Sources Istanbul University, Institute Of Health Science, Department Of Physiology. Msc Thesis. İstanbul

Stem cell transplantation is considered one of the available treatments for leukemia, lymphoma, hereditary blood diseases and bone marrow failure. Bone marrow (BM), peripheral blood progenitor cells (PBPC), and cord blood (CB) are the predominant source of stem cells. Recently new type of stem cell with a pluripotent potential has been identified. These cells named as “very small embryonic like stem cells (VSELsc)”. They claimed that VSEL stem cells found in adult BM, peripheral blood (PB), CB and other body tissues. This study is designed to characterize and isolate VSEL stem cells from different human hematopoietic sources; cord blood, peripheral blood and apheresis material. VSEL stem cells isolated from MNC and erythrocyte layers for all materials by using centrifugation and ficoll gradient method. We determined embryonic markers by flow cytometry, immunofluorescence and western blotting methods. The results from western blotting and immunofluorescence show high level of NANOG and OCT4 protein expression in PB, apheresis material and CB. And also immunofluorescence images show cytoplasmic and nuclear presence of these proteins. Flow cytometry results show higher expression of VSEL markers on debris area than CD45-population. And also higher expression on CB then PB. As a result, these findings show that it is necessary to investigate the function of pluripotent stem cell markers in differentiated adult cells. Another conclusion is, among the lysis and ficoll gradient method, lysis method has the highest cell recovery amount. Consequently this study gives us new informations and viewpoints about expression of PSC markers in adult tissues.

Keywords: Very Small Embryonic-like (VSEL) stem cells, Apheresis, Cord blood, Peripheral blood, Pluripotent stem cell markers

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde kök hücre nakli (KHN) rejeneratif tıpta önemli bir tedavi yöntemidir. KHN; lösemi, lenfoma gibi bazı malin kan hastalıkları ve kemik iliği yetmezlikleri ile doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde sıklıkla başvuru alan hayat kurtarıcı yöntemlerden biridir.

Kök hücreler çeşitli kaynaklardan elde edilir. Embriyonik kök hücreler yetişkin bireyin tüm hücre ve dokularını oluşturabilme kapasitesinden dolayı, geniş bir kullanım alanına sahipken, insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı dünyanın birçok ülkesinde çeşitli etik tartışmalar, allojenik kullanımındaki sorunlar ve teratoma riski nedeniyle kısıtlandırılmıştır. Kök hücre nakillerinde bu yüzden daha çok hematopoetik kök hücre (HKH) kaynakları kullanılmaktadır. Bu amaçla daha çok kemik iliği (Kİ), periferik kan progenitör hücreleri (PKPH) ve kordon kanı (KK) kullanılır (Barriga ve ark. 2012). Bu kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için ağırlıklı olarak pluripotent potansiyeli olan kök hücreler olması gereklidir (Kaufman 2009).

Kİ vericiden toplandıktan sonra doğrudan (fraksiyone edilmeden tümü) alıcıya verilir. Oysa PKPH ve KK kapalı santrifüj sistemlerinden geçirilerek daha çok mononükleer hücre tabakalarının bulunduğu kısım izole edilerek saklanır ve gerektiğinde hastaya verilir. KK'nın ve PKPH'nin total miktarları da çoğu kez yetişkin bir kişide hematopoetik rejenerasyonu sağlamaya yetmediği için (en az 3.5×10^8 /kg mononükleer hücre (MNH) veya $2-6 \times 10^6$ /kg CD34+) transplantasyon başarısız olmaktadır (Perutelli ve ark. 1999). Hatta KK bu nedenle sadece çocuklarda kullanılabilir. Aynı zamanda allojenik ve otolog HKH transplantasyonunda Graft Versus Host Hastalığı (GVHH) oluşma riskide oldukça yüksektir (Rocha ve ark. 2006).

Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotansiyel karakterine sahip ve organizmada tüm yaşam boyunca var olan yeni bir kök hücre türü tanımlandı (Kucia ve ark. 2006). Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (Very small embryonic-like stem cells - VSEL) olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde şimdilik kemik iliği, kordon kanı ve çok az da olsa periferik kanda bulunduğu gösterildi (Zuba-Surma ve ark. 2009). Bu hücrelerin izolasyon işlemi esnasında (KK ve PKPH için) mononükleer tabakanın dışında eritrosit katmanında bulunduğu için kaybedildiği iddia edilmektedir. KK ve PKPH gibi kök hücre kaynaklarının pluripotent kök hücre sayısını artırarak niteliğini iyileştirmek ve yetişkinlerde de kullanılabilme potansiyelini artırmak konusundaki çalışmaların, bu materyalin kullanım sınırlarını genişleteceği düşünülmektedir.

Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (VSEL kök hücreleri) ilk olarak 2006 yılında Zuba-Surma ve arkadaşları tarafından tanımlanan çok yeni bir kök hücre türüdür. Oldukça yeni keşfedilmiş olmaları nedeniyle haklarında bilinenler son derece kısıtlıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların çoğunun fareler üzerinde yapılmış olması da, insandaki durumları hakkında bize yeterince bilgi verememektedir (Kucia ve ark. 2008).

Bu projede çeşitli hematopoetik kaynaklar kullanarak VSEL kök hücrelerinin insandaki varlığının belirlenmesi hedeflendi. Projede periferik kan, aferez materyali ve kordon kanını karşılaştırarak VSEL kök hücreleri açısından aralarındaki farklar tayin edildi. Günümüze kadarki çalışmalarda özellikle insan kaynaklı kök hücre materyallerinde böyle bir karşılaştırma yapılmamış olması projenin çıkış noktasıdır. Literatüre göre periferik kanda son derece az miktarda VSEL kök hücresi bulunduğunu bilinmektedir (Kucia ve ark. 2008). Aferezde ise büyüme faktörleri (G-CSF) kullanılarak hücre miktarı artırıldığı için VSEL kök hücrelerinin miktarının normal periferik kana oranla daha fazla olması gerektiği düşünülmektedir (Sovalat ve ark. 2011). Kordon kanında ise miktarı ve niteliği ile ilgili çok az literatür bulunmaktadır (Halasa ve ark. 2008). Bu nedenle VSEL kök hücrelerini çeşitli kaynaklardan izole ederek tanımlamak projenin ana hedeflerindedir. Bütün materyallerden iki yöntemle VSEL izole edilmiştir. Birinci yöntemde santrifuj ve fikel

gradient ile hem MNH hemde eritrosit katmanındaki hücreler kullanılmıştır. İkinci yöntemde ise tüm kandaki eritrositler lizis edilerek kullanılmıştır. Bu katmanlardaki VSEL kök hücreleri akış sitometri, immünfloresans ve western blot yöntemleri ile embriyonal reseptörlerin varlığına göre tanımlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kök Hücre Tanımı

Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanabilmesi için 2 temel özellik gereklidir.

- Kendini yenileyebilme yeteneği (self-renewal)
- Tek bir hücrenin birden çok hücre serilerine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) (Bongso ve Lee 2005).

2.2.Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, sınırsız düzeyde kendini yenileme ve birden fazla seriye farklılaşma yeteneğine sahip olan klonojenik hücreler olarak tanımlanırlar. Kök hücreler, bir canlıda yaşam boyu yenilenen tüm farklılaşmış hücrelerin kaynağını oluştururlar.

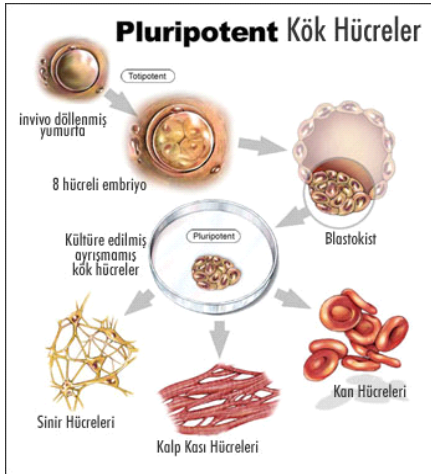
Günümüzde kök hücreler iki farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Fonksiyonlarına göre kök hücreler ve elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler (Kolios ve Moodley 2013).

2.2.1.Fonksiyonlarına Göre Kök Hücreler

Fonksiyonlarına göre kök hücreler 5 alt gruba ayrılırlar. Totipotent Kök Hücreler, Pluripotent Kök Hücreler (PKH), Multipotent Kök Hücreler, Oligopotent Kök Hücreler ve Unipotent Kök Hücreler.

Totipotent kök hücreler plasenta dahil tüm canlıyı oluşturabilmektedir. Tüm doku ve hücre tiplerine dönüşebilen kök hücre grubudur. Kendini yenileme kapasiteleri son derece yüksektir. Sadece embriyonun 8 hücreli morula dönemindeki hücreler totipotent özelliktedir. PKH'ler ise plasentayı oluşturamazlar fakat hemen hemen diğer tüm hücre tiplerine dönüşebilirler. Kendini yenileme kapasiteleri çok yüksektir. Embriyonun blastosist iç kütleindeki hücre grubu pluripotent özelliktedir. Blastosist iç kütle *in vitro* kültüre alınıp çeşitli faktörlerle

uyarıldığında kas, sinir, kemik, bağ doku gibi dokulara özelleşebilmektedir. Multipotent kök hücreler ise belli bir noktaya kadar özelleşmiş hücrelerdir, kendilerine yakın akraba hücre tiplerine farklılaşabilirler. Kendini yenileme özellikleri PKH'lere oranla daha düşüktür. Erişkin bireyde bulunan kök hücrelerin bir kısmı, örneğin mezenkimal kök hücreler (MKH) bu gruba dahildir. MKH'ler konnektif dokunun öncül hücreleridir. Oligopotent hücreler birkaç farklı hücreye farklılaşabilirken unipotent kök hücreler sadece tek bir hücre tipini oluşturabilir. Unipotent kök hücreleri normal hücreden ayıran özellik ise farklılaşmadan önce kendilerini yenilemeleridir.



Şekil 2.1: Fonksiyonlarına göre kök hücreler -www.kökhücrederneji.org.tr'den

2.2.2.Elde Edildiği Kaynağa Göre Kök Hücreler

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre ise 3 gruba ayrılırlar. Embriyonik Kök Hücreler (EKH), Yetişkin Kök Hücreler (YKH), Fetal Kök Hücreler (Bongso ve Lee 2005).

Embriyonik kök hücreler morula evresinde totipotent özelliktedirler. Buradaki 8 hücrede canlıyı tek başına oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Embriyo blastosist evresine geçtiğinde ise blastosistin iç kütledeki hücre topluluğu artık tüm bireyi veremez hale gelir, bu hücreler pluripotent hücrelerdir. EKH'ler endoderm, eksoderm ve mezoderm olmak üzere 3 germ tabakasını da verebilirler.

EKH'ler yetişkin bireyin tüm hücre ve dokularını oluşturabilme kapasitesinden dolayı, rejeneratif tıpta geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir.

Ancak insan EKH'lerinin kullanımı dünyanın birçok ülkesinde çeşitli etik tartışmalar, allojenik kullanımındaki sorunlar ve teratoma riski nedeniyle kısıtlandırılmıştır. EKH'ler transplantasyon sonrasında malin hale gelme ihtimalleri yüksek bir hücre topluluğudur. Hücre bölünmesinin kontrolünü sağlamak, hücre ne kadar primitif ise o kadar zordur. Bu yüzden teratoma oluşma riski yüksektir. Bu risk de kullanımlarını kısıtlamaktadır.

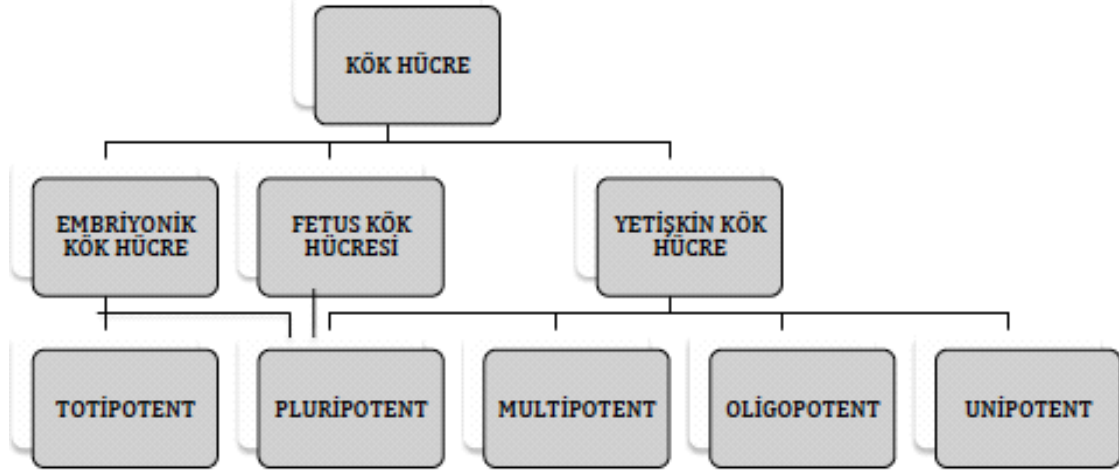
Yetişkin kök hücreler ise erişkin bireyin dokularında bulunan kök hücrelerdir. Yetişkin bireylerde kemik iliği, kan, kornea, retina, karaciğer, deri, gastrointestinal sistem, pankreas gibi birçok doku gerektiğinde farklılaşmaya uğrayabilen yetişkin kök hücrelere sahiptir. Bu hücrelerin görevi canlının yaşamı boyunca, bulunduğu dokudaki hasarları onarmak üzere değişikliğe uğramaktır.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) de yetişkin kök hücre grubundandır. MKH bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilirler. Aynı zamanda destek doku olan stromal hücrelerinde kökenini teşkil etmektedirler.

Hematopoetik kök hücreler (HKH) yetişkin bireyde en iyi tanımlanmış kök hücre gruplarından biridir. Tüm kan hücrelerini oluşturma kapasitesine sahiptirler. HKH'ler kemik iliğinde bulunarak homeostazisi sağlarlar. HKH'ler kendini yenileme ve farklılaşma dengesini kurabilirler. Böylece kan hücrelerinin yaşam boyu üretimi, HKH havuzundaki hücre sayısının azalmadan sürdürülmesi gerçekleşir. HKH'ler hücre siklusunun G₀ fazında bulunurlar, diğer bir deyimle uyku (dormancy) halindedirler. Bu özellikleri sayesinde DNA replikasyonunun, hücre bölünmesinin, metabolik ürünlerin ve reaktif oksijen ürünlerinin mutajenik hasarından kendilerini korurlar.

Fetüs organlarında bulunan kök hücreler fetal kök hücreler olarak adlandırılırlar. Bu hücreler de kültür ortamında tüm hücre türlerine dönüşebilirler. Yani embriyonik kök hücrelerine benzer davranış göstermektedirler. Bu nedenle çalışmalarda embriyonik kök hücrelere alternatif olarak kullanılırlar. Ancak fetüstan elde edilen bu kök hücreler gelişimin daha geç safhasında olduğu için çoğalma

potansiyeli biraz daha düşük olmaktadır. Düşük yapan kadınlardan elde edilen fetüslar veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetüslar bu tür kök hücreler için kaynak oluşturmaktadır (Vats ve ark. 2005; Jones ve ark. 2010).



Şekil 2.2: Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

2.3.Kök Hücre Belirteçleri

Kök hücrelerin birbirinden ayırt edilmelerini ve izole edilebilmelerini sağlayan çeşitli belirteçler bulunmaktadır. Hücre yüzey reseptörleri, transkripsiyon faktörleri, çeşitli enzimler (alkalin fosfataz, telomeraz gibi), germ line belirteçleri sayılabilir. EKH, HKH, Lenfoid/Miyeloid soy kök hücreleri, mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, miyogenik prekürsör hücreler, osteoprojenitör hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH), kanser kök hücreleri gibi farklı kök hücre türleri için ortak veya ayrı belirteçler bulunmaktadır.

2.3.1.Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri

EKH'leri ayırt edebilmek için kullanılan çeşitli belirteçlerin fonksiyonlarının doğru anlaşılması; EKH'lerin tanımlanmasında, pluripotent potansiyellerinin anlaşılmasında, kendini yenileme kapasitelerinde ve çeşitli çalışmalarda EKH'lerin kullanımlarının artmasında önemli role sahiptir.

Hem insan hem de fare embriyonik kök hücrelerinde alkalin fosfataz aktivitesi pozitifdir, telomeraz aktiviteleri yüksektir ve çekirdek-sitoplazma oranı fazladır. Alkalin fosfataz insanda TRA-2-49 ve TRA-2-54 (Anti-Alkaline

Phosphatase Tissue Non-Specific antibodies, Anti-Alkalin Fosfataz Dokuya Özgü Olmayan Antikorlar) antikorları ile belirlenebilir. Farede ise tipik olarak enzimatik reaksiyonun belirlenmesine dayanan metodlar kullanılır. Telomeraz aktivitesi ise pluripotansiyel özellik ile direkt ilişkilidir. Pluripotansiyel özelliği fazla olan hücre hatlarında telomeraz aktivitesi de yüksektir (Zhao 2012; Pazhanisamy 2013).

2.3.1.1.Hücre Yüzey Belirteçleri

TRA-1-60 ve TRA-1-81 antijenleri; insan embriyonik karsinoma hücreleri, insan pluripotent kök hücreleri, iPKH ve aynı zamanda embriyonik germ (EG) hücreleri için belirteç görevi görmektedir. Bu iki antijen perisellüler matriks keratan sülfat/kondroitin sülfat proteoglikan ile ilişkili olup, farklılaşmamış insan EKH hücrelerinde pozitiftir. TRA-1-60 ve TRA-1-81 antikorları blastokist iç hücre kitlesi hücrelerine bağlanır. Bu iki faktörün rolleri henüz tam olarak açıklanamamıştır. TRA-1-60 reseptörü, fare EKH ve embriyokarsinoma hücrelerinde (EK) pozitif değildir (Vatansever 2009; Pazhanisamy 2013) .

SSEA (Stage-specific embryonic antigen, Embriyonik evreye özel antijenler) bilinen diğer önemli membran yüzey belirteçlerindedir. Hem fare hem de insan embriyonik kök hücrelerinde tanımlanan bu antijenin bilinen üç formu vardır; SSEA-1, SSEA-3 ve SSEA-4. SSEA'lar EKH, EG, fare EKH ve EK hücrelerinde görülmektedir. İnsan embriyonik kök hücresi pluripotent dönemde SSEA-3 ve SSEA-4 pozitif iken, farklılaşmaya başladığı dönemde SSEA-1 antijenini de ifade etmeye başlar. Pre-implantasyon dönemindeki fare embriyosunda sadece SSEA-1 pozitiftir. Fakat farklılaşma ile birlikte SSEA-1 antijen pozitifliği kaybolur. Fare iç hücre kitlesi SSEA-1 pozitif iken, fertilize olmamış oosit ve erken yarıklanma dönemindeki fare embriyosunda SSEA-3 ve SSEA-4 pozitiftir. Fakat insan embriyosuna zıt olarak blastokist aşamasında SSEA-3 ve SSEA-4 negatiftir (Vatansever 2009; Yanagisawa 2011).

2.3.1.2.Transkripsiyon Faktörleri ve Hedefleri

Oct4 (Oct3/4, Oct3) (Octamer-binding transcription factor 4, Oktamer-bağlanma transkripsiyon faktörü 4) EKH'nin en önemli transkripsiyon faktörlerinden

birisidir. İnsan ve farede iç hücre kitlesinden ifade edilir. Oct4 embriyonik hücrelerin farklılaşmasını inhibe eder. Oct4'ün ifadesinin azalması ile birlikte farklılaşma başlar. Ayrıca Oct4 ifadesi ile birlikte erken embriyonik dönemde Sox2 (SRY (sex determining region Y)-box 2, cinsiyet belirleyici bölge-kutusu), Rex1 (Reduced expression protein 1, Artmış ekspresyon proteini 1) ve Utf1 (Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1, Farklılaşmamış embriyonik hücre transkripsiyon faktörü) gibi birçok genin ifadesi de başlamış olur. Anneden gelen Oct4 proteini fertilize olmamış oositte, 2 hücreliden 8 hücreli döneme kadar pozitiftir. Farklılaşmanın başlaması ile birlikte Oct4 sentezinde azalır. Oct4 iç hücre kitlesi ve epiblast hücrelerinin oluşması için gereklidir. Oct4, EKH 'in kendilerini yenileyebilmeleri için de gereklidir. Oct4 ve NANOG farklılaşmanın inhibisyonu sırasında gözlenirler (Vatansever 2009; Zhao 2012).

Sox2 iç hücre kitlesinde ve EKH'de eksprese edilir ve Oct4'ün kofaktörüdür. Maternal Sox2 preovulatuvar oosit, iç hücre kitlesi ve trofoblastta pozitiftir. Zigotta ilk olarak morula döneminde salınır ve daha sonra iç hücre kitlesi, epiblast ve ekstraembriyonik hücrelerde, nöral tabakada, geç dönemde de sinir sistemi, barsak ve germ hücreleri gibi kök hücrelerde sınırlı dağılım gösterir. Sox2 insan ve fare embriyolarında preimplantasyon döneminde ifade edilmeye başlar ve fonksiyonu Oct4 ile aynıdır. Gelişimin daha sonraki dönemlerinde Sox2, Oct4 ile birlikte göç eden primordial hücrelerde gözlenir. Oct4, Sox2 ve osteopontin erken embriyonik dönemdeki aynı hücrede aynı anda ifade edilirler. Farklılaşma sırasındaki osteopontinin ifadesindeki artış ve azalma, Oct4 ve Sox2 ile aynı anda gerçekleşir.

NANOG, LIF (Leukemia inhibitory factor, Lösemi inhibitör faktörü) yokluğunda fare embriyonik kök hücrelerinin pluripotansiyeli için gereklidir. Morula ve blastokist döneminde ifadesi en fazla iken, implantasyondan hemen önce azalır. NANOG ifadesi fare ve insan EKH'lerinde, embriyonik germinal hücreleri ve EKH'de gözlenmiştir. Oct4 ve NANOG birlikte hücrelerin farklılaşmamış düzeyde kalmalarını sağlarlar. Oct4'ün esas fonksiyonu iç hücre kütlesi ve EKH hücrelerinin trofoektoderme farklılaşmasını önler iken, NANOG bağımsız olarak

ekstraembriyonik endoderme farklılaşmasını önler ve temel olarak pluripotansiyel özelliğinin korunmasını sağlar (Yamanaka 2003; Vatansever 2009).

Farklılaşmamış fare EKH ve EK'da salgılanan Rex-1, trofoblast ve spermatogenetik hücrelerin gelişiminde de önemli rol oynar. İç hücre kütlesi ve polar trofoblast hücrelerinde pozitif olan Rex-1, insanlarda faredeki ile aynı özellikte dağılım gösterir. Kısaca Rex-1, pluripotent hücreler için belirteçdir.

Tablo 2.1'de insan ve fare EKH belirteçlerin karşılaştırılması olarak dağılımları gösterilmiştir.

Tablo 2.1: İnsan ve fare embriyonik kök hücrelerindeki belirteçlerin karşılaştırılması

Belirteç	İnsan EKH	Fare EKH
SSEA-1	-	+
SSEA-3	+	-
SSEA-4	+	-
TRA-1-60	+	-
TRA-1-81	+	-
Alkalen Fosfataz	+	+
NANOG	+	+
OCT3/4	+	+
Sox2	+	+
Rex1	+	+

2.3.2.Hematopoetik Kök Hücre Belirteçleri

HKH'ler kemik iliği, kordon kanı ve mobilize edilmiş periferik kan gibi hematopoetik dokularda bulunurlar. Olgunlaşma belirteçlerinin (Lineage marker, Lin-) yokluğu ile birlikte bazı HKH'ye özgü belirteçler ile tanımlanırlar. HKH'lerin en önemli belirteçlerinden birisi CD34'dür. Bu, insan kemik iliği hücrelerinin %0.5-5'inde ifade olur. Erken progenitörlerde bulunurken daha olgun hücrelerde bulunmaz. İnsan HKH'lerinde bulunan belirteçler; CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻, CD133⁺, VEGFR-2⁺ (vasküler endotelial büyüme faktör reseptör 2), CD164⁺, CXCR-4⁺ (CXC-kemokin reseptör 4), p-glikoprotein, CD45⁺ şeklindedir (Ratajczak 2008a; Ural 2012).

2.3.3.İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Belirteçleri

İlk olarak 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka isimli araştırmacıların çalışmaları ile somatik bir hücreye gen aktarılması sonucu pluripotent özellikte hücreler elde edilmiştir ve bu hücrelere indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) adı verilmiştir. iPKH'ler oluşturulurken pluripotent özelliği sağlamak amacıyla c-Myc, Sox-2, Oct 3/4 ve Klf-4 genleri transfeksiyonla somatik hücrelere aktarılmaktadır. Gen aktarımı işlemi sonucunda aktif genleri içeren hücre kolonilerinin seçimi ile iPKH'ler elde edilmektedir (Yamanaka ve Takahashi 2006).

İnsan iPKH'lerinde hücre yüzey belirteçleri, EKH'ler ile çok benzerdir. SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E, ve NANOG pozitifliği göstermektedirler. Fare iPKH'leri ise SSEA-1 ifade ederken SSEA-3 ve SSEA-4 pozitifliği göstermezler. Transkripsiyon faktörlerinden Oct-3/4, Sox2, NANOG, GDF3, REX1, ve hTERT ifade ederler (Yamanaka ve ark. 2014).

2.4.Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı

Klinik uygulamalarda çeşitli kök hücreler uzun süredir ve yaygın olarak birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Bu amaçla, HKH kaynakları olarak Kİ, PKPH ve KK kullanılmaktadır. Bu kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için ağırlıklı olarak pluripotent potansiyeli olan kök hücreler olması gereklidir. Ayrıca son yıllarda ortopedi, plastik cerrahi ve diş hekimliğinde de mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kullanımı rağbet görmektedir (Sahin ve ark. 2005).

2.4.1.Hematopoetik Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı

Hematopoetik kök hücrelerin transplantasyonu (HKHT) son yıllarda dünyada ve ülkemizde sıklıkla uygulanan bir yöntem olmaktadır. Avrupa ülkelerinde çocuk ve adolesanları içeren yaklaşık 80 milyon pediatrik popülasyonda yılda yaklaşık 1500-1600 HKHT uygulamasına gereksinim olduğu belirlenmiştir. Bu ülkelerde HKHT uygulamaları çoğunlukla malin hastalıklarda yapılmaktadır, Avrupa Kemik İliği Transplantasyon (EBMT) Grubu'nun 2008 verilerine göre HKHT uygulanan

hastalıkların yaklaşık %75'ini lösemi ve lenfoma gibi malin hastalıklar oluşturmaktadır. Ülkemizde ise yılda yaklaşık 200 HKHT uygulanmaktadır. En sık HKHT uygulanan hastalıklar arasında talasemi major ve akut lösemiler bulunmaktadır (Yeşilipek 2014)

HKHT, kemik iliğinin iyi huylu veya malin hastalıklarında, hastanın kendisinden (otolog) ya da sağlıklı ve doku grubu uyumlu kişilerden (allojenik) alınan HKH'lerin hastaya verilmesidir. Allojenik transplantasyon için hastayla uyumlu bir donör bulunmalıdır. 6. kromozomda bulunan İnsan Histokompatibilite Kompleksi (HLA-Human Histocompatibility Locus) allellerinin karşılaştırılmasıyla uyumlu donörler seçilir. Hasta ile donör arasında ki uyum düşük, orta yada yüksek olabilir. Uyumun yüksek olması başarılı bir transplantasyon için önemlidir. Günümüzde HKHT, lenfomalar, lösemiler, solid tümörler, hemoglobinopatiler, aplastik anemi, immün yetmezlik sendromları gibi birçok hastalığın tedavisinde uygulanmaktadır. HKHT uygulandığı hastalıklar Tablo 2.2 de gösterilmektedir.

Tablo 2.2: HKHT Endikasyonları

Otolog Nakil Yapılan Hastalıklar	Allojenik Nakil Yapılan Hastalıklar	
Multiple myeloma	Akut myeloid lösemi	Aplastik anemi
Hodgkin hastalığı	Akut lenfoblastik lösemi	Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
Hodgkin dışı Lenfoma	Kronik myeloid lösemi	Fankoni anemisi
Akut myeloid lösemi	Myelodisplastik sendrom	Blackfan Daimond anemisi
Nöroblastoma	Myeloproliferatif hastalıklar	Talasemi major
Over kanseri	Hodgkin/Non-Hodgkin lenfoma	Orak hücreli anemi
Germ hücreli tümörler	Kronik lenfositik lösemi	Ciddi kombine immün yetmezlik
Otoimmün hastalıklar	Multiple myeloma	Wiskott Aldrich sendromu
Amiloidoz	Juvenil kronik myeloid lösemi	Doğumsal metabolizma hastalıkları

Bir hastaya HKHT uygulamanın birden fazla amacı olabilir. Yüksek doz kemoterapi yada radyasyon uygulanan kanser hastasına tedavinin yüksek toksik etkilerinden korumak için HKHT uygulanabilir. Bu yöntem için hem otolog hem allojenik transplantasyon yapılabilir. Çoğu kemoterapi ve radyoterapi rejiminin hedefi kanser hücreleri olsada sağlıklı HKH de doza bağlı olarak harabiyete uğramaktadır. Bazı kanserlerde tedavi dozunun üzerinde yüksek dozlar kullanılması sonucu daha dirençli malin hücreler öldürülerek uzun süreli yanıtlar elde edilmektedir. Ancak bu yoğun tedavi sonrasında derin miyelosupresyon hatta ölümcül miyeloablasyon oluşabilir. Tedavi öncesi toplanmış olan otolog HKH'nin yeniden infüzyonu ile hematopoez düzeltilebilir. Konjenital yada akut kan hastalıklarında hematopoetik sistemin düzeltilmesinde diğer bir seçenek de allojenik transplantasyonun kullanılmasıdır.

HKH kaynağı olarak periferik kan hem otolog hem de allojenik olarak elde edilebilir. Granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF) ile kök hücreler periferik kana mobilize edilerek lökoferez denen yöntemle toplanır ve transplantasyonu yapılır. Aferez, uzaklaştırma-ayırma anlamında olup, kanın bir komponentinin alınıp, geri kalanının kişiye verilmesi işlemidir. Lökositlerin toplandığı afereze ise lökoferez denir (Dilek ve ark. 1998; Barriga ve ark. 2012).

Başka bir kök hücre kaynağı ise HKH bakımından çok zengin olan kemik iliğidir. Kemik iliği genel anestezi altında genellikle arka iliak kanattan toplanır. Toplanan kemik iliğinin yeterliliği çekirdekli hücre sayısına göre belirlenir. Başarılı bir nakil için alıcı vücut ağırlığı başına $2-4 \times 10^8$ çekirdekli hücre gereklidir (Ratajczak ve ark. 2008b)

Son olarak kök hücre kaynağı için diğer bir seçenek kordon kanı sayılabilir. Kordon kanı anne ile bebek arasındaki beslenmeyi sağlayan kordondan doğum sırasında toplanmaktadır. Graft versus host hastalığı (GVHH) riski daha azdır. Klinik kullanımının kısıtlanmasının nedeni ise miktarının az oluşudur. Kordon kanı izolasyonu sonucu elde edilen katmandaki (buffy coat-mononükleer hücre tabakası) hücre miktarı az olduğu için yetişkin bir insanın hematopoetik rekonstriksiyonu için yetersizdir. Bu nedenle kordon kanı bankalarında toplanan materyal sadece 30-40

kg ağırlığındaki çocuklarda kullanılmakta, erişkinde veya yakın akrabalarında kullanılamamaktadır (EuroCord kayıtlarına göre engraftment için optimum gerekli hücre miktarları; KK 0.47 x 10⁸/kg, KİT 3.5 x 10⁸/kg MNC). Bu hücre sayısının azlığı graft yetersizliğine neden olmaktadır. Diğer transplantasyon materyalleri ile mukayese edildiğinde, sadece kordon kanında hastaya hazırlık rejimi uygulamaya gerek yoktur (Rocha ve ark. 2006).

Hastalarda nakille ilişkili çeşitli komplikasyonlar gelişebilmektedir. Komplikasyon gelişmesi bireysel yatkınlık, immünoşüpresyon tedavisi, nakil öncesi tedavilerin toksisiteleri ve nakil sırasında oluşan diğer etmenlerle ilişkili olabilmektedir. Allojenik HKHT'nin en önemli komplikasyonu graft versus host hastalığıdır (GVHH). GVHH, verici T-lenfositlerine karşı immün reaksiyon oluşmasıdır. GVHH gelişmesinde en önemli risk faktörü HLA uyumsuzluğudur. Uyumsuzluk ne kadar artarsa GVHH riski de o kadar artmaktadır. En çok periferik kan nakillerinde GVHH riskinin arttığı, en düşük riskin ise kordon kanı kullanımında görüldüğü bilinmektedir (Papadopoulus ve Jakubowski 2006).

2.4.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı

MKH tedavileri birçok değişik hastalığın tedavisinde gelecek vaat eden bir biyolojik tedavi yöntemidir. MKH'nin kolay elde edilebilir olması, kültürlerde çoğaltılabilmesi, multipotansiyel özellikleri ve farklı dokulara yönlendirilmeleri tedavide kullanımlarını cazip bir hale getirmektedir.

Hematopoetik kök hücre ve organ transplantasyonunda özellikle immünoşüpresif olmaları ve stroma desteği sağlamaları nedeniyle önemli katkıları olacağı düşünülmektedir. HKHT, yeni gelişen hematopoezin desteklenmesi, kemik iliği reddinin önlenmesi ve allojenik transplantasyonlarda GVHH'nin önlenmesi veya tedavisinde katkıları gösterilmiştir. Literatürde, immünoşüpresif etkinin yanında otolog ve allojenik HKHT'da yeni gelişen hematopoezi destekleyerek engraftmanın güçlendirilmesini sağladığı gösterilmiştir (Barry ve Murphy 2004).

Birçok avantajı olduğu gösterilen bu hücrelerin klinik kullanım açısından en önemli dezavantajı sayılarının çok az olması nedeniyle in-vitro ortamında

haftalarca süren kültürlerde çoğaltılması durumudur. Bu hücrelerin çoğaltılması çok ciddi bir teknoloji ve alt yapı gerektirir. Maliyetinin yüksek olması nedeniyle de MKH ile çalışma yapılan merkez sayısı oldukça azdır.

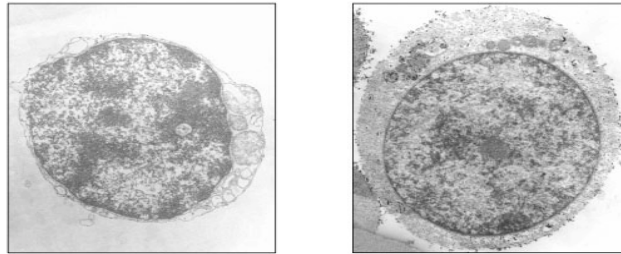
Mezenkimal kök hücreler ile in-vitro ve in-vivo deneysel araştırmalar çok sayıda olsa da rapor edilen klinik uygulama sayısı çok azdır. Ayrıca etkinliği konusunda da çalışmaların sayısı yeterli değildir. Bu nedenle, yaygın kullanıma geçmeden önce çok daha fazla sayıda hastada klinik deneyim kazanılması gerekmektedir (Tap ve ark. 2012).

2.5.VSEL Kavramı

Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinde bulunan pluripotansiyel özelliğe sahip yeni bir kök hücre türü tanımlanmıştır. Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (Very small embryonic-like stem cells, VSEL_s) olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde periferik kan, kemik iliği ve bütün vücut dokularında bulunduğu iddia edilmektedir ayrıca yenidoğan kordon kanında bulunduğu da gösterilmiştir (Kucia ve ark. 2006, Kim ve ark. 2014).

VSEL kök hücrelerinin diğer kök hücrelerden farklı olarak boyutlarının (5-6 μ m) eritrositlere (7-8 μ m) yakın olmasıdır. Ayrıca bu hücrelerin nukleus/sitoplazma oranı normal bir hücreninkinden büyüktür. Kromatin yapısı daha kompakt ve metabolik olarak aktivitesi düşüktür. Henüz son 8-10 yıldır tanımlanan ve daha çok farelerde araştırılan bu kök hücre grubunun transplantasyon amacı ile kullanılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Zuba-Surma ve ark. 2008; Bhartiya ve ark. 2013).

Kemik iliğinde VSEL Kordon Kanında VSEL



şekil 2.3: VSEL hücrelerinin morfolojik yapısı - Kucia (2006)'dan

2.6.VSEL'ler Hakkında Bilinenler ve Bilinmeyenler

Embriyonik kök hücreler yetişkin bireyin tüm hücre ve dokularını oluşturabilme kapasitesinden dolayı, rejeneratif tıpta geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ancak insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı dünyanın birçok ülkesinde çeşitli etik tartışmalar, allojenik kullanımındaki sorunlar ve teratoma riski nedeniyle kısıtlıdır.

Son yıllarda ortaya çıkan VSEL kök hücre kavramı bu sorunların üstesinden gelerek, kök hücreye yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır. İlk olarak 2006'da Kucia, Zuba-Surma Ratajczak ve ark. tarafından fare kemik iliğinde embriyonik karakter taşıyan (very small embryonic-like, VSEL) çok küçük (2-4 μm) hücrelerden oluşan homojen bir populasyon tanımlanmıştır. Araştırmacılar; bunların epiblast kökenli, üç germ tabakasına farklılaşarak bütün organları yenileyebilme potansiyeli olan ve erken gelişme esnasında fetal karaciğer ve Kİ'de koloniler halinde bulunarak, doku ve organ hasarı olduğunda Kİ nişlerinden serbestleyerek göç ettiği hipotezini ortaya attılar (Kucia ve ark. 2006; Ratajczak ve ark. 2014a). Daha sonra aynı grup, kök hücre plastisite teorisinden yola çıkarak, kemik iliğinde kimliği belirlenmemiş, hematopoetik olmayan ama yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip bir grup hücrenin olabileceğini ve bu hücrelerin kök hücre plastisitesinden sorumlu olabileceğini düşündüler (Kucia ve ark. 2008). Zuba-Surma ve arkadaşları VSEL kök hücrelerinin embriyonik gelişim sırasında kemik iliğinde depo edildiğini ve dolaşımın pluripotent kök hücre havuzunu oluşturduğunu öne sürmüşlerdir. Bu hücrelerin hem hematopoetik hemde hematopoetik olmayan dokularda doğum sonrası doku yenilenmesinde (turnover) önemli rol oynadıklarını düşündüler (Ratajczak ve ark. 2008c). Ayrıca fare miyoblast C2C12 hücreleri üzerinde in vitro proliferasyonunu inceledikleri deneylerde ise, VSEL kök hücrelerinin primitif kök hücre içeren alanlar oluşturduğunu gösterdiler. Bu alanlardaki hücreler izole edildiklerinde ve doku spesifik sitokin içeren ortamlara nakledildiklerinde 3 germ tabakasına farklılaşabilmektedirler. Fakat farelerde VSEL kök hücre sayısının ve bu alanları oluşturma yeteneğinin yaşla beraber azaldığı önemle vurgulanmaktadır (Zuba-Surma ve ark. 2009). Çalışmaları sonucunda

embriyonik benzeri, pluripotent özellikte epiblasttan kökenlenmiş küçük kök hücrelerin varlığını gösterdiler. Bu hücreleri fare ve insan kemik iliğinden izole etmeyi başardılar. Bu hücreleri izole ederken çeşitli hücre yüzey belirteçlerini kullandılar. İnsanlarda CXCR4⁺, CD45⁻, CD133⁺, CD34⁺, farelerde ise CXCR4⁺, CD45⁻, SCA-1 belirteçleri kullanıldı. Hematopoetik hücre belirteci olan CD45 negatif, pluripotent hücre belirteci olan CD133, CD34 ise pozitif olan hücreler tespit edildi (Zuba-Surma ve ark. 2009). Bu hücrelere çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (very small embryonic-like stem cells VSEL stem cells) adını verildi.

Bir başka grup, kordon kanından VSEL kök hücre izolasyonu için daha komplike olan iki aşamalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Önce eritrositlerin hipotonik olarak lizisi yapıldıktan sonra, çok parametrelili FACS ile saflaştırdılar. Lin⁺CD45⁺ hücreleri attıktan sonra CXCR4⁺ CD34⁺ CD133⁺ belirteçlerini taşıyan hücreleri ayırdılar. Bu iki aşamalı yöntemle kordon kanından, kemik iliğindeki benzeyen küçük boyutlu, Oct-4, NANOG mRNA'sını sentezleyen VSEL kök hücrelerini izole edebilmeyi başarmışlardır (Halasa ve ark. 2008)

Daha sonra, Sovalat ve arkadaşları insan kemik iliğinde granülosit koloni-stimüle edici faktör (G-CSF) kullanıldıktan sonra periferik kana mobilize olan CD34⁺ hücreler elde ettiler. Bu hücre grubunda kalp ve endotel dokulara yönlenebilen, alt popülasyonların bulunduğunu gözlemlediler. Yaptıkları çalışmada bu hücrelerin kemik iliğinde bulunan VSEL kök hücrelerinden kökenlenmiş olabileceğini ve periferik kana G-CSF ile mobilize olduktan sonra geçtiğini ileri sürdüler. Çalışmalarının sonucunda insan kemik iliğinden ve lökoferez materyalinden CD34⁺/CD133⁺/CXCR4⁺/Lin⁻ CD45⁻ belirteçlerine sahip olgunlaşmamış hücre grupları izole ettiler. Bu küçük hücrelerin (2-5 m) Oct4, NANOG ve SSEA-4 sentezlediğini protein ve mRNA düzeyinde göstermişlerdir (Sovalat ve ark. 2011).

Parte ve arkadaşları, kök hücre farklılaşma potansiyellerini araştırmak için erişkin tavşan, koyun, maymun ve menopozal insan ovaryum yüzey epiteli (ovarian surface epithelium - OSE) ile çalışmışlardır. Elde edilen OSE'lerde 2 farklı kök hücre varsayılan popülasyon gözlemiştir. Bu iki farklı popülasyondan küçük olan

populasyonun (1-3 μ m) VSEL kök hücreleri olabileceğini; bu hücrelerin pluripotent özellikte olduğunu, nuklear Oct-4, hücre yüzeyinde ise SSEA-1 taşıdığı gözlemlenmiştir. Daha büyük olan populasyonun (4-7 μ m) ise sitoplazmik Oct-4 ve minimal düzeyde SSEA-1 ekspre ettiği ve büyük olasılıkla dokuya özgü projenitör hücreler olduğunu gözlemlenmiştir. RT-PCR (reverse transcriptase–polymerase chain reaction) ile koyun ve insan OSE’da pluripotent gen transkriptleri olan Oct-4, Oct-4A, NANOG, Sox-2, TERT ve Stat-3 belirteçlerine bakarak, varlığını göstermişlerdir. Kültür yapılan OSE’da 3 hafta sonunda, kök hücre olduğu varsayılan populasyon spontan farklılaşmaya girerek oosit-benzeri yapıları (oocyte-like structure) oluşturmuştur (Parte ve ark. 2011).

Bir başka grup araştırmacı ise kök hücrelerin normalde ficol ile ayrılan kanın mononükleer hücre katmanında bulunmasına rağmen, VSEL kök hücrelerinin en alt katman olan eritrosit katmanında bulunduğunu gösterdi (Bhartiya ve ark. 2012). VSEL kök hücrelerinin diğer kök hücrelerden farklı olarak eritrosit katmanında bulunmalarının nedeni boyutlarının (5-6 μ m) eritrositlere (7-8 μ m) yakın olmasıdır. Ayrıca bu hücrelerin nükleus/sitoplazma oranı normal bir hücreninkinden büyüktür. Kromatin yapısı daha kompakt ve metabolik olarak aktivitesi düşüktür. Bhartiya ve arkadaşları çalışmalarında topladıkları kordon kanlarından VSEL izolasyonu yapmışlardır. Bu çalışma, VSEL kök hücrelerinin eritrosit katmanında bulunduğunu kordon kanı saklanması sırasında atıldıklarının ve bu yüksek rejenerasyonu sahip hücrelerden yararlanılmadığını gösteren ilk çalışmadır (Bhartiya ve ark. 2012).

Ratajczak ve arkadaşları 2013’de yaptıkları çalışmalarda ise VSEL kök hücrelerinin ayrıntılı mikroarray genetik analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu analizler sonucunda VSEL kök hücrelerin de doku spesifik gen gruplarının oluşmasında artış gözlemlenmiştir. Aynı zamanda UV radyasyon cevabında, mRNA işlenmesinde ve mitojenik büyüme faktörlerinin sinyalleşmesinde görevli gen gruplarında baskılanma olduğunu gözlemlenmiştir. RT-PCR yaparak, VSEL kök hücrelerinde GRB2, SHC, MAP2K1 gibi bazı genlerin (bu genler mitojenik büyüme faktörleri sinyal yollarında görevli genler) baskılanmış olduğunu göstermişlerdir. Bu baskının tersine dönüştürülmesi sonucunda VSEL’lerin daha fazla hücre tipine

farklılaştığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda bakıldığında VSEL kök hücrelerinde kontrol edilemeyen proliferasyon ve teratoma oluşumunu engellemek için mitojenik büyüme faktörlerinin sinyal yollarında baskılanmanın bir çözüm olabileceğini savunmaktadırlar (Mierzejewska ve ark. 2013).

Chang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda kordon kanı saklama işlemleri esnasında VSEL kök hücrelerinin atılıp atılmadığını araştırmışlardır. Literatüre göre fikol-gradient yöntemi kullanılarak ayrılan kanda, VSEL kök hücreleri eritrosit katmanında kaldığından ve kriyoprezervasyon sırasında sadece buffy coat kullanıldığından bu az sayıda bulunan değerli hücreler gözardı edilmektedir. Bazı kordon kanı bankaları fikol-gradient yöntemi yerine HESPAN sedimentasyon yöntemini kullanmaktadır. Bu çalışmada da Chang ve arkadaşları HESPAN kullanıldığında VSEL kök hücrelerinin ne olduğunu araştırmışlardır. CD45-/Lin-/SSEA-4+ VSEL hücre grubunun HESPAN sedimentasyon yöntemi ile ayrıldığında, hücre kaybının fikole oranla en az olduğunu göstermişlerdir (Chang ve ark. 2014).

Szade ve arkadaşları farelerde VSEL kök hücrelerini Lin⁻/Sca-1⁺/CD45⁻ fenotip ile ve küçük boyutlarıyla tanımlamaktadır. Yaptıkları çalışmanın amacı Lin⁻/Sca-1⁺/CD45⁻ fenotipine sahip populasyonun heterojenitesini araştırarak hematopoetik kök hücre ve endotelyal projenitör hücreler ile kesişen ortak özelliklerini belirlemektir. Çalışmanın sonucuna göre Lin⁻/Sca-1⁺/CD45⁻ fenotip sahip populasyon 3 farklı alt populasyona ayrılabilir. 1) *c-Kit*⁺/*KDR*⁻ (neredeyse tümü küçük hücre, VSEL kriterini sağlıyor) 2) *c-Kit*⁺/*KDR*⁺ (daha büyük hücreler) 3) *c-Kit*⁺/*KDR*⁻ (Annexin V+ apoptotik hücreler, ileri araştırma gerekli). Aynı zamanda yapılan qRT-PCR sonuçları Oct-4A ve Oct-4B mRNA ekspresyonunun ne kemik iliğinde ne de Lin⁻/Sca-1⁺/CD45⁺ fraksiyonunda rastlanmadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, Lin⁻/Sca-1⁺/CD45⁻ hücreler pluripotent belirteci olan OCT-4A ekspresyonuna sahip olmayan heterojen hücre topluluğundan oluşur (Szada ve ark. 2013).

Danova-Alt ve arkadaşları insan kordon kanında VSEL kök hücrelerinin bulunup bulunmadığını, hangi belirteçlere sahip olduğunu araştırmışlardır. Fikol gradient yöntemi ve eritrosit lizis yöntemi ile izole ettikleri hücrelere FACS analizi

yapmış ve Lin-CD45-CXCR4+ olan hücre serilerinde çeşitli pluripotent belirteçlere bakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, bu hücrelerin hiç birisi pluripotent spesifik belirteç göstermezken, pluripotent olduklarını kanıtlayacak ayrıma da sahip değillerdir. Bu çalışma incelendiğinde, pluripotent özellikte olmadıklarını söyledikleri VSEL kök hücrelerini tanımlarken başka literatürlerden farklılıklar görülmektedir. Örneğin, VSEL kök hücreleri olarak tanımlanan hücrelerin CD133+ olması gerekirken bu çalışmada incelenmemiştir. Başka önemli bir fark ise VSEL kök hücre izolasyonu ve tanımlanmasının önemli basamaklarında biri olan boyuta göre izolasyon da burada görülmemektedir (Danova-alt ve ark. 2012).

VSEL kök hücrelerinin varlığını gösteren yaklaşık 150 (bugüne kadar) yayına karşılık, varlığını tartışan birkaç literatür de bulunmaktadır. Weissman ve arkadaşları fare kemik iliği ile yaptıkları çalışmalarda VSEL'leri gösteremediklerini ileri sürmektedirler. Farelerin kemik iliğinden yaptıkları çalışmalarda yüzey antijenleri olan CD45, Lin ve SCA-1 ekspresyonunu akış sitometri ile araştırmışlardır. Aynı zamanda RT-PCR ile Oct4 ekspresyonuna bakmışlardır. Sonuçta, elde edilen verilerin VSEL kök hücrelerinin pluripotent özellikte olduğunu doğrulamadığını söylemektedirler (Weissman ve ark. 2013).

Son iki literatürdeki farklı sonuçlar, Oct4 ekspresyonunun farelerdeki varlığı veya bu proteini tespit eden antikorun özgünlüğü ile ilgili olabilir çünkü literatürün çoğunluğunda embriyonik belirteçlerin varlığı gösterilmiştir. Kendini yenileme ve in vitro ekspansiyon konusunda henüz çok az bilgi bulunmasına rağmen farelerde in vivo proliferasyonu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar bu nadir primitive kök hücre grubunun saflaştırma ve tanımlama konusunda daha çok ayrıntılı araştırmaya gerek olduğunu göstermektedir. Özellikle insan materyalinde çok az sayıda yapılan çalışma vardır. Geliştirilen metodlar sonucunda, saflaştırılacak bu hücreler transplantasyon ve rejenerasyon alanında çığır açacaktır.

2.7.VSEL Belirteçleri

VSEL kök hücrelerini ayırt edebilmek için birden çok belirteç kullanılmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalara göre insan VSEL kök hücreleri için belirlenen

hücre yüzey belirteçleri şöyledir; Lin-/CD45-/CD133+/CXCR4+. Transkripsiyon faktörleri ise insanda; NANOG, Oct3/4, SSEA-4, Sox2, LIF-R, farede ise; SSEA-1, Rex1, Dppa3, Rif1 ve Sca-1 gösterilmiştir (Zuba-Surma ve ark. 2009).

Tablo 2.3 Kök hücre çeşitlerine göre taşınan belirteçler – Zuba-Surma (2009)'dan

Kök Hücre	Fenotip
Mezenkimal Kök Hücreler	CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14-, CD11b-, CD79a-, CD19-, HLA-DR-
Multipotent Yetişkin Projenitör Hücreler	SSEA-1+, CD13+, Fik-1 ^{LOW} , CD34-, CD44-, CD45-, CD117(c-kit)-, MHC I-, MHC II-
MULTipotent Yetişkin Kök Hücreler	CD13+, CD49b+, CD90+, CD73+, CD44+, CD29+, MHC I+, HLA-DR-, CD14-, CD34-, CD45-, CD38-, CD133-, c-kit-
VSEL	CXCR4+, AC133+, CD34+, SSEA-1+(Fare), SSEA-4+(İnsan), AP+, c-Met+, LIF-R+, CD45+, Lin-, HLA-DR-, MHC I-, CD90-, CD29-, CD105-

VSEL hücrelerinin pluripotent özellikleri farelerde gösterilmiş olmasına rağmen hala insan için kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır (Heider ve ark 2012). Bu son derece nadir ve yüksek pluripotent özellikteki hücrelerin insanda miktarını, fonksiyonunu, nasıl lokalize olduklarını ve transplantasyon için kullanım imkanını araştırmak son derece önemlidir. VSEL kök hücrelerinin pluripotent oldukları ve 3 germ tabakasını verebildikleri biliniyor. Bu nedenle transplantasyonda kullanılmaları engraftman sürelerini azaltacağı için son derece önemlidir. Ayrıca otolog rezervi (kordon kanı ve aferez materyali) kullanma sözkonusu olduğu için etik sorun bulunmamaktadır. Kendini yenileme kapasiteleri hakkında kapsamlı bir veri yada çalışma henüz olmasa da pluripotent hatta unipotent olmaları bile kordon kanı transplantasyonunda daha çok hücre kullanma şansı sağladığı için daha kısa sürede engraftman sağlayacaktır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen örnekler İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 20.06.2013 tarih'li 724 no'lu izni ile kullanılmıştır.

Tüm hücre izolasyon ve tanımlama yöntemleri ayrıntılı olarak Şekil 3.1' de gösterilmiştir.

3.1.Gönüllü Bireyler

Çalışmamıza katılan bireylere gönüllü onam formları imzalatılmıştır. 8 tane periferik kan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezinden, 7 tane aferez ürünü İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Aferez Ünitesinden, 9 kordon kanı ise Zeynep Kamil Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinden alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriteri;

- Sağlıklı 18 yaş ve üstü donörler

Çalışmaya dahil edilmeme kriteri;

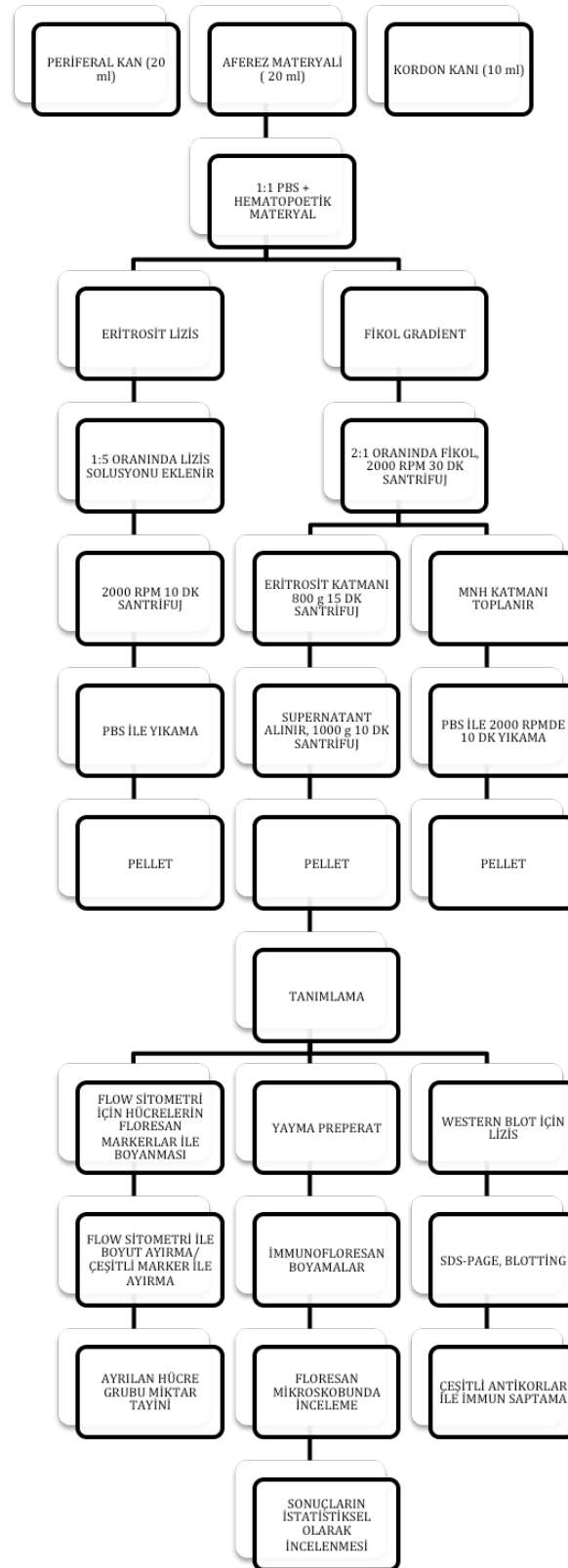
Periferik kan ve G-CSF ile uyarılmış mobilize kan için,

- Kronik bir hastalığı olan
- Son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmiş
- Sigara kullanan donörler

Kordon kanı için,

- Kronik bir hastalığı olan, sigara kullanan annelerin çocukları
- Prematüre bebekler
- Konjenital hastalıklara sahip bebekler olarak saptanmıştır.

İzolasyon ve karakterizasyon yöntemleri canlı hücrelerde çalışmayı gerektirdiği için alınan kanlar bekletilmeden aynı gün içinde çalışılmıştır.



Şekil 3.1 Hücre izolasyon ve tanımlama yöntemleri

3.2.Kan Materyallerinin Alınması

3 farklı materyalden hücre izolasyonu yapıldı. Periferik kan, aferez ürünü ve kordon kanı.

3.2.1.Periferik Kanların Toplanması

Periferik kanlar, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezinden alındı. Donörlerden taze olarak alınan periferik kanlardan “buffy coat” olarak tanımlanan kısımlar toplandı. Buffy coat kısmı mononükleer hücrelerin yoğun olarak bulunduğu katmana verilen isimdir. Bir donörden tam kan alındıktan sonra trombosit ve eritrositler ayrılır, arada kalan katmanda mononükleer hücrelerin yoğunlukla bulunduğu buffy coat katmanıdır. Buffy coat tranfüzyon işlemi için uygun olmadığından atılan katman olmaktadır. Tam kandan ayrılan trombositler ve eritrositler ise transfüzyon işlemi için kullanılmaktadır.

Çalışmamızda kan merkezinden 8 tane sağlıklı bireyin buffy coatları toplandı. Hepatit B, Hepatit C ve HIV negatif olan kanlar seçildi.

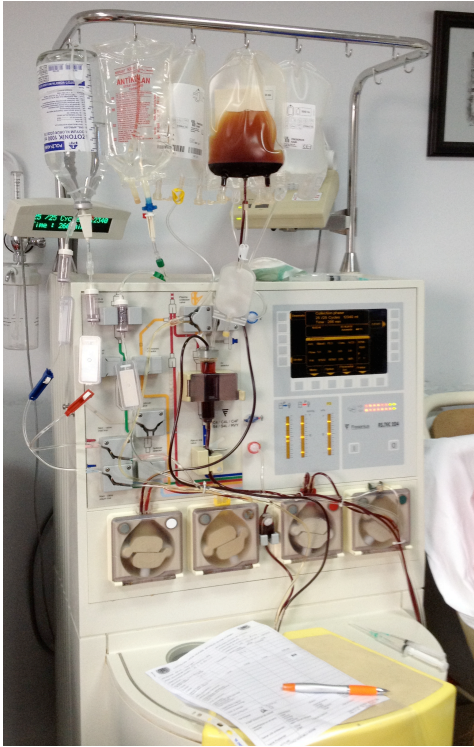


Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan periferik kanlar

3.2.2. Aferez Ürünün Toplanması

Aferez, hastaya/donöre granülosit-koloni stimüle edici faktör (G-CSF) verilerek hematopoetik dokulardaki hücrelerin periferik kana mobilizasyonu ile istenen hücre grubunu ayırarak toplamayı sağlayan yöntemdir (Gordon ve ark. 2006).

Bu çalışmada allojenik lökoferez işlemi uygulanan 7 hastadan materyal toplandı. Çalışmada kullanılan materyal, aferez setinin bir parçası olan ve transplant materyali hastaya verildikten sonra bir miktar hücrenin kaldığı çanak kısmından sağlanmıştır. Bu çanak kısmı normalde aferez setiyle birlikte atılmaktadır. Hastada kullanılan aferez ürününe dokunulmadan, bu atılan kısımdaki kan toplanmıştır. Aradığımız hücre grubunun eritrosit katmanında olduğu düşünüldüğünden eritrositlerin bulunduğu çanakdan elde edilen materyal çalışma için uygun olmaktadır. Böylelikle hastalar içinde materyal kaybı söz konusu olmamaktadır.



Şekil 3.3: Aferez ünitesi

3.2.3.Kordon Kanlarının Toplanması

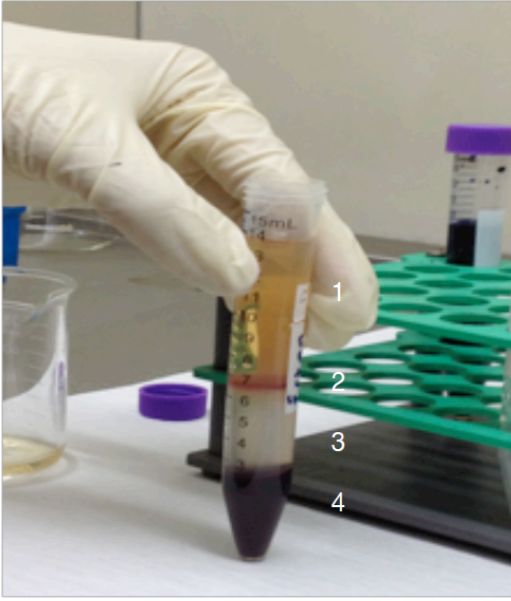
Kordon kanı, bebek doğar doğmaz göbek bağı kesildikten sonra göbek bağının plasenta tarafında kalan bölümünden alındı. Bu kan, toplanmadığı tüm durumlarda plasenta ile birlikte atıldığından, toplanması normal doğum prosedürünü ve bebeği herhangi bir şekilde etkilemez. Toplama işlemi doğum esnasında doğumu yaptıran hekim tarafından yapıldı. Bilindiği gibi bebek doğduktan hemen sonra göbek kordonu iki taraflı klemlenerek kan akımı durdurulur ve kordon kesilerek bebek ve plasenta anneden ayrılır. Bu ayrılmadan hemen sonra plasentaya bağlı olan kordonun içindeki kan, özel bir sistem yardımıyla pıhtılaşmayı önleyici heparin içeren tüplerin içine toplanır. İşlem hem normal hem de sezeryan doğumlarda uygulanabilir. Toplanan kan 24 saat içinde çalışmanın yapılacağı İstanbul Üniversitesi Fizyoloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı. 9 sağlıklı gönüllü donörden doğum sonrası kullanılmayan kordon kanları hücre izolasyonu yapılmak üzere toplandı.

3.3.Hücre İzolasyonları

Alınan tüm materyallere aynı izolasyon işlemleri uygulandı. İki farklı izolasyon yöntemi ile hücreler ayrıştırıldı.

3.3.1.Fikol ile Hücre İzolasyonu

Fikol-gradient santrifüj yöntemi sıklıkla kullanılan ve kan hücrelerini çeşitli katmanlara ayırmaya yarayan bir yöntemdir (Loos ve ark. 1976). Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra santrifüj edilir ve 4 katman halinde hücreler ayrılmış olur. İlk baştaki katmanda (1. katman) trombositler, sonraki katmanda (2. katman) ince bir çizgi halinde mononükleer hücreler (MNH), ardından 3.katmandaki fikolda bulunan nötrofiller ve en son olarak yoğunluklarından dolayı en altta bulunan eritrositler (4. Katman) olarak sıralanır.

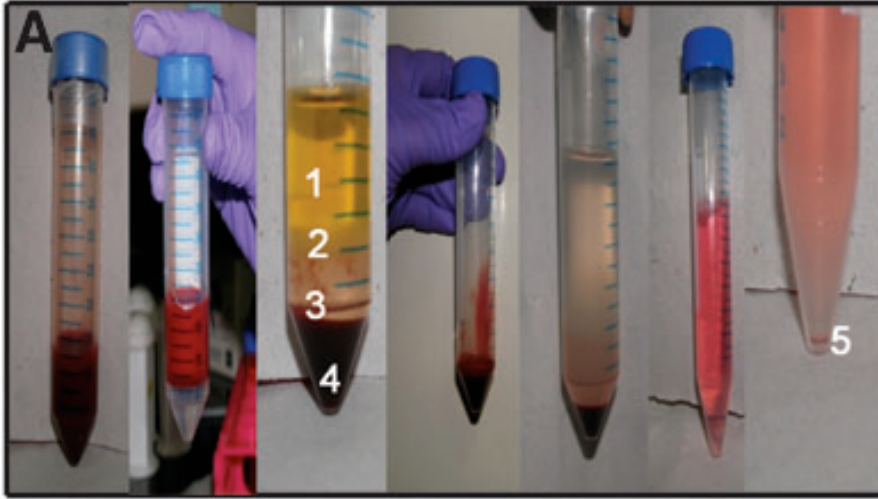


Şekil 3.4: Fikol ile ayrılmış hüce katmanları

Bu izolasyon yönteminde, mononükleer hücreler fikol ile ayrılarak, hem MNH katmanında hemde eritrosit katmanında VSEL saflaştırıldı. Alınan materyal 1:1 oranında PBS (phosphate-buffered saline) ile dilüe edildi. Sonrasında solüsyon 1:2 oranında Ficoll-Hypaque (BioWest Lymphosep 1.077 g/mL) solüsyonu üzerine eklenerek 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 4 katmanın 2.si (MNH) ve 4.sü (eritrosit) çalışmada kullanıldığı için bunlar dikkatli bir biçimde ayrı tüplere aktarıldı. 2. Katman 1:3 oranında RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) eklenerek dilüe edildikten sonra 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek kalan pellet RPMI ile yeniden süspansiyon edildi.

Daha sonra eritrositlerin bol miktarda bulunduğu 4.katman aynı şekilde dilüe edilerek daha yüksek bir hızda (2690 rpm 15 dk) santrifüj edildi. Bunun nedeni, VSEL kök hücrelerinin boyut olarak eritrositlere yakın olmasıdır. Ortalama eritrosit boyutu ~7-8 µm iken VSEL kök hücrelerinin boyutu yaklaşık 5-6 µm'dir. Böylece eritrositlerin dibeye çökmesi sağlanarak süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Yeni tüpe alınan süpernatant 3000 rpm 10 dk santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atıldıktan sonra dipteki pellet RPMI ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyon VSEL hücrelerinin bulunduğu bilinen katmandır (5. katman) (Bhartiya ve ark. 2012). Elde edilen her

katmandan yayma preperat hazırlandı. Kullanılmayan pelletler protein izolasyonu için -20'de saklandı.



Şekil 3.5: Eritrosit katmanına uygulanan işlemler - Bhartiya ve ark. (2012)'den

3.3.2.Eritrosit Lizisi ile İzolasyon

VSEL izolasyonu için kullanılan diğer bir yöntem ise eritrosit lizisidir. Fikol yöntemi ile çok fazla hücre kaybı oluşurken bu yöntemde hücre kaybının daha az olduğu düşünülmektedir (Chang ve ark. 2014). Bu nedenle çalışmada 2 yöntem birlikte kullanıldı. Tüm materyal eritrositleri parçalayan (amonyum klorür) tamponlu çözelti ile 1:5 oranında karıştırılarak 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 2000 rpm'de 10'dk santrifüj edilerek üst katman toplandı. Eritrositler tamamen uzaklaşmaya kadar bu işlem tekrarlandı. Genellikle 2 kere tekrarlamak yeterli oldu. Lizisi daha fazla tekrarlamak hücre kaybına ve hücre agregasyonuna neden olmaktadır. Daha sonra PBS ile 2000 rpmde 10 dk yıkama yapılarak, süpernatant atıldı ve dibteki pellet RPMI ile süspansiyon edildi. Yayma preperat yapıldıktan sonra kullanılmayan pellet -20'de saklandı.

3.4.Akış Sitometri Ölçümleri

Akış sitometri ölçümleri hücre canlılığı gerektirdiğinden dolayı alınan örnekler izole edildikten sonra aynı gün içerisinde akış sitometri ölçümleri yapılmıştır.

Floresan ışımaların birbirine karışmaması için 4 ayrı tüpte, 4 farklı antikora bakıldı. Kullanılan antikolar Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

- 1.Tüpte > SSEA-4-TR, CD45-PE
- 2.Tüpte > NANOG-FITC, CD45-PE
- 3.Tüpte > CXCR-4-FITC, CD45-PE
- 4.Tüpte > OCT3/4-FITC, CD45-PE

Tablo 3.1: Antikor listesi

Antikor Adı	Marka	Katalog Numarası
SSEA-4	Santa Cruz Biotechnology	sc-21704
PE anti-human CD45	BioLegend	304008
NANOG	Santa Cruz Biotechnology	sc-30332
CXCR-4	Santa Cruz Biotechnology	sc-6190
OCT 3/4	Santa Cruz Biotechnology	sc-8628
Goat anti-mouse IgG-TR*	Santa Cruz Biotechnology	sc-2781
Donkey anti-goat IgG-FITC*	Santa Cruz Biotechnology	sc-2024

*Sekonder antikor

Akış sitometrik ölçümler sadece eritrosit lizisi yapılmış hücre grubuna uygulandı (Antikor kıstlılığı ve öteki katmanlardaki hücre azlığı nedeniyle). Lizis yapılmış hücreler 1×10^6 /ml hücre olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Her bir akış tüpüne 100 µl hücre süspansiyonu konuldu. Tüpte 1 µg olacak şekilde primer antikolar eklenerek, 30 dakika karanlıkta bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplere 500 µl PBS eklenip, 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki supernatant atılarak 100’er µl PBS eklenip, pipetaj yapıldı. Primer antikolar ile uyumlu olan sekonder antikolar her tüpte 0,5 – 1 µg arasında olacak şekilde eklendi ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra bir

kere daha PBS ile yıkama yapıldı. Supernatant atıldı. Her tübe yaklaşık 500 µl akış solüsyonu konarak ölçüm yapıldı.

VSEL hücrelerinde literatüre göre CD45 belirteçinin negatif olduğunu, CD34'ün ise pozitif olduğu gösterilmiştir (Sovalat ve ark. 2011). Bu bilgi doğrultusunda; 1. tüpte CD45-/CD34+/SSEA-4+ hücreleri, 2. tüpte CD45-/NANOG+, 3. tüpte CD45-/CXCR-4+ ve 4. tüpte CD45-/OCT-3/4+ olan hücreler kapılanarak incelendi. Gene literatüre göre; VSEL hücrelerinin mononükleer hücrelere göre daha küçük olduğu için debris kısmında da bulunabileceği belirtildiğinden dolayı, debrisden de kapı alınarak aynı ölçümler gerçekleştirildi.

3.5.İmmünfloresan Boyama

Tüm izolasyon işlemlerinden sonra hazırlanan yayma preparatlar %96'lık etanolde 10 dakika bekletildikten sonra kurumaya bırakılarak fikse edildi. Ardından PBS ile 3 kere yıkama yapıldı. Hücre permeabilizasyonu için, %0,1'lik triton X-100 2 ml PBS içinde hazırlanarak 15 dakika buzda inkübe edildi. Permeabilizasyon işlemi, aranan antikörün sitoplazmada yada nükleusta olması durumunda antikörün hücre içine rahat geçmesini ve bağlanma afinitesinin artmasını sağlar. İnkübasyon bitiminde 3 kere PBS ile yıkanarak her yıkamada 3'er dakika beklendi. Ardından nonspesifik bağlanmaları önlemek için bloking tamponunda buzda 1 saat inkübasyona bırakıldı. 10 ml'lik bloking tamponu; 10 ml PBS, %2'lik BSA (bovine serum albumin) ve %0,3'lük triton X-100 ile hazırlandı. 1 saatlik inkübasyonun ardından 3'er kez, 3 dakikalık PBS ile yıkama yapıldı. Primer antikör 1:1000 oranında bloking solüsyonunda dilue edilerek hazırlandı. +4 °C 'de tüm gece inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda ertesi gün PBS ile 5 kere, 5'er dakikalık yıkamalar yapılır. 1:1000 oranında dilue edilen sekonder antikör ile 1 saat karanlıkta bekletilir. Daha sonra, tekrar PBS ile 5 kere 5'er dakikalık yıkamalar yapıldı. Son olarak çekirdek sitoplazma ayrımının yapılabilmesi ve hücrelerin rahat seçilebilmesi için DNA bazlarına bağlanan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile boyama yapıldı (Santa Cruz Biotechnology sc-3598). 1µl stok DAPI 5 ml PBS de dilue edildi ve her örneğin üzerini kapatacak şekilde (yaklaşık 300 µl) konarak 15

dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sona erdiğinde 3 kere PBS ile yıkama yapıldı. Üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskopunda bakıldı.

Floresan mikroskobu için kullanılan antikorlar, akış sitometride kullanılanlar ile aynı antikorlardır. Liste Tablo 3.1 de gösterilmektedir. Floresan mikroskopunda hangi örneklerin hangi boyalar ve antikorlar ile boyandıkları Tablo 3.2 de gösterilmektedir.

Tablo 3.2: İmmünfloresan preparatlar ve antikorlar

Kaynak Adı	Hücre Grubu	Antikorlar		
		1.Preperat	2.Preperat	3.Preperat
Periferik Kan, Kordon Kanı, Aferez Materyali	MNH Katman Preperatı	SSEA-4-TR CXCR4- FITC DAPI	NANOG- FITC DAPI	OCT4- FITC DAPI
	5. Katman Preperatı	SSEA-4-TR CXCR4- FITC DAPI	NANOG- FITC DAPI	OCT4- FITC DAPI
	Lizis Preperatı	SSEA-4-TR CXCR4- FITC DAPI	NANOG- FITC DAPI	OCT4- FITC DAPI

3.6. Western Blot Yöntemi ile Protein Tayini

Çalışmamızda -20'de saklanan izole edilmiş pellet halindeki tüm materyallere western blot yöntemi ile protein tayini yapılmıştır. Western blot yöntemi ile çalışılan proteinler ise NANOG ve OCT4'dür. Kontrol olarak β -actin kullanıldı.

Western blot temel olarak 4 aşamadan oluşur. Birinci aşama proteinlerin çözümlenmiş halde hücre dışına çıkartılmasıdır. İkincisi proteinlerin bir jel üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması, üçüncüsü ise ayrıştırılan proteinlerin bir membran üzerine transferidir. Son adımda ise özel antikorlar ile muamele edilerek membran üzerinde görüntülenmesidir.

3.6.1.Örneklerin Hazırlanması

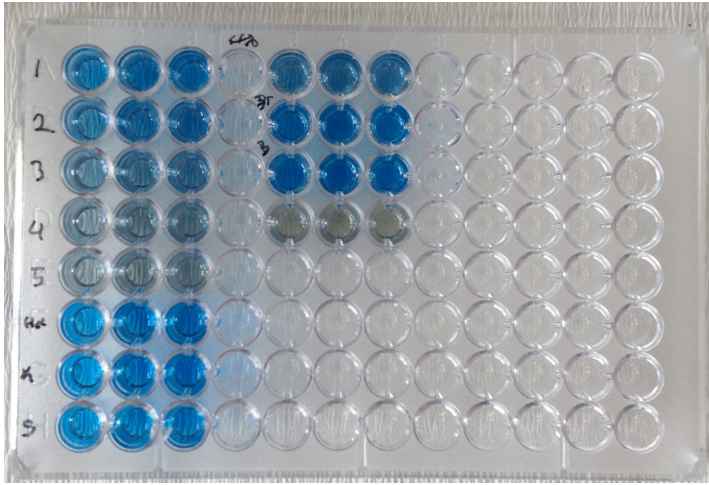
PBS ile sulanmış pellet halindeki örnekler -20'de saklanmaktadır. Örnekler -20'den çıkarılıp buz üstünde çözünmesi sağlandı. 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak supernatant atıldı. Pelletteki hücrelerin parçalanarak proteinlerin açığa çıkması istenildiğinden hücre lizisi yapıldı. Hücre Lizis Tamponu (Cell Lysis Buffer) hazırlandı.

Hücre Lizis Tamponu (1L stok); 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, %0,5 Triton X-100 hazırlanır ve 1L distile suya tamamlanır.

PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) proteaz inhibitörü stok; 1µl etanolde 17,4mg 10ml stok hücre lizis tamponunu içine, PMSF stokdan 10 µl eklendi, vortekslendi. Hücre pelletlerinin üzerine 100 µl lizis tamponu eklenerek vortekslendi. 30-60 dk buzda inkübe edildi. Arada tekrar vorteks işlemi uygulandı. 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. İstenilen protein supernatantta kaldığı için supernatantlar yeni ependorflara toplandı.

3.6.2.Protein Tayini (Bradford Testi)

Elektroforez yaparken jelle eşit miktarda protein yüklenmesi gereklidir. Yüklenen örneklerin aynı hızda ve aynı hizada olması için önemlidir. Bu nedenle elimizdeki protein miktarını bilmek ve eşit bir şekilde yükleme yapabilmek için protein miktar tayini yapılmaktadır. Çalışmada protein tayini için Bradford assay kullanıldı. Bu yöntemin seçmesinin nedeni ise kullanışlı, daha ucuz ve daha kolay yapılmasıdır. Standart olarak BSA kullanıldı. BSA stok; 1,46mg/ml distile suda hazırlandı. Stok BSA, 5 tane standart elde edecek şekilde seri dilasyon yapıldı. Standartlar Tablo 3.3 de gösterilmektedir.



Şekil 3.6: Bradford test standartları ve örnekler

Tablo 3.3: BSA Standartlar

Standart	BSA mg/ml	Alınan BSA miktarı	Alınan distile su Miktarı
1	7,3 mg/ml	50 ul BSA stok	50 ul
2	3,6 mg/ml	50 ul Standart BSA 1	50 ul
3	1,8 mg/ml	50 ul Standart BSA 2	50 ul
4	0,9 mg/ml	50 ul Standart BSA 3	50 ul
5	0,4 mg/ml	50 ul Standart BSA 4	50 ul

Hücre lizis tamponu ile lizis yapılmış örnekler kullanıldı. Hücre lizis tamponunun içerisinde deterjan bulunması nedeniyle Bradford testinin hassasiyetinin bozulmasını önlemek için örnekler 1:5 oranında distile su ile sulandırıldı. Bradford belirteci hazırlandı. Stok +4 °C'de saklanır. Kullanılacağı zaman whatman no:1 filtre kağıdından geçirilerek kullanılır.

Bradford belirteci (stok);

- 25mg Coomassie Brilliant Blue G-250
- 12,5 ml %95'lik Etanol ile çözülür
- 25 ml %85'lik H₃PO₄ (fosforik asit) eklenir
- 250 ml'ye distile su ile tamamlanır

96'lık mikrotelere 10 µl örnek 200 µl Bradford belirteci 3 tekrarlı şekilde eklendi. Bir sıraya kör örnek (distile su kullanılır), 5 tane standart ve kullanılacak kadar örnek telere yüklendi. 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Işıktan korundu.

Spektrofotometrede 560-590 nm arasında okundu. Standartların ölçülen absorbansları kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Elimizdeki örneklerin absorbansları bu grafikte yerine konularak protein miktarları saptandı.

Çalışmada genellikle 50-60 µg protein jele yüklemek tercih edildi. Hesaplamalar buna göre yapılarak örnekler distile su ile sulandırıldı.

3.6.3.SDS-PAGE Jel Dökümü

Örnekler hazırlandıktan sonra elektroforez kısmına geçildi. Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) kullanıldı. Elektrik akımı etkisi ile proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan ortam, akrilamid ve N-N'-metilen bis-akrilamid monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matriksidir. SDS-PAGE jellerde, Sodyum dodesil sülfat (SDS), proteinlerin hidrofobik bölgelerini bağlayarak denatüre eder. Aynı zamanda SDS denatüre proteinleri yüksek miktarda negatif yükle yükler. Bu yük normalde proteinler üzerinde bulunan yükleri maskeler ve proteinler jel üzerinde yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Proteinlerin alt üniteleri disülfat bağları ile bir arada tutuluyorsa, bu bağlar elektroforezden önce SDS, beta-merkaptotanol ve ısı aracılığı ile kırılmalıdır.

SDS-PAGE jel elektroforezi için öncelikle jel döküldü. Poliakrilamid jel matriksi farklı büyüklükte kanallar (porlar) içerdiğinden denatüre protein karışımı ile yüklenip elektroforez uygulandığında proteinlerin bu kanallardan geçiş hızları tamamen büyüklüklerine bağlıdır. Küçük proteinler daha hızlı büyük proteinler daha yavaş ilerler. Bu nedenle jeldeki akrilamid konsantrasyonunu ayırmak istediğimiz polipeptidin molekül ağırlığına uygun olarak seçilmelidir. Tablo 3.4 'de akrilamid % konsantrasyonları ve uygun molekül ağırlıkları verilmiştir.

Tablo 3.4: Akrilamid yüzdesine uygun polipeptid ağırlıkları

Akrilamid Konsantrasyonu (%)	Polipeptid Molekül Ağırlığı (kD)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5	57-212

Çalışmada bakılan proteinlerin molekül ağırlıkları 40-45 kD arasında olduğundan dolayı %12'lik akrilamid içeren ayırma jeli kullanılmıştır. SDS-PAGE'de gradien jel kullanıldığından üst kısma %5'lik yükleme jeli dökülmüştür.

Jelin döküleceği camlar öncelikle %70 lik metanol ile sonra da distile su ile temizlendi. Camlar üstüste yerleştirilir aralarına 1mm boşluk bırakması sağlanan spacer adı verilen çubuklar konuldu. Camlar jel dökme kasetine yerleştirildi. Öncelikle %12'lik ayırıcı jel hazırlandı.

%12'lik Ayırma Jeli;

- 3,22 ml Akrilamid/Bisakrilamid %30'luk
- 2 ml 1,5M Tris pH 8,8
- 2,72 ml distile su
- 0,072 ml %10'luk SDS
- 60 ul %10'luk APS (amonyum persülfat)
- 30 ul TEMED (tetrametiletildiamin)

Tüm malzemeler hazırlandı. Polimerizasyonun başlamasını sağladıkları için APS ve TEMED en son eklenir. Camlar arasına tek bir noktadan mikropipet yardımı ile döküldü. En üst kısımda yaklaşık 2 cm'lik boşluk kalacak şekilde döküldü. Polimerizasyon başlamadan jelin hava ile temasını engellemek için, jelin üstüne 1 ml izopropanol eklendi. Polimerize olması için yaklaşık 20 dakika beklendi. Jel polimerize olduktan sonra üstteki isopropanol dökülüp distile su ile temizlendi ve %5'lik yürütücü jel hazırlandı.

%5'lik Yürütücü Jel;

- 0,42 ml Akrilamid/Bisakrilamid %30'luk
- 0,625 ml 1M Tris pH 6,8
- 1,46 ml distile su

- 0,025ml %10'luk SDS
- 20 µl %10'luk APS
- 10 µl TEMED

Hazırlanan jel ayırıcı jelin üzerine tek taraftan mikropipet yardımı ile döküldü. Taraklar takıldı. 30 dakika polimerizasyon için beklendi. Aynı gün kullanılmayacak ise tarak kısmı parafilm ile kapatılarak +4°C'de saklandı. Hemen kullanılacak ise taraklar çıkarılıp elektroforez sistemine takıldı.

3.6.4.Elektroforez

Protein miktarı istenilen oranda ayarlanmış örnekler jele yüklemek için hazırlandı. 2x Laemmlı Örnek Tamponu (Laemli Sample Buffer) ile örnekler 1:1 oranında karıştırıldı (15µl örnek + 15µl örnek tamponu). Laemmlı örnek tamponu içine β-merkaptoetanol %5 oranında eklendi. Aynı zamanda örnek tamponu içerisinde bromofenol blue bulundurmaktadır. Bu örneklerin mavi renkle boyanarak jelde takip edebilmesini sağlamaktadır. Protein denatürasyonu için 80°C'de 15 dakika inkübe edildi. Ardından hemen buza alındı.

Örnekler yüklemeye hazır hale geldikten sonra elektroforez tankı hazırlandı. Jel tanktaki kasete takıldı. Tarak çıkartıldı. Jel kaseti ve tank yürütme tamponu ile işaretli yere kadar dolduruldu.

Yürütme Tamponu;

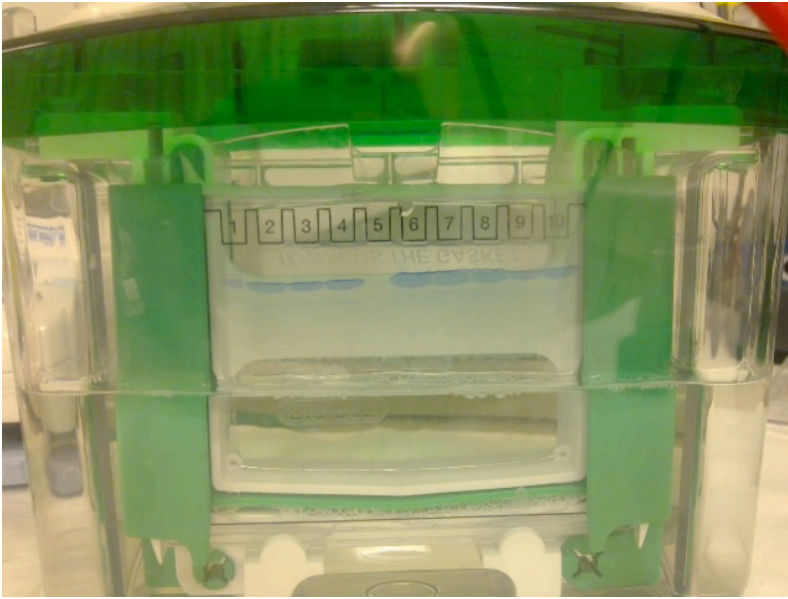
- 100 ml 10x Tris/SDS/Glisin Tamponu
- 900 ml distile su

İlk kuyucuğa belirteç sonrakilere örnekler olmak üzere 20 µl yükleme yapıldı. Tank güç kaynağına bağlandı. 130 V'da 45 dakika yürütüldü. Örnekler jelin sonuna geldiğinde yürütme durduruldu. Jel kaseti tanktan çıkartıldı. Spatul yardımı ile jel kasetten ayrıldı. Ayırma jeli kesilip atıldı. Jelin altına jelin tarafını belirlemek için küçük bir kesik yapıldı. Jel transfer tamponuna çıkartıldı. Yürütme sırasında

esneyen ve porları genişleyen jelin düzelmesi için 10 dakika transfer tamponunda bırakıldı.

Transfer Tamponu (Towbin Buffer);

- 100ml 10xTris/SDS/Glisin Buffer
- 200 ml Metanol
- 700 ml distile su



Şekil 3.7: Örnekler yüklenmiş yürüyen jel görüntüsü

3.6.5. Blotlama

Blotlama, yürütülen jeldeki proteinlerin, protein absorbe edebilen bir membran üzerine, yine elektrik akımı uygulanan bir ortamda aktarımıdır. Proteinlerin jelden, membrana transfer edilmesindeki amaç, çalışılan proteinlerin tanımlanmasında kullanılacak problemlerin proteinlerle daha kolay etkileşmesini ve bağlanmasını sağlamaktır. Proteinler jelde gömülü iken bu etkileşim söz konusu değildir. Transfer işlemi için genellikle nitroselüloz yada PVDF (Poliviniliden Florid) membranlar kullanılır. Çalışmada PVDF membran kullanıldı, PVDF membran daha dayanıklı olması ve protein afinitesinin daha yüksek olması nedeniyle tercih edildi.

Yürütülen jel transfer tamponuna çıkarıldı. Aynı zamanda PVDF membran jel boyutunda kesilerek %100 saf metanolde 10 saniye tutarak aktive edildi.

Blotlama kasetine konulacak 2 gri pad ve 2 filtre kağıdı transfer tamponunda ıslatıldı. Kasetin altına bir ped, bir filter kağıdı konur bunların üzerine jel jelin üstüne membran konuldu. Tekrar bir filter kağıdı konuldu ve roller ile hava kabarcığı kalmaması için üzerinden geçildi. Son olarak bir ped daha üste koyarak membran jel sandöviçi tamamlanmış olur kapatılarak kaset tanka yerleştirildi. Tank işaretli yere kadar transfer tamponu ile doldurulur. Güç kaynağı ayarlanır. Blotlama yaparken Volt'u sabit tutmak daha verimli bir blotlama sağlarken, ısının çok yükselmesine sebep olur. Amperi sabit tutmak ise ısıyı daha az arttırırken daha yavaş bir blotlama sağlar. Çalışmada ısının fazla artmasının blotlama verimini çok düşürdüğü için amperi sabitlemek tercih edildi. 350 mA'de 60 dakika blotlama yapıldı. Süre tamamlandıktan sonra güç kapatıldı, kaset çıkarıldı ve membran yeni bir kaba alındı.

3.6.6.Membranda İlgili Proteinin İşaretlenmesi

Proteinler membrana transfer edildikten sonra istenen proteinin açığa çıkarılması ve miktarının belirlenmesi gerekir. Bunun için aradığımız proteinin antikoruna özel ikincil antikorbağlanması sağlanır ve bu bağlanmayı açığa çıkaracak bir görüntüleme yöntemi kullanılır. Kromogenik yada kemilüminesans görüntüleme en çok kullanılanlardandır.

Transfer yapılmış membrana ilk önce bloking yapıldı. Süt tozu yada BSA ile bloking yapılarak, primer antikor ile inkübasyondan önce protein immobilize edilmiş membranların, proteinsiz kısımlarının spesifik olmayan bir proteinle bloke edilerek, kendisinde bir protein olan primer antikorun membran non-spesifik olarak tutunması engellenmiş olur. TBST'de %5'lik süt tozu bloking solüsyonu olarak kullanıldı.

TBST (Tris-Buffered Saline, Tween 20 ile);

- 100 ml 10X TBS
- 900 ml distile su
- 1ml Tween-20

%5'lik süt tozuyla bloking solüsyonu;

- 100 ml TBST
- 5g yağsız süt tozu

Bloking solüsyonunda, membran 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bloking bitince yıkama solüsyonu olan TBST'de 3 kere 5'er dakikalık çalkalayıcıda yıkama yapıldı.

Primer antikor bloking solüsyonunda istenen oranda sulandırılarak hazırlandı. Primer antikor gece boyu +4°C'de çalkalayıcıda bırakıldı. +4°C'de bırakılmasının nedeni oda sıcaklığında primer antikorun kontamine olarak non-spesifik bantlar oluşturmasını önlemektir. Primer antikorla inkübasyon süresini arttırmak daha verimli bir bağlanma sağlamaktadır. Kullanılan antikorların dilusyonları Tablo 3.5'de gösterilmektedir. Inkübasyon bitince 3'er kez 5'er dakikalık TBST ile yıkama yapıldı.

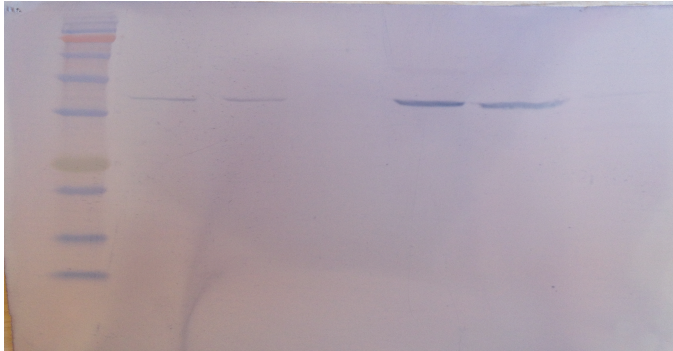
Sekonder antikor alkalın fosfataz (AP) konjuge olarak seçildi. Görüntüleme yöntemi olarak kromogenik görüntüleme yapılacağından sekonder antikor bu görüntüleme yöntemine uygun olarak seçildi. Sekonder antikorda istenilen oranda %5'lik süt tozu solüsyonunda dilue edildi. 1 saat çalkalayıcıda, oda sıcaklığında inkübe edildi.

Tablo 3.5: Antikor dilusyonları

Antikor İsmi	Dilusyon oranı	Diluent
NANOG (sc-30332)	1:1000	%5'lik süt tozu içeren bloking solüsyonu
OCT-4 (sc-6190)	1:1000	%5'lik süt tozu içeren bloking solüsyonu
β -actin (sc-1616)	1:1000	%5'lik süt tozu içeren bloking solüsyonu
Donkey anti-goat IgG-AP	1:10000	%5'lik süt tozu içeren bloking solüsyonu

3.6.7.Görüntüleme

Sekonder antikor AP ile konjuge olarak seçildiğinden AP substratı olan Novex AP Chromogenic Substrat ile görüntüleme yapıldı. Sekonder antikordan sonra 3'er kez 5'er dakikalık TBST ile yıkama yapıldı. Sonra distile su ile 2 dakika daha membran çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra distile su dökülerek membranın üstünü kaplayacak kadar Novex Substrat konuldu. Bantlar istenen şekilde görüntüleninceye kadar karanlıkta çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Yarım saatten fazla inkübe edilmesi AP'nın membranı çok fazla boyamasına, bantların netliğinin bozulmasına ve non-spesifik bantlanmaya neden olur. İstlenen görüntü elde edilince distile su ile reaksiyon durduruldu. Musluk suyu, asit gibi başka maddelerle yıkamak bantların sararmasına yada silinmesine neden olur. Membran kurutularak, bilgisayarda tarandı. Membran karanlıkta saklandığı sürece bantlar varlıklarını korurlar fakat ışığa ne kadar maruz kalırsa okadar çabuk solar.



Şekil 3.8: Alkalın fostataz substratıyla görüntülenen western blot membranı

3.7.İstatistiksel Analiz

Akış sitometri sonuçlarının analizinde, kapılanan bölgedeki antikorların kendi içlerinde anlamlılığı 'one-way ANOVA" testi ile, kapılanan farklı bölgeler arasındaki antikorların anlamlılıkları ise parametrik t testi ile yapılarak incelenmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

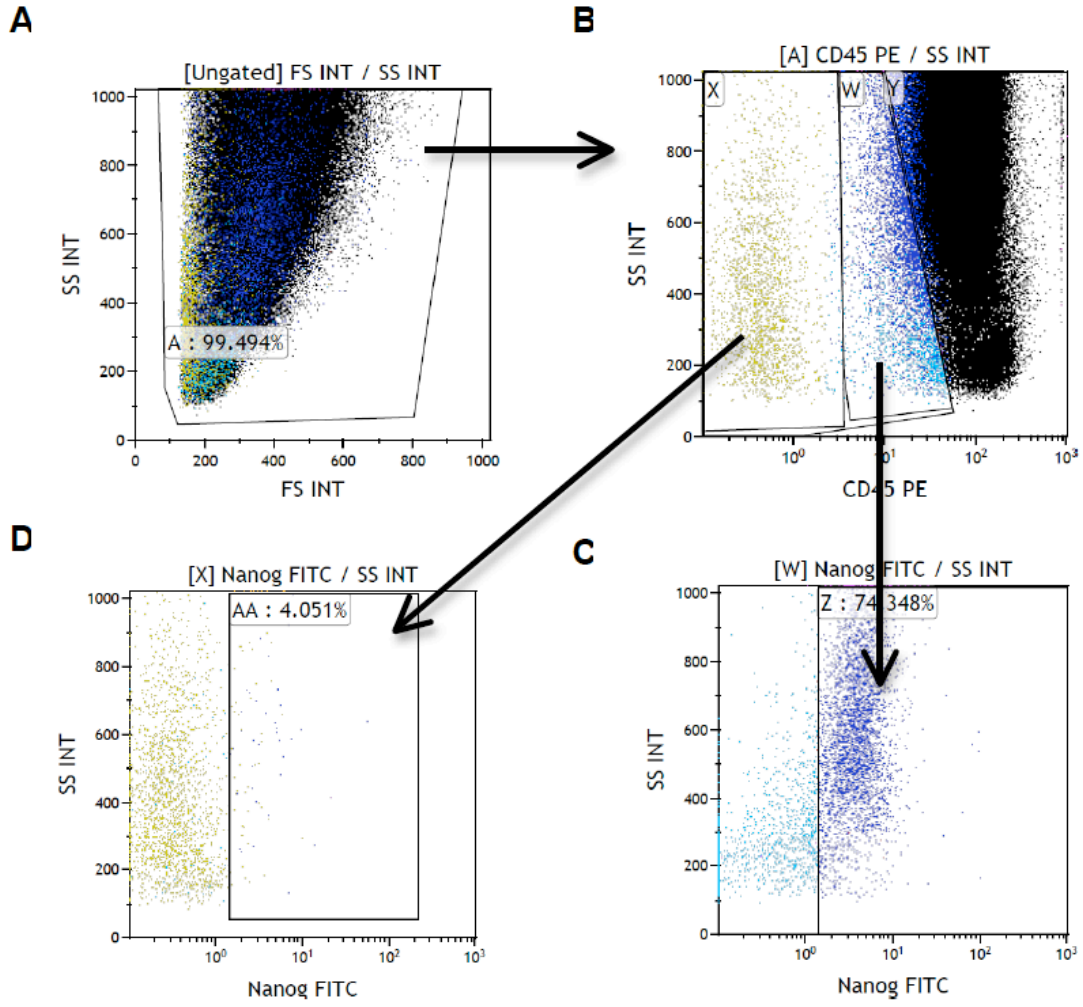
4.1.Periferik Kan

Normal sağlıklı kişilerden alınan 8 adet periferik kan örneğinden üç farklı yöntemle izole edilen hücrelerde VSEL belirteçleri akış sitometri, western blot ve immünfloresan boyama ile incelendi.

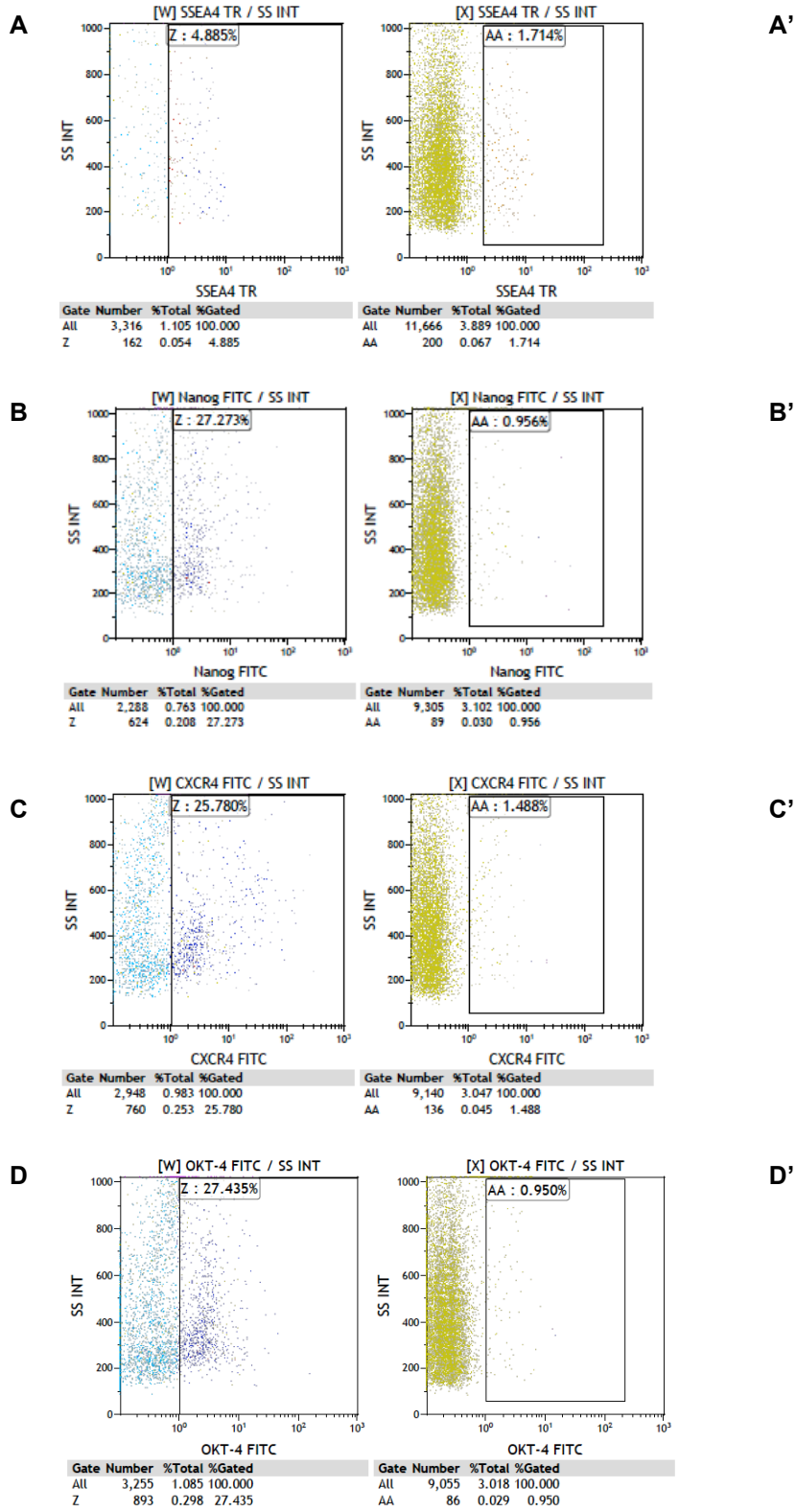
4.1.1.Periferik Kanda Akış Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı

Akış sitometri sadece periferik kandan lizis yöntemi ile elde edilen hücrelere yapıldı. Akış sitometri incelemeleri için en az 10^6 /ml hücre gerektiğinden, materyallerden elde edilen hücre sayıları diğer metodları uygulamaya yetmedi, ayrıca tez projesi kapsamında alınan antikor miktarının kısıtlı olması böyle bir seçimi zorunlu hale getirdi.

Akış sitometride iki farklı kapılama yapılarak, hücreler üzerindeki VSEL belirteçlerinin varlığına ve sayısına bakıldı. İlk kapılama CD45 negatif hücreler (CD45 soluk hücreler de negatif olarak kapılamaya dahil edildi) üzerinden yapıldı. Bu grubun içindeki NANOG, CXCR4, OCT3/4 ve SSEA-4 pozitif hücre sayısı belirlendi. İkinci kapılamada ise VSEL hücreleri mononükleer hücrelerden küçük olduğu ve debris popülasyonunda bulunduğu literatür bilgisine göre, debris kısmı da alındı. Bu kısımda da aynı belirteçler incelendi. Şekil 4.1'de kapılama stratejisi gösterilmektedir. Şekil 4.2'de alınan bir periferik kan örneğinin akış sonuçları verilmektedir.



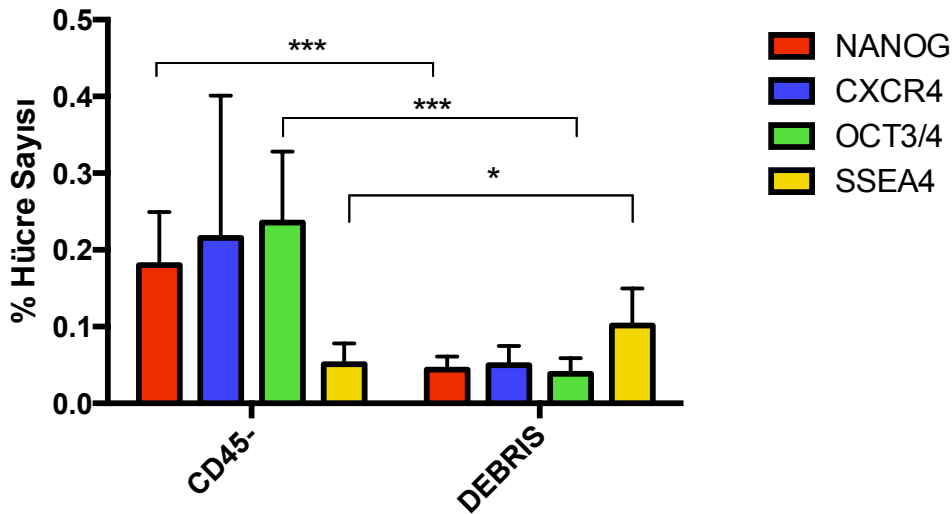
Şekil 4.1: Akış Sitometri Kapılama **A)** Cihazdan geçirilen tüm hücre grubunu göstermektedir. **B)** Hücreler içinde X kapısı debris kısmını, W kapısı ise CD45 negatif olanların bulunduğu alanı göstermektedir. **C)** CD45 negatif olanlar içinden NANOG pozitif kısmın seçildiği kapılama **D)** Debris grubunun içinden NANOG pozitif hücrelerin seçildiği kapılama.



Şekil 4.2: Periferik kanda VSEL belirteçlerinin akış sitometri ile gösterilmesi. **A)** Debris popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **A')** CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **B)** Debris popülasyonunda,

NANOG pozitif hücreler **B'**) CD45- populasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **C)** Debris populasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler **C')** CD45- populasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler **D)** Debris populasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler **D')** CD45- populasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler görülmektedir.

Elde edilen sayımların yüzde olarak ortalamaları Tablo 4.1 de gösterilmektedir. Her iki kapılamadaki antikörlerin kendi aralarındaki korelansı anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Debris ve CD45- populasyonunda NANOG, SSEA4 ve OCT3/4 antikörlerinin farklılığının anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0.05$). İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 4.3 de gösterilmektedir.



Şekil 4.3: Periferik kandan eritrosit lizisi ile elde edilen hücrelerde akış sitometride CD45- populasyonunda ve debrisde VSEL belirteçlerinin (NANOG, CXCR4, OCT3/4, SSEA-4) oranları.
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (antikörler arasındaki anlamlılık parametrik t-testi ile incelendi)

Tablo 4.1: Akış Sitometri ile sayılan hücrelerin yüzde cinsinden ortalamaları gösterilmektedir.

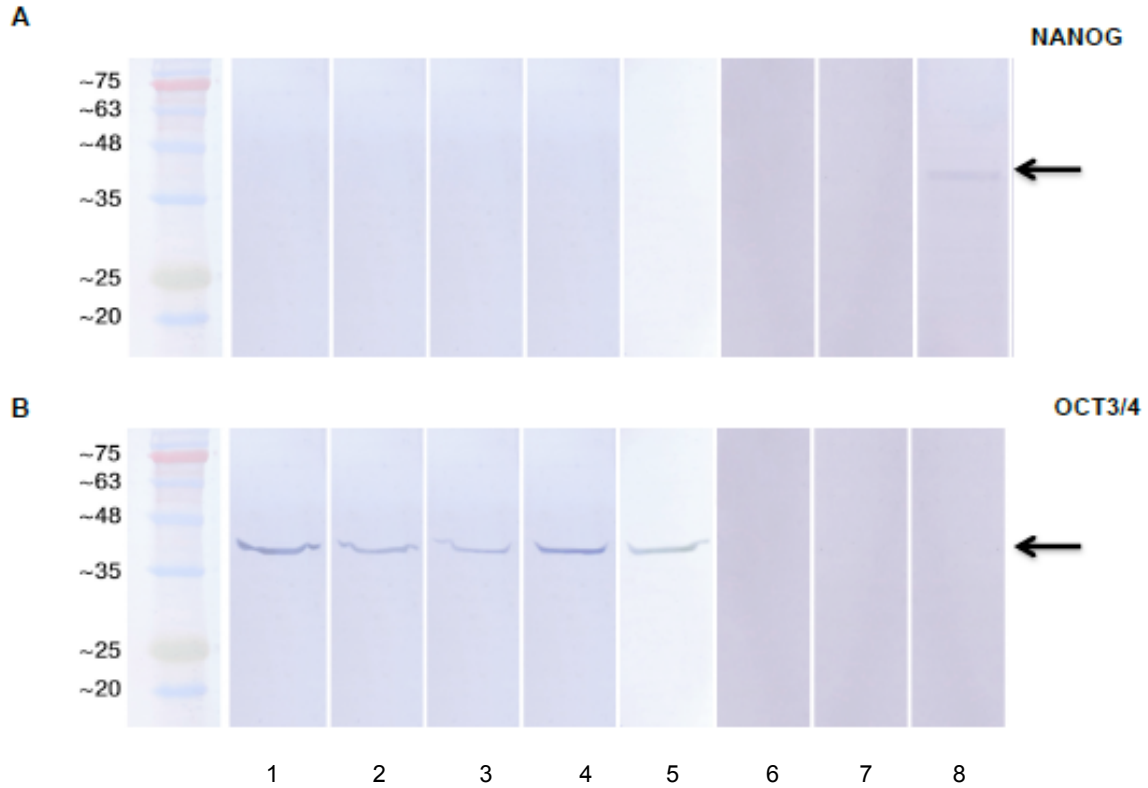
	%NANOG	%CXCR4	%OCT3/4	%SSEA-4	F Değeri	p Değeri
CD45-	0.180	0.215	0.235	0.05	4.085	0.0172
DEBRİS	0.044	0.049	0.038	0.101	5.354	0.0076

*p ve F değeri oneway anova ile hesaplandı.

4.1.2. Western Blot Yöntemi ile Periferik Kandan VSEL Proteinlerinin Tayini

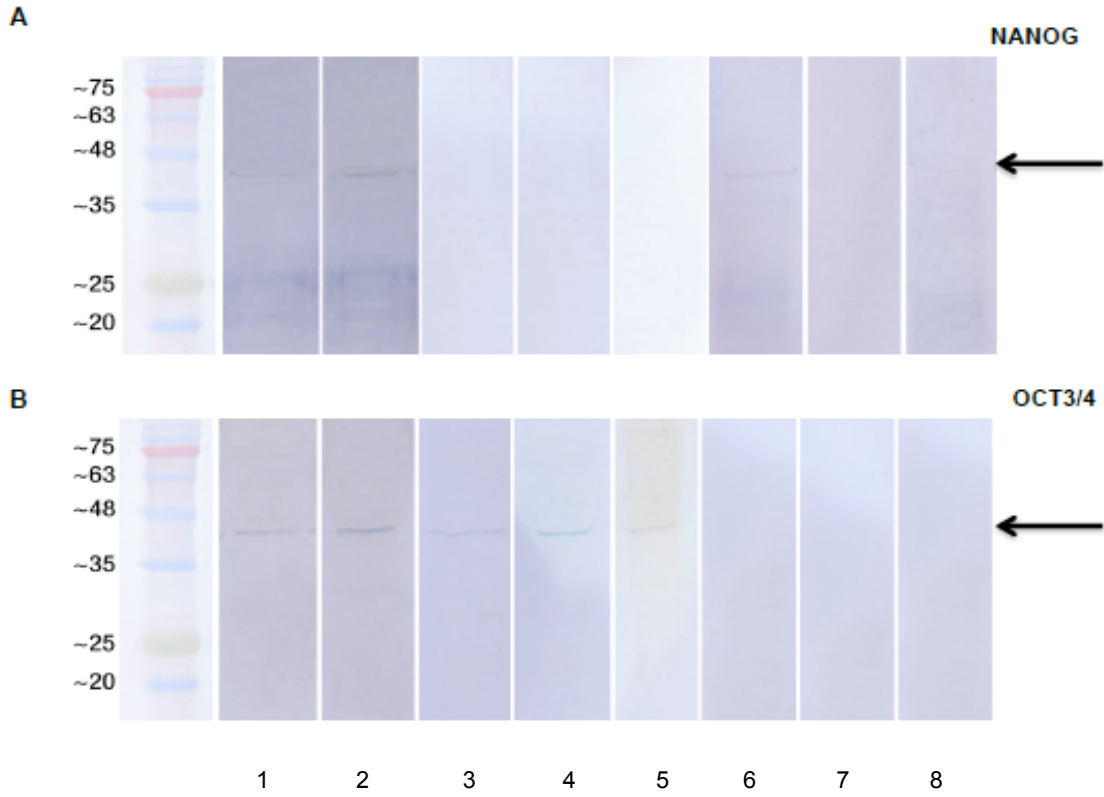
Alınan 8 periferik kanın incelenen katmanlarında (lizis, MNC ve 5. katman) western blot yöntemi ile OCT3/4 ve NANOG proteinlerinin varlığı araştırıldı.

Şekil 4.4'de lizis katmanında, NANOG 40 kDa ağırlığında sadece 1 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulundu.



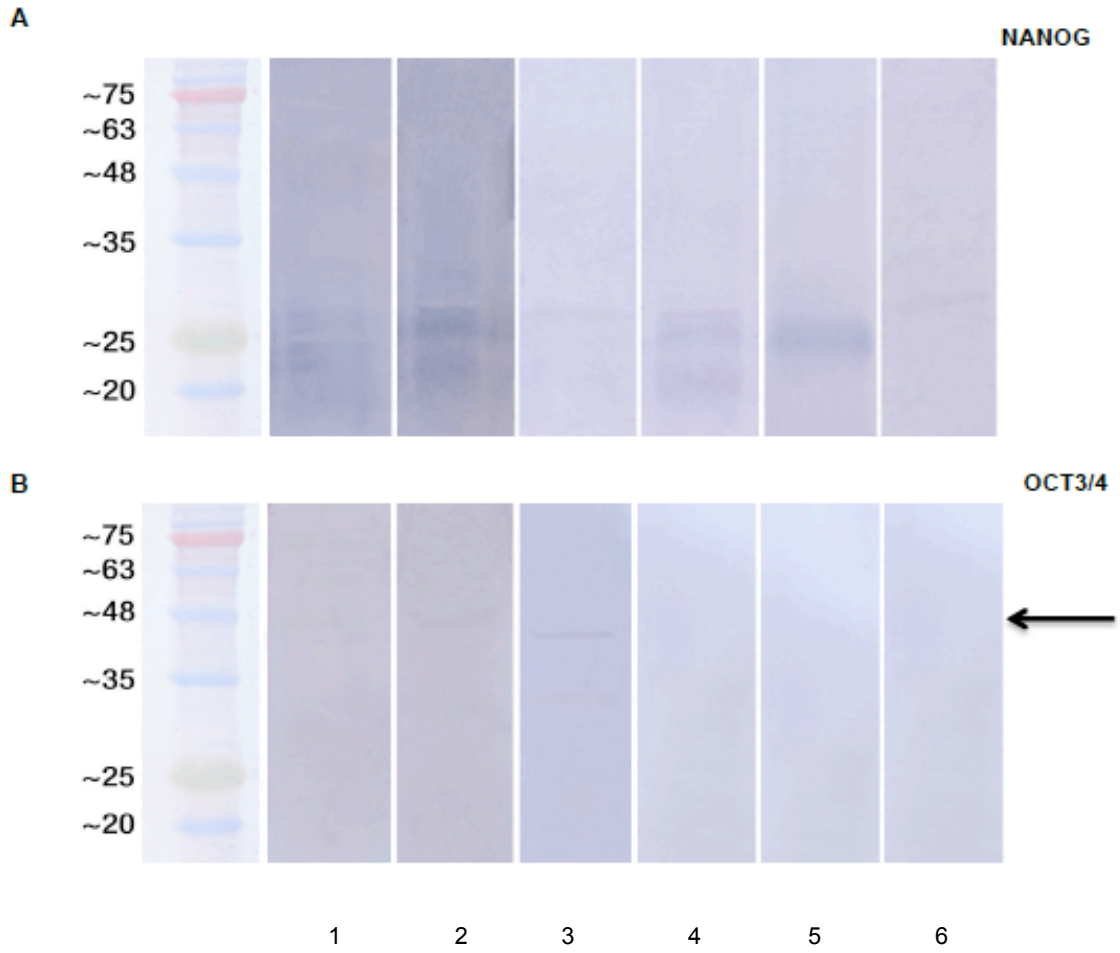
Şekil 4.4: Periferik kan lizis katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi **A)** NANOG proteinin varlığı **B)** OCT3/4 proteinin varlığı

Şekil 4.5'de MNC katmanında NANOG 40 kDa düzeyinde sadece 3 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. Aynı örneklerde 25 kDa düzeyinde ekstra ladder şeklinde bantlar görüldü. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulundu.



Şekil 4.5: Periferik kan MNC katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi **A)** NANOG proteinin varlığı **B)** OCT3/4 proteinin varlığı

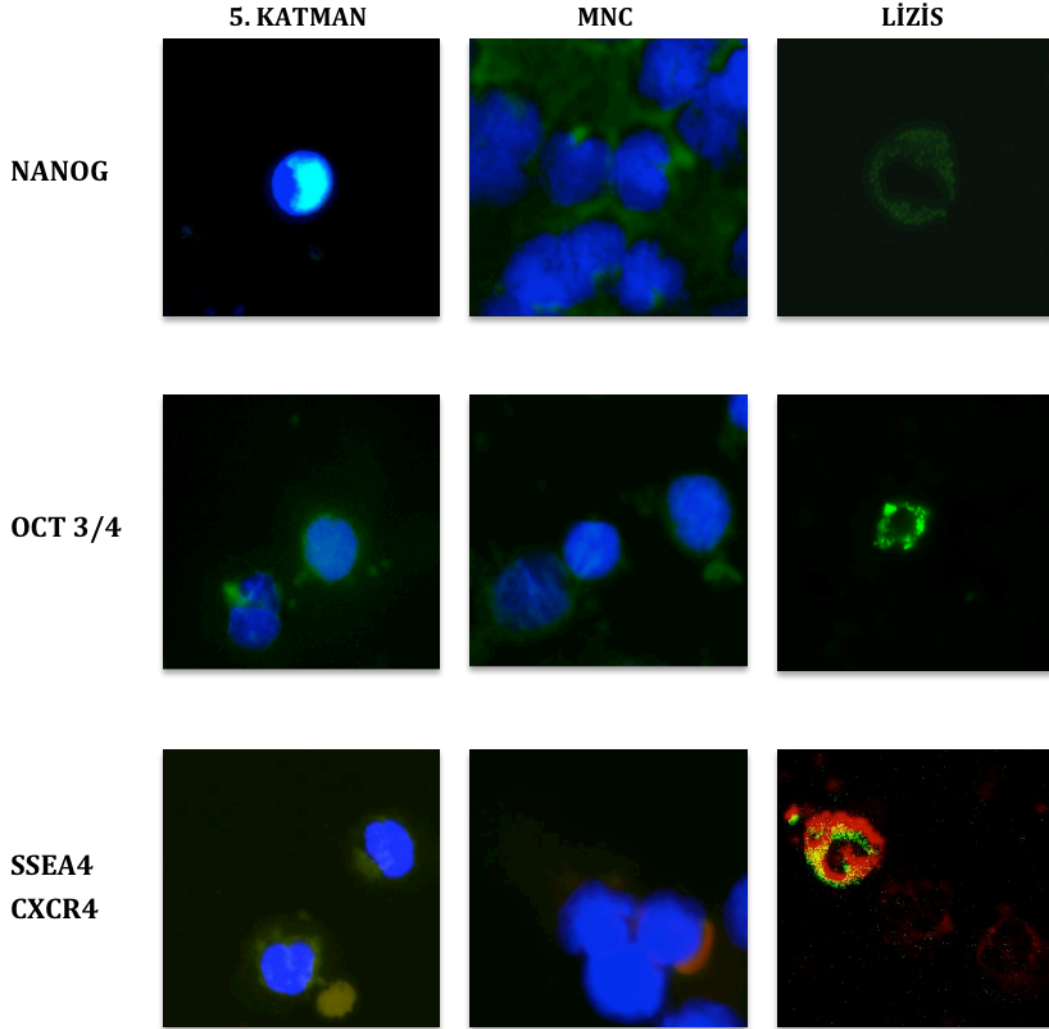
Şekil 4.6'de 5. katman hücrelerinde bulunan bantlar gösterilmektedir. NANOG 25 kDa düzeyinde tüm örneklerde ladder şeklinde bantlar tespit edildi. OCT3/4 proteini 33 kDa düzeyinde 1 örnekte pozitif bulundu.



Şekil 4.6: Periferik kan 5. Katman hücrelerinde, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi **A)** NANOG proteinin varlığı **B)** OCT3/4 proteinin varlığı

4.1.3. Periferik Kanda VSEL Belirteçlerinin İmmü Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi

Periferik kan grubundan hazırlanan preparatlar immü floresan boyalar ile boyandıktan sonra floresan mikroskobu ile incelendi. Şekil 4.7’de, 3 hücre katmanında da yapılan immü floresan boyamalar gösterilmektedir.



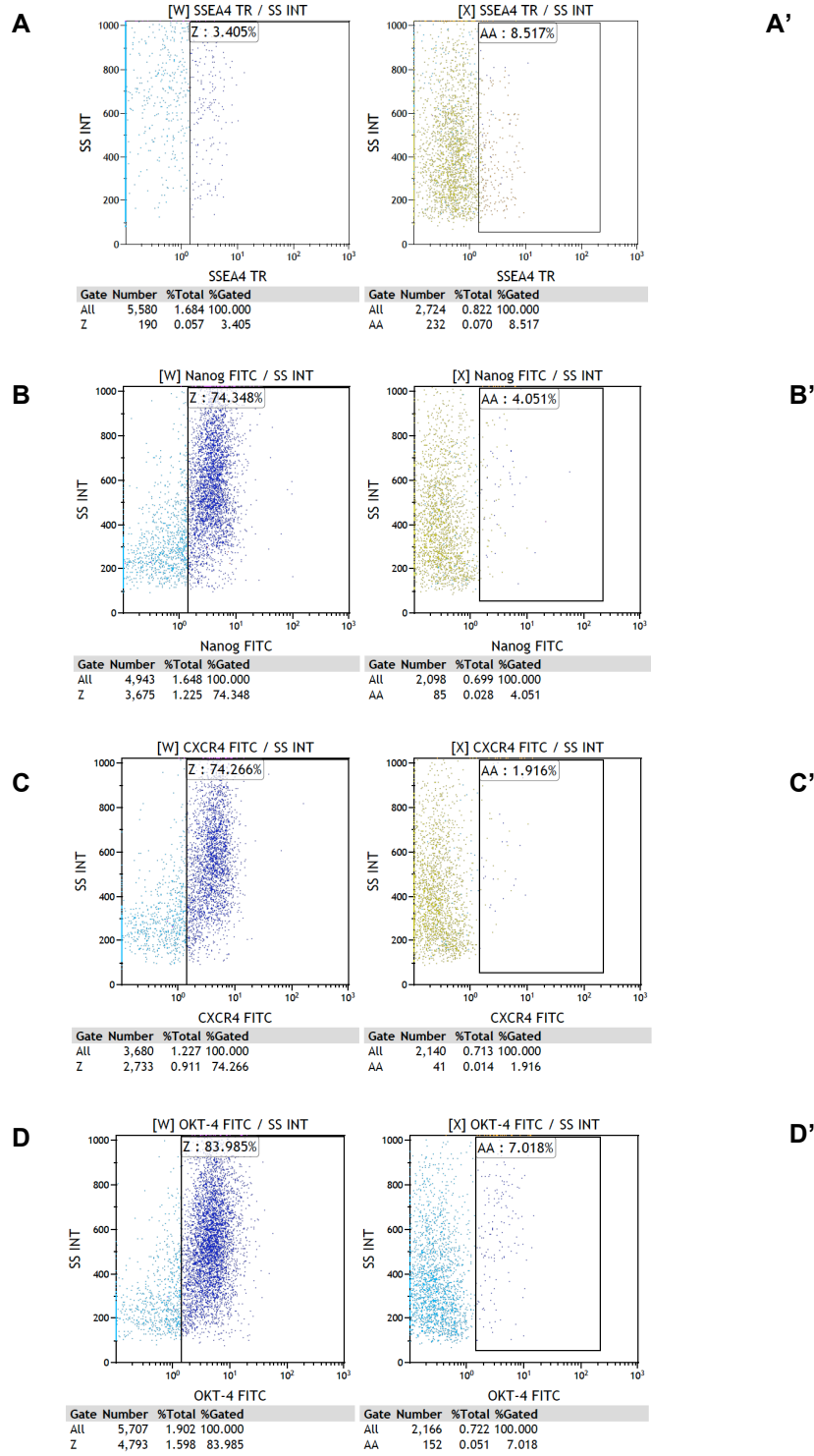
Şekil 4.7: Periferik kandan izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin (NANOG, OCT3/4, SSEA-4, CXCR4) immü floresan ile gösterilmesi. Satırlarda kullanılan antikorlar, sütunlarda ise hücre katmanları göstermektedir. DAPI nükleusu boyayarak mavi floresan vermektedir. VSEL belirteçlerinin pozitifliği ise, NANOG, OCT3/4 ve CXCR4 için yeşil floresan ile, SSEA-4 için ise kırmızı floresan ile gösterildi.

4.2.Aferez Materyali

Toplam 7 tane allojenik aferez materyali alınmıştır. 7 aferez materyalinin sadece 3 tanesi akış sitometride incelenmiştir. Akış sitometri incelemesi aynı gün yapılması gerektiğinden,materyalin alınma koşulları nedeniyle geri kalan 4 tanesi akış sitometri ile incelenememiştir. Western blot tayininde ise 7 materyal kullanılmıştır. İmmünfloresan boyamalar bir örnekte yapılmıştır.

4.2.1.Aferez Materyalinde Akış Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı

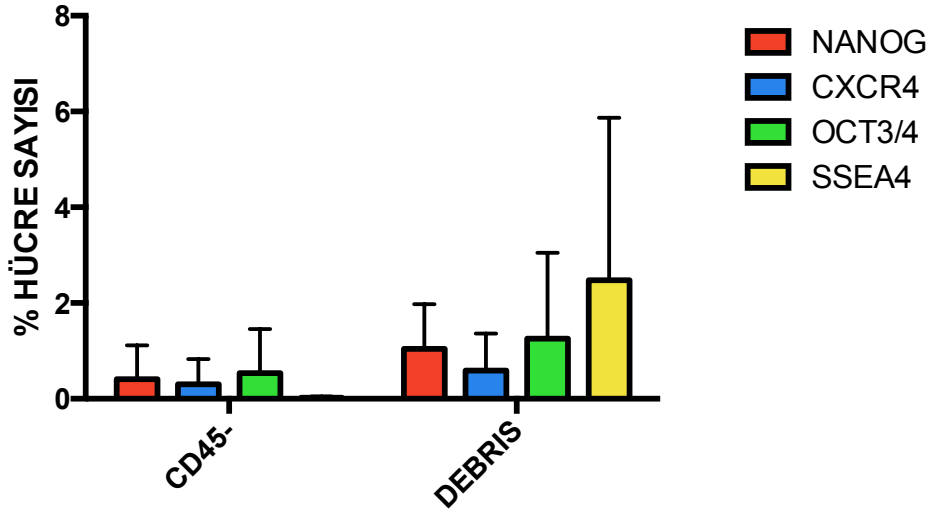
Alınan aferez materyallerinden lizis yöntemi ile elde edilen hücre katmanına akış sitometri yapıldı. Kapılama yöntemi olarak periferik kanla aynı strateji uygulandı. CD45 negatif hücre grubuyla debris grubu karşılaştırıldı. Şekil 4.8'de alınan bir aferez örneğinin akış sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 4.8: Aferez materyalinde VSEL belirteçlerinin akış sitometri ile gösterilmesi. **A)** Debris popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **A')** CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **B)** Debris popülasyonunda, NANOG pozitif hücreler **B')** CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **C)** Debris popülasyonunda,

CXCR4 pozitif hücreler C) CD45- populasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler D) Debris populasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler D) CD45- populasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler görülmektedir.

Elde ettiğimiz sayımların yüzde olarak ortalamaları Tablo 4.2 de gösterilmektedir. Her kapılamadaki antikörlerin kendi aralarındaki korelansı anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Debris ve CD45- grupları arasındaki farklılığın (standart sapmaların yüksek olması nedeniyle) anlamsız olduğu gösterilmiştir ($p>0.05$). İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9: Aferez materyalinden eritrosit lizisi ile elde edilen hücrelerde akış sitometride CD45- populasyonunda ve debrisde VSEL belirteçlerinin (NANOG, CXCR4, OCT3/4, SSEA-4) oranları.

Tablo 4.2: Akış Sitometri ile sayılan hücrelerin yüzde cinsinden ortalamaları gösterilmektedir.

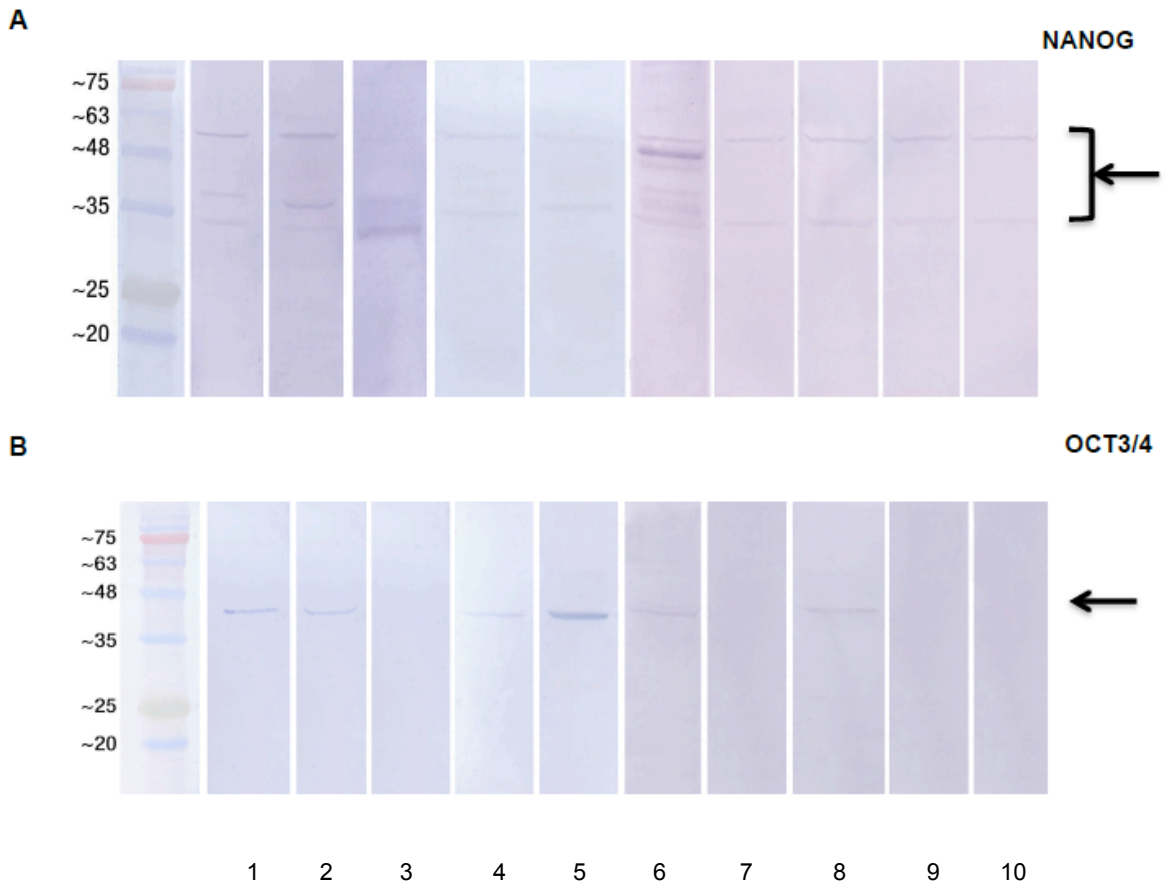
	%NANOG	%CXCR4	%OCT3/4	%SSEA-4	F Değeri	p Değeri
CD45-	0.412	0,304	0,536	0,023	0.3553	$p>0,05$
DEBRİS	1,046	0,588	1,253	2,476	0.4810	$p>0,05$

*p ve F değeri oneway anova ile hesaplandı.

4.2.2. Western Blot Yöntemi ile Aferez Materyalinden VSEL Proteinlerinin Tayini

Alınan 7 aferez materyalinin tüm katmanlarına (lizis, MNC ve 5. katman) western blot yöntemi uygulanmıştır. Western blot ile hem OCT3/4 hem de NANOG proteinlerinin varlığı tespit edilmiştir.

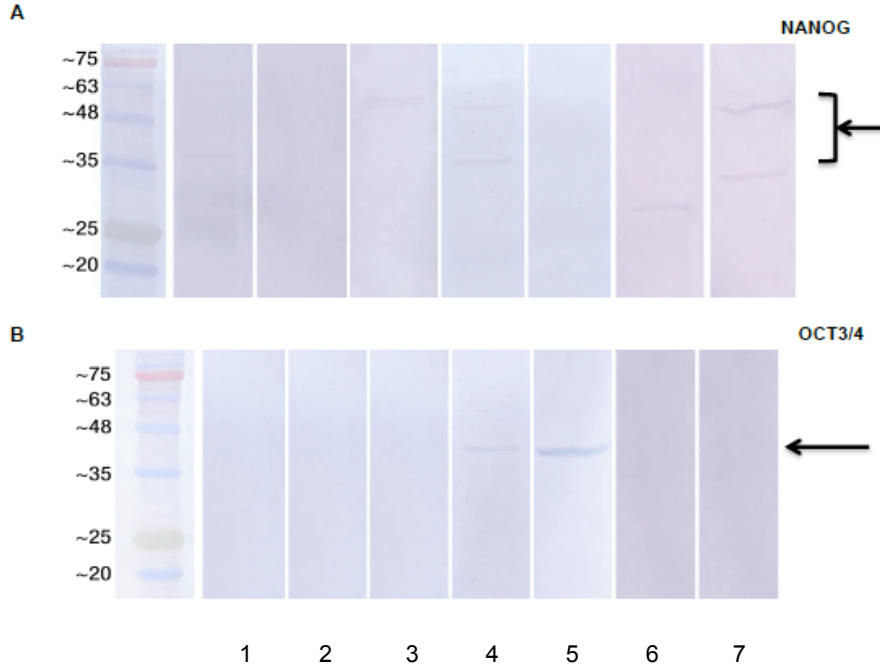
Şekil 4.10'de lizis katmanında, NANOG 40 kDa ağırlığında tüm örneklerde pozitiflik tespit edildi. Aynı zamanda tüm örneklerde yaklaşık 55 kDa ağırlığında ikinci bir bant daha görüldü. 35 kDa ağırlığında da 4 örnekte bir üçüncü bant tespit edildi. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 6 örnekte pozitif bulundu.



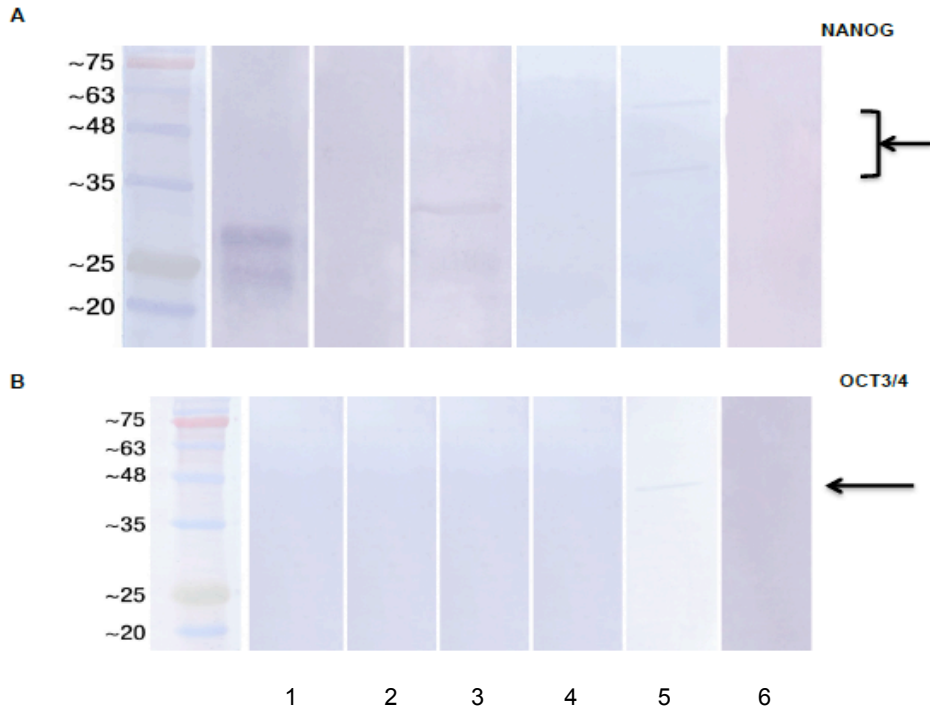
Şekil 4.10: Aferez materyali lizis katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi **A)** NANOG proteinin varlığı **B)** OCT3/4 proteinin varlığı

Şekil 4.11de MNC katmanında NANOG 40 kDa düzeyinde sadece 3 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. 55 kDa ağırlığındaki bant 3 örnekte görüldü. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 2 örnekte pozitif bulundu.

Şekil 4.12'de 5. katman hücrelerinde bulunan bantlar gösterilmektedir. NANOG 40 kDa düzeyinde 2 örnekte tespit edildi. 55 kDa ağırlığındaki bant bir örnekte görüldü. Bir örnekte 25 kDa düzeylerinde ladder bant görünürken öteki örneklerde görülmedi. OCT3/4 proteini 33 kDa düzeyinde 1 örnekte pozitif bulundu.



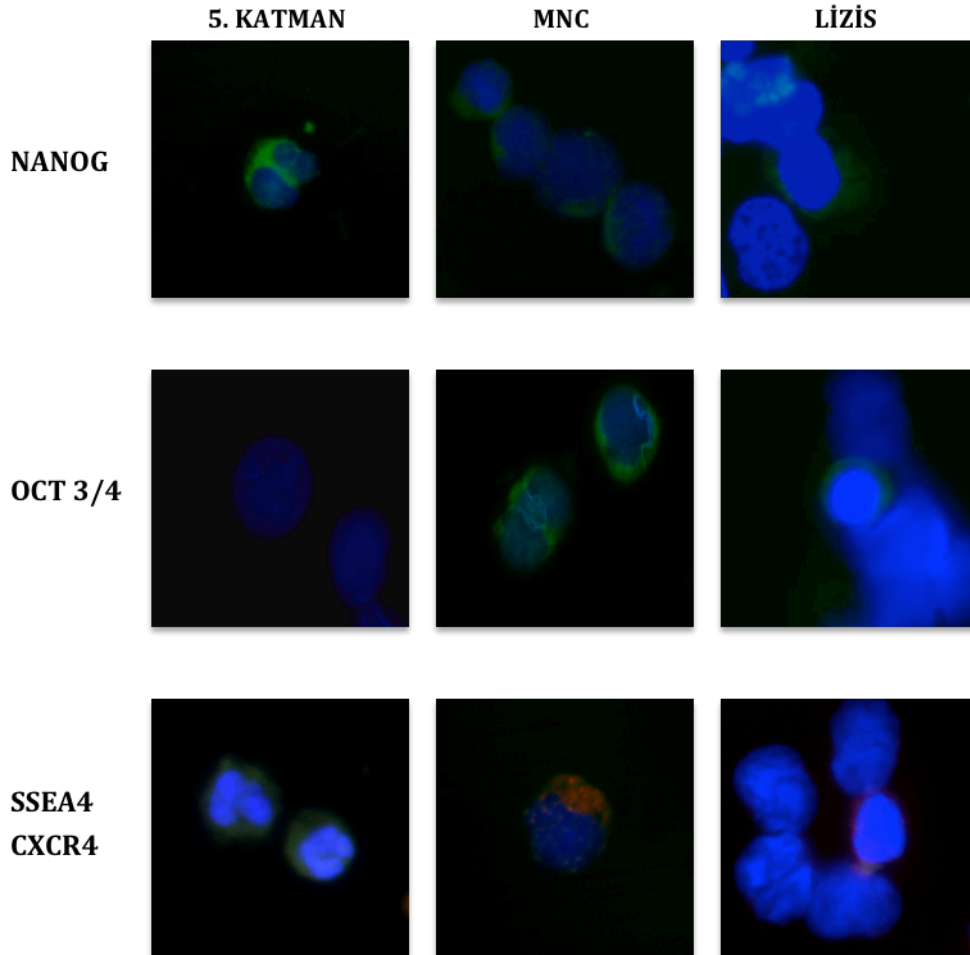
Şekil 4.11: Aferez materyali MNC katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi **A)** NANOG proteinin varlığı **B)** OCT3/4 proteinin varlığı



Şekil 4.12: Aferez materyali 5. katman grubunda, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı

4.2.3. Aferez Materyalinde VSEL Belirteçlerinin İmmü Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi

Aferez materyalinden grubundan hazırlanan preparatlar immü floresan boyalar ile boyandıktan sonra floresan mikroskobu ile incelendi. Şekil 4.13'de her üç hücre katmanında da yapılan immü floresan boyamalar gösterilmektedir.



Şekil 4.13: Aferez materyalinden izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin (NANOG, OCT3/4, SSEA-4, CXCR4) immü floresan ile gösterilmesi. Satırlarda kullanılan antikorlar, sütunlarda ise hücre katmanları göstermektedir. DAPI nükleusu boyayarak mavi floresan vermektedir. VSEL belirteçlerinin pozitifliği ise, NANOG, OCT3/4 ve CXCR4 için yeşil floresan ile, SSEA-4 için ise kırmızı floresan ile gösterildi.

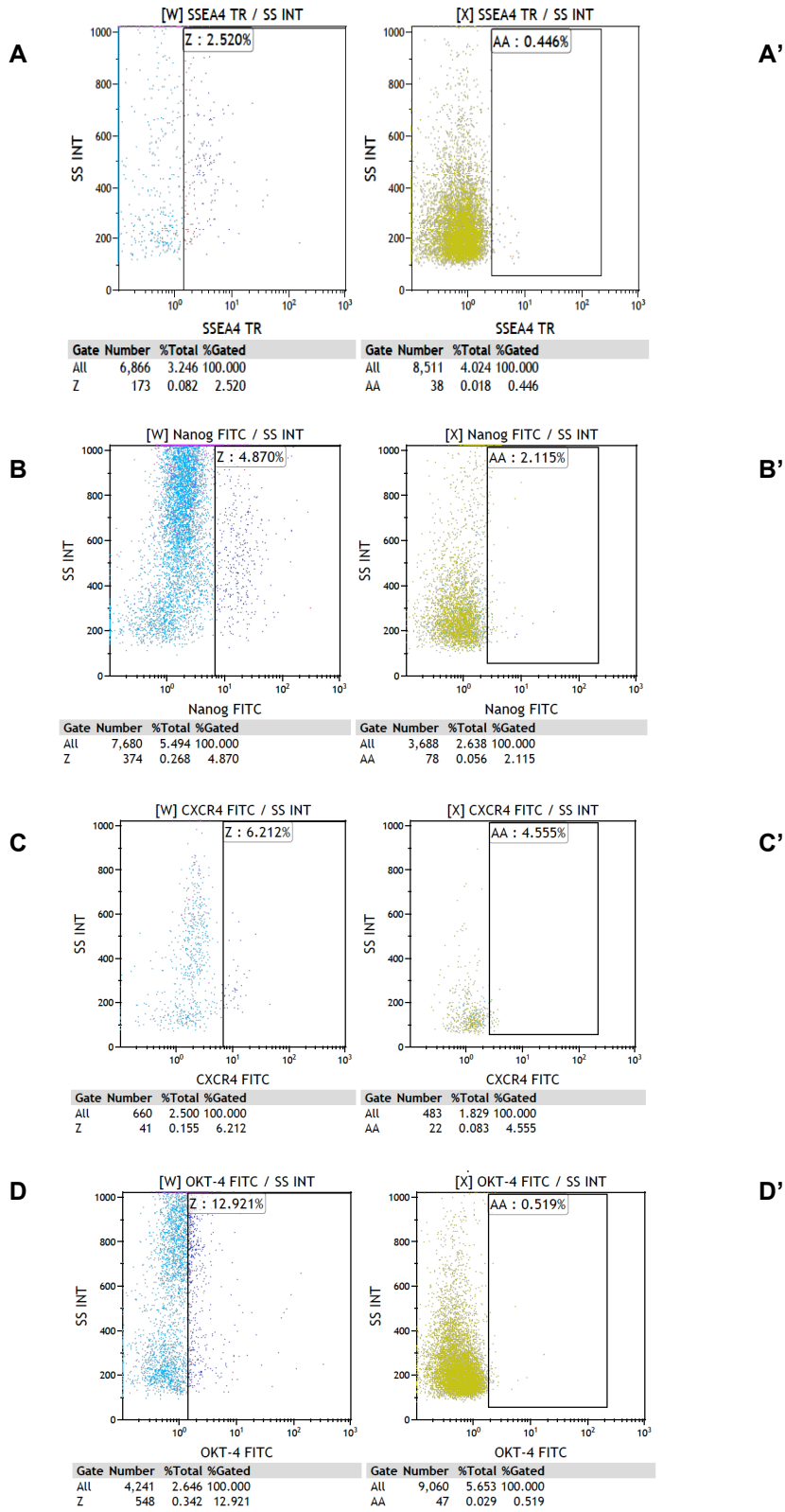
4.3.Kordon Kanı

Alınan 9 adet periferik kan akış sitometri, western blot ve immünfloresan boyama olmak üzere üç yöntem ile de çalışıldı.

4.3.1.Kordon Kanında Akış Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı

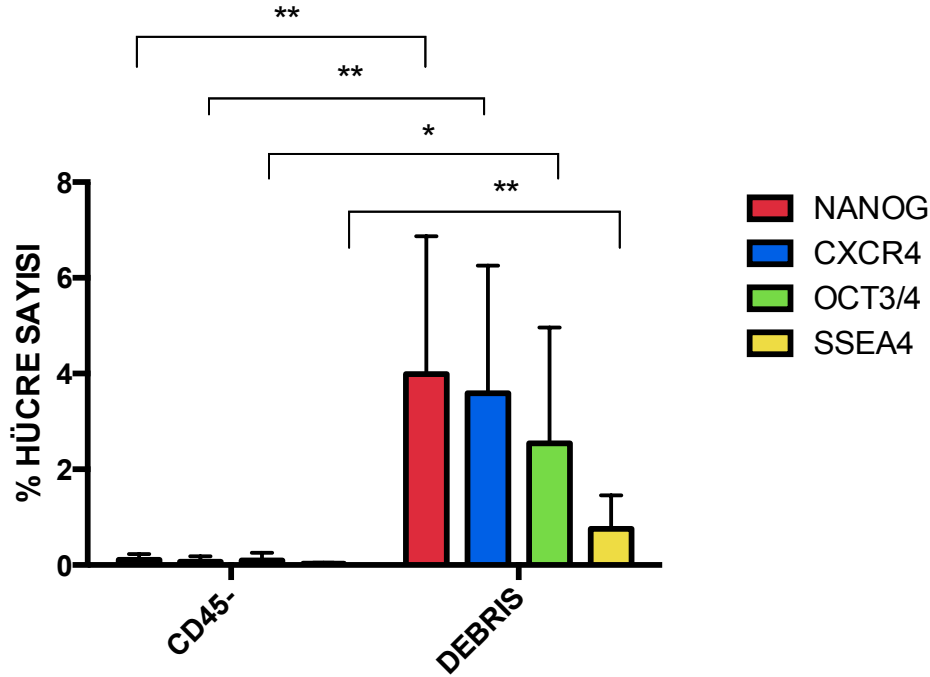
Alınan kordon kanlarından lizis yöntemi ile elde edilen hücre katmanına akış sitometri yapıldı. Kapılama yöntemi olarak periferik kanla aynı strateji uygulandı. CD45 negatif hücre grubuyla Debris grubu karşılaştırıldı. Şekil 4.14'de alınan bir kordon kanı örneğinin akış sonuçları gösterilmektedir.

Elde ettiğimiz sayımların yüzde olarak ortalamaları Tablo 4.3 de gösterilmektedir. Debris ve CD45- grupları arasındaki dört antikorunda pozitifliğinin anlamlı olarak farklı olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 4.15 de gösterilmektedir.



Şekil 4.14: Kordon kanında VSEL belirteçlerinin akış sitometri ile gösterilmesi. **A)** Debris popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **A')** CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **B)** Debris popülasyonunda,

NANOG pozitif hücreler **B'**) CD45- populasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler **C)** Debris populasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler **C')** CD45- populasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler **D)** Debris populasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler **D')** CD45- populasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler görülmektedir.



Şekil 4.15: Kordon kanında eritrosit lizisi ile elde edilen hücrelerde akış sitometride CD45- populasyonunda ve debrisde VSEL belirteçlerinin (NANOG, CXCR4, OCT3/4, SSEA-4) oranları. (*) $p < 0,05$ (**) $p < 0,01$ (antikorlar arasındaki anlamlılık parametrik t-testi ile incelendi)

Tablo 4.3: Akış Sitometri ile sayılan hücrelerin yüzde cinsinden ortalamaları gösterilmektedir.

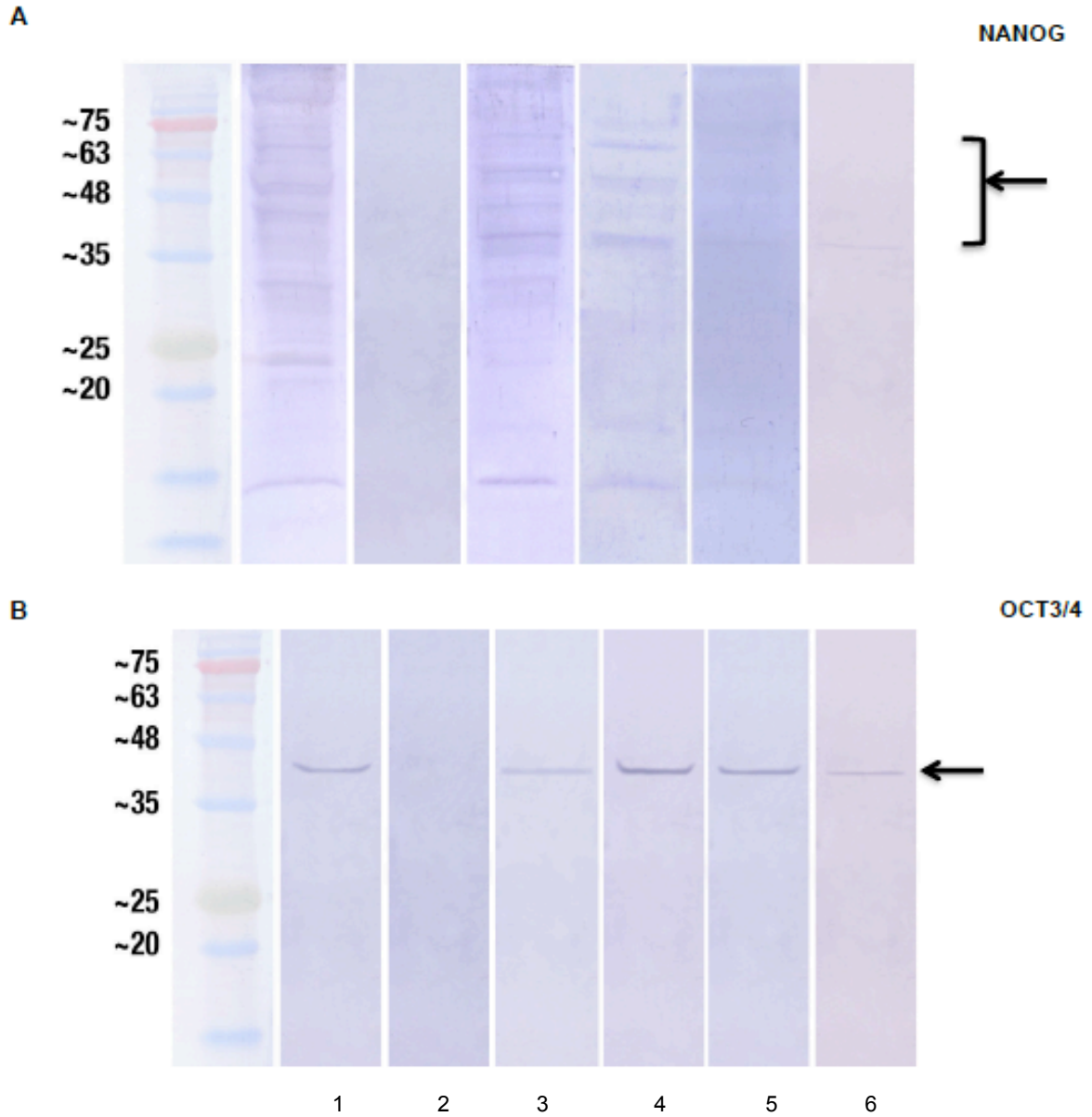
	%NANOG	%CXCR4	%OCT3/4	%SSEA-4	F Değeri	p Değeri
CD45-	0.111	0.070	0.098	0.027	0.9518	$p > 0.05$
DEBRİS	3.993	3.588	2.543	0.757	3.334	0.00371

*p ve F değeri oneway anova ile hesaplandı.

4.3.2. Western Blot Yöntemi ile Kordon Kanından VSEL Proteinlerinin Tayini

Alınan 9 kordon kanının tüm katmanlarına (lizis, MNC ve 5. katman) western blot yöntemi uygulanmıştır. Western blot ile hem OCT3/4 hem de NANOG proteinlerinin varlığı tespit edilmiştir.

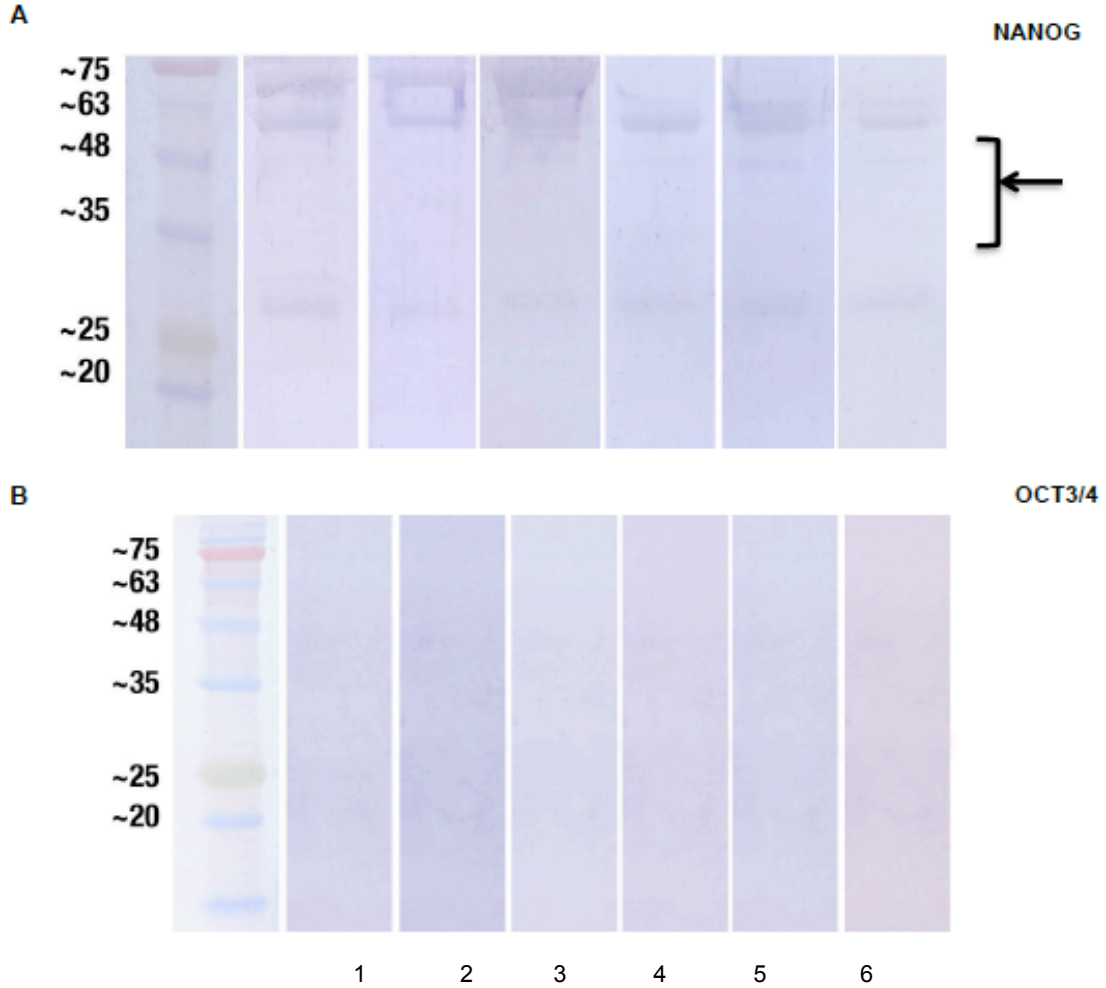
Şekil 4.16'da lizis katmanında, 5 örnekte NANOG pozitifliği tespit edildi. Bu örneklerde bantlar ladder şeklinde görüntülenmiştir. Tüm örneklerde bantların şekilleri ve buldukları konumları aynı olarak görülmüştür. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulundu.



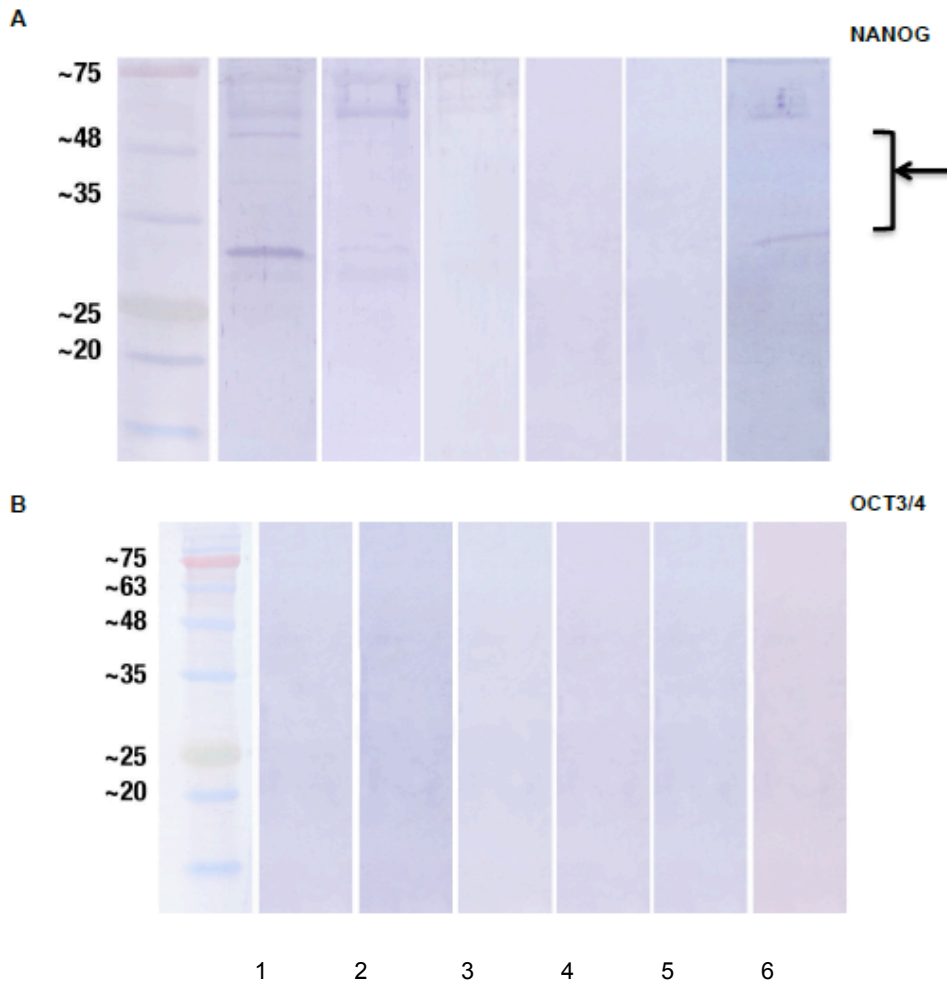
Şekil 4.16: Kordon kanı lizis katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı

Şekil 4.17’de MNC katmanında tümör örneklerde, NANOG yaklaşık 55 kDa ve 29 kDa düzeyinde görülmüştür. OCT3/4 proteini hiç bir örnekte gösterilememiştir.

Şekil 4.18’de 5. katman hücrelerinde bulunan bantlar gösterilmektedir. NANOG 55 kDa düzeyinde 4 örnekte tespit edildi. Yaklaşık 30 kDa düzeyinde, 3 örnekte bant görüldü. OCT3/4 proteini hiç bir örnekte görünmedi.



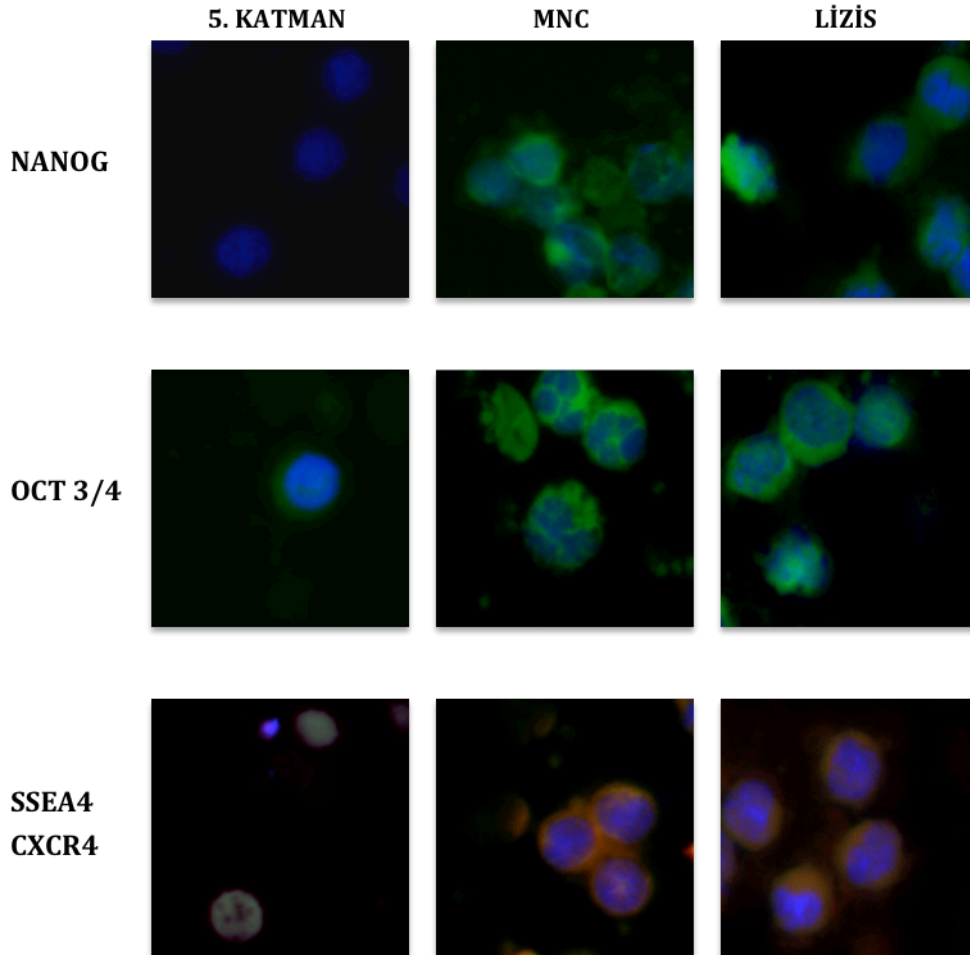
Şekil 4.17: Kordon kanı MNC katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı



Şekil 4.18: Kordon kanı 5. katman grubunda, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi **A)** NANOG proteinin varlığı **B)** OCT3/4 proteinin varlığı

4.3.3.Kordon Kanında VSEL Belirteçlerinin İmmünfloresan Boyamalar ile Gösterilmesi

Kordon kanı grubundan hazırlanan preparatlar immünfloresan boyalar ile boyandıktan sonra floresan mikroskobu ile incelendi. Şekil 4.19'de 3 hücre katmanında yapılan immünfloresan boyamalar gösterilmektedir.



Şekil 4.19: Kordon kanından izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin (NANOG, OCT3/4, SSEA-4, CXCR4) immünfloresan ile gösterilmesi. Satırlarda kullanılan antikolar, sütunlarda ise hücre katmanları göstermektedir. DAPI nükleusu boyayarak mavi floresan vermektedir. VSEL belirteçlerinin pozitifliği ise, NANOG, OCT3/4 ve CXCR4 için yeşil floresan ile, SSEA-4 için ise kırmızı floresan ile gösterildi.

5.TARTIŞMA

Embriyonik kök hücreler pluripotent özelliklerinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahipken, etik sebeplerden dolayı kullanımları son derece kısıtlanmıştır. Klinik alanda kullanımı en yaygın olan kök hücre grubu hematopoetik kök hücrelerdir. HKH'lerin transplantasyonda kullanım oranının yüksek olması rejenerasyonu sağlamada daha başarılı olmalarından kaynaklanmaktadır. HKH plastisitesi, HKH'lerin transdediferansiyasyon geçirerek başka bir dokuyu oluşturmasına denir. HKH'lerin rejeneratif kapasitesinden plastitenin sorumlu olduğu düşünülmekteydi (Ratajczak 2008b). Zuba-Surma ve arkadaşları 2005 yılında ortaya attıkları hipotez ile bu rejeneratif kapasitenin nedeninin kemik iliğinde bulunan, henüz tanımlanmamış, hematopoetik olmayan, primitif bir hücre grubu olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Kucia ve ark 2005a; 2005b). VSEL kavramı da bu hipotez doğrultusunda ortaya çıkmıştır. Yüksek nükleus/sitoplazma oranına sahip, boyutları 4-6 µm olan, EKH belirteçlerini sentezleyen dormansi halde bir grup kök hücrenin kemik iliğinde varlığını göstermişlerdir. Bu hücrelerin boyutlarının küçük olması nedeniyle 'Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücreler (VSELsc)' adını almışlardır (Kucia ve ark. 2006). O zamandan günümüze kadar, hala bu hücrelerin varlığı, pluripotent kapasiteleri ve kendilerini yenileyebilir oluşları, in vitro/vivo çoğalması bir tartışma konusu halindedir (Ratajczak ve ark. 2014b; Parker 2014; Szade ve ark 2013).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bu hücreleri tanımlamak ve fonksiyonlarını anlayabilmek amaçlı yapılmış olmakla beraber, genellikle fare çalışmalarıdır. İnsan materyalinde VSEL çalışılması, son bir iki yılda daha yoğunlaşmıştır ve farelerdeki VSEL kök hücreleriyle benzerlikleri ve farklılıkları araştırılmaktadır (Kassmer ve Krause 2013; Heider ve ark. 2012).

2006 yılında Kucia ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma, VSEL kavramı için öncü niteliği taşımaktadır. Bu çalışmada fare Kⁱ'nden FACS yöntemi ile Sca-1⁺/Lin⁻/CD45⁻ hücre topluluğunu ayırtmışlardır. Bu hücre topluluğunun HKH belirteci olmayan PKH belirteci niteliğindeki hücre yüzey belirteci olan SSEA-1'i ve

transkripsiyon faktörleri olan Oct4, NANOG, Rex-1'i sentezlediğini göstermişlerdir. Bu hücrelerin kemik iliği mononükleer hücre grubunun yaklaşık %0,02'sini oluşturduğunu bildirmişlerdir. Kİ'de bulunmaları üzerine 2008 yılında yayınladıkları çalışmalarında bu hücrelerin fare periferik kanındaki bulunup bulunmadığına bakmışlardır. PK ile G-CSF ile mobilize edilmiş PK'nın VSEL açısından farkını kıyaslamışlardır. Akış sitometri ile buldukları sonuçlara göre; fare PK'sında Sca-1⁺/Lin⁻/CD45⁻ olan hücre miktarı 160 hücre/ml (yani total lökosit hücrelerinin %0,0016) iken mobilize olmuş PK'da 800 hücre/ml'dir (yani total beyaz lökosit hücrelerinin %0,0035'i). Aynı zamanda Oct4, NANOG gibi transkripsiyon faktörlerinin mobilize kanda ekspresyonunun arttığını mRNA düzeylerine göre hesaplamışlardır. İmmünofloresan boyama ile, nukleusta Oct4 ve NANOG ekspresyonunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin sadece PKH belirteçlerini ifade etmediklerini aynı zamanda 3 germ tabakasına da farklılaştığını göstermek için hücreleri kültür yaptıklarında farklılaştıklarını gözlemlemişlerdir. İzole edilen VSEL hücreleri kardiyomyosit, nöral hücreler ve pankreatik hücrelere benzer kümeler oluşturmuşlardır (Kucia ve ark. 2006; 2008). Bu bulgular fare hücrelerinde gösterildiği için daha sonra insan hücrelerinde de araştırılmaya başlanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda insan kordon kanında VSEL arayışı başlamıştır. İnsan kordon kanından 3 grup olmak üzere lin⁻/CD45⁻/CXCR4⁺, lin⁻/CD45⁻/CD34⁺, lin⁻/CD45⁻/CD133⁺ hücreleri izole etmişlerdir. Bu hücre gruplarının total kordon kanı hücrelerinde sırasıyla %0,037, %0,118 ve %0,018 oranında olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bu grupları FACS ile izole ederek, yüksek miktarda Oct4 ve NANOG mRNA düzeyleri elde etmişler ve immünofloresan ile de hücre yüzeyinde SSEA-4, nukleusta Oct4 ve NANOG varlığını belirlemişlerdir (Kucia ve ark. 2007).

Başka bir grup VSEL hücrelerinin Kİ'deki durumunu merak etmişlerdir. Kİ ile G-CSF ile mobilize olmuş PK (Lökoferez) arasındaki farkı araştırmışlardır. Kİ de Lin⁻/CD45⁻ olan MNH'lerin %0,107'si CD34, %0,105'i CD133 ve %0,068'i CXCR4 pozitif bulunmuştur. Lökoferez de ise Lin⁻/CD45⁻ olan MNH'lerin %0,039'u CD34, %0,05'i CD133 ve %0,042'si CXCR4 pozitif olarak bulunmuştur. Bu hücre

gruplarında immüno Floresan ve reverse transkriptaz PCR ile OCT4, NANOG ve SSEA-4 anlatımı gösterilmiştir. Fakat Oct4'un immüno Floresan görüntülerinde hem nükleusda hem de sitoplazmada bulunduğunu tesbit ettiklerinde, Oct4 un farklı formlarının olabileceğini düşünmüşlerdir (Sovalat ve ark 2011).

Bu makalelerin ışığında bu tez çalışmasında insan PK, Aferez materyali (G-CSF ile mobilize olmuş PK) ve kordon kanından akış sitometri ile VSEL varlığı bakıldı. VSEL izolasyonunda önemli olan parametrelerden biride hücrelerin boyutu olduğundan çalışmada debris katmanıda ele alındı. PK hücrelerinde CD45⁻ gruptan sırasıyla %0,18 NANOG, %0,215 CXCR4, %0,235 Oct4 ve %0,05 SSEA-4 pozitif bulunmuştur. CD45⁻/Debris grubundan %0,044 NANOG, %0,049 CXCR4, %0,038 Oct4 ve %0,101 SSEA-4 pozitifliği gösterilmiştir (n=8).

Aferez materyalinde CD45⁻ gruptan sırasıyla %0,412 NANOG, %0,304 CXCR4, %0,536 Oct4 ve %0,023 SSEA-4 pozitif bulunmuştur. CD45⁻/Debris grubundan %1,046 NANOG, %0,588 CXCR4, %1,253 Oct4 ve %2,476 SSEA-4 pozitifliği gösterilmiştir (n=3).

Kordon kanında CD45⁻ gruptan sırasıyla %0,111 NANOG, %0,07 CXCR4, %0,098 Oct4 ve %0,037 SSEA-4 pozitif bulunmuştur. CD45⁻/Debris grubundan %3,993 NANOG, %3,588 CXCR4, %2,543 Oct4 ve %0,757 SSEA-4 pozitifliği gösterilmiştir (n=9).

2012 yılında Bhartiya ve arkadaşları VSEL hücrelerinin boyutlarını göz önüne alarak VSEL izolasyonu için farklı bir yöntem belirtmişlerdir. İnsan kordon kanını Fikol-gradient yöntemi ile ayrıştırarak 4 farklı katman elde etmişlerdir. Normalde kök hücrelerin bulunduğu katman MNH katmanı olmaktadır. Fakat VSEL hücrelerinin boyutlarının eritrositlere yakın olmasından dolayı eritrosit katmanına farklı santrifüj yöntemleri uygulayarak 5. bir katman elde etmişlerdir ve bu katmanda VSEL varlığını RT-PCR ve immüno Floresan yöntemlerle göstermişlerdir. 5. Katmandaki hücrelerin Oct4 ve NANOG ifade ettiğini hatta MNH katmanındaki hücrelere oranla bu transkripsiyon faktörlerinin daha fazla olduğunu göstermişlerdir. İmmüno Floresan boyamalarda ise Oct4'un HKH'lerde sitoplazmada

VSEL'lerde ise çekirdekte olduğunu, SSEA4 unda hücre yüzeyinde VSEL'lerde pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bhartiya ve arkadaşları bu sonuçların ışığında VSEL hücrelerinin MNH katmanı dışındaki eritrosit katmanında daha fazla bulunduğunu ve bundan dolayı kordon kanı saklanırken sadece MNH hücrelerinin dondurulduğu ve bu alt katman olan kısmın dahil edilmediği için VSEL hücrelerinin atılmış olduğunu ileri sürmüşlerdir (Bhartiya ve ark. 2012).

Bu makaleyi yol gösterici olarak, bu tez çalışmasında alınan PK, aferez materyali ve KK ürünlerinin bir kısmına da ficol-gradient yöntemi uygulanarak 5. Katmanları ve MNH katmanları izole edilmiştir. Bu katmanlardaki VSEL kıyaslaması için western blot yöntemi kullanılmıştır. Western blot yöntemi VSEL çalışmalarında bu güne kadar hiç kullanılmamış bir yöntemdir. Genellikle çalışmalar mRNA miktarını gösteren RT-PCR üzerinden yapılmıştır. Fakat RT-PCR genellikle western ile de doğrulama gerektiren bir yöntemdir. Çünkü RT-PCR ile bakılan mRNA düzeyi, her ne kadar bir proteinin bilgisini transkripsiyonal düzeyde verse de proteine dönüşen miktar (translasyonel) hakkında bilgi verememektedir. mRNA'dan protein sentezi sırasında yanlış, eksik yada sentezlenmeyen proteinler olabilmektedir. Bu yüzden genellikle RT-PCR western blot ile desteklenmelidir. Bu bilgiler ile bu tez çalışmasında tüm kan materyallerinde MNC ve 5. Katman ve fikolle ayrılmamış total hücre grubuna western blot yapılmıştır. Western blot ile Oct4 ve NANOG proteinlerinin varlığı incelenmiştir. Daha sonra immünfloresan ile Oct4, NANOG, CXCR4 ve SSEA-4 varlığını araştırılmıştır.

Western blot sonuçlarına göre tüm materyallerin lizis ve MNC katmanında Oct4 varlığı gösterilmiştir. 5. Katmanda varlığı gösterilememiştir. 5. Katman çok az miktarda hücreden oluşmaktadır ve bu da western blot için gerekli olan total protein miktarını genel olarak sağlayamamasından görüntü elde etmek zor olmaktadır. Bu sonuçlar oldukça ilginç olmakla birlikte başka soruları da beraberinde getirmektedir. Özellikle periferik kanda PKH belirteci olan bir transkripsiyon faktörünün varlığının gösterilmesi bizi Oct4 hakkında daha kapsamlı bir araştırma yapmaya itmiştir.

Bu çalışmada bulunan sonuçlara benzer sonuçları 2006 yılında Zangrossi ve arkadaşları PK MNH'lerinde Oct4 varlığını PCR, Western blot ve immünfloresan

yöntemlerle göstermişlerdir ve Oct4'un saf bir pluripotent kök hücre belirteç olup olmadığını tartışmalı bir konu olabileceğine değinmişlerdir (Zangrossi ve ark. 2007). Fakat aynı yıl Lee ve arkadaşları Oct4 izoformlarını inceleyerek Oct4 'un yapısını anlayama yönelik önemli bilgiler edinmişlerdir (Lee ve ark. 2006).

Oct4 bilindiği üzere bir transkripsiyon faktörüdür ve varlığı hücrenin farklılaşmasını engellemektedir. Oct4 baskılanınca hücre farklılaşmaya başlar. Bu Oct4'un bilinen pluripotent özelliğidir. Oct4 POU domain ailesinin bir üyesidir ve insanda Oct4A ve Oct4B izoformları olmak üzere 2 formu bulunmaktadır (Cauffman ve ark. 2006).

Lee ve arkadaşlarının sonuçlarına göre; Oct4 mRNA'sı 3 bölümden oluşmaktadır. N-terminal kısmı, POU DNA bağlanma bölgesi ve C-terminal kısmı. Oct4A ve Oct4B mRNA'larının POU ve C-terminal kısmı aynı olmasına rağmen N-terminal kısımları farklıdır. Oct4B N-terminal kısmında yaklaşık 95 amino asitlik bir eksik bulunmaktadır. Bu eksiklik Oct4B izoformunun DNA ya bağlanma yeteneğini inhibe etmektedir. Bunun aksine Oct4A DNA'ya bağlanabilmekte ve pluripotensiyi koruyabilmektedir. Aynı zamanda embriyonik hücre hatlarında iki isoformda bulunmasına rağmen Oct4A miktarı, Oct4B miktarına oranla oldukça yüksek olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda Oct4A nukleusda lokalize olurken Oct4B sitoplazmada görülmektedir.

Liedtke ve arkadaşları 2007 yılında Oct4 varlığını PK ve KK MNH'lerinde RT-PCR ile gösterirken primer seçiminin çok önemli olduğunu yanlış primer seçimi ile Oct4A ile Oct4B izoformlarının birbirine karıştırılabileceğini ve Zangrossi'nin yaptığı çalışmada da bulduklarının aslında Oct4B izoformu olduğunu göstermişlerdir (Liedtke ve ark. 2007; Kotoula ve ark 2008).

Daha sonraki çalışmalarda bir kısım kanserli hücre hattında ve HKH'lerde Oct4B izoformunun varlığı gösterilmiştir (Tai ve ark. 2005; Atlasi ve ark. 2008; Redshaw ve Strain 2010).

Bunlar doğrultusunda western blot sonuçlarında bulunan Oct4 varlığının Oct4B izoformu olduğunu düşünmekteyiz. İmmunofloresan görüntüler de bu kanıyı

desteklemektedir. Yaptığımız immünfloresan boyamalarda Oct3/4'un sitoplazmik lokasyona sahip olduğunu görmekteyiz. Western blot sonuçlarıyla beraber ele alınınca PK, mobilize PK ve KK 'da Oct4B izoformunun yüksek miktarda ifade edildiğini söylemenin yanlış olmayacağını düşünüyoruz. Fakat her materyalde ekspresyon olmasına rağmen yapılan izolasyon işlemleriyle miktarının azaldığı gösterilmiştir. Fikol ile ayrılan katmanlarda Oct4 ifadesinin azaldığını yada yok olduğu tüm 3 kan materyalinde de görülmektedir. Bu da fikolün hücre kaybına neden olduğunu doğrulamaktadır. Yada MNC katmanı dışında kalan bir hücre gurubunun daha Oct4B ifade ettiğini göstermektedir. Bunun anlaşılması için daha ileri testler yapılmalıdır.

Oct4B izoformunun tam olarak görevi, hangi hücrelerde bulunduğu, Oct4A ile olan etkileşimlerinin ne olduğu bilinmemektedir. Bu henüz aydınlatılmamış bir konu olarak durmaktadır ve daha kapsamlı araştırmalar gerektirmektedir.

Western blot ile incelediğimiz bir öteki antikor ise NANOG proteindir. NANOG pluripotensiyi sağlamada önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Oct4 ve Sox2 genleriyle iş birliği halinde hücrenin pluripotent kalmasını sağlar. NANOG pluripotent özelliğin sürdürülmesini sağlar, NANOG miktarı azaldığında pluripotansiyel özellik azalır.

Yapılan western blot deneylerinde mobilize PK ve KK da yüksek miktarda NANOG ifadesi görülürken PK 'da çok daha az bir NANOG anlatımı gözlemledik. Fakat NANOG antikorunun western blot sonuçlarında birden fazla bant verdiğini ve tahmin edilen kDa'dan farklı noktalarda da bantlar oluşturduğunu belirledik. Bu NANOG'un çabuk degrade olduğunu, post translasyonel modifikasyonlara uğrayarak bu şekilde bir bant dizisi verdiğini düşündürmektedir (Ambady ve ark. 2010).

PK'daki varlığı tartışmalı olsa da, KK ve mobilize PK'da yüksek oranda ifade olması NANOG için gene aynı soruyu akla getirmektedir. NANOG saf bir kök hücre belirteci midir?

2004 yılında Holland ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NANOG proteinin 11 tane psödogeni olduğunu göstermişlerdir. Bu 11 genin hepsinin fonksiyonel bir NANOG proteini oluşturup oluşturamadığını araştırmışlardır. NANOGP1 ve NANOGP8 dışında geri kalan NANOGP2, NANOGP3, NANOGP4, NANOGP5, NANOGP6, NANOGP7, NANOGP9, NANOGP10 ve NANOGP11 psödogenler eksik intronları, okuma çerçevesi içinde stop kodunu bulundurması veya okuma çerçevelerinin kayması gibi nedenlerle protein üretememektedirler. NANOGP1 ise duplike psödogendir. NANOG ile çok benzer ekson-intron organizasyonuna sahiptir ve fiziksel olarak da birbirlerine bağlıdırlar. Sekans dizimi %97 NANOG ile aynıdır. Fakat NANOGP1 dizisindeki bir nükleotidin değişimi ile dizinin başlarında stop kodonu oluşmaktadır. Dolayısıyla mRNA'sı düzgün bir protein kodlayamamaktadır. NANOGP8 okuma çerçevesine sahip olan ve fonksiyonel olabileceği düşünülen psödogendir (Booth and Holland 2004).

Hatano ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise farede NANOG proteinin western blot ile incelenmesinde antikorun kolaylıkta fragmente olup bir merdiven (ladder) şeklinde bant görüntüsü verdiğini ve bununda proteinin sürekli turnover geçirmesinden olabileceğini savunmuşlardır. Yaptıkları incelemelerde NANOG hücresel lokalizasyonunun fare embriyonik kök hücrelerinde çekirdekde olduğunu göstermişlerdir (Hatano ve ark. 2005).

Ambady ve arkadaşları 2010 da yaptıkları çalışmalarda NANOG ve NANOGP8'in farklılaşmış ve farklılaşmamış hücrelerdeki varlığını araştırmışlardır. İnsan embriyonik kök hücreleri, neonatal fibroblastlar, HeLa hücreleri (servikal kanser hücreleri), SH-SY5Y (nöroblastoma hücreleri), ve insan mezenşimal kök hücreleri embriyonik NANOG ifade ederken, erişkin fibroblastları, HUVEC hücreleri (endotel hücreleri), total kalp dokusu ve insan düz kas hücrelerinin sadece NANOGP8 ifade ettiğini görmüşlerdir. Aynı zamanda farklı hücre tiplerinde NANOG proteinin farklı hücresel lokalizasyonuna sahip olduğunu saptamışlardır. NANOG yada NANOGP8 ifade etmelerinin lokalizasyon açısından anlamlı bir farkı olmadığını iki formunda farklı hücrelerde sitoplazmik yada nükleik olabileceğini ve lokalizasyonun hücre tipine göre değiştiğini gözlemlemişlerdir. Western blot ile

incelediklerinde ise NANOG proteinin birden fazla bant vermesinin post translasyonel modifikasyonlardan kaynaklanabileceğini savunmuşlardır (Ambady ve ark 2010).

2010 yılında yapılan bir çalışmada ise Levasseur ve arkadaşları farede NANOG proteinini 3 adet varyantı olduğunu saptamışlardır. Alternatif bölünme ile 3 farklı NANOG proteini oluştuğunun ve 3 varyantında kendini yenilemeyi koruyabildiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda bu farklı varyantların farklı kDa'a sahip olduğundan western blot'da görünen ladder formuna b varyantların sebep olabileceğini bildirmişlerdir. 4 farklı fare embriyonik kök hücre hattı kullanarak yaptıkları çalışmalarında NANOG isoformlarının sitoplazmada da bulunduğunu göstermişlerdir (Levasseur ve ark 2011).

NANOG proteinin kanserli hücre hatlarında varlığının gösterilmesinin artmasıyla birlikte bu alanda çalışmalarda artmıştır. 2012 yılında Gu ve arkadaşları insan servikal kanser hücrelerinde (SCC) NANOG varlığını göstermişlerdir. Çeşitli safhalardaki SCC'lerde NANOG varlığını araştırmışlardır. NANOG varlığını SCC'lerde sitoplazmik olarak göstermişlerdir. NANOG hücresel lokalizasyonun hücre tipine ve kanserin safhasına göre değiştiğini bildirmişlerdir. SCC'den türetilmiş mezenşimal kök hücrelerinde sitoplazmik NANOG'un pozitif olduğunu göstermişlerdir (Gu ve ark 2012).

Tüm bu çalışmaların ışığında, bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında, NANOG proteinin periferik kanda bulunduğu söylenebilir. Özellikle mobilize PK'da ekspresyonunun yüksek olduğu western sonuçlarında görülmektedir. Bu çalışmada, NANOG proteinin western blotta bir ladder oluşturduğunu gözlemleyerek, western blot için optimize etmesi zor bir antikor olduğunu düşünüyoruz. Western blot sonuçlarına göre, belirli katmanlarda farklı ağırlıkta bantlar görmekteyiz; bu da NANOG proteinin farklı hücre gruplarında farklı post translasyonel modifikasyonlara uğrayabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda farklı NANOG varyantlarında farklı hücre gruplarında bulunabileceğini göstermektedir. Bunlar hakkında kesin kaniya varabilmek için ayrıca gen düzeyinde PCR gibi ilave testlerle de gösterilmesi gerekmektedir.

KK'da üç katmanda da varlığı gösterildiği halde en yüksek olarak lizisde görülmektedir. Mobilize PK'da ise lizis katmanında ekspresyonu maksimumdayken öteki katmanlarda çok azalmış durumdadır. Normal PK'da ise lizis katmanında bir ekspresyon görülmezken, MNC katmanında NANOG ifade edilmektedir. 5. Katmanda ise tüm örneklerde 27 kDa yakınlarında bir bant grubu gözlemlenmiştir. Normal NANOG bantından çok aşağılarda böyle bir bantın olması ve tüm PK grubunda bu bantın görünmesi belki NANOG proteinin fragmente olarak böyle bantlar vermiş olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak 5. Katmanda protein miktarının çok az olması hücre grubu hakkında yorum yapmayı kısıtlı bir alana itmektedir.

Yaptığımız immünfloresan çalışmalarımızda ise hem sitoplazmik hemde nükleik NANOG varlığını görmekteyiz. PK, KK ve mobilize PK'da tüm katmanların da sitoplazmik varlığının gösterilmesinin yanısıra KK'da hem nükleik hem de sitoplazmik NANOG görünmektedir. Bu verilerde bize NANOG proteinin hücresel lokalizasyonunun, belkide hücrenin primitif olmasıyla değişiyor olabileceğini düşündürmektedir. Hücre primitiflikten farklılaşmaya doğru ilerledikçe NANOG proteinin varlığının nukleustan sitoplazmaya doğru değiştiği düşüncesini akıllara getirmektedir.

Şimdiye kadar NANOG varlığı embriyonik kök hücrelerde, primordial germ hücrelerinde, insan germ hücre tümörlerinde, mezenşimal kök hücrelerde, testis kanserinde, meme karsinomalarında, fetal testisde, malin servikal epitel hücrelerinde ve erişkin insan fibroblastlarında gösterilmiştir (Ezeh ve ark. 2005; Page ve ark. 2009; Alvarez ve ark. 2010; Eberle ve ark. 2010; Gu ve ark. 2012). NANOG proteininin başka hangi hücrelerde olduğu yada psödogeni olan NANOGP8'in nasıl bir etki yarattığını bilmiyoruz. Sitoplazmik yada nükleik olmasının nasıl bir değişikliğe veya fonksiyona neden olduğunu, hangi mekanizmalarla sitoplazmik NANOG oluştuğunu bilmiyoruz. Bu konuda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Genel olarak değerlendirmek gerekirse 3 materyalde de 5. Katmanda Bhartiya ve ekibinin gösterdiği derecede yüksek pluripotent özellikte, rejenerasyon

kapasitesi yüksek yeterli miktarda hücre grubuna rastlamadık. 5. Katmanda pluripotent özellik gösteren hücreler var olsa da yeterli miktarda ve sayıda bulunmadıklarını ve transplantasyon başarısını arttırabilecek düzeyde olamayacaklarını düşünmekteyiz.

3 materyal içinde Lizis ve MNC katmanları ele alınırsa, fikol kullanımının hücre miktarını azalttığını, hücre kaybına neden olduğunu biz de gösterdik. VSEL hücrelerini ve hematopoetik kök hücreleri korumak ve materyaldeki bütünü değerlendirmek istiyorsak fikol kullanımını sınırlamak zorundayız.

VSEL hücrelerinin varlığı ve miktarı hakkında western blot ile kesin olarak bir yargıya varmak pek mümkün görünmemektedir. Bunun nedeni kullanılan pluripotent belirteçlerin çeşitli izoformlarının olması ve bu izoformların western blot ile bir birinden ayırt edilmesinin mümkün olmaması böyle bir yargıya varmayı zorlaştırmaktadır.

Akış sonuçlarına göre bakıldığında pluripotent belirteçleri taşıyan hücre miktarı Zuba-Surma ve arkadaşlarının gösterdiği gibi debris kısmında daha fazla görünmektedir. Bu hücrelerin küçük olmaları debrisle karışmalarına ve bu yüzden gözden kaçmalarına neden olmaktadır.

VSEL hücrelerinin karakterlerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Bu hücrelerin kendini yenileyebilme kapasitesi, buldukları dokular ve işlevlerinin anlaşılması sonunda klinik kullanım potansiyellerinin de yolu açılacaktır.

KAYNAKLAR

Alvarez, A., Hossain, M., Dantuma, E., Merchant, S. ve Sugaya, K. (2010). Nanog overexpression allows human mesenchymal stem cells to differentiate into neural cells. *Neuroscience and Medicine*, **1**, 1-13.

Ambady, S., Malcuit, C., Kashpur, O., Kole, D., Holmes, W.F., Hedblom, E. ve ark. (2010). *The International of Developmental Biology*, **54**, 1743-1754.

Atlasi, Y., Mowla, S.J., Ziaee, S.A.M., Gokhale, P.J. ve Andrews, P.W. (2008). OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells*, **26**, 3068-74.

Barriga, F., Ramirez, P., Wietstruck, A. ve Rojas, N. (2012). Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res*, **45**, 307-316.

Barry, F.P. ve Murphy, J.M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **36**, 568-584.

Bhartiya, D., Shaikh, A., Nagvenkar, P., Kasiviswanathan, S., Pethe, Prasad., Pawani, H., ve ark. (2012). Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. *Stem Cell and Development*, **21(1)**.

Bhartiya, D., Unni, S., Parte, S. ve Anand, S. (2013). Very Small Embryonic-Like Stem Cells: Implications in Reproductive Biology. *BioMed Research Internation*, **2013**.

Bongso, A. ve Lee, E.H. (2005). Stem Cells From Bench to Bedside. İçinde A.Bongso ve E.H.Lee (Ed) *Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources*. World Scientific Publishing; 1-14

Booth, H.A.F. ve Holland, P.W.H. (2004). Eleven daughters of NANOG. *Genomics*, **84**, 229-238.

Cauffman, G., Liebaers, I., Steirteghem, A.V. ve Velde, H.V.D. (2006). POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells*, **24**, 2685-91.

Chang, Y., Tien, K., Wen, C., Hsieh, T. ve Hwang, S. (2014). Recovery of CD45(-)/Lin(-)/SSEA-4(+) very small embryonic-like stem cells by cord blood bank standard operating procedures. *Cytotherapy*, **0**, 1-6.

Danova-Alt, R., Hieder, A., Egger, D., Cross, M. ve Alt, R. (2012). Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. *Plos One*, **7(4)**.

Dilek, İ., Arslan, Ö. Ve Gürman, G. (1998). Allogeneik periferik kök hücre transplantasyonu. *Van Tıp Dergisi*, **5(3)**, 183-187.

Eberle, I., Pless, B., Braun, M., Dingermann, T. ve Marschalek, R. (2010). Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG 2 in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Research*, **38(16)**, 5384-5395.

Ezeh, U.I., Turek, P.J., Reijo, R.A. ve Clark, A.T. (2005). Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer*, **104**, 2255-65.

Gordon, M.Y., Levicar, N., Pai, M., Bachelier, P., Dimarakis, I., Al-Allaf, F. ve ark. (2006). Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*, **24**, 1822-1830.

Gu, T., Liu, S. ve Zheng, P. (2012). Cytoplasmic NANOG- positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *The American Journal of Pathology*, **181(2)**, 652-660.

Halasa, M., Baskiewicz-Masiuk, M., Dabrkomska, E. ve Machalinski, B. (2008). An efficient two-step method to purify very small embryonic-like (VSEL) stem cells from umbilical cord blood. *Folia Histochemical Cytobiology*, **46(2)**, 239-243.

Hatano, S., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T. ve ark. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mechanisms of Development*, **122**, 67-79.

Heider, A., Danova-Alt, R., Egger, D., Cross, M. ve Alt, R. (2012), Murine and human very small embryonic-like cells: A perspective. *Cytometry Part A*, **83A**, 72-75.

Jones, R., Lebkowski, L. ve Mcniece, I. (2010). Stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, **16**, 115-118.

Kaufman, D.S. (2009). Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood*, **114(17)**, 3513-3521.

Kassmer, S.H. ve Krause, D.S. (2013). Very small embryonic-like stem cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Molecular Reproduction and Development*, **80**, 677-690.

Kim, Y., Jeong, J., Kang, H., Lim, J., Heo, J., Ratajczak, J. ve ark. (2014). The molecular nature of very small embryonic-like stem cells in adult tissues. *International Journal of Stem Cells*, **7(2)**, 55-61.

Kolios, G. ve Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, **85**, 3-10.

Kotoula, V., Paramichos, S.I. ve Lambropoulos, A.F. (2008). Revisiting Oct4 expression in peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cells*, **26**, 290-291.

Kucia, M., Reca, R., Jala, V.R., Dawn, B., Ratajczak, J. ve Ratajczak M.Z. (2005a). Bone marrow as a home of heterogenous population of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia*, **19**, 1118-1127.

Kucia, M., Ratajczak, J. ve Ratajczak M.Z. (2005b). Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous – That is the question. *Experimental Hematology*, **33**, 613-623.

Kucia, M., Reza, R., Campbell, F.R., Zuba-Surma, E., Majka, M., Ratajczak, J. ve Ratajczak, M.Z. (2006) A population of very embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺ SSEA-1⁺ Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, **20**, 857-869.

Kucia, M., Halasa, M., Wysoczynski, M., Baskiewicz-Masiuk, M., Moldenhawer, S., Zuba-Surma, E. ve ark. (2007). Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4⁺/SSEA-4⁺/Oct-4⁺ very small embryonic-like cells purified from human cord blood – preliminary report. *Leukemia*, **21**, 297-303.

Kucia, M., Wysoczynski, M., Wu, W., Zuba-Surma, E.K., Ratajczak, J. ve Ratajczak, M.Z. (2008). Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*, **26**, 2083-2092.

Lee, J., Kim, H.K., Rho, J., Han, Y. ve Kim, J. (2006). Human Oct4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 33554-65.

Levasseur, D.N., Das, S. ve Jena, S. (2011). Alternative splicing produces nanog protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 42690-42703.

Liedtke, S., Enczmann, J., Walclawczyk, S., Wernet, P. ve Kögler, G. (2007). Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell*, **1**, 364-366.

Loos, H., Blok-Schut, B., Van Doorn, R., Hoksbergen, R., Riviere, A.B. ve Meerhof, L. (1976). A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradient. *Blood*, **48**, 731-742.

Mierzejewska, K., Heo, J., Kang, J.W., Kang, H., Ratajczak, J., Ratajczak, M.Z., Kucia, M. ve Shin, D. (2013). Genome-wide analysis of murine bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells reveals that mitogenic growth factor signaling pathways play a crucial role in the quiescence and ageing of these cells. *International Journal Of Molecular Medicine*, **32**, 281-290.

Page, R., Ambady, S., Holmes, W.F., Vilner, L., Kole, D., Kashpur, O. ve ark. (2009). Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning and stem cells*, **11(3)**, 417-425.

Parte, S., Bhartiya, D., Telang, J., Daithankar, V., Salvi, V., Zaver, K. ve ark. (2011). Detection, characterization and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cells and Development*, **20(8)**, 1451-1464.

Parker, G.C. (2014). Very small embryonic-like stem cells: A scientific debate?. *Stem Cells and Development*, **23(7)**, 687-688.

Papadopoulus, E.B. ve Jakubowski, A.A. (2006). Novel approaches in allogenic stem cell transplantation. *Current Oncology Reports*, **8(5)**, 325-336.

Pazhanisamy, S. (2013). *Adult Stem Cell and Embryonic Stem Cell Markers*. Baylor College of Medicine, <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.200>

Perutelli, P., Catellani, S., Scarso, L., Cornaglia-Ferraris, P. ve Dini, G. (1999). Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. *Vox Sanguinis*, **76**, 237-240.

Ratajczak, M.Z. (2008a). Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Hematology*, **15**, 293-300.

Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Wojakowski, W., Kucia, M. ve Ratajczak, J. (2008b). Bone marrow – Home of versatile stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **35**, 248-259.

Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Shin, D., Ratajczak, J. ve Kucia, M. (2008c). Very small embryonic-like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity. *Experimental Gerontology*, **43**, 1009-1017.

Ratajczak, M.Z., Marycz, K., Poniewierska-Baran, A., Fiedorowicz, K., Zbucka-Kretowska, M. ve Moniusko, M. (2014a). Very small embryonic-like stem

cells as a novel developmental concept and the hierarchy of stem cell compartment. *Advances of Medical Sciences*, **59**, 273-280.

Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Wojaskowski, W., Suszynska, M., Liu, R., Ratajczak, J. ve ark. (2014b). Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia*, **28**, 473-484.

Redshaw, Z. ve Strain, A. (2010). Human hemotopoietic stem cells express Oct4 pseudogenes and lack the ability to initiate Oct4 promoter-driven gene expression. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, **9**.

Rocha, V., Gluckman, E. ve Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Grup. (2006). Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **12**, 34-41.

Sovalat, H., Scrofani, M., Eidenschenk, A., Pasquet, S., Rimelen, V. ve Henon, P. (2011). Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34+/CD133+/CXCR4+/ Lin-CD45- cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Experimental Hematology*, **39**, 495-505.

Szade, K., Bukowska-Strakova, K., Nowak, W.N., Szade, A., Kachamakova-Trojanowska, N., Zukowska, M. ve ark. (2013). Murine Bone Marrow Lin-Sca-1+CD45- Very Small Embryonic-Like (VSEL) Cells Are Heterogeneous Population Lacking Oct-4A Expression. *Plos One*, **8(5)**, e63329.

Sahin, F., Saydam, G. ve Omay, S.B. (2005). Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, **1(15)**, 48-56.

Tai, M., Chang, C., Olson, L.K. ve Trosko, J.E. (2005). Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **26(2)**, 495-502.

Tap, Ö., İstek, B. ve Çelik, G. (2012). Mezenkimal kök hücreler. *Gazikök*, **1**.

Ural, A.U. (2012). *Hematopoetik kök hücre*. 7. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu Ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi.

Weissman, I.L., Miyanishi, M., Mori, Y., Seita, J., Chen, J.Y., Karten, S. ve ark. (2013). Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic-like stem cells?. *Stem Cell Reports*, **1**, 198-208.

Vatansever, S.H. (2009). Embriyonik kök hücreler. *Sağlıkta Birikim*, **1(5)**, 25-44.

Vats, A., Bielby, R.C., Tolley, N.S., Nerem, N. ve Polak, J.M. (2005). Stem cells. *Lancet*, **366**, 592-602.

Yamanaka, S., Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., ve ark. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, **113**, 631-642.

Yamanaka, S. ve Takahashi, K. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.

Yamanaka, S., Tanabe, K., Kazutoshi Takahashi, K., (2014). Induction of pluripotency by defined factors. *Proc. Jpn. Acad*, **90**, 83-96.

Yanagisawa, M. (2011). Stem cell glycolipids. *Neurochem Res*, **36**, 1623-1635.

Yeşilipek, M.A. (2014). Çocuklarda hematopoetik kök hücre nakli. *Türk Pediatri Arşivi*, **49**, 91-98.

Zuba-Surma, E.K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Dawn, B., Hall, B., Singh, R. ve ark. (2008). Morphological characterization of very small embryonic-like stem cells (VSELs) by ImageStream system analysis. *J. Cell. Mol. Med.*, **12(1)**, 292-303.

Zuba-Surma, E.K., Kucia, M., Ratajczak, J. ve Patajczak, M.Z. (2009). "Small stem cells" in adult tissues: Very small embryonic-like stem cells (VSELs) Stand up. *Cytometry*, **75(1)**, 4-13.

Zangrossi, S., Marabese, M., Broggin, M., Giordano, R., D'Erasmus, M., Montelatici, E. ve ark. (2007). Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells*, **25**, 1675-80.

Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L. ve Ma, L. (2012). Embryonic stem cells. *Molecules*, **17**, 6196-6236.

EK 1 : ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 724

Tarih : 20.06.2013


Konu : Prof.Dr.Serap KURUCA hk,

Sayın, Prof.Dr.Serap KURUCA
Fizyoloji Anabilim Dalı

İlgi :Fizyoloji Anabilim Dalının 07/05/2013 gün ve 120 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Dolay Damla ÇELİK'in yürüteceği 2013/709 dosya numaralı "Çeşitli hematopoetik kaynaklardan küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin (Very small embryonic-like stem cells - VSELs) saflaştırılması ve tanımlanması" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 07/06/2013 gün ve 11 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itifetikkurul@istanbul.edu.tr.

BASVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Çeşitli hematopoetik kaynaklardan küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin (Very small embryonic-like stem cells - VSELs) saflaştırılması ve tanımlanması"		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Serap KURUCA		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Fizyoloji		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı		
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>		
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz : Deneysel Araştırma			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLAR ARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	20/05/2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>	Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI GÖNÜLLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	ILAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
Diğer:	<input checked="" type="checkbox"/>	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirilmesine Dair Belge, CV, CD				
KARAR BELGELERİ	Karar No:11	Tarih: 07/06/2013				
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında görevli Prof.Dr.Serap KURUCA'nın sorumluluğunda ve Yüksek Lisans Öğrencisi Duyay Damla ÇELİK'in yardımıyla yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerçekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıyla katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.09.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki *	Katılım **	İmza		
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyostatistik	İÜ, İstanbul Tıp Fakültesi Biyostatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* -Araştırma ile İlişki
** -Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulun onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli izin alınması gerekmektedir.

EK 2 : GÖNÜLLÜ ONAY FORMLARI

GÖNÜLLÜ OLURU FORMU

Sayın Bay/Bayan,

Size İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmekte olan "Çeşitli hematopoetik kaynaklardan küçük embriyonik kök hücrelerin (Very small embryonic-like stem cells - VSEs) saflaştırılması ve tanımlanması" adlı araştırmamız hakkında bilgi vermek üzere ulaştığımız durumdayız.

Bildiğiniz gibi kan üretilemeyen bir dokudur ve halen tek kaynağı sağlıklı bağışçılardır. Kan bağışı hem toplumsal hem kişisel açıdan çok önemlidir. Yalnız acil ihtiyaçlarda değil, aynı zamanda devam eden birçok hematolojik çalışmalarda da temel materyal olan kan, siz gönüllü bağışçılar sayesinde temin edilebilmektedir. Araştırmamızda kullanılmak üzere bağışladığınız kandan bir tüp temin edilecektir. Alacağımız numune kök hücre araştırmamızda kullanılacaktır. Size yapılacak olan kan alma işlemi dışında ekstra bir işlem yapılmayacaktır.

Araştırma nedeniyle size herhangi bir zarar verilmeyecek ve herhangi ilaç ya da madde kullanılmayacaktır. Bu araştırmadaki bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır. Sizden araştırma esnasında ya da neticesinde herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız durumunda size ek bir ücret de verilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmayı kabul etmeyebilir ya da daha sonradan katılmaktan vazgeçebilirsiniz.

Bu metni tam olarak okuyup anladığınıza ve çalışmada gönüllü olarak yer almayı kabul ettiğinize dair aşağıdaki boş yerleri lütfen doldurunuz.

Bu araştırmada yer almanızdan ötürü teşekkür eder, size sağlıklı bir yaşam dileriz.

Temas Adresi: İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Serap Kuruca
Çapa 34390 İstanbul

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

GÖNÜLLÜ OLURU FORMU

Sayın Bay/Bayan,

Size İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmekte olan "Çeşitli hematopoetik kaynaklardan küçük embriyonik kök hücrelerin (Very small embryonic-like stem cells - VSELS) saflaştırılması ve tanımlanması" adlı araştırmamız hakkında bilgi vermek üzere ulaşmış durumdayız.

Bildiğiniz gibi aferez işlemi, cihaza bağlı bağışçısı ile cihaz arasında, hasta için gereken kan bölümü elde edilene kadar devam eden bir kan alıp-verme işlemidir. Cihaz bağışçısının kanını küçük miktarlarda alarak gerekli kısmı ayırır ve kalan kanı bağışçıya geri verir. Bu sistemde bağışçıdan yalnızca hasta için gerekli olan kan bölümü alındığından önemli bir sorun oluşmaz. Aferez işleminde kan hiçbir şekilde makinenin herhangi bir parçasına değmez ve her hasta için tek kullanımlık steril setler kullanılır. Araştırmamızda aferez işleminiz sonucu normal şartlarda atılan tek kullanımlık bu set kullanılacaktır. Alacağımız numune yapacağımız kök hücre araştırmamızda kullanılacaktır. Kök hücreler günümüzde tedavisi olmayan hastalıklara karşı yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesinde, var olan tedavilerin verimini arttırmada, canlıların moleküler düzeyde yapılarının daha iyi anlaşılmasında büyük öneme sahiptir. Yetişkinlerde kök hücrelerin varlığı birçok dokuda kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamız, kan dokusunda var olduğu düşünülen ve embriyonik benzeri olan kök hücreleri izole etmeyi amaçlamaktadır.

Size yapılacak olan aferez işlemi dışında ekstra bir işlem yapılmayacaktır. Çalışmamız aferez işlemi dışında ek bir süre gerektirmemektedir. Araştırma nedeniyle size herhangi bir zarar verilmeyecek ve herhangi ilaç ya da madde kullanılmayacaktır. Bu araştırmadaki bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır. Sizden araştırma esnasında ya da neticesinde herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız durumunda size ek bir ücret de verilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmayı kabul etmeyebilir ya da daha sonradan katılmaktan vazgeçebilirsiniz.

Bu metni tam olarak okuyup anladığınıza ve çalışmada gönüllü olarak yer almayı kabul ettiğinize dair aşağıdaki boş yerleri lütfen doldurunuz.

Bu araştırmada yer almanızdan ötürü teşekkür eder, size sağlıklı bir yaşam dileriz.

Temas Adresi: İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Serap Kuruca
Çapa 34390 İstanbul

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

GÖNÜLLÜ OLURU FORMU

Sayın Bay/Bayan,

Size İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmekte olan "Çeşitli hematopoetik kaynaklardan küçük embriyonik kök hücrelerin (Very small embryonic-like stem cells - VSELs) saflaştırılması ve tanımlanması" adlı araştırmamız hakkında bilgi vermek üzere ulaştığımız durumdayız.

Anne karnında bebek ile anne arasındaki besin ve oksijen alışverişi plasenta tarafından sağlanır. Bebek, göbek kordonu ile plasenteye bağlıdır. Doğum sürecinin tamamlanmasından kısa süre sonra plasenta görevini tamamlayarak rahim dışına atılır. "Kordon kanı" olarak isimlendirilen kan, bebeğin doğumundan sonra göbek kordonu içinde kalan kandır. Kordon kanı bebek doğar doğmaz ilk 10 dakika içinde, göbek bağı kesildikten sonra göbek bağının plasenta tarafında kalan bölümünden alınır. Bu kan, toplanmadığı tüm durumlarda plasenta ile birlikte atıldığından, toplanması normal doğum prosedürünü ve bebeği herhangi bir şekilde etkilemez. Sadece birkaç dakika alan kordon kanının toplanması işlemi; basit, tehlikesiz ve acı vermeyen bir uygulamadır.

Araştırmamızda kordon kanı kullanmamızın nedeni, dolaşımdaki kana oranla içerisinde daha fazla kök hücreler bulundurmasıdır.

Araştırma nedeniyle size herhangi bir zarar verilmeyecek ve herhangi ilaç ya da madde kullanılmayacaktır. Bu araştırmadaki bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır. Sizden araştırma esnasında ya da neticesinde herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız durumunda size ek bir ücret de verilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmayı kabul etmeyebilir ya da daha sonradan katılmaktan vazgeçebilirsiniz.

Bu metni tam olarak okuyup anladığınıza ve çalışmada gönüllü olarak yer almayı kabul ettiğinize dair aşağıdaki boş yerleri lütfen doldurunuz.

Bu araştırmada yer almanızdan ötürü teşekkür eder, size sağlıklı bir yaşam dileriz.

Temas Adresi: İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Serap Kuruca
Çapa 34390 İstanbul

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Dolay Damla	Soyadı	Çelik
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	25.09.1990
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	
Email	dolaydamla@gmail.com	Tel	0535 383 35 32

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2012
Lise	İstek Özel Acıbadem Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Yeniüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.	2014-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi	80	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,5	76	67,4

Bilgisayar Bilgisi

Program7	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi
GraphPad Prism	İyi
Mac OS X	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

-

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, latin dansları, sinema.