



**GÖBEK KORDONUNDA EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VARLIĞININ
BELİRLENMESİ VE TİPLENDİRİLMESİ**

Firdevs USUL

Aralık 2011

DENİZLİ

**GÖBEK KORDONUNDA EMBRİYONİK KÖK HÜCRE
VARLIĞININ BELİRLENMESİ VE TİPLENDİRİLMESİ**

Pamukkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Firdevs USUL

Danışman: Prof. Dr. Recep KUTLUBAY

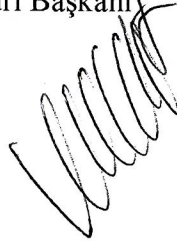
Aralık, 2011

DENİZLİ

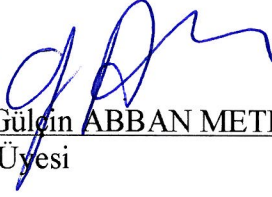
YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Firdevs USUL tarafından, Prof. Dr. Recep KUTLUBAY yönetiminde hazırlanan “Göbek Kordonundaki Embriyonik Kök Hücrelerin Varlığının Gösterilmesi ve Tiplendirilmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aziz POLAT
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Recep KUTLUBAY
Jüri Üyesi(Danışman)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/2/12 tarih ve 12/5-5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür



TEŞEKKÜR

Tezimin oluşturulmasındaki yardımlarından dolayı tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Recep KUTLUBAY'a ve çalışmalarımızın tüm aşamalarında destek, bilgi ve önerilerini bizden esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE' ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa başlamamı sağlayan, destek ve imkanlarını benden esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Osman Özdel'e ve Dr. Lale Özdel'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım süresince, birikimleri ile yanımda olduklarını hissettiren hocalarım Sayın Prof. Dr. A. Çevik TUFAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Nazan KESKİN'e, tezimin deneysel aşamalarında gerekli olan materyalleri sağlamamda bana yardımcı olan Pamukkale Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı asistan doktorlarına, tezimin histolojik preparasyon aşamalarında tecrübelerinden yararlandığım Sağlık Teknikeri Erdinç KARATAŞ'a, Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve tezimin yapılmasında emeği geçen değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren aileme, bu süreçteki destek ve sabırları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmaların yapılması ve bulguların analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza:

Öğrenci Adı Soyadı: Firdevs USUL

ÖZET**GÖBEK KORDONUNDA EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VARLIĞININ
BELİRLENMESİ VE TİPLENDİRİLMESİ****USUL, Firdevs****Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Recep KUTLUBAY****Aralık 2011, 54 Sayfa**

Bu tezde kök hücre belirteçlerinden Oct3/4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, TRA1-80, TRA1-60, CD34, CD45, CD73, CD105 ve STRO-1 ifadesi kordon kanı mononükleer hücre tabakasında incelendi.

Çalışmada önceden izin alınmış, sağlıklı vericilerden (n=11) kordon kanı alındı. Mononükleer hücre tabakasında Oct3/4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, TRA1-81, TRA1-60, CD34, CD45, CD73, CD105 ve STRO-1 ifadeleri immünohistokimyasal boyama yapılarak araştırıldı ve resimlendi.

SSEA-1, SSEA-3, TRA1-60, CD34, CD45, CD105 ve STRO-1 ifadesi mononükleer hücre tabakasında pozitif, Oct3/4, Nanog, CD73, TRA1-81 ifadesi ise negatifti.

Kordon kanı; kemik iliği ve çevre kanı gibi dokularla kıyaslandığında daha uzun telomere, daha yüksek proliferatif kapasiteye sahip kök hücre içeriği, immün yapılanma yönünden henüz timus eğitimini tamamlamamış olması, başka bir insanda daha kolay uyum gösterme nitelikleri ile önemli avantajlara sahiptir. Ayrıca etik problemlere neden olmadığından embriyonik kök hücre ve hücre tabanlı tedaviler için alternatif bir kaynak oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kordon kanı, kök hücreler, embriyonik kök hücre

ABSTRACT**IDENTIFICATION OF PRESENCE AND TYPIIFICATION OF
EMBRYONIC STEM CELLS IN UMBLICAL CORD****USUL, Firdevs****M. Sc. Thesis in Histology and Embryology Department****Supervisor: Prof. Dr. Recep KUTLUBAY****December 2011, 54 pages**

In our study, we investigated stem cell markers including Oct3/4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, TRA1-81, TRA1-60, CD34, CD45, CD73, CD105 ve STRO-1 from expression from the cord blood mononukleer cell layer.

In this study, cord blood was collected from healty donors (n=11) which been permitted previously. Immunohistochemistry was used to examine the expression of Oct3/4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, TRA1-81, TRA1-60, CD34, CD45, CD73, CD105 and STRO-1 in cord blood mononukleer cell layer.

Cord bood mononukleer cells were positive for SSEA-1, SSEA-3, TRA1-60, CD34, CD45, CD105 and STRO-1, but cord bood mononukleer cells were negative for Oct3/4, Nanog, CD73, TRA1-81.

Cord blood is which have not yet comploted its tymus training in terms of structuring the immune, have some important adventages, such as can be adopt more easily to another person. In addition, cord blood is not cause ethical problems, and it is an alternative source for embryonic stem cell and cell-based therapies.

Keywords: Cord blood, stem cells, embryonic stem cells

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------------|
| TEŞEKKÜR..... | i |
| ÖZET..... | ii |
| ABSTRACT..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| TABLolar DİZİNİ | vii |
| SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI | 3 |
| 2.1. GÖBEK KORDONU..... | 3 |
| 2.1.1. Göbek kordonu embriyolojisi..... | 3 |
| 2.1.2. Göbek kordonu histolojisi | 4 |
| 2.2. KÖK HÜCRELER | 5 |
| 2.2.1. Kök hücre nedir? | 5 |
| 2.2.2. Kök hücrelerin genel özellikleri | 6 |
| 2.2.2.1. Farklanma (plastisite)..... | 6 |
| 2.2.2.2. Kendini yenileme, bölünme biçimleri ve kök hücre nişi | 8 |
| 2.2.2.3. Köklülük (stemness) | 12 |
| 2.3. GÖBEK KORDONU KÖK HÜCRELERİ | 14 |
| 2.3.1. Hematopoetik kök hücreleri | 15 |
| 2.3.2. Mezenkimal kök hücreleri..... | 15 |
| 2.3.3. Embriyonik kök hücreleri..... | 16 |
| 2.4. HİPOTEZ VE ÇALIŞMANIN AMACI..... | 16 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 18 |
| 3.1. KORDON KANI TOPLANMASI VE MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASININ TOPLANMASI | 18 |
| 3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA | 18 |
| 4. BULGULAR..... | 20 |
| 4.1. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA CD34 İFADESİ..... | 20 |
| 4.2. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA CD73 İFADESİ..... | 20 |
| 4.3. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA CD45 İFADESİ..... | 20 |
| 4.4. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA CD105 İFADESİ..... | 20 |
| 4.5. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA NANOG İFADESİ | 20 |
| 4.6. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA OCT3/4 İFADESİ | 20 |
| 4.7. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA SSEA-1 İFADESİ | 20 |
| 4.8. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA SSEA-3 İFADESİ | 20 |
| 4.9. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA STRO-1 İFADESİ..... | 20 |
| 4.10. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA TRA-1-60 İFADESİ | 21 |
| 4.11. MONONÜKLEER HÜCRE TABAKASINDA TRA-1-81 İFADESİ | 21 |
| 4.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 21 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 5. TARTIŞMA..... | 33 |
| 6. SONUÇL..... | 36 |
| 7. KAYNAKLAR | 37 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ..... | 41 |

ŒEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

| | |
|---|----|
| Œekil 1. Göbek kordonunun histolojik kesiti..... | 4 |
| Œekil 2. İki farklı kök hücre niŒi..... | 11 |

TABLolar DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo-1. Kökenlerine, farklanma etkinliklerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri..... | 6 |
| Tablo-2. Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (plastisite)..... | 8 |
| Tablo-3. Blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyon kök hücrelerinin yaygın kullanılan belirteçleri..... | 13 |
| Tablo-4. İmmünohistokimyasal boyamalara göre pozitif ve negatif hücre sayısı..... | 21 |

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------------|--|
| CD | Farklanma Kümeleri |
| DP | Dermal Papilla |
| EKH | Embriyonik Kök Hücreleri |
| G-CSF | Granulosit Koloni Uyaran Faktör |
| GM-CSF | Granulosit-Makrofaj Koloni Uyaran Faktör |
| GVHH | Graft-Versus-Host Hastalığı |
| HLA | İnsan Lökosit Antijeni |
| HKH | Hematopoetik Kök Hücre |
| HRP-SA | Peroksidaz Konjugatı Streptavidin |
| IL-6 | İnterlökin-6 |
| IVF-ET | İnvitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi |
| LIF | Lösemiye Engelleyen Faktör |
| M-CSF | Makrofaj Uyaran Faktör |
| PBS | Fosfat Buffer Salın |
| PH | Progenitör Hücre |
| SSEA | Stage Spesifik Embriyonik Antijen |
| VSELs | Çok Küçük Embriyonik Benzeri Hücreler |
| YKH | Yetişkin Kök Hücreleri |

1. GİRİŞ

Rejeneratif biyoloji ve bunun uygulama alanı olan rejeneratif tıp günümüzde hızla gelişen ve vaad ettiği gelecek açısından son derece ilgi duyulan araştırma konuları haline gelmiştir. Bu alandaki gelişmeler doğrultusunda günümüzdeki uygulamalarla tedavi edilemeyen organ veya doku yaralanmaları ve çeşitli hastalıkların tedavisi gündeme gelmiştir. Hücre tedavisinin temel amacı hastalık ve yaralanma sonucu kaybedilen işlevin, nakledilen sağlıklı hücreler ile yeniden sağlanmasıdır (Attar 2004). Günümüzde yazılı ve görsel yayın organları tarafından sıkça bahsedilen kök hücreler, hücre bazlı tedaviler için umut ışığı olmaktadır (Karaöz 2004).

İnsanoğlu kök hücrelerin özelliklerini keşfettikçe, onları elde edebileceği kaynakları da artırmaya çalışmaktadır. Kök hücre kaynağı olarak in-vitro fertilizasyonla elde edilen embriyolar ve kemik iliği dışında son zamanlarda kordon kanını da kullanılmaya başlanmıştır. Kordon kanının belirli koşullar altında dondurulup, sonra çözülüp tekrar kullanılabilmesinin anlaşılmasıyla ilk kez 1994'de Amerika Birleşik Devletleri'nde olmak üzere dünyada kordon kanı bankaları kurulmuştur.

Günümüzde embriyonik ya da erişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam ve koşullar oluşturularak bir çok hücre tipine in-vitro koşullarda farklılaştırılmaları sağlanmıştır. Ancak farklılaştırılan hücrelerin, in-vivo tedavide kullanımları için hücrelerin çoğalma kontrol mekanizmalarının ve genetik yapılarının çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Elde edilecek bu hücrelerden oluşturulacak hücre-doku ya da organların hasarlı olan bölgeye aktarılması, yerine koyma (reperatif) ve tamir etme (rejeneratif) tedavilerinin yolunu açacaktır. Bu konuda çalışmalar kök hücrelerden in-vitro koşullarda belirli şartlar ve ortamlar yaratılarak farklılaştırılmış hücrelerin in-vivo ortamdaki davranışlarının araştırılmasını gerektirmektedir. Farklılaşan hücrelerin de-diferansiyasyon ve re-diferansiyasyon potansiyelleri, çoğalma ve göçlerinin kontrolü değerlendirilmektedir. Bu konunun aydınlatılması için daha birçok çalışmaya gereksinim olduğu görülmektedir (İnan 2009).

Memeli organizma hücrelerinin gelişiminde kök hücrelerinin erken dönemlerde değişik hücre türlerine yönlendirmelerinin temel mekanizmalarının araştırılması, yönlendirilmelerinde rol alan biyolojik süreçlerin açığa kavuşturulması, farklılaşma ve yönlendirmede rol alan genlerin araştırılması, kanı oluşturan kök hücrelerinin büyüme,

çoğalma ve farklılaşmalarında rol alan mezenkimal kök hücrelerin kan yapımındaki etkilerinin incelenmesi, embriyonik kök hücrelerinin in vitro şartlarda organ oluşumu sürecindeki biyolojik evrelerinin tam olarak açıklığa kavuşturulması beklenmektedir (Kansu 2005).

Kök hücrelerin biyolojisinin anlaşılması ve insanlarda kök hücre tedavisinde ortaya çıkan soruları cevaplandırabilmek için çok daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Şu an tedavisi olmayan hastalıklar kök hücreler çalışmalarının hedefini oluşturmaktadır (Şahin vd. 2005).

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Göbek Kordonu

2.1.1. Göbek kordonu embriyolojisi

Embriyonun lateral ve ventral vücut duvarı oluşurken, vücut yüzeyini örten ektoderm ile amnion kesesi duvarının birleşim noktası, ventralde, bağlantı ve vitellus sapları etrafında oval bir halka oluşturur. Buna ilkel göbek halkası denir. Gelişmenin 5. haftasında aşağıdaki şu yapılar göbek halkasından geçerler:

1- İki arter ve bir venden oluşan göbek damarları ile allantois kesesini içeren bağlantı sapı.

2-Vitellus kesesi damarları ve vitellus kesesi sapı ya da vitellus kanalı.

3-İntra ve ekstraembriyonik sölom boşluklarını birleştiren kanal (Şeftalioğlu 1998).

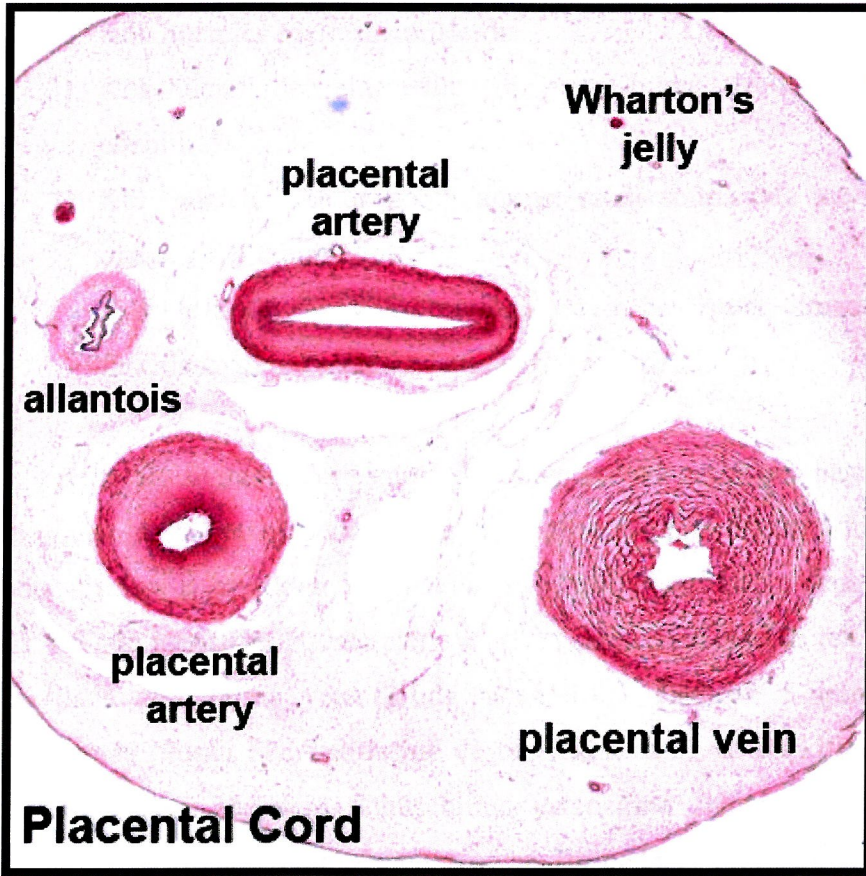
Daha ileri gelişme döneminde (10 haftalık embriyonda), amniyon boşluğu, koryon boşluğunun zarına hızla büyür. Büyüme sırasında, amniyon kesesi duvarı, bağlantı ve vitellus kesesi zarlarını dıştan sarar ve ilkel göbek kordonunu oluşturur. İlkel göbek kordonu, distal olarak vitellus kesesi sapı ve göbek damarlarını, proksimal olarak da birkaç bağırsak halkasını ve allantois kalıntısını içerir. Vitellus kesesi, ilkel göbek kordonunda yer almaz, koryon boşluğunda bulunur ve kendi sapına bağlı olarak göbek kordonu ile ilişkidir. Amniyon kesesinin hızla büyümesi sonucu amniyon kesesi duvarı ile birleşir ve koryon boşluğu silinir. Buna bağlı olarak, vitellus kesesi de sapından kopar, amniyon ile koryon arasında yer alır (Şeftalioğlu 1998).

Karın boşluğu, geçici olarak hızla gelişen bağırsak halkaları nedeniyle çok küçüktür. Bu nedenle bağırsak halkalarının bir kısmı, göbek kordonundaki ekstraembriyonik sölom içine itilirler ve fizyolojik göbek fitiğini oluştururlar (Şeftalioğlu 1998).

Üçüncü ayın sonunda, bağırsak halkaları, embriyonun bedeni içine alınırlar. Bu olaydan sonra göbek kordonundaki sölom boşluğu, allantois kesesi, vitellus kanalı ve damarları silinir. Kordonda yalnızca Wharton jeli ile sarılı iki arter ve bir ven kalır (Şeftalioğlu 1998).

2.1.2. Göbek kordonu histolojisi

Göbek kordonu genellikle, 1-2 cm çapında ve 30-90 cm uzunluğundadır. Göbek kordonu Wharton jeli olarak adlandırılan müköz bağ doku ile çevrelenmiş iki arter ve bir ven içerir. Kordonun etrafı amniyon zarından köken alan epitel ile kaplıdır. Şekil 2.1. de göbek kordonu histolojisi gösterilmiştir. Ağsı yapıdaki kollajen lifler ile küçük dalgalı kollajen demetleri göbek kordonunun etrafını sararak süreklilik arz eden bağ doku iskeletini oluşturur. Yoğun olarak glikozaminoglikan olan hyaluronik asiti içeren Wharton jeli, fibroblastlar ile kollajen lifler etrafında sulu bir jel oluşturarak göbek kordonunu basınçtan koruyan bir doku mimarisi oluşturur (Baran vd. 2007).



Şekil 1. Göbek kordonunun histolojik kesiti

(embryology.med.unsw.edu.au 17.12.2011).

2.2. KÖK HÜCRELER

2.2.1. Kök hücre nedir?

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler “kök hücreler” olarak bilinmektedir (İnan vd. 2009).

Bilim adamları bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamak için beş ölçüt kullanmışlardır. (Karaöz vd. 2004)

- 1) Kök hücreleri, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptirler.
- 2) Kök hücreler özelleşmemişlerdir.
- 3) Kök hücrelerden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.
- 4) Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilmelidir.
- 5) Kök hücreler in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilmelidir.

Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu, tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip ilk embriyonal hücreye “totipotent” hücre denir. Döllenmeyi takiben ilk 4-5 gün içerisinde bu hücreler aynı güce sahip olup her biri tek başına bir organizma meydana getirebilme yeteneğinde hücrelerdir. Yaklaşık 5 gün yani 2-3 bölünme sonrasında oluşan hücre kitlesine de blastokist denir ve bu kitle içindeki hücreler de vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar. Bu nedenle bu hücrelere “pluripotent” hücre denir. Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyona sahip olmakta ve erişkin kök hücreleri oluşturmaktadırlar. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere ise “multipotent” hücre adı verilir (Şahin vd. 2005). Unipotent kök hücreler ise sadece bir hücre tipine farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir (Whittaker 2005). Tablo 2.1. de Kökenlerine, farklılaşma etkinliklerine veya farklılaşma yönlerine göre kök hücre türleri verilmiştir.

Tablo- 1 Kökenlerine, farklanma etkinliklerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri.

| İsim | Hücre Tipi (Yerleşim) | Farklanma etkinliği | Farklanma yönü |
|-------|--|---------------------|--|
| EKH* | Morula aşamasındaki hücreler | Totipotent | Embriyon ve embriyon dışı tabakalar |
| EKH | Blastokist aşamasındaki hücreler | Pluripotent | Embriyon gövdesi(tüm somatik ve germ hücreleri) |
| EKH | Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri | Pluripotent | Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri |
| EKH | Ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri | Pluripotent | Tüm somatik hücreler |
| YKH** | Özgün doku hücreleri | Multipotent | Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre |
| YKH | Bir dokudaki yerleşik hücreler | Unipotent | Bir hücre tipi |

EKH*: Embriyonik kök hücreler; YKH**: Yetişkin kök hücreler; Bu tablo Can A (2008)' den alınmıştır.

2.2.2. Kök hücrelerin genel özellikleri

2.2.2.1. Farklanma (plastisite)

Farklanma sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin kombine etkisiyle başarılan, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklanma aşamasına giren bir hücre, bir yandan bölünmeyi durdururken diğer yandan çevresinden gelen sinyallere yanıt vermeye hazırlanır. Bunun için genellikle enzim-bağımlı yüzey ve hücre içi reseptörler

ve aktivasyon yolları ortaya çıkararak hücrede uzun erimli olayların başlamasını tetikler (Can 2009).

Bir hücre için farklanma süreci genellikle o hücrenin çoğalma sürecinin bittiği noktadan başlar. Söz konusu hücre önce yeterli sayıya ulaşır, bu aşamadan sonra çoğalma ile ilgili hücre yüzeyi ve hücre içi yollar kapatılır ve farklanma ile ilgili mekanizmalar devreye girer. Bu süreç genellikle hücre bölünme döngüsünden kalıcı veya geçici olarak çıkılması anlamına gelir. Farklanmayı uyaran ve sürdüren etkenler ortadan kaldırılırsa, birçok hücre bölünme döngüsüne tekrar girer (Can 2009).

Laboratuvar ortamında kök hücrelerin belli bir çizgide farklanması (yönlendirilmiş farklanma) belli kimyasal ve fiziksel koşulların yerine getirilmesi ve doğrudan hücrenin genetik programının değiştirilmesiyle başarılır. Örneğin; yetişkin bir kök hücrenin yağ hücresine farklanması için kültür ortamına belli dozlarda deksametazon, indometazin, izobutilmetilksantin ve insülin gibi doğal hormonlar ve yapay kimyasal maddeler kullanılır. Bu maddelerin in vitro ortamda kök hücrelerin yağ hücresine dönüşümünü uyarıp uyarmadığı bilinmese de, in vivo karşılıklarıyla kıyaslanacak düzeyde olgunlaşırlar. Ancak 'in vitro ortamda farklandırılan kök hücrelerin canlıya nakledilmesiyle elde edilecek tedavi etkinliği, kök hücrelerin farklandırılmadan nakledilmesiyle elde edilebilir mi?' sorusunun yanıtını bulma çabası bu alanın en önemli çalışma konularından birisini oluşturur (Can 2009).

Embriyon kök hücrelerinde farklanmayı kontrol etmek diğer kök hücre türlerine göre daha zordur. Bunun için in vitro ortamda çoğaltılan embriyon kök hücrelerinde kendiliğinden farklanmasını engellemek gerektiğinden, IL-6 (interlökin-6) ailesi üyesi olan lösemiye engelleyen faktör (LIF) kullanılır (Can 2009).

Kendini yenilemekte olan bir hücrede çok sayıda gen aktif iken az sayıda gen ifadesi görülür; buna karşın farklanmakta olan bir hücrede az sayıda gen aktif iken çok sayıda gen ifadesi görülür. Bir başka ifadeyle farklanmakta olan bir hücrede protein sentezi ileri derecede artmıştır. Hücre işlevsel bir hücre olma yolunda ilerlerken gerek yapısal, gerekse işlevsel bütün özelliklerini kazanmak üzere özgün proteinler sentezler ve salgılar. Bunun en tipik örneği, embriyon kök hücreleriyle yetişkin kök hücrelerin kıyaslanmasıyla ortaya konur. Embriyon kök hücreleri, her üç embriyon tabakasına ait proteinleri sentezlerler. Bu durum, farklanma yolunda ilerlemelerinin sonuna doğru geldiklerinin bir kanıtıdır (Can 2009).

Kök hücrelerini diğerlerinden ayıran en önemli özellik, farklanma yetkinliklerinin yüksek oluşudur. Bu özellikleri sayesinde organizmanın hücresel yapım ve onarım

olaylarında eksilen hücreleri yenilemek üzere geniş bir olanak sunarlar. Kök hücrelerin farklanma potansiyelleri örnekleri ile tablo- 2.2 de özetlenmektedir. Kök hücre alanında çalışmaların ilerlemesiyle araştırmacılar, ara farklanma (transdiferansiyasyon) terimini bir yönde farklanmış hücrelerin bir başka hücreye doğru farklanması olarak tanımlamışlardır (Can 2009).

Tablo-2. Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (plastisite). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Sağlık Enstitüsü, totipotent kavramını “sınırsız kapasite”, pluripotent kavramını da “birçok dokuya köken verebilme” olarak tanımlamıştır (2000).

| Kısaltılmış Biçimi | Anlamı | Örnek |
|--------------------|---------|-------------------|
| Toti | Bütün | Embriyon |
| Multi | Birçok | Hematopoetik |
| Pluri | Çok | Hematopoetik |
| Oligo | Az | GIS kök hücreleri |
| Quadri | Dört | GIS kök hücreleri |
| Tri | Üç | Bronş epiteli |
| Bi | İki | Safra kanalı |
| Uni | Bir/tek | Prostat |

Bu tablo Can (2009)'dan alınmıştır.

2.2.2.2. Kendini yenileme, bölünme biçimleri ve kök hücre nişi

Kök hücrelerinin tanımında da yer alan kendini yenileme özelliği, organizmanın yaşamı boyunca bir hücrenin kendi kopyasını alacak şekilde çoğalması ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilmesi anlamına gelir. Embriyonun gelişmesi sürecinde, yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve

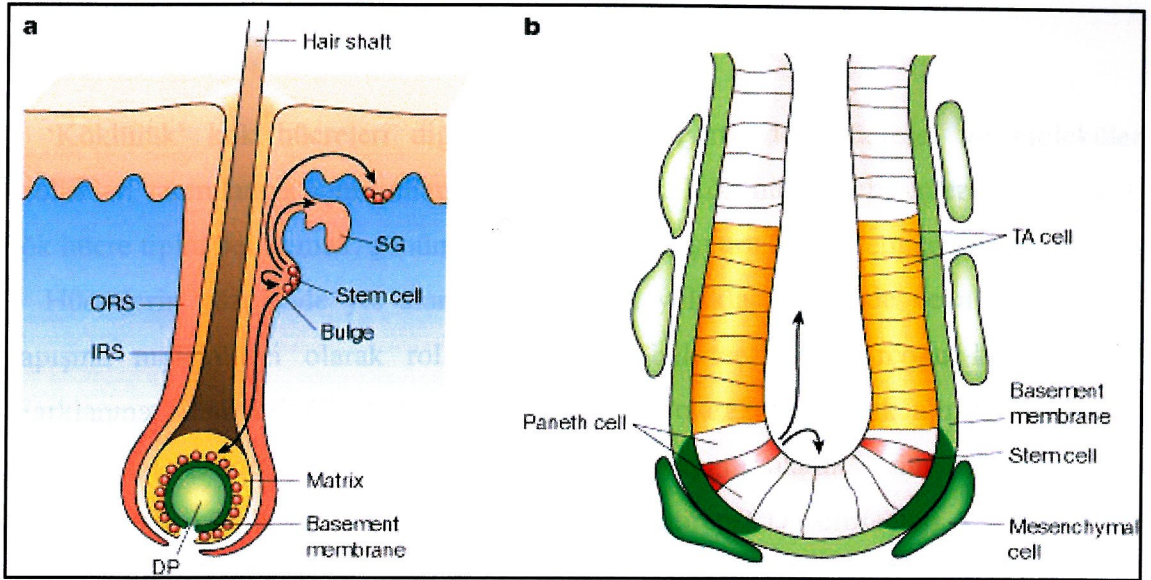
onarımında, kök hücreler ile farklılaşmakta olan hücreler arasındaki denge çok önemlidir (Can 2009).

Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri, kök hücrelerin bölünmeler esnasında bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken bir yandan da kendi yedeğini almasıdır. Bu olay simetrik hücre bölünmesi sonucu oluşur ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar. Asimetrik hücre bölünmesi, hem hücre içi hem de hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesini gerektirir. Hücre içindeki asimetri, bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birisine aktarılmasıyla başarılır. Bazı çalışmalar DNA'nın da asimetrik dağıldığını göstermektedir. Bölünmenin sonucunda orijinal DNA, yavru hücrelerden birisine giderken kararlanma geçirir ve öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücrede yeni DNA sentezi meydana gelir. Bu mekanizma sayesinde kök hücreler, yeni sentezlenen DNA'da meydana gelebilecek ve birikim ortaya çıkaracak olan mutasyonlardan korumakta ve her zaman aynı genoma sahip hücreler olarak bozulmadan kalabilmektedirler. Bunun sonucu olarak DNA ile birlikte DNA da meydana gelen değişimler ve bununla ilgili proteinler gibi epigenetik özellikler de kopyalanan hücreye katılmaktadır. Dolayısıyla kök hücrede gen ifadesi ve işlevleri de korunmaktadır (Can 2009).

Kök hücrelerin hücre dışı asimetrisi, hücrenin dışındaki mikroçevre (niş) tarafından meydana getirilir. Nişi oluşturan hücre dışı matris bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri, kök hücre sayısını ve hücrenin bulunduğu durumu kontrol altında tutar. Örneğin; *Drosophila* ovaryumunda, kök hücrelerin bölünme eksenini niş tarafından belirlenir; mitoz mekiği nişe dik açıyla konumlanır. Böylece hücre bölündükten sonra Hücrelerden birisi nişe yakın biçimde kalıp kök hücre özelliğini korurken diğeri niş ile olan ilişkisini kaybettiği için farklılaşmaya başlar. Sonuç olarak, hücre içi ve dışı sinyallerin kutuplaşması, hücrenin kendini yenilemede önemli etkenlerden biridir. Her ne kadar kök hücre havuzunu sabit tutabilmek için asimetrik hücre bölünmesi homeostatik koşullarda gerçekleşse de, embriyonun gelişim sürecinde ve doku onarımında gerekli olan yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için simetrik hücre bölünmesi de gerçekleşmelidir. Özellikle doku işlevlerinin olumsuz etkilendiği akut harabiyet durumlarında bu mekanizmayla kök hücrelerin öncü hücreye dönüşerek kısa zamanda doku restorasyonunu garanti altına alması amaçlanır ve sonuçta kök hücre havuzu küçülür. Buna karşın kök hücreler simetrik olarak bölünerek yeni kök hücreleri oluştururlar ve kök hücre havuzu genişler. Üçüncü bir mekanizma da, fare

spermatogenezinde karşımıza çıkar. Burada bir kök hücre, iki yavru hücre olacak şekilde bölünür ve daha sonra bu geçici çoğalan hücreler niş ile ilişkiye girerek kök hücre haline dönüşür ve kök hücre havuzu genişler (Can 2009).

Kök hücrelerin nişten uzaklaştırılması, örneğin; laboratuvarında kök hücrelerin ayrıştırılması ve kültürü, bu hücrelerin kendini yenileme yeteneklerinin hızla kaybolmasıyla sonuçlanır. Kök hücre nişine örnek olarak hematopoetik kök hücre nişi verilebilir. Hematopoetik kök hücre nişinde, hematopoetik kök hücreleri, kemik matriksi sentezleyen osteoblastlar, endotel hücreleri, farklılaşmış kan hücreleri, büyüme faktörleri, kollajen ve birçok hücreler arası matriks proteinleri bulunur. Şekil 2’de kök hücre nişi kavramına uygun derideki epitelyal kök hücre nişi ve ince bağırsaktaki intestinal kök hücre nişi gösterilmiştir. Kök hücre nişinde bulunan hücrelerden salgılanan proteinler biyokimyasal belirleyiciler olarak yer alırken, mikro çevrenin akışkanlığı da fiziksel belirleyici olarak kök hücrelerin pozitif ve negatif yönde etkilenmelerine neden olur ve kendini yenileme etkinliklerini kontrol eder. Gelişme, yaşlanma, yaralanma ve hastalık durumlarında niş bölgesinde gerek hücresel, gerekse hücre dışı yapılarda çok sayıda değişiklik meydana gelir; bu da kök hücreleri olumlu ve olumsuz yönde etkiler. Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmasının hassas bir denge içinde ayarlanması, dokuda yenilenmesi gereken hücrelerin ortaya çıkışında kritik rol oynar, bir yandan farklılaşmakta olan yeni hücreler oluşurken, öte yandan kök havuzu sabit tutulmaya çalışılır (Can 2008).



Şekil 2. İki farklı kök hücre nişi görülmektedir: (a) Derideki kök hücreler, yağ bezinin (SG'nin) hemen altında kıl folikülünün tümsek bölgesinde yerleşmişlerdir. Dermal papilla (DP) bazal membrana karşı lokalize olmuş matriks kök hücrelerine sinyal gönderir. Matriks hücreleri iç kök kılıfı (IRS) ve dış kök kılıfı (ORS)'ndan oluşan korteks, medulla ve kutikül içeren bir kıl gövdesine farklılırlar. Tümsek bölgesinde bulunan kök hücreler periyodik bir şekilde matriks hücrelerini yeniden oluşturur, ayrıca yağ bezlerini ve foliküller arası bölgede bazal tabakayı örten bazal laminaya karşı uzanan epidermal kök hücreleri korumaya yardımcı olurlar. **(b)** İnce barsakta kök hücreler kriptlerin tabanındaki paneth hücrelerinin arasında lokalize olurlar. Koyu sarı alandaki kök hücre soyları transit hücrelerdir (TA), yukarı taşınırlar ve farklılaşırlar. Epitelial hücrelere komşu olan mezenşimal hücreler, kök hücre aktivitesinin düzenlenmesine yardımcı sinyaller gönderirler (Spradling vd. 2001). Barsaktaki yenilenme, barsak kök hücreleriyle sağlanır ve dört farklı tipte epitelial soy oluşturulur: emici enterositler, musin salgılayan goblet hücreleri, paneth hücreleri ve enteroendokrin hücreler (Winton 2000).

2.2.2.3. Köklülük (stemness)

'Köklülük' kök hücreleri diğer hücrelerden ayırt eden hücresel ve moleküler özellikleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kök hücre belirteçleri kullanılarak kök hücre tipini belirlemek, günümüzde en yaygın başvurulan yöntemlerden birisidir.

Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücre sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu kısaca 'CD' (Farklanma Kümeleri=Clusters of differentiation) olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar. Örneğin; hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul gören CD belirteçleri, CD33 ve CD 45'tir. Mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için CD29, CD79, CD10 gibi belirteçler kullanılır (Can 2009). Embriyonik kök hücreler için kabul gören köklülük belirteçlerinden; yüzey özellikleri, transkripsiyon faktörleri, enzimler ve büyüme faktörleri Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Nanog, Oct3/4 (Oct4) ve Sox2 embriyonik kök hücrelerde yüksek düzeyde ekspresyon edilen transkripsiyon faktörleridir. Bu transkripsiyon faktörleri gelişim sırasında diğer genlerin ekspresyonunu düzenlerler ve embriyonun iç hücre kitlesindeki pluripotent hücrelerde yüksek seviyede ekspresyon edilirler. Farklılaşma aşamalarının başlaması, kendini yenileme ve pluripotensinin kaybıyla birlikte bu üç transkripsiyon faktörü baskılanır (Carlin vd. 2006).

Nanog embriyonik kök hücre pluripotansini korumak için gösterilen DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörlerinden homeobox ailesinin bir üyesidir. Farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerinde ekspresyonu yüksektir. Hücrede nanog ifadesi ve pluripotensinin azalması ile embriyonik kök hücre farklılaşması eş zamanlı olarak gerçekleşir (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

Oct3/4 memeli embriyonik kök hücrelerinde ve germ hücrelerinde ekspresyon edilen POU ailesi domaini içeren bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrede Oct3/4 ifadesi pluripotensi ve hücrenin kendi kendini yenilemesi için gereklidir (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

Tablo-3. Blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyon kök hücrelerinin yaygın kullanılan belirteçleri.

| |
|---|
| Pozitif Belirteçler |
| Alkalın fosfataz |
| SSEA1, SSEA4, TRA-1-60, TRA1-81/cd9/E-cadherin |
| Sox2, Oct4, Nanog, Rex, Utf-1, Dppa5, Klf-4, c-Myc |
| TERT (telomeraz revers transkriptaz) |
| Stabil karyotip |
| Oluklu bağlantılar (gap junctions) |
| Negatif Belirteçler |
| Trofoektoderm belirteci: BEX |
| Nöroektoderm belirteci: sox1 |
| Endoderm belirteçleri: GATA genleri, HNF3 β , PDX-1 |
| Mezoderm belirteçleri: Brachury, MSX-1 |

Bu tablo Can (2009)'dan alınmıştır.

Farklılaşmamış insan embriyonal karsinoma hücreleri stage spesifik antigenler olan SSEA-1, SSEA-3, TRA2-39, TRA-2-54 ve yüksek molekül ağırlıklı glikoprotein olan TRA-1-60 ve TRA-1-81 eksprese etmeleriyle karakterizedirler. Bunlara ek olarak SSEA-1, SSEA-3 ve SSEA-4 embriyonik kök hücre ve embriyonik germ hücrelerini karakterize eden markırlardır (ayrıntılı bilgiye www.scbt.com sitesinden ulaşılabilir). SSEA markerları ilk olarak lacto ve globo serisi glikolipitlerle ilişkili tanımlanan karbonhidrat epitoplara tanyan antikorları olarak tespit edilmiştir. Farklılaşmayla birlikte SSEA-1 ifadesi artarken, SSEA-3 ve SSEA-4 ifadesi azalır (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

TRA-1-60 antijeni orijinal olarak embriyonik karsinoma progenitör hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen müssin benzeri bir antijen olarak tanımlanmıştır. TRA-1-60,

TRA-1-81 ve SSEA antijenleri birlikte eksprese edilirler (ayrıntılı bilgiye www.scbt.com sitesinden ulaşılabilir).

CD34 lenfomapoetik kök hücrelerin, progenitör hücrelerin, kılcal damar endotelial hücrelerinin, embriyonik fibroblastların, bazı fetal hücrelerin ve yetişkin sinir dokularındaki hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen, yoğun glikozillenmiş bir transmembran proteindir. CD34 ilkel embriyonik kök hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilir ve progenitör hücrelere farklılaştıkça CD34 ekspresyonu azalır (ayrıntılı bilgiye www.scbt.com sitesinden ulaşılabilir).

CD45 hematopoetik orjinli tüm hücrelerde, özellikle eritrosit ve plateletlerde eksprese edilen tek zincirli tip I transmembran proteini olan tirozin fosfatazdır (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

CD73 (Ecto 5'Nükleotidaz) disülfid bağlantılı homodimer oluşturan glikozil fosfotidilinositol bağlı ektoenzimdir. Ektraselüler adenozin (doku hasarı ve inflamasyonda görevli sinyal molekülü) üretiminden sorumlu çeşitli enzimlerden biridir. Çoğu hücre tipi CD73'ü eksprese eder (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

CD105 (Endoglin) tip I integral transmembran proteindir ve TGF-beta süper ailesi ligantları için gerekli bir reseptördür. Endoglin vasküler endotelial hücrelerde, kondrositlerde ve term plasentanin sinsityotrofolastlarında yüksek düzeyde eksprese edilir. Ayrıca aktif monositler ve mezenşimal kök hücrelerde bulunur (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

STRO-1 kemik iliği stromal hücreleri ve eritroid öncülleri tarafından eksprese edilen hücre yüzey proteindir (ayrıntılı bilgiye www.rndsystems.com adresinden ulaşılabilir).

2.3. Göbek Kordonu Kök Hücreleri

Gebelik boyunca anneyle rahimdeki bebek arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonundaki kana kordon kanı adı verilir. İçerisinde erişkin kanında gördüğümüz eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücrelerine ilaveten erişkin kanından daha yüksek oranda kök hücrelerde bulunur (Beksaç 2009).

Kordon kanı, kemik iliği ve çevre kanı gibi dokularla kıyaslandığında daha uzun telomere, daha yüksek proliferatif kapasiteye sahip kök hücre içeriği, immün yapılanma

yönünden henüz timus eğitimini tamamlamamış olması, başka bir insanda daha kolay uyum gösterme nitelikleri ile önemli avantajlara sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle eskiden doğum eylemi sonrasında çöpe atılan kordon kanı, artık tedavi amacıyla kullanılan bir kök hücre kaynağı haline gelmiştir ve doğumu hemen takiben toplanarak ilerde kullanılmak üzere özel koşullarda saklanmaya alınabilmektedir (Beksaç 2009).

2.3.1. Hematopoetik kök hücreleri

Bir hematopoetik kök hücre kandan ve kemik iliğinden izole edilebilen, kendi kendini yenileyebilen, kan dolaşımıyla mobilize olabilen, özelleşmiş hücre çeşitlerine farklılaşabilen, programlı hücre ölümüne gidebilen hücre olarak tanımlanmaktadır. 1980'lerin sonu ve 1990'ların başında araştırmacılar insan göbek kordonu ve plasentadan elde edilen kanın, zengin bir hematopoetik kök hücre kaynağı olduğunun farkına vardılar (ayrıntılı bilgiye stemcells.nih.gov adresinden ulaşılabilir).

İlk başarılı göbek kordon kanı transplantasyonu Fanconi anemili bir hastaya uygulandığından beri, kordon kanı toplanması ve bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanımı hızla artmıştır. Hematopoetik kök hücrelerin yetişkin kemik iliği kök hücreleri ve kordon kanı kök hücrelerinin biyolojik özelliklerini karşılaştırmak için araştırmalar yapılmaktadır. Göbek kordon kanı kök hücrelerinin tüm germ tabakalarına (endoderm, ektoderm ve mezoderm) gelişme yeteneğine sahip olduğunu destekleyen öneriler bulunmaktadır (ayrıntılı bilgiye stemcells.nih.gov adresinden ulaşılabilir).

2.3.2. Mezenkimal kök hücreleri

Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilen, tüm dokularda destek hücreleri olan, stromal hücrelerin kökenini oluşturan, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kemik iliği kültürlerinde adhezyon özelliği gösteren bağ (konnektif) dokunun ana hücreleridir (Çetinkaya 2009).

Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışması, stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (Çetinkaya 2009).

Kemik iliği mezenkimal kök hücre içeren ilk kaynak olarak rapor edilmiştir (Kern vd. 2006). Kemik iliği dışında birçok dokudan mezenkimal kök hücreler izole edilebilmektedir. Kemik/ periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular,

karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amnion sıvısı, sinovial sıvı ve periferik kandan mezenkimal kök hücrelerin ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (Çetinkaya 2009). Kordon kanı kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine göre biyolojik özellikleri açısından daha kararlı olduğu belirtilmektedir (Lu vd. 2006).

2.3.3. Embriyonik kök hücreleri

Son yıllarda kordon kanının mezenkimal kök hücrelerden daha erken aşamalara ait embriyonik kök hücre özellikleri de içerdiği gösterilmiştir. Embriyonik kök hücre işaretleyicilerinden olan Oct3/4, Nanog veya SSEA-3, SSEA-4 pozitifliği göstermesinin yanısıra bazı özellikleri taşımayarak ve allojenik lenfositleri uyarmayarak embriyonik özelliklerini hala koruduğunu kanıtlamak mümkün olmuştur. Hatta kordon kanından elde edilen bu embriyonik kök hücrelerin deneysel olarak diyabet oluşturulmuş farelere aktarıldığında insulin üreten hücreler (endodermal gelişim) geliştirerek hipergliseminin engellendiği gösterilmiştir. Yine kordon kanından kültür yapılarak elde edilen bu embriyonik kök hücrelerden endotel (mezodermal gelişim) veya nöron benzeri (ektodermal gelişim) hücrelerin de elde edilebileceği gösterilmiştir. Hem hücre belirleyicileri hem de bu farklılaşma deneyleri kordon kanının embriyonik kök hücre potansiyelini kanıtlamaktadır (Beksaç 2009).

2.4. Hipotez ve Çalışmanın Amacı

Göbek kordonu anne karnındaki bebeğin besin ve oksijen ihtiyacını karşılayan, bebeği plasenta aracılığıyla anneye bağlayan dokudur. Kordon kanı ise doğumdan sonra bu dokudan ve plasenta içinde kalan kandır. Göbek kordonu ve plasenta 20 yıl öncesine kadar çöpe atılan doğum sonu artığı olup kök hücreler içerdiği tespit edildikten sonra kazandığı yeni statü ile pek çok kişiye kazanç kapıları açmıştır.

Kordon kanı, kemik iliği ve çevre kanı gibi dokularla kıyaslandığında daha uzun telomere, daha yüksek poliferatif kapasiteye sahip kök hücre içeriği, immün yapılanma yönünden henüz timus eğitimini tamamlamamış olması, başka bir insanda daha kolay uyum gösterme nitelikleri ile de önemli avantajlara sahiptir. Üstelik bu kaynak verici için hiçbir zahmet oluşturmadan ve etik problemlere neden olmadan toplanıp

saklanabildiği HLA (lösemiye engelleyen faktör) uygun bir verici saptandığında hemen kullanılabilme gibi çok büyük bir üstünlüğe sahiptir.

Kordon kanının sağladığı bu avantajlar birçok hastalığın tedavisi ve hastalar için umut ışığı olmuştur. Örneğin kordon kanının saklanmasıyla kanser, kemik iliği hastalıkları, lenfomalar-orak hücresi anemisi, talasemi, doğuştan gelen metabolik düzensizlikler, felç, nöroblastom, amegokorsitik trombositopeni, Parkinson, Alzheimer, tip I diyabet ve bazı bağışıklık yetmezlikleri gibi hastalıkların tedavisinin hastanın kendi kordon kanının toplanmasıyla yapılabileceği vurgulanmaktadır.

İn vitro fertilizasyon ile elde edilen hücre tabanlı tedaviler için en büyük potansiyeli oluşturan embriyonik kök hücreler üzerinde etik tartışmalar sürmektedir. Ancak biz bu çalışmamızda göbek kordonundaki embriyonik kök hücrelerin varlığını göstererek hücre tabanlı tedaviler için alternatif bir kaynak oluşturmaktayız.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kordon Kanı Toplanması ve Mononükleer Hücre Tabakasının Toplanması

Pamukkale Üniversitesi Kadın Doğum Hastalıkları biriminde gerekli bilgilendirmenin yapıldığı ve yazılı izinlerin alındığı sağlıklı 11 vericiden heparinlenmiş bir enjektöre 10 ml kordon kanı alınarak Pamukkale Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Ana bilim Dalı'na getirildi.

Laminar flow içerisinde, kordon kanı ile fosfat buffer salin (PBS) ile 1:1 oranında dilüe edildi. 10 ml ficoll bir tüp içerisine konuldu, daha sonra 10 ml kordon kanı ficoll üzerine yavaş yavaş ilave edilip, soğutmalı santrifüjde 2500g de 20 dakika santrifüj edildi.

Üstte plazma ve plateletler, altında mononükleer hücre tabakası adı verilen kök hücre ve lökositleri içeren tabaka, onun altında ficoll ve en alt tabakada ise eritrositler bulunacak şekilde bir gradientlenme oluşturuldu.

3.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Mononükleer hücre tabakası dikkatli bir şekilde toplandı, sitosantrifüjleme yapılarak lamlara hücreler düşürüldü ve sırasıyla şu işlemler uygulandı.

- a. Lamların üzeri asetonla tamamen kapatıldı ve +4 °C'de 10 dakika bekletildi.
- b. Lamlar 3 defa 2-3 dakika PBS ile bekletildi.
- c. % 30'luk H₂O₂: Metanol (1/9) ile 10 dakika bekletildi.
- d. Lamlar 3 defa 2-3 dakika PBS ile bekletildi.
- e. Lamların üzeri bloklama solüsyonu ile kapatılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- f. Lamlar üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece +4 °C'de over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan embriyonik, mezenkimal ve hematopoetik kök hücre markırları şu şekildedir: SSEA-1, SSEA-3, TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG, OCT3/4, CD34, CD 45, CD73, CD105 ve STRO-1.
- g. Lamlar 3 defa 2-3 dakika PBS ile bekletildi.

- h.**Lamlara primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikor damlatılarak 10 dakika bekletildi.
- i.** Lamlar 3 defa 2-3 dakika PBS ile bekletildi.
- j.** Lamlara biotinlenmiş-sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) damlatılarak 10 dakika bekletildi.
- k.** Lamlar 3 defa 2-3 dakika PBS ile bekletildi.
- l.** Lamlar kromojen boyası DAB ile 10 dakika muamele edildi.
- m.** Lamlar distile su ile yıkandı.
- n.** Hemotoksilen ile lamlara zıt boyama yapıldı ve lamların üzeri entellan ile kapatılarak, mikroskopta değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Mononükleer Hücre Tabakasında CD34 İfadesi

Tüm mononükleer hücreler içerisinde CD34 ifade eden hücreler oldukça az sayıdaydı. Bu hücrelerde boyanma nükleerdi. Oldukça seyrek olarak izlenen bu hücrelerin bazılarında reaksiyon diğerlerine göre daha kuvvetliydi (Resim 1).

4.2. Mononükleer Hücre Tabakasında CD73 İfadesi

Mononükleer hücrelerden hiçbiri CD73 için pozitif reaksiyon göstermedi (Resim 2).

4.3. Mononükleer Hücre Tabakasında CD45 İfadesi

Hücrelerin çoğu CD45 ile pozitif reaksiyon gösterdi. Hücrelerin çekirdekleri yoğun boyanma gösterirken, sitoplazmaları zayıf boyanma gösterdi. Pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin bazılarında, reaksiyon diğerlerine göre daha kuvvetliydi (Resim 3).

4.4. Mononükleer Hücre Tabakasında CD105 İfadesi

Mononükleer hücrelerden çok azında CD105 için zayıf pozitif boyanmaya rastlandı, boyanma sitoplazmikti (Resim 4).

4.5. Mononükleer Hücre Tabakasında Nanog İfadesi

Mononükleer hücrelerden hiçbiri Nanog için pozitif reaksiyon göstermedi (Resim 5).

4.6. Mononükleer Hücre Tabakasında Oct3/4 İfadesi

Mononükleer hücrelerden hiçbiri Oct3/4 için pozitif reaksiyon göstermedi (Resim 6).

4.7. Mononükleer Hücre Tabakasında SSEA-1 İfadesi

Mononükleer hücrelerin çoğunda SSEA-1 için pozitif reaksiyon izlendi. Boyanma çekirdekte kuvvetli, sitoplazmada ise orta yoğunlukta idi. Çekirdek ve sitoplazmik boyanma göstermeyen hücrelerde ise zayıftan orta yoğunluğa doğru değişen hücre zarı boyanması izlendi (Resim 7).

4.8. Mononükleer Hücre Tabakasında SSEA-3 İfadesi

Mononükleer hücrelerinin bazılarında SSEA-3 için sitoplazmik boyanmalar gözlemlendi (Resim 8).

4.9. Mononükleer Hücre Tabakasında STRO-1 İfadesi

Pozitif reaksiyon gösteren mononükleer hücrelerde boyanma farklılık gösteriyordu. Bazılarında kuvvetli çekirdek boyanması gösterirken, bazılarında orta derecede sitoplazmik boyanma izlendi (Resim 9).

4.10. Mononükleer Hücre Tabakasında TRA-1-60 İfadesi

Mononükleer hücrelerin bazılarında zayıf ve orta yoğunlukta olmak üzere sitoplazmik boyanmalar gözlemlendi (Resim 10).

4.11. Mononükleer Hücre Tabakasında TRA-1-81 İfadesi

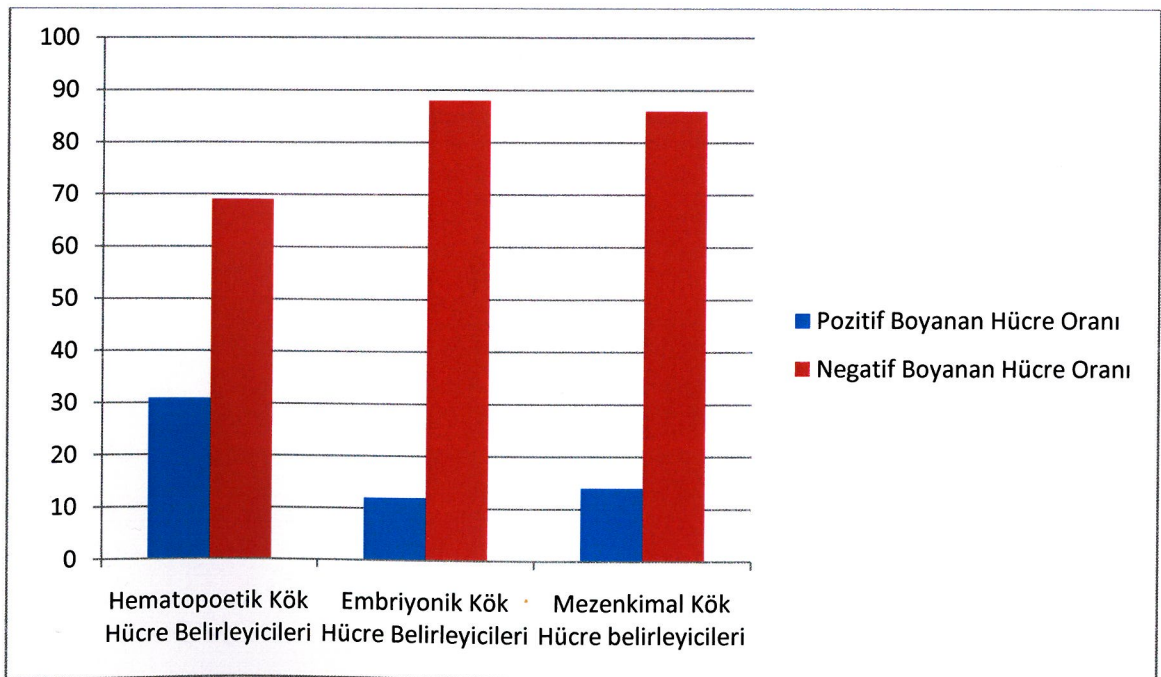
Mononükleer hücrelerin hiçbirinde TRA-1-81 için pozitif reaksiyon izlenmedi (Resim 11).

4.12. İstatistiksel Analiz

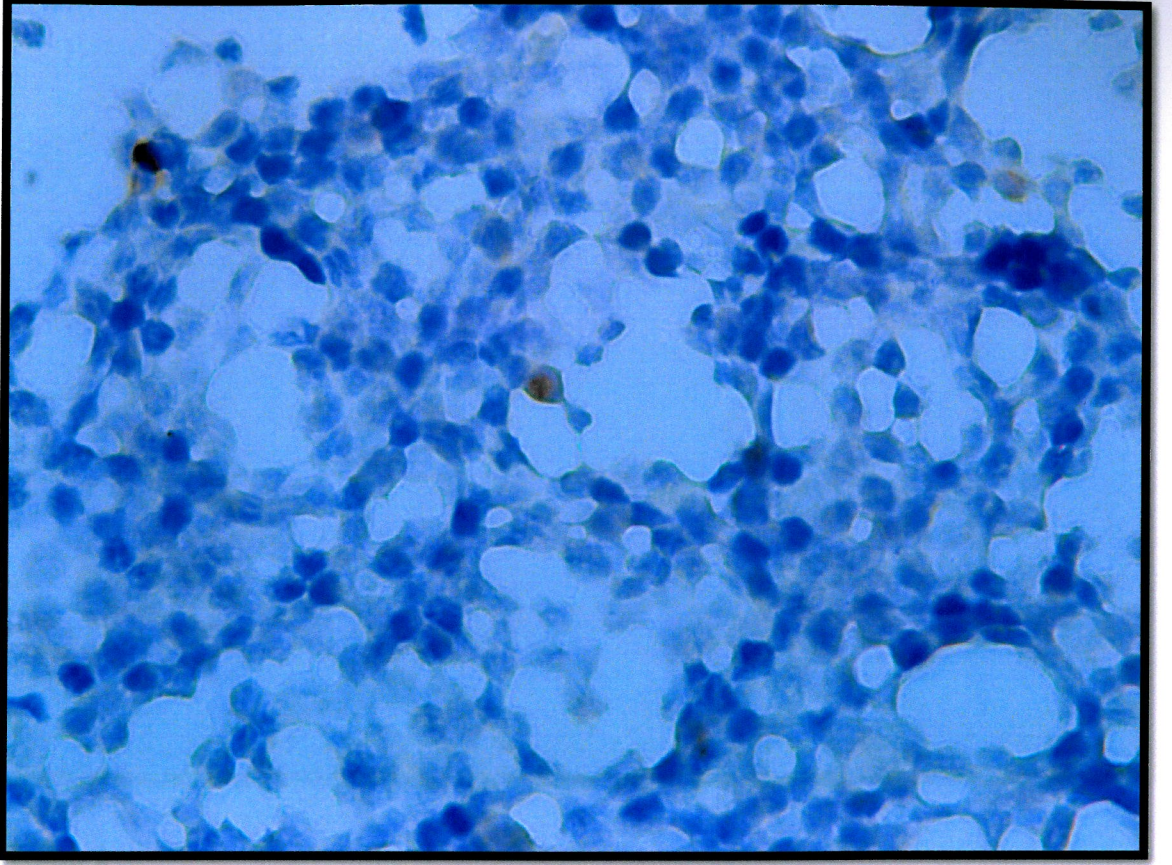
Yapılan immünohistokimyasal boyamalarda hücreler pozitif ve negatif olarak değerlendirilip (Tablo ve grafik 1) ve istatistiksel analizi ki-kare testine göre yapıldı. Hücrelerin Pozitif boyanması açısından anlamlı bir fark olduğu görüldü.

Tablo 4. İmmünohistokimyasal boyamalara göre pozitif ve negatif hücre sayısı

| | Pozitif Hücre Sayısı | Negatif Hücre Sayısı | Toplam |
|--|----------------------|----------------------|--------|
| Hematopoetik Kök Hücre Belirleyicileri | 95 (30.9) | 212 (69.1) | 307 |
| Embriyonik Kök Hücre Belirleyicileri | 90 (12.0) | 663 (88.0) | 753 |
| Mezenkimal Kök Hücre Belirleyicileri | 6 (14.0) | 37 (86.0) | 43 |
| Toplam | 191 | 912 | 1103 |

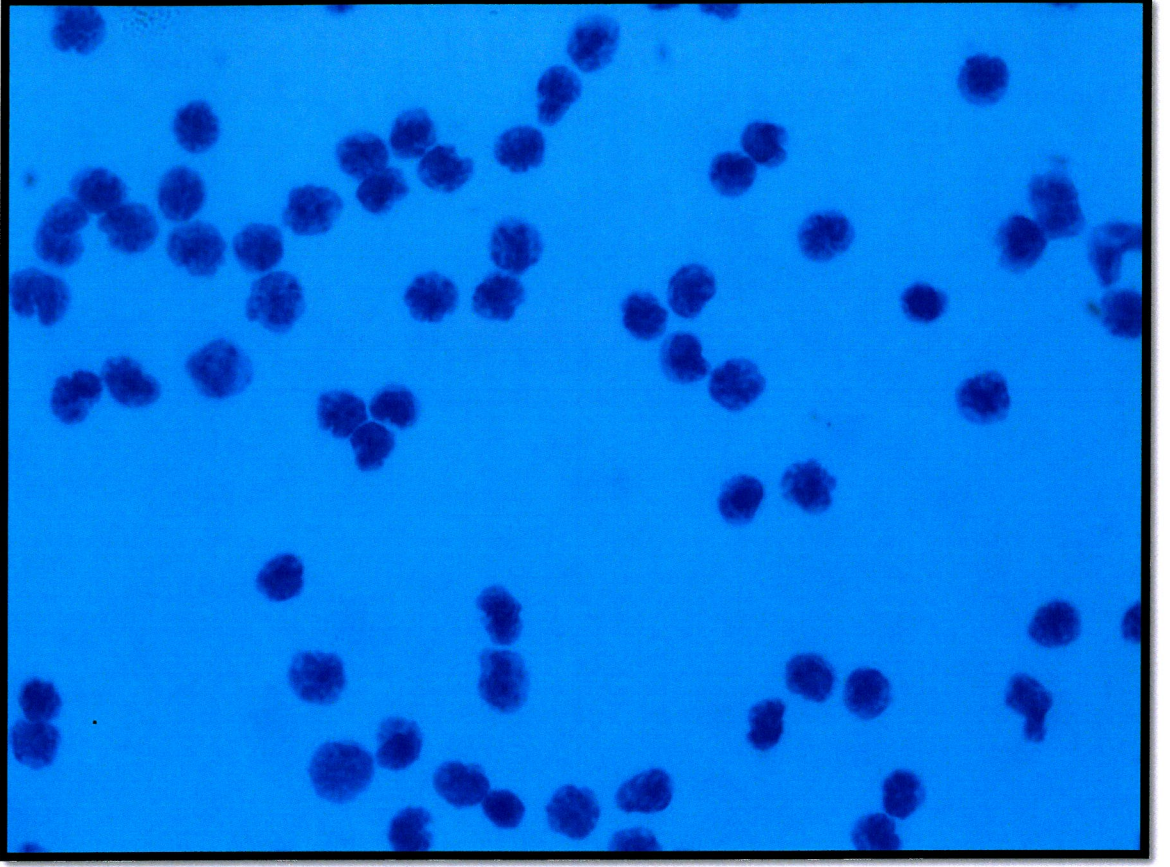


Grafik 1. İmmünohistokimyasal Boyamalara Göre pozitif ve Negatif Hücre Oranları

**Resim 1**

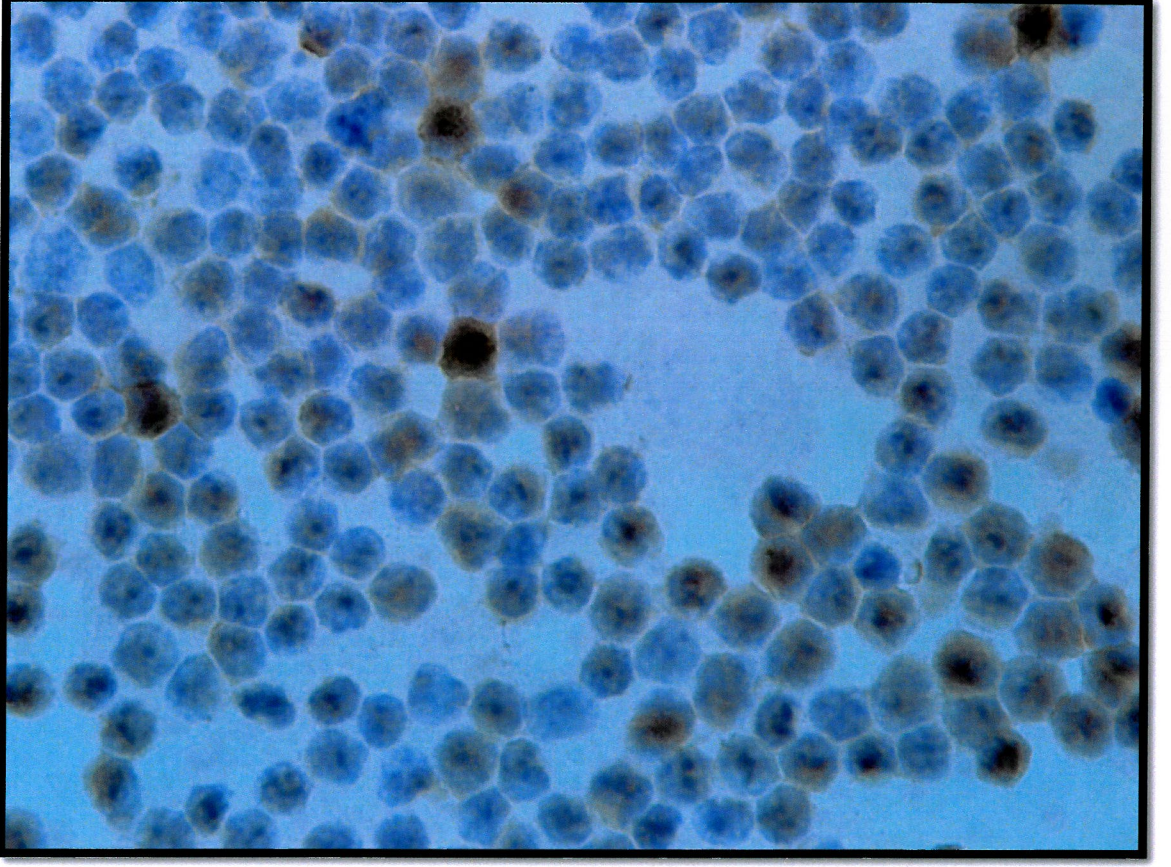
CD 34 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 2**

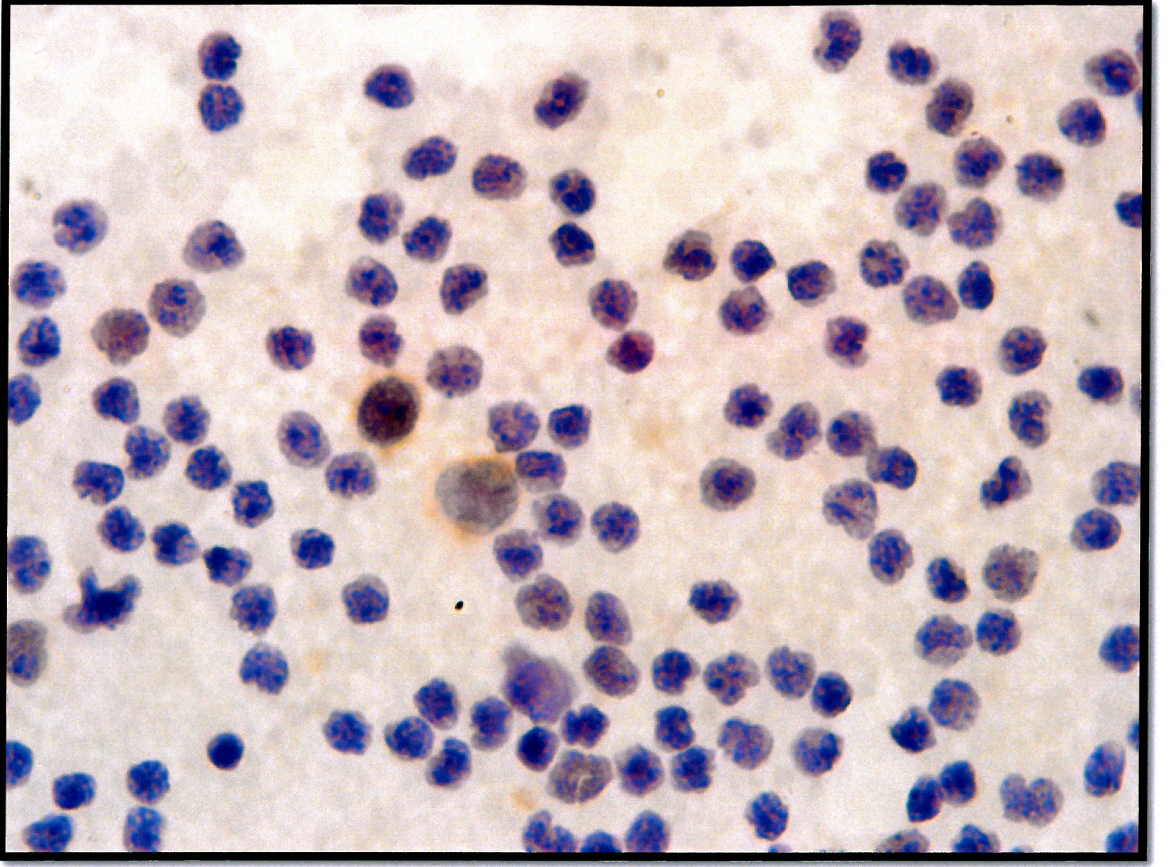
CD 73 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

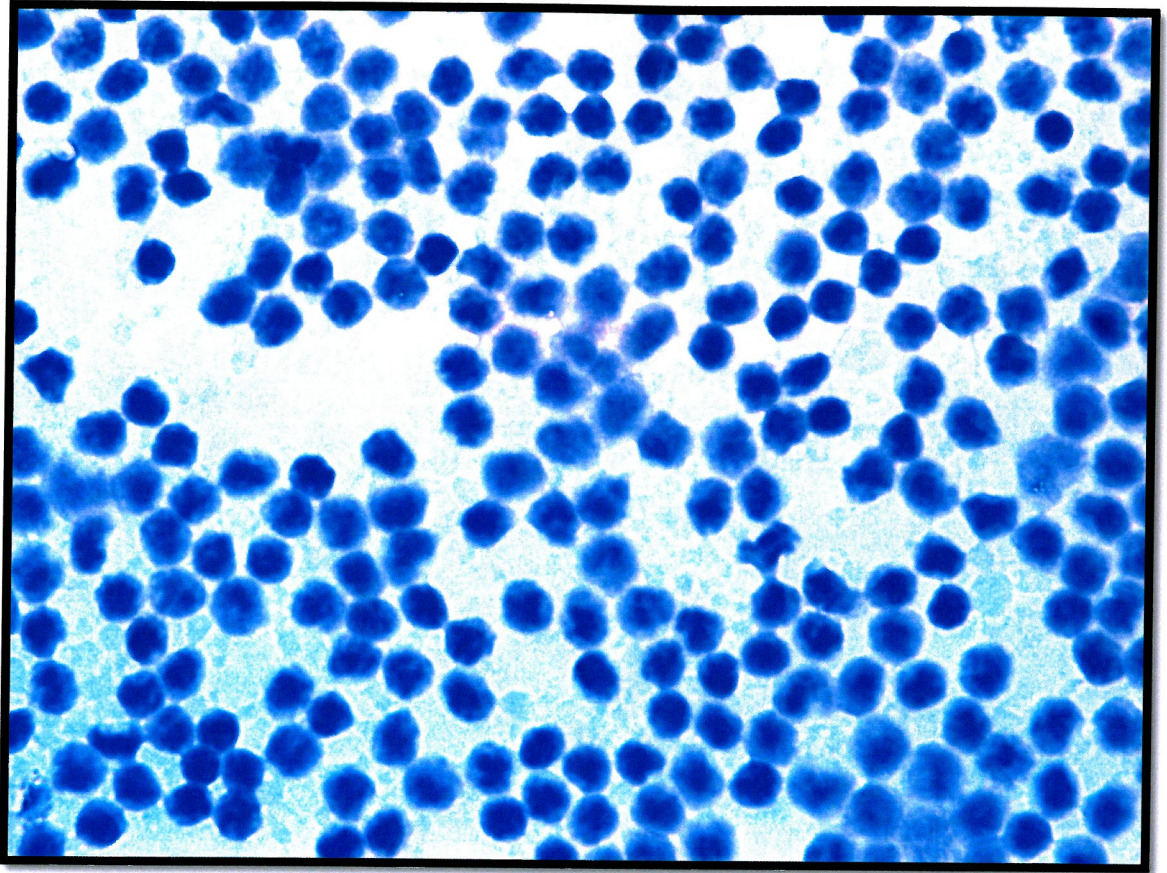
**Resim 3**

CD 45 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

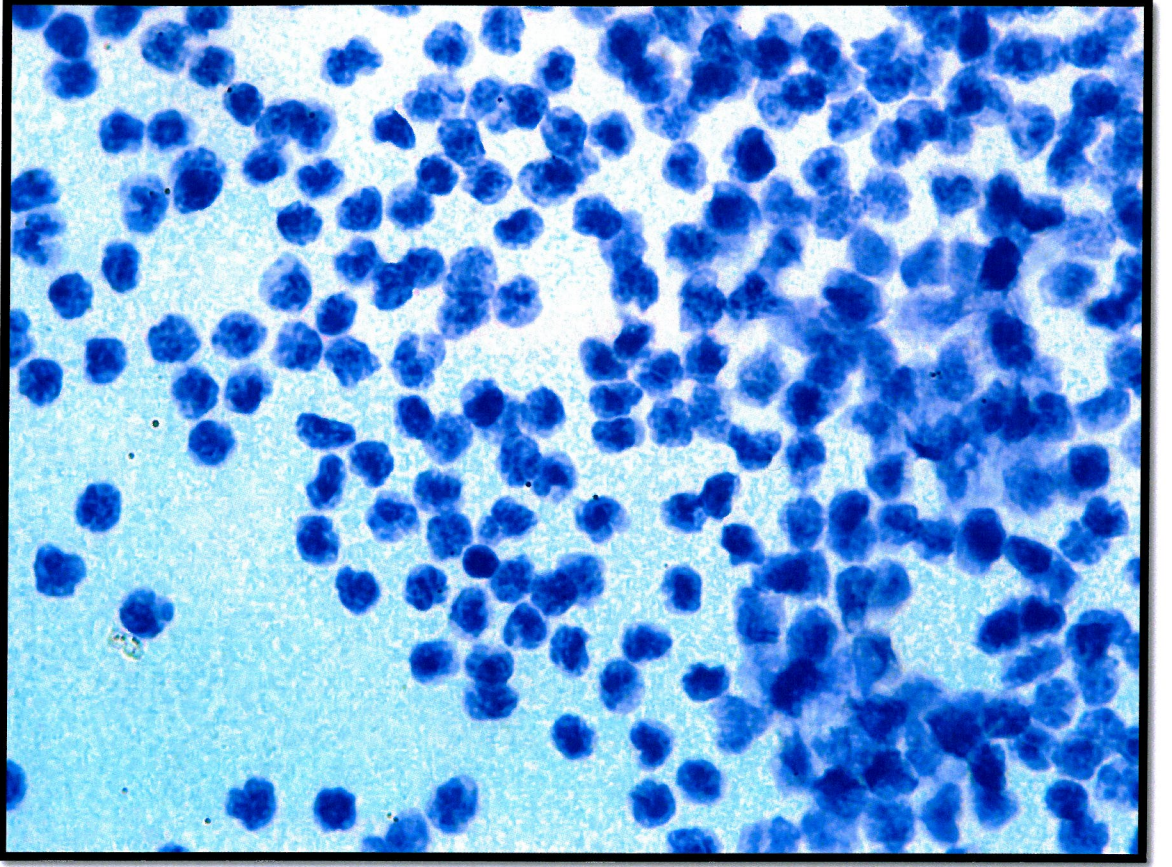
**Resim 4**

CD 105 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.
(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 5**

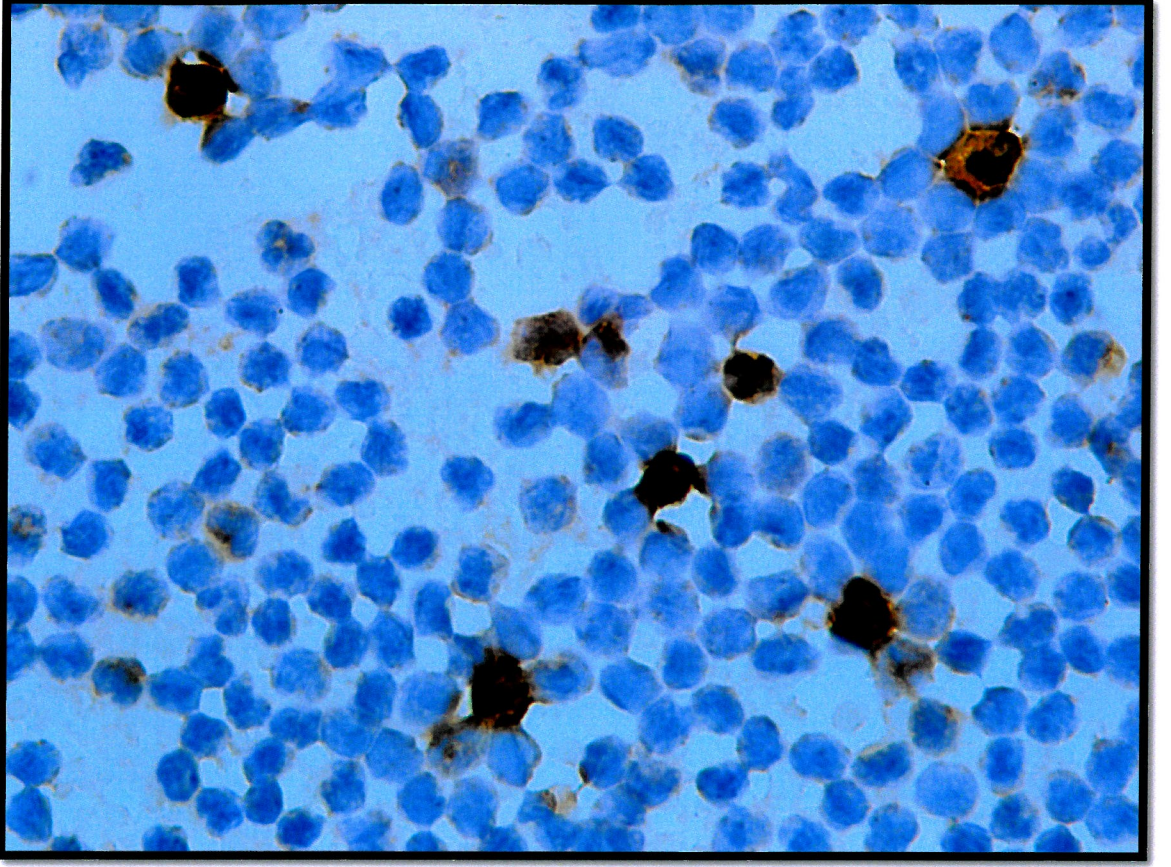
Nanog ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 6**

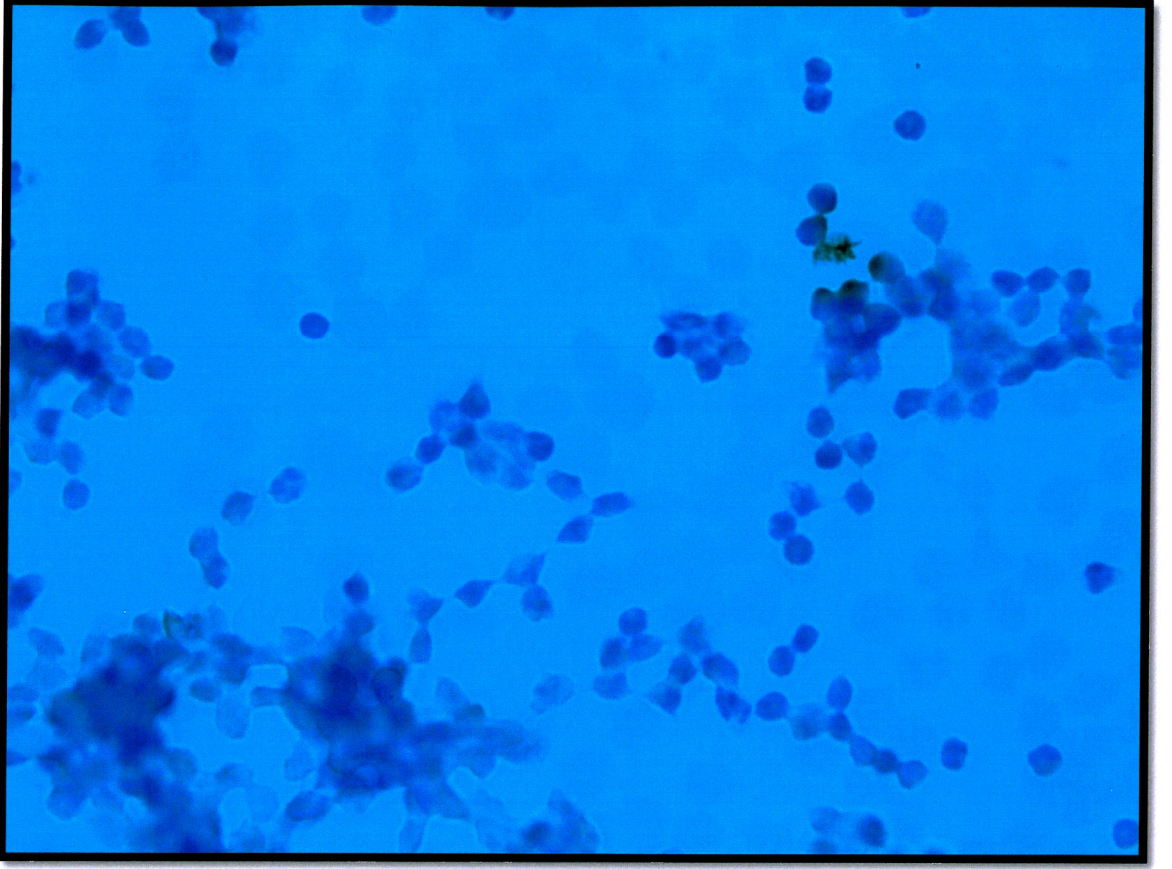
Oct 3/4 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 7**

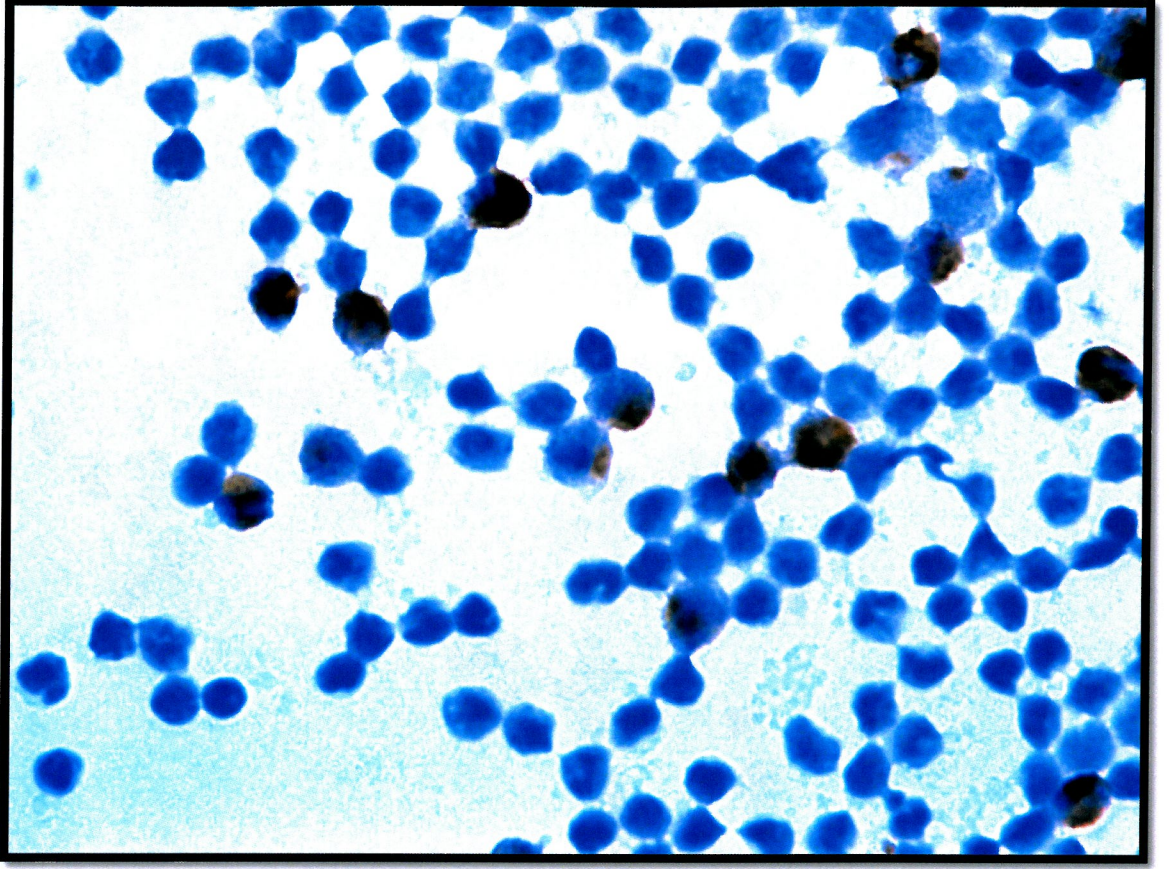
SSEA-1 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 8**

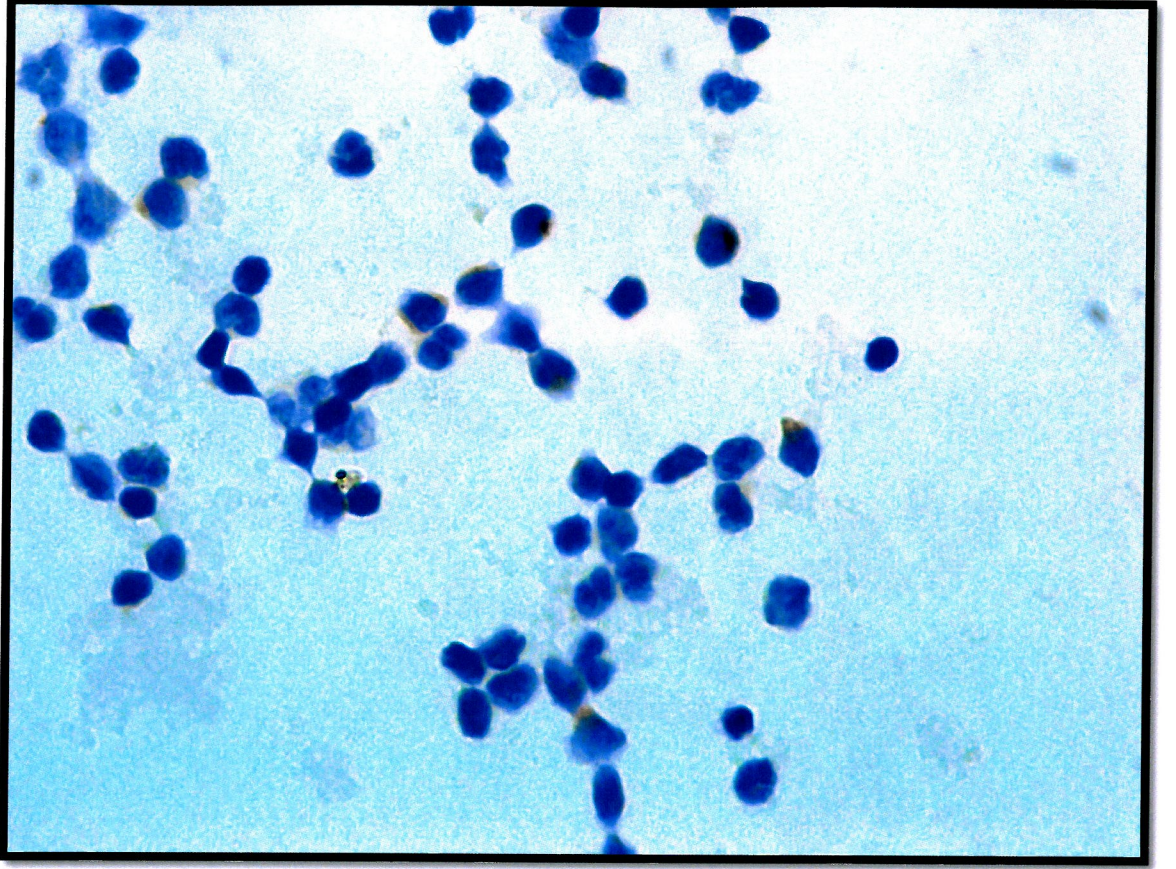
SSEA-3 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 9**

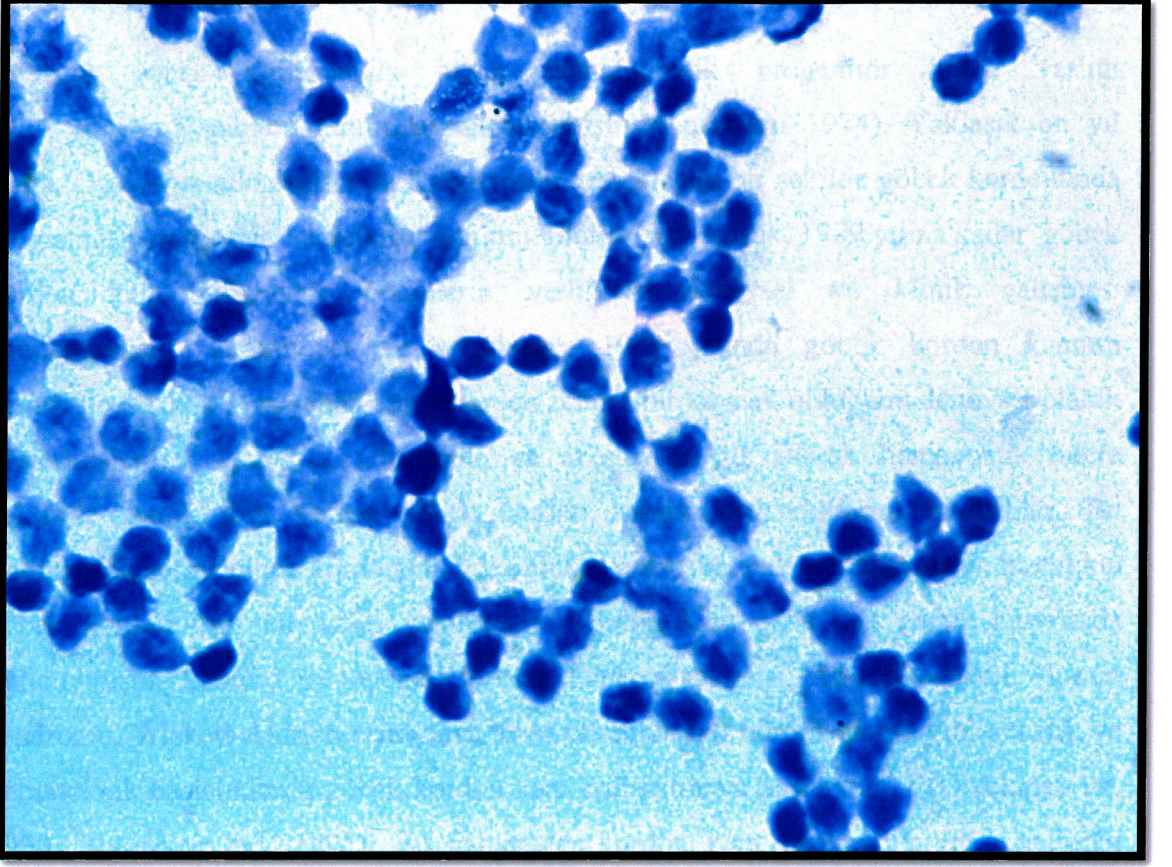
STRO-1 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 10**

TRA-1-60 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

**Resim 11**

TRA-1-81 ifadesi mononükleer hücre tabakasında görülmektedir.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, x100)

5. TARTIŞMA

İnsan göbek kordonunda olgun hematopoetik progenitör hücre varlığı 1974 yılında Knudtzon tarafından gösterilmiştir (Knudtzon 1974). Yaklaşık on yıl sonra, Ogawa ve arkadaşları da Knudtzon'u destekleyen bir şekilde göbek kordonunda progenitör hemapoetik hücrelerin varlığını bildirmiştir. Ancak, 1989 yılına kadar göbek kordon kanı progenitör hücrelerin varlığının deneysel ve klinik çalışması yapılamamıştır. Broxmeyer ve arkadaşları 1989 yılında göbek kordon kanının hematopoetik kök / progenitör hücrelerden zengin bir kaynak olduğunu deneysel olarak göstermişlerdir. Aynı yıl, Gluckman ve arkadaşları ilk olarak hemapoetik hücre naklinde kemik iliği yerine göbek kordon kanını kullandıklarını bildirdiler. Bu bildirimden sonra göbek kordonuna ilgi oldukça artmıştır. Pek çok hastada ve hastalıkta göbek kordon kanı taransferi yapılmıştır. Kordon kanı daha çok çocuk hastalarda kullanılmıştır. Lenfoid ve myeloid lösemi, Fankoni anemisi, Aplastik anemi, Hunter sendromu, Wiskott-Aldrich sendromu, Beta-talesemi and nöroblastoma gibi genetik ve hematolojik hastalıklarda göbek kordon kanı kullanılmaya başlanmıştır (Gluckman vd. 1993, Rubinstein vd. 1995). Bu çalışmalar kordon kanı bankacılığının temellerini atmıştır.

Kordon kanı kök hücreleri yavaş bir hücre bölünme siklusuna sahiptir. Ancak büyüme faktörlerinden gelen sinyallere çabuk yanıt vererek hızlıca çoğalabilirler. Bu faktörler granulosit-makrofaj koloni uyaran faktör (GM-CSF), makrofaj uyaran faktör (M-CFS), Granulosit uyaran faktör (G-CSF), interlökin (IL-3), eritropoetin, trombopoetin, sitokinler, stem cell faktör ve Flt3- ligandır. Kordon kanı kök hücrelerin çoğalması ve yayılmasını araştıran çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır ve bu hücrelerin kendi kendilerini çoğaltma mekanizmaları aydınlatılamamıştır. Bazı araştırmalar kordon kanı kök hücrelerin kendi kendini çoğaltmasında embriyonik kök hücrelerde olduğu gibi Oct4, Sox-2 gibi hücre içi moleküllerin rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Mayanı vd. 1998).

Göbek kordonu kök hücrelerinin işlevininin daha iyi anlaşılabilmesi ve klinik kullanımının daha verimli olabilmesi için biyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Bu çalışmada göbek kordonu kök hücrelerinde embriyonik, hematopoetik ve mezenkimal kök hücre ifadesinin immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Göbek kordonu kök hücreleri, periferik kan kök hücreleri ve kemik iliği kök hücreleri genel olarak otolog hematopoetik kök hücre kaynaklarıdır. Ancak kordon kanının diğer kaynaklardan daha fazla sayıda kök hücre içerdiği bildirilmektedir (Bhartiya vd. 2011).

Göbek kordonu kök hücreleri kemik iliği kök hücrelerine oranla daha yüksek kapasitede çoğalabilme özelliğine ve buna karşın daha düşük immunolojik reaktiviteye sahiptir. Bu nedenle nakillerde Graft-versus-host hastalığı (GVHH) daha düşük orandadır (Broxmeyer vd. 1989, Yu vd. 2001, Ballen 2005, Schoemans vd. 2006, Brunstein vd. 2007, Hwang vd. 2007, Broxmeyer 2010). Ağır immün yetmezlik olan farelerin kemik içine bu hücreler nakledildiğinde, bu farelerde kemik dokunun yeniden oluştuğu izlenmiştir (Mazurier vd. 2003, Wang vd. 2003). Delaney ve arkadaşları 2010 yılında yetişkin kemik iliği HKH'lerine alternatif olarak kordon kanı kök hücrelerinin klinikte kullanılabileceğini bildirmiştir. Klinikte daha çok izole edilen ve kullanılan hücreler CD34+ ve CD38- dir. Sitokin uygulamasına takiben bu hücrelerin sayıları göbek kordonunda kemik iliği ve periferik kandakine oranla daha yüksektir (Pappa vd. 2009). Göbek kordonu kanında hematopoetik kök hücrelerin yanısıra mezankimal kök hücrelerinde olduğu ve in vivo çoğalımında bu mezankimal hücrelerinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Javazon vd. 2004, Wang 2003, Weiss vd. 2006, Secco vd. 2008). Mezenkimal kök hücrelerin kordon kanındaki miktarı düşüktür. Bieback ve arkadaşları 2004'de topladıkları örneklerin sadece üçünden mezankimal kök hücreyi elde etmeyi başarmışlardır.

Kordon kanı kök hücreleri basal düzeyde OCT4, Nanog, SSEA-3 ve SSEA-4 gibi embriyonik kök hücre belirteçlerini ifade ederler (Zhao vd. 2006). Kordon kanından iki aşamalı izolasyonda eritrositeler parçalanmış ve geri kalan hücreler flow sitometri yardımıyla tiplendirilmiştir. Tiplendirilen bu hücreler CXCR4+, CD133+, CD34+, Lin- ve CD45- dir.

Zuba-Surma ve arkadaşları kordon kanında 3-5 mikron çapında ve OCT-4, Nanog ile SSEA-4 ifade eden çok küçük embriyonik benzeri hücreler (very small embryonic-like kök hücreler, VSELs) olarak adlandırılan hücreleri tanımlamışlardır (Kucia ve arkadaşları 2007, Zuba-Surma vd. 2010). VSELs hücreler kemik iliğinde azdır ve bunların olasılıkla primordial germ hücreleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler mezankimal kök hücrelerle karşılaştırıldığında çok küçüktürler buna karşın çekirdekleri açık tipte kromatin içerir ve sitoplazmayı hemen hemen kaplar durumdadır (Bhartiya vd. 2010, Parte vd. 2011).

Bu küçük hücrelerin varlığını bildiren bir diğer çalışmada Bhartiya ve arkadaşlarının 2011 yılında Stem cell ve Development dergisinde yayınlanmıştır. Bhartiya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan göbek kordonunda hemapoetik öncül hücreler dışında çok küçük hücrelerin varlığında göstermişlerdir. Bu çalışmada hem küçük embriyonik benzeri hücreler (VSELS) hem de hemapoetik hücrelerdeki Oct4, SSEA-4 CD34 ve CD 45 ifadeleri incelenmiştir. Çalışmaya göre tüm hücreler CD34 için pozitif bulunmuştur. Oct4 ise VSELS hücrelerde nükleer boyanma gösterirken hemapoetik hücrelerde sitoplazmik boyanma göstermiştir. Benzer boyanma SSEA-4'te de izlenmiştir. CD45 hemapoetik hücrelerde pozitifken VSEL hücrelerde negatif olarak izlenmiştir. Kendi kendine çoğalmada SCF/c-kit ve FL'nin etkili olabileceği yönünde görüşler bulunmaktadır.

Biz çalışmamızda embriyonik /pluripotent, mezenkimal ve hemapoetik öncül kök hücre belirteçlerini kullandık. Bizim sonuçlarımızda embriyonik /pluripotent kök hücre belirteçlerinden yalnızca SSEA-1 ve TRA-1-60 pozitif reaksiyon gösterdi. SSEA-1 kuvvetli boyanma gösterirken TRA-1-60 yalnızca zayıf sitoplazmik reaksiyon gösterdi. Mezenkimal kök hücrelerden CD105 ve STRO-1'de, hematopoetik kök hücre belirteçlerinden CD45 ve CD34'de pozitif reaksiyon izlendi.

6. SONUÇ

Göbek kordon kanı mononükleer hücrelerinde CD34, CD73, CD45, CD105, Nanog, Oct3/4, SSEA-1, SSEA-3, STRO-1, TRA-1-60 ve TRA-1-81 ifadeleri immünohistokimyasal olarak incelendi.

CD73, Nanog, Oct3/4 ve TRA-81 mononükleer hücrelerde pozitif reaksiyon göstermezken, CD34, CD105, CD45, SSEA-1, STRO-1, SSEA-3 ve TRA-1-60 pozitif reaksiyon gösterdi.

CD34 mononükleer hücrelerin az bir kısmında pozitif reaksiyon verdi ve boyanmalar nükleerdi. CD45 için pozitif olan hücrelerin çekirdekleri yoğun, sitoplazmaları ise zayıf boyandı. Çok az hücrede CD105 ifadesi vardı ve zayıf pozitif bayandı. SSEA-1 ve STRO-1 ile pozitif reaksiyon veren hücrelerin çekirdekleri kuvvetli, sitoplazmaları orta yoğunlukta boyandı. TRA-1-60 ile pozitif reaksiyon veren hücrelerde zayıf ve orta yoğunlukta sitoplazmik boyanmalar vardı. SSEA-3 ise mononükleer hücrelerde sitoplazmik olarak boyandı.

Yapılan istatistik analiz sonucunda ($P < 0.001$) mezenkimal ve kök hücre belirteçlerini eksprese eden hücrelerin oranının embriyonik kök hücre belirteçlerini eksprese eden hücrelere oranından biraz daha fazla olduğu görülmüştür.

Klinikte geniş kullanım alanı olan göbek kordon kanı progenitor/ kök hücrelerin biyolojik özelliklerinin bilinmesi klinik çalışmalarda önemli olacaktır. Biz bu çalışmada daha sonra yapacağımız çalışmalara temel oluşturması için öncelikle göbek kordon kanının immunolojik özelliklerini belirlemeye çalıştık. Göbek kordon kanı kök hücre eldesi yönünden kolay ve pratik bir kaynaktır. Embriyonik/ pluripotent, hematopoetik ve mezenşimal kök hücre belirteçlerini inceleyen çalışma çok azdır. Bu çalışmada bu belirteçler ilk kez immünohistokimyasal yöntemle belirlenmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Ballen, K.K. (2005) New Trends in Umbilical Cord Blood Transplantation. *Blood.*, 105:3786-3792.
- Baran, Ö., Nergiz, Y. ve Bahçeci, S. (2007) Göbek Kordonu Kan ve stromal Kökenli Hücrelerin Sınır Hücrelerine Farklılaşması. *Dicle Tıp Dergisi.*, 34,3:233-238s.
- Bhartiya, D., Kasiviswanathan, S., Unni, S.K., Pethe, P., Dhabalia, J.W., Patwardhan S. and Tongaonkar H.B. (2010) Newer Insights into Premeiotic Development of Germ Cells in Adult Human Testis Using Oct-4 As A Stem Cell Marker. *J Histochem Cytochem.*, 58:1093–1106.
- Bhartiya, D., Shaikh, A., Nagvenkar, P., Kasiviswanathan, S., Pethe, P., Pawani, H., Mohanty, S., Rao, A., Zaveri, K. and Hinduja, I. (2011) 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 Cells and Development.*,00:1-6.
- Bieback, M., Kern, S., Kluter, H. and Eichler, H. (2004) Critical Parametres for The Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells.*, 22:625-634.
- Broxmeyer, H. (2010) Umbilical Cord Transplantation: Epilogue. *Sernin Hematol.*, 47:97-103.
- Broxmeyer, H., Douglas, G.W., Hangoc G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Army, M., Thomas, L. and Boyse, E.A. (1989) Human Umbilical Cord Blood As A Potential Source of Transplantable Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 86:3828–3832.
- Brunstein, C.G., Setubal, D.C. And Wagner, J.E. (2007) Expanding the Role of Umbilical Cord Blood Transplantation. *Br.J. Hematol.*, 137:20-35.
- Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B. and Troyer, D. (2006) Expression of Early Transcription Factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by Porcine Umbilical Cord (PUC) Matrix Cells. *Reproductive Biology and Endocrinology.*, 4:1-13.
- Gluckman, E., Wagner, J., Hows, J., Kernan, N., Bradley, B. and Broxmeyer, HE. (1993) Cord Blood Banking for Hematopoietic Stem Cell Transplantation: an International Cord Blood Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant.*, 11:199-200.
- Hwang, W.Y.K., Samuel, M., Tan, D., Koh, L.P., Lim, W. and Linn, Y.C. (2007) A Meta-Analysis of Unrelated Donor umbilical Cord Blood Transplantation Versus Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation in Adult and Pediatric Patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 13:444-453.

- İnan, S., Özbilgin, K. (2009) Kök Hücre Biyolojisi. *Sağlıkta Birikim.*, 1,5:11-23s.
- Javazon, E., Beggs, K. and Flake, A. (2004) Mesenchymal Stem Cells: Paradoxes of Passaging. *Exp. Hematol.*, 32:414-425.
- Karaöz, E., Ovalı, E. (2004) Kök Hücreler, Derya kitabevi, Trabzon,187s.
- Karaöz, E. (2004, Mart.) *Bilim ve Teknik Dergisi.*, 32: 62-64.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. and Bieback, K. (2006) Comparative analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cell.*, 24:1294-1301.
- Knudtson, S. (1974) In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood.*, 43:357-361.
- Kucia, M., Halasa, M., Wysocynski, M., Baskiewicz-Masiuk, M., Moldenhawer, S., Zuba-Surma, E., Czajka, R., Wojakowski, W., Machalinski, B. and Ratajczak, MZ. (2007) Morphological and Molecular Characterization of Novel Population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ Very Small Embryonic-like Cells Purified from Cord Blood: Preliminary Report. *Leukemia.*, 21: 297-303.
- Kucia, M., Zuba-Surma, E., Wysocynski, M., Dobrowolska, H., Reza, R., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. (2006) Physiological and Pathological Consequences of Identification of Very Small Embryonic like (VSEL) Stem Cells in adult Bone Marrow. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57: 5-18.
- Leary, A.G., and Ogawa, M. (1987) Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood.*,69:953-956.
- Lu, L., Liu, Y., Yang, S., Zhao, Q., Wang, X., Gang, W., Han, Z., Xu, Z., Lu, Y., Liu, D., Chen, Z., Han, Z. (2006) Isolation and Characterization of human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells with Hematopoiesis-supportive Function and Other Potentials. *Haematologica.*, 91:1017-1026.
- Mayani, H. and Lansdorp, P.M. (1998) Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells.*, 16:153-165.
- Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O. and Dick, J. (2003) Rapid Myeloerythroid Repopulation After Intrafemoral Transplantation of NOD-SCID Mice Reveals A New Class of Human Stem Cells. *Nat. Med.* 9:959-963.
- Nakahata, T. and Ogawa, M. (1982) Hemopoietic Colony-forming Cells in Umbilical Cord Blood with Extensive Capability to Generate mono- and Multipotential Hemopoietic Progenitors. *J clin Invest.*, 70:1324-1328.
- Pappa, K. and Anagnou, N. (2009) Novel Sources of fetal Stem Cells: Where Do They Fit on The Developmental Continuum? *Regen. Med.*, 4:423-433.

- Parte, S., Bhartiya, D., Telang, J., Daithankar, V., Salvi, V., Zaveri K. and Hinduja, I. (2011) Detection, Characterization and Spontaneous Differentiation in Vitro of Very Small Embryonic-like Putative Stem Cells in Adult Mammalian Ovary. *Stem Cells Development.*, 20(8):1451-1464.
- Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield R.E., Adamson, J.W., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Taylor, P.E. and Stevens, C.E. (1995) Processing and Cryopreservation of Placental/Umbilical Cord Blood for Unrelated Bone Marrow Reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 92:10119-10122.
- Sağsöz, H., Ketani, M. (2008) Kök Hücreler. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi.*, 1,2:29-33.
- Schoemans, H., Theunissen, K., Maertens, J., Boogaerts, M., Verfaillie, C. and Wagner, J. (2006) Adult Umbilical Cord Blood Transplantation: A Comprehensive review. *Bone Marrow Transplant.*, 38: 83-93.
- Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N.M., Fogaça, L.L., Cerqueira, A., Carvahó, M.D., Jazedje, T., Okamoto, O.K., Muotri, A.R. and Zatz, M. (2008) Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer Than Blood! *Stem Cells.*, 26:146-150.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. and Kai, T. (2001) Stem cells find their niche. *Nature*, 414:98-104.
- Şahin, F., Saydam, G. and Omay, S. (2005) Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. *Türk Hematoloji- Onkoloji Dergisi.*, 15, 1: 48-56s.
- Şeftalioğlu, A. (1998) Genel İnsan Embriyolojisi, **Ankara**, 159s
- Wagner, J.E. (1994) Umbilical Cord Blood Transplantation: Overview of the Clinical Experience. *Blood Cells.*, 20:227-234.
- Wang, H., Hung, S., Peng, S., Huang, C., Wei, H., Guo, Y., Fu, Y., Lai, M. and Chen C. (2004) Mesenchymal Stem Cells in The Warton's jelly of The Human Umbilical Cord. *Stem Cells.*, 22:1330-1337.
- Wang, J., Kimura, T., Asada, R., Harada, S., Yokota, S., Kawamoto, Y., Fujimura, Y., Tsuji, T., Ikehara, S. and Sonoda Y.(2003) SCID-repopulating Cell Activity of Human Cord Blood –derived CD34- Cells Assured by Intra-bone Marrow Injection. *Blood.*,101(8):2924-31.
- Weiss, M.L. and Troyer, D.L. (2006) Stem Cells in The Umbilical Cord. *Stem Cell rev.*, 2: 155-162.
- Whittaker, P.A. (2005) Therapeutic cloning: The ethical limits. *Toxic Appl Pharmacol* 270,689-691.
- Winton, D. (2000) Stem Cell in the Epitelium of the Small Intestine and Colon. In *Stem Cell Biology*, (ed. D. R. Marshak, R. L. Gardner, D. Gottlieb.) **NY:Cold Spring Harbor Lab. Press**, pp. 515-36.

Yu, L.C., Wall, D.A., Sandler, E., Chan, K.W., Grayson, G. and Kletzel, M. (2001) Unrelated Cord Blood Transplant Experience by the Pediatric Blood and Marrow Transplant consortium. *Pediatr. Hematol. Onc.*, 18:235-245.

Zhao, Y., Wang, H. and Mazzone, T. (2006) Identification of Stem Cells from Umbilical Cord Blood with Embryonic and Hematopoietic Characteristics. *Exp. Cell Res.*, 312:2454-2464.

Zuba-Surma, E.K., Klich, I., Greco, N., Laughlin, M.J., Ratajczak, J. and Ratajczak, M.Z.(2010) Optimization of Isolation And Further Characterization of Umbilical-cord-blood-derived Very small Embryonic/epiblast Like Stem Cells (VSELs). *Eur. J. Haematol.*, 84:34-46.

WEB_1. (2011) Stem Cell Markers. <http://www.rndsystems.com/> (17.12.2011).

WEB_2. (2011) Stem Cell Markers. <http://www.scbt.com/> (17.12.2011).

WEB_3. (2011) Stem Cell Markers: Scientific Progress and Future Research Directions. <http://stemcells.nih.gov/index.asp> (24.05.2011).

WEB_4. (2011). Hill's web site. Göbek kordonu Histolojik Kesiti. <http://embryology.med.unsw.edu.au/> (17.12.2011).

8. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Denizli’de doğdum. Orta öğretimimi Denizli Merkez İlköğretim okulunda, Orta öğrenimimi Denizli Kazım Kaynak Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde tamamladım. 2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2007 yılında mezun oldum. 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. Pamukkale Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı’nda 2008 yılından itibaren Biyolog olarak çalışmaktayım.