

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALDEHİT GRUBU FİKSATİFLERİN FİKSASYON POTANSİYELİNİN
İMMÜNFLÜORESAN TEKNİK İLE SÜPER ÇÖZÜNÜRLÜK MİKROSKOBUNDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ceren Mungan

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alp Can

Temmuz

2019

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ceren Mungan

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Alp CAN danışmanlığında Ceren MUNGAN tarafından hazırlanan bu çalışma 01/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İ.Sinan ÖZKAVUKÇU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Alp CAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Aldehit Grubu Fiksatiflerin Fiksasyon Potansiyelinin İmmünflüoresan Teknik İle Süper Çözünürlük Mikroskobunda Değerlendirilmesi

Ceren Mungan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Alp Can

Fiksasyon, hücre ve doku ile ilgili yapılan çalışmalar için ön basamaktır. Çalışılacak örneğin yapısına uygun fiksatifin seçilmesi bu işlemi etkin kılacak bir özelliktir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda en çok kullanılan fiksatifler Paraformaldehit ve Formaldehit olmakla birlikte son yıllarda fiksatiflerle ilgili yapılan çalışmalara kullanımı nadir ve eski olan Gliyoksal eklenmiştir. Bu fiksatiflerin hücre ya da dokulara uyumlu çalışmasını ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonu ve ısısı, fiksatifin konsantrasyonu, osmolaritesi ve doku ya da hücre penetrasyonu etkilemektedir.

Çalışmamızda ticari olarak satın alınan GMP kalitesindeki insan göbek kordonu stroması kaynaklı kök hücreler kullanmış ve PFA, FA ve Gly ve bir iyonik olmayan deterjan Triton X-100'ün farklı kokteylleri halinde hazırlanarak fikse edilmiş ve hücrelerin belli yerlerinde lokalize olan proteinler işaretlenerek fiksatiflerin fiksasyon potansiyeli, boyanma deseni ve sinyal şiddeti ölçümlerine göre lazer taramalı süper çözünürlük konfokal mikroskobunda gözlemlere dayalı kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, Gly gruplarında arka plan ve spesifik olmayan boyanmalar gözlenmiş ve FA gruplarında Gly'ye göre daha iyi bir boyanma deseni ve güçlü bir sinyal oluşumu belirgindir. Bu durumda Gly fiksasyonunun PFA veya FA'ya göre üstün yönleri olmadığı ve FA hücre fiksasyonu sırasında kullanılabilir bir fiksatif olabileceği saptanmıştır.

2019, 61 sayfa

Anahtar kelimeler: Fiksasyon, paraformaldehit, formaldehit, gliyoksal, mezenkimal kök hücre, süper çözünürlük mikroskobu

ABSTRACT

MSc Thesis

Assesment of Fixation Potential of Aldehyde Group Fixatives on Super Resolution
Microscopy by Immunofluorescence Technique

Ceren Mungan

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Alp Can

Fixation is the preliminary step for cell and tissue studies. Selecting the fixative appropriate to the structure of the sample to be studied is a feature that will make this process effective. Although most commonly used fixatives in immunohistochemical studies are Paraformaldehyde and Formaldehyde, Glioxal, which is rare and old in use, has been added to the studies on fixatives in recent years. Hydrogen ion concentration and temperature of the medium, fixative concentration, osmolarity, and tissue or cell penetration are influenced by the compatibility of these fixatives with cells or tissues.

In our study, we used commercially purchased GMP quality human umbilical cord stromal derived stem cells and prepared cocktails in different applications of PFA, FA and Gly and a non-ionic detergent Triton X-100. fixation potential, staining pattern in cell morphology and signal strength measurements were evaluated qualitatively and quantitatively based on observations on laser scanning super resolution confocal microscopy. In FA groups, a better staining pattern and a stronger signal formation are evident than in Gly. In this case, Gly fixation was not superior to PFA or FA and it could be used as a fixative during FA cell fixation.

2019, 61 pages

Keywords: Fixation, paraformaldehyde, formaldehyde, glyoxal, mesenchymal stem cell, super resolution microscopy

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden çokça faydalandığım, sosyal yaşamı ile hayatıma iyi bir rol model olan ve yaptığım çalışmalar sırasında sabır ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen değerli tez danışmanın Sayın Prof. Dr. Alp CAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez ve araştırma projelerimizi tamamlama aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Özgür ÇINAR'a çok teşekkür ederim. Laboratuvarında saatlerimizi, günlerimizi birlikte dolu dolu geçirdiğim ve iyi bir çalışma ortaklığı yaptığım değerli hocam Sayın Öğr. Gör. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte 4 yıl geçirdiğim Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı asistanlarına, teknisyenlerine ve idari personeline çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirmeyen ve adeta benimle birlikte çabalayan annem Ayşe MUNGAN'a, babam Cemal MUNGAN'a ve kardeşim Murat MUNGAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ONAY	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. FİKSASYON	3
2.1.1. FİKSATİFLER VE ETKİ MEKANİZMALARI	3
2.1.2. Fiksasyonu etkileyen Faktörler	4
2.1.2.1. Hidrojen iyonu konsantrasyonu (pH)	5
2.1.2.2. Osmolarite.....	5
2.1.2.3. Fiksasyon Sıcaklığı.....	5
2.1.2.4. Fiksatifin Doku/Hücreye Penetrasyonu	6
2.1.2.5. Fiksasyon Süresi.....	6
2.2. ALDEHİT GRUBU FİKSATİFLERİ	6
2.2.1. FORMALDEHİT (FA).....	6
2.2.2. GLİYOKSAL (Gly)	7
2.2.3. PARAFORMALDEHİT	9

2.3. YAYGIN OLARAK KULLANILAN PERMEABİLİZASYON AJANLARI.....	9
2.4. KÖK HÜCRE.....	10
2.4.1. MEZENKİMAL STROMA HÜCRELERİ	10
İnsan Göbek Kordonu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	11
2.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BELİRTEÇLER.....	11
2.5.1. HÜCREYE ÖZGÜ BELİRTEÇLER	11
2.5.1.1. N-Cadherin (N-Cad)	11
2.5.1.2. CD73.....	11
2.5.1.3. Mitotracker™	12
2.5.2. HÜCRE İSKELETİ BELİRTEÇLERİ	12
2.5.2.1. Pericentrin (PCN)	12
2.5.2.2. Vimentin (Vim)	12
2.5.3. ÇEKİRDEK BELİRTEÇLERİ	13
2.5.3.1. Nucleostemin (NS)	13
2.5.3.2. Sentromerik Protein- A (CENP-A)	13
2.5.3.3. Lamin A+C	13
3. GEREKÇE VE AMAÇ	14
4. GEREÇ VE YÖNTEM	15
4.1. GEREÇ	15
4.1.1. İGK-MKH'LERİN LABORATUVAR TRANSFERİ	15
4.1.2. İGK-MKH'LERİN KÜLTÜR EDİLMELERİ	15
4.1.3. ARAŞTIRMADA KULLANILAN FİKSATİFLER VE HAZIRLANIŞLARI	16
4.1.4. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BELİRTEÇLER	17

4.2. YÖNTEM.....	17
4.2.1. FİKSATİF VE DETERJAN HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	17
4.2.1.1. % 3,5 FA hazırlama.....	17
4.2.1.2. % 3,5 PFA Hazırlama	18
4.2.1.3. % 3 Gly Hazırlama	18
4.2.1.4. % 0,1 TX deterjanının Hazırlanması	18
4.2.2. İGK-MKH'lerin FİKSASYON ÖNCESİ ve SIRASINDA SÜPER ÇÖZÜNÜRLÜK MİKROSKOBUNDA GÖRÜNTÜLENMESİ.....	19
4.2.3. Fiksasyon sonrası hücrelerin immünohistokimyasal işaretlenmesi	20
4.2.4. FİKSE EDİLEN İGK-MKH'LERİN SÜPER ÇÖZÜNÜRLÜK MİKROSKOBUNDA GÖRÜNTÜLENMESİ.....	23
4.2.5. FLÜORESAN SİNYALLERİN ANALİZİ VE KANTİTASYONU	24
4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	24
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
5.1. İGK-MKH'LERİN FİKSASYON SÜRECİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	25
5.2. FİKSASYON SONRASI İGK-MKH'LERİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	28
5.2.1. CANLI HÜCRELERDE MİTOKONDRIYON İŞARETLEMESİ ÜZERİNE FİKSASYONUN KORUYUCU ETKİSİ	28
5.2.2. FİKSASYON SONRASI İGK-MKH'LERİN İMMÜNFLÜORESAN İŞARETLENMESİ	30
5.2.2.1. CENP-A.....	30
5.2.2.2. NS.....	32
5.2.2.3. Lamin A+C	34

5.2.2.4. N-Cad.....	36
5.2.2.5. CD73.....	38
5.2.2.6. Vim.....	41
5.2.2.7. PCN.....	43
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
6.1. İGK-MKH'LERİN FİKSASYON SÜREÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	47
6.2. İGK-MKH'LERİN İMMUNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER SONRASINDA MORFOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	47
6.3. SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. FA (A) ve Gly'nin (B) yapısal formülleri	8
Şekil 4.1. Mikrograflar üzerinden CTCF değerinin hesaplanması	24
Şekil 5.1. Kültür ortamı içerisinde İGK-MKH'lerin canlı kayıtların başlangıç (T0) ve bitiş (T15) zamanları	26
Şekil 5.2. İGK-MKH'lerin her fiksatif grubu ile yapılan canlı kayıtların başlangıç (T0) ve bitiş (T5, T15) zamanları.....	27
Şekil 5.3. Canlı İGK-MKH'lerin fiksasyon sonucunda izlenen MitoTracker desenleri.....	29
Şekil 5.4. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası CENP-A desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c).	30
Şekil 5.5. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası NS desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c).	32
Şekil 5.6. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası Lamin A+C desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c).	34
Şekil 5.7. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası N-Cad desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c).	36
Şekil 5.8. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası CD73 desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c).	38
Şekil 5.9. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonra vimentin desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c).	41
Şekil 5.10. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonra PCN desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) ölçümlerinden elde edilen değerlerin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c)	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Fiksatif gruplarının formül açıklamaları.....	16
Çizelge 4.2. Fiksatiflerin ve deterjanın marka ve katalog numarası, stok konsantrasyonu ve çalışma konsantrasyonu	16
Çizelge 4.3. Hücresel belirteçlerin marka ve katalog numarası, çalışma dilüsyonları ve hücre lokalizasyonları	17
Çizelge 4.4. Fiksatif gruplarının uygulama değişkenleri	19
Çizelge 4.5. Canlı görüntüleme ve fiksasyon sırasında gerçekleştirildiği sıcaklık değerleri, alınan kayıtların süresi ve interval aralığı	20
Çizelge 5.1. Canlı görüntüleme ve fiksasyon sırasında alınan canlı kayıtların morfolojik sonuçları	26
Çizelge 5.2. CENP-A ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları	31
Çizelge 5.3. NS ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları....	33
Çizelge 5.4. Lamin A+C ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları	35
Çizelge 5.5. N-Cad ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları	37
Çizelge 5.6. CD73 ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları	39

Çizelge 5.7. Vim ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları....42

Çizelge 5.8. PCN ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları....44

Çizelge 5.9. İmmünflüoresan işaretlemeler sonrasında fiksatif gruplarının genel performansı.....45



SİMGELER DİZİNİ

AMP	Adenozin Monofosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
Apo	Apokromatik
cm ²	Santimetre Kare
CTCF	Corrected Total Cell Fluorescence
CO ₂	Karbondioksit
DIC	Differential interference contrast (Diferansiyel Girişim Kontrast)
Dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FA	Formaldehit
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Flüoresan İzotiyosiyanat)
g	Gram
Gly	Gliyoksal
GTP	Guanidin Trifosfat
HAM's F-12	F-12 Besi Ortamı
İGK-MKH	İnsan Göbek Kordonu Stroması Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
kDa	Kilodalton
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mL	Mililitre
mm	Milimetre

MW	Megawatt
mV	Milivolt
nm	Nanometre
N	Normal
NA	Numerik Açıklık
N-Cad	N-Cadherin
NS	Nucleostemin
PBS	Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tamponlu Salin
PCN	Pericentrin
PCM	Pericentrioler Materyal
PFA	Paraformaldehit
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
°C	Santigrat Derece
Vim	Vimentin

1. GİRİŞ

Fiksasyon, dokuları, hücre ve hücre bileşenlerini otolize karşı korumayı amaçlayan immunhistokimyasal ve sitokimyasal araştırmaların temel ve ilk basamağıdır. Böylelikle uygun boyama ve hücre içi işaretleme tekniğı kullanılarak mikroskopik gözlemler yapılabilir. Bu amaçla 19. yüzyıldan bu yana çok sayıda kimyasal fiksatif türü ve karışımları kullanılmıştır (1). İlk kez, 1893 yılında aldehit grubu fiksatifleri arasında en yaygın olarak kullanılan formaldehit (FA) 1:10 oranında seyretilmiş (formalin çözeltisi olarak adlandırılır.) olarak, birçok kokteylde bulunur (2). Formaldehit (FA), iki karbon, bir hidrojen ve bir oksijen atomundan oluşan aldehit grubunun en küçük üyesidir. FA, makromoleküllere bağlanarak öncelikle metilen köprüleri kurar ve çapraz bağlar oluşturur (3). Düşük moleköl ağırlığı sayesinde doku ya da hücrelere kolayca penetre olur ve bu sayede dokuların uzun süre saklanmasına olanak verir. Birçok araştırmada oldukça yaygın kullanılan FA'nın solunum sistemi, cilt ve gözlere olan zararlı etkisi hâlâ tartışma konusudur (4).

Paraformaldehit (PFA), FA'nın polimerize edilmiş hali olarak, proteinlerin üçüncül yapısını değıştirmeden amino gruplarına çapraz bağlanır. Böylece hücresel epitoplara spesifik antikorlar ile işaretleme prosedürlerinde nispeten korunmuş halde kalır (5, 6). PFA fiksasyonu, hücre fiksasyonu sırasında immün işaretleme için gerekli olan hücre morfolojisini korumak için çalışma konsantrasyonu % 3-4 olarak kabul edilmiştir (7). Fakat fiksasyon sırasında PFA'nın morfolojik değışimlere, antijen spesifitesinin kaybına neden olduğı yönünde raporlar bulunmaktadır (8).

Gliyoksal (Gly), arka arkaya bağlanmış formaldehite benzer yapısal bir formüle sahip dialdehittir. 1960'dan bu yana birçok bilimsel araştırmada fiksatif olarak kullanılmıştır. Daha güvenli bir profil, daha hızlı reaksiyon hızı ve seçici çapraz bağlanması sebebiyle gliyoksalin immunreaktiviteyi koruduğı ve antijen geri kazanımına olan ihtiyacı azalttığı düşünölmektedir (9).

Fiksasyonun yanı sıra, birçok örnek antijen- antikor etkileşiminin sağlanması için deterjan ekstraksiyonu gerekmektedir. Bu nedenle Triton X-100 (TX) gibi iyonik olmayan deterjanlar kullanılarak antikorun antijene bağlanma sürecini daha hızlandırabilir. TX,

hücre zarındaki lipid yapısını etkili bir şekilde yıkar, ancak antijen-antikor etkileşimini inhibe etmez. Fakat zar ile ilişkili antijenler için kullanıma uygun değildir. Fiksasyon çözeltilisine TX eklenebilir. Böylece fiksasyon ve permeabilizasyon aynı anda gerçekleştirilir. Alternatif olarak fiksasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra TX uygulanabilir. Bu uygulama rutinde daha çok kullanılmaktadır.

Bu yüksek lisans tezi çalışmasının amacı fiksasyon işleminde Gly ve FA fiksasyonunun en sık kullanılan PFA fiksasyonuna göre kök hücrelerin farklı lokasyonlarında ifadelenen farklı proteinlerin immün işaretlemesine etkisi olup olmadığını saptamak ve bu fiksatiflerin karşılaştırmalı olarak fiksasyon potansiyelini değerlendirmektir. Fiksatiflerle ilgili kazanılan deneyimlerden yola çıkarak, insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (İGK-MKH) üç farklı fiksatifi TX deterjanının farklı uygulamaları ile birlikte fikse edip, sekiz farklı hücresel proteinin ayrı ayrı işaretleyerek süper çözünürlük konfokal mikroskopundan elde edilen görüntülerde yer alan boyanma desenini kalitatif olarak ve alınan sinyal şiddetlerini kantitatif olarak değerlendirmeyi amaçladık.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. FİKSASYON

Fiksasyon terimi, sabit ya da sıvı bir ortamda sabitleme olarak tanımlanmaktadır. Sitokimyasal ve immunhistokimyasal çalışmalarda doku veya hücrelerde meydana gelen değişimlerin ayrıntılı olarak incelenmesi fiksasyon yöntemleri ile sağlanmaktadır. Yapılan çalışmaları mikroskopta gözlenmeden önce örneklerin otolize uğramasını önlemek için fiksasyon temel bir basamaktır (1). Bu işlem için seçilmiş ve uygun fiksatifin kullanılması son derece önemlidir.

Uygun bir fiksatifin kullanılmaması halinde yapılan birçok işlem etkisiz kalır ve pratikte kullanılmaz hale gelir. Biyolojik örneklerin morfoloji ve fonksiyonlarındaki değişimi anlamak için çeşitli fiksatif türleri kullanılır. İyi bir fiksatifin temel özelliği çalışılan örneğin kimyasını değiştirmeden ve canlı haline en yakın şekilde incelenmesine olanak verecek şekilde örneği korumalı ve makromolekülleri çözünmez hale getirmelidir. Aynı zamanda mikroskop altında gözlemlenirken, doku ya da hücrenin boyanmış bölgelerinde hücre içi ile hücre dışı bileşenler arasındaki bütünlüğün korunmuş olması gerekmektedir (10). Fikse edilmiş örneğin moleküler kaybı, fiksasyon süresi boyunca meydana gelen morfolojik değişimler histokimyasal ve immunhistokimyasal boyamaların kalitesini, biyolojik analizlerin doğruluğunu etkilemektedir.

2.1.1. FİKSATİFLER VE ETKİ MEKANİZMALARI

Fiksasyonda amaç çalışılan biyolojik örneğin canlı haline en yakın şekilde korunmasını sağlamaktır. Fiksasyon işlemi lizozomal enzimleri inaktifleştirip proteinleri stabil hale getirerek hücre ve komponentlerini otolize karşı daha dirençli hale getirir. Başarılı bir fiksasyonun gerçekleşmesi ortamın sıcaklığına, hidrojen iyonu konsantrasyonuna (pH), fiksatifin dokuya penetrasyonuna, fiksatifin osmolaritesine, ve fiksasyonun süresine bağlıdır.

Fiksatifler ise fiksasyon işlemi sırasında spesifik bir hücre ya da dokuya göre belirli konsantrasyonda, osmolaritede ve pH aralığında çalışan kimyasal maddelerdir. Fiksasyon fiziksel ve kimyasal fiksasyon olmak üzere iki tür yöntem ile yapılır;

1. Fiziksel Fiksasyon

- Isıtma, mikrodalga, dondurarak kurutma vb.

2. Kimyasal Fiksasyon

- Aldehit grubu ajanlar: Formaldehit, gliyoksal, paraformaldehit, glutaraldehit
- Oksitleyici ajanlar: Potasyum permanganat, potasyum dikromat, osmiyum tetraoksit
- Proteinleri denatüre edici ajanlar: Asetik asit, etanol, metanol
- Diğer çapraz bağlayıcı ajanlar: Karbodiimitler
- Diğer ajanlar: Merkürük klorit, pikrik asit

Kimyasal fiksasyon için fiksatif gücü olan kimyasal madde (genellikle katı) ve kimyasal madde için taşıyıcı sıvı gereklidir. Fiksatifler, koagülant ve koagülant olmayan fiksatifler olmak üzere ikiye ayrılır. Etanol, metanol ve aseton gibi koagülant fiksatifler biyolojik örneğe ait proteinleri denatüre eder. Hücre ya da dokulardaki suyu dehidrate ederek proteinleri çökmesine yol açar. Bu durumda proteinlerin konformasyonunda ve çözünme özelliklerinde değişime sebep olur (11).

Hüresel yapı, lipoprotein ve lifli proteinler tarafından korunmaktadır. Bu tip proteinlerin koagülasyonu, doku ya da hücrelerin morfolojisini değiştirmez. Fakat koagülant fiksatifler sitoplazmik membranda büzüşmelere, mitokondriyon ve salgı granüllerinin zayıf korunumuna neden olduğu için yapısal analizlerin kullanımı için uygun değildir (9). Aldehit grubunda yer alan FA, PFA, Gly ve glutaraldehit gibi koagülant olmayan fiksatifler hücre içerisinde yer alan proteinlere ve diğer komponentlere çapraz bağlanarak hüresel yapının daha iyi korunmasını sağlar. Bu fiksatiflerin taşıma sıvısı ise hücre iskeletinin bulunduğu ortama tutunması için içerisinde inorganik tuzları bulunduran, gerekli pH aralığını dengede tutmak için kullanılan bir tampon çözeltilidir. Bu çözelti fiksatif ile uyumlu çalışmalıdır.

2.1.2. Fiksasyonu etkileyen Faktörler

Her fiksatifin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Doku ya da hücre örnekleri, mikroskop altında incelenmeden önce hassas tekniklerle hazırlanıp, boyanır. Fiksasyon, örnekleri boyanmadan önce buldukları ortama sabitleyerek örneğe uygulanacak diğer adımların kalitesini de etkiler. Bundan dolayı bir fiksatifin başarılı bir fiksasyon

gerçekleştirmesi hidrojen iyon konsantrasyonuna, osmolariteye, doku ya da hücreye penetrasyonuna, fiksasyon süresine ve ortam sıcaklığına bağlıdır (12).

2.1.2.1. Hidrojen iyonu konsantrasyonu (pH)

Çalışılan fiksatif türüne göre değişen, en kolay ölçülebilen parametrelerden birisidir. Uygun tampon çözeltisi kullanılarak fizyolojik çalışma aralığı elde edilmektedir. Fiksasyon genel olarak pH 6 ile 8 aralığında gerçekleşmektedir; pH bu değerlerden farklı olduğunda hücre ya da dokuda meydana gelebilecek değişimler ölümcül olabilir. Bu yüzden hidrojen konsantrasyonu, doku ya da hücrelerin maruz kalacağı uygulamalara bağlı olarak önem taşımaktadır.

2.1.2.2. Osmolarite

Osmolarite, bir litre çözeltideki çözünen madde miktarıdır. Farklı iki ortamda çözülmüş madde miktarının eş yoğunlukta olduğu çözeltiler izotonik olarak adlandırılır. İzotonik çözeltilerde osmolarite değeri 280-310 mOsmol/L aralığındadır (12). Tampon çözelti ve fiksatifin osmolaritesi iyi bir fiksasyon işlemi için doku ya da hücrenin yapısının korunması açısından önemlidir. Hücre kendi sitoplazmik yoğunluğundan daha fazla bir yoğunlukta hipertonic ortamda veya sitoplazmik yoğunluğundan daha düşük bir yoğunlukta hipotonik bir ortamda bulunması fiksasyon sırasında doku ya da hücrenin küçülmesine veya şişmesine neden olmaktadır. Benzer şekilde fiksatif çözeltisi içinde bulunan Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi iyonların konsantrasyonu hücrenin yapı ve morfolojisini etkilemektedir. Fiksatif çözeltisinin içindeki iyon konsantrasyonu mümkün olduğunca izotonik olmalıdır.

2.1.2.3. Fiksasyon Sıcaklığı

Sıcaklık artışı, moleküllerin difüzyon hızını artırır. Doku ya da hücrenin fiksatif ile difüze olması ortam sıcaklığına bağlıdır. Fiksasyon genel olarak oda ısısında yapılmaktadır. Nadiren de olsa + 4°C'de fiksasyon işlemi yapılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta difüzyon hızlı gerçekleşirken aynı zamanda bu durum buharlaşmaya neden olabileceği için fiksasyon işleminin optimum sıcaklıkta yapılması gerekir.

2.1.2.4. Fiksatifin Doku/Hücreye Penetrasyonu

Biyolojik örneğe fiksatifin penetre olması önemli bir etkidir. Bu süreç görece yavaş seyredebilir. Başarılı bir penetrasyon için örnek küçük ve ince olmalıdır. Fiksasyon sadece fiksatifin penetrasyonuna bağlı değil aynı zamanda dokuya bileşenleri ile reaksiyona girme hızına da bağlıdır. Yavaş reaksiyon hızına sahip bir fiksatif örneğin çeşitli bileşenlerini farklı derecelerde fikse etmesine neden olur (10).

2.1.2.5. Fiksasyon Süresi

Yukarıda sıralanan tüm özelliklerin tamamıyla ilişkilidir. Fiksasyon süresi değerlendirilirken, tanımlanan her bir özelliğin de değerlendirilmesi gerekir. Fiksatifin gereken süreden daha fazla tutulması doku ya da hücrede kırılma, büzüşme ve sertleşme gibi durumlara neden olabilir.

2.2. ALDEHİT GRUBU FİKSATİFLERİ

2.2.1. FORMALDEHİT (FA)

Formaldehit 1 karbon, 1 oksijen ve 2 hidrojen atomuna sahip, aldehit grubunun en küçük üyesidir. Sahip olduğu küçük molekül ağırlığı sayesinde doku ve hücrelere kolayca penetre olur. Böylece fikse edilen örneğin uzun süre saklanmasını sağlar. Bu özelliği sayesinde günümüzde hâlâ biyolojik örnekleri fikse eden, koruyan en yaygın fiksatiftir. FA'ya çapraz bağlı dokuların saklanması, biyobelirteçlerin geliştirilmesinde ve hastalıkların incelenmesinde değerli bir ajan olarak görülmektedir. Önemli biyolojik soruların yanıtını bulmak için FA'nın kullanıldığı çalışmalar geliştirilmiş ve FA'nın hücre zarına hızlı penetre olması ve hücre ya da dokunun en doğal haline yakın olacak şekilde hücre kompartmanlarını koruması sebebiyle canlı hücrelerde moleküller arası etkileşimin aydınlatılmasına izin vermektedir.

FA makromoleküllere birkaç adımda bağlanır. Proteinlerde, amino gruplarının sonlarına ya da proteinlerin yan zincirlerinde bulunan amino gruplarına kovalent bağlanarak metilol ilavesi ile sonuçlanır. Ardından dehidrasyon gerçekleşerek Schiff bazına dönüşür. Modifiye edilmiş olan bu grup tekrar bir aminoasit ile reaksiyona girdiğinde metilen köprüsü oluşturur ve çapraz bağlı peptit meydana gelir. Metilen köprülerinin miktarını

FA'nın konsantrasyonu, pH, ortamın sıcaklığı ve fiksasyon süresi etkilemektedir (3). Bu süreçte proteinlere bağlanma görece hızlı, metilen köprülerinin oluşumu ise yavaş gerçekleşmektedir (13).

FA ile proteinler arasında metilen köprülerinin kurulup ardından çapraz bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmesiyle fiksasyon aşaması tamamlanmaktadır. Ama çapraz bağlanmada yer alan peptid ve proteinlerdeki aminoasit sayısı oldukça sınırlıdır. Kural olarak, her amino asidin N-terminal bölgesi, metilen köprülerinin kurulması sırasında yer alırken, çapraz bağlanma sırasında lizin, arjinin, sistein ve triptofan gibi spesifik amino asitlerin yan grupları da FA tarafından modifiye edilebilir. FA'nın inkübasyon süresi ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle lizinin kolayca modifiye edildiği raporlanmıştır (14).

Rutin olarak kullanılan en yaygın fiksatif %37'lik FA'nın 1:10 oranında sulandırılmış formu olan (% 3,7 FA) formalindir ve % 1 oranında metanol içerir. Formalin dokuların yapısında küçülmeye ya da hücre yapısının bozulmasına yol açmayan ve ticari olarak kolaylıkla ve ucuza temin edilebilen bir fiksatiftir. Seyretilmemiş ticari %37'lik FA, yoğunlaşma reaksiyonunu engellemek için % 10 metanol içerir. Bundan dolayı formalin iki fazlı bir fiksatiftir. İlk fazda alkol doku ya da hücreleri dehidrate ederek sertleştirir. Daha sonra aldehit grupları tarafından çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleşerek fiksasyon tamamlanır (15).

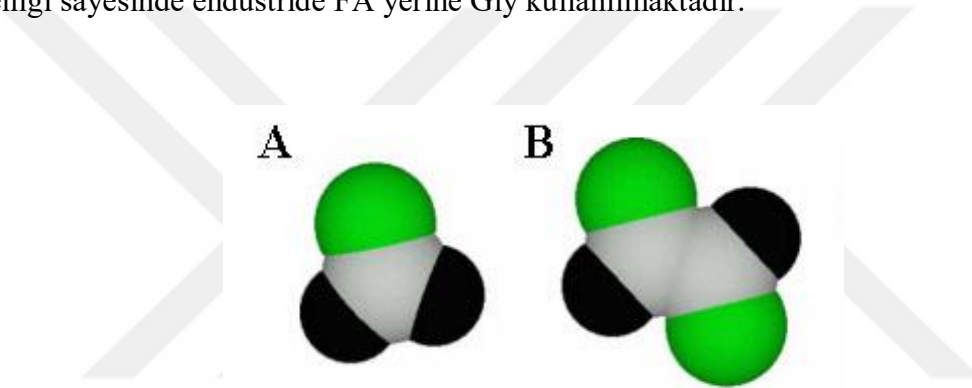
2.2.2. GLİYOKSAL (Gly)

Gliyoksal, bilim insanları tarafından çok iyi bilinmemesi ve bilimsel çalışmalara hizmet veren yerlerde bir kimsiyal olarak tedarik edilmemesine rağmen, sanayide ve ürünlerinde geniş çapta kullanılmaktadır.

Bilimsel araştırmalarda Gly ile 1960'lı yıllarda Sabatini ve ark. ve Janigan ve ark. tarafından enzim histokimyası ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Fakat formülleştirme yöntemleri nedeniyle histolojik çalışmalar için zayıf bir fiksatiftir; glutaraldehit ile birlikte etkili bir çapraz bağlanma göstermektedir. Formalin ile karşılaştırıldığında ise, daha güvenli oluşu, reaksiyon hızı ve belirli koşullar altında çapraz bağlanmaya olan meyilinin az olması sebebiyle daha başarılı fiksasyon gerçekleştirdiği raporlanmıştır. Ayrıca

immunreaktiviteyi koruma ve antijen geri kazanımını azaltmak Gly’i üstün kılan diğer özelliklerdir.

Gly arka arkaya bağlanmış FA benzeri yapısal bir formüle sahip dialdehittir. Teorik olarak gaz halinde bulunur ama sıvı çözeltiler içinde üretilmektedir. Gly ve metilen glikol hidratlanmış formlarda bulunurken, FA tek bir hidratlanmış tür oluşturur. Bunlardan en yaygın olanı oda sıcaklığında siklik dimer 1,3 dioksolandır. Metilen glikol de dahil olmak üzere hidratlanmış bu türler aldehit gruplarının reaktivitesini korumaktadır. Metilen glikolden farklı olarak FA sıvı halden gaz haline geçer ve bu reaksiyon geri dönüşümsüzdür. Gly hidratlar ise sıvı olarak korunmuş, sıcaklığı belli derece yükseltildiğinde buhar oluşumu gözlenmez ve dolayısıyla solunum riski oluşturmaz. Bu özelliği sayesinde endüstride FA yerine Gly kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. FA (A) ve Gly'nin (B) yapısal formülleri

Gly'in sulu çözeltileri uç gruplara karşı zayıf bağlanma eğilimi göstermektedir. Bu zayıf bağlanma eğilimini ortadan kaldırmak için ortama reaksiyon hızlandırıcı ya da katalizörler eklenir. Uygun katalizör ya da hızlandırıcı sayesinde Gly azot veya oksijen içeren uç gruplara bağlanır.

FA, protein ve karbonhidratlara eklenti oluşturup onları çapraz bağlarken, Gly ise bu makromolekül grupları ile farklı pH aralıklarında reaksiyona girer. Çapraz bağlanma, spesifik reaksiyon koşulları gerektirmekte ve fiksasyonun sırasında çapraz bağlanmaların kurulmaması fiksasyon sürecini yavaşlatmaktadır. Çapraz bağlanmanın yavaş kurulması sebebiyle ortama katalizör ya da reaksiyon hızlandırıcılar eklenmesiyle, reaksiyon hızlanır ve epitoplara immunreaktivitesi de korunarak başarılı bir Gly fiksasyonu gerçekleşir (9).

2.2.3. PARAFORMALDEHİT

Paraformaldehit, nötral pH'da 60°C'de ayrışarak polimerize olmuş, toz ve toksik yapıda bir formaldehittir. Taze hazırlanmış PFA, içeriğinde katkı maddesi bulunmadığı için immünohistokimyasal çalışmalarda tercih edilir (16). PFA, proteinlerin amino gruplarına değiştirmeden onlara bağlanarak hücre ya da dokudaki proteinlerin lokalizasyonlarını korur ve epitoplarm ilgili antikorları tanımasını sağlar (5, 17). Bu yüzden immünohistokimyada oldukça yaygın kullanılan bir fiksatifdir. PFA fiksasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, hücre iskeleti elemanlarından aktinin süper çözünürlük mikroskobu ile yapılan gözlemleri sonuncunda, hücre iskeletini koruyan tampon çözelti içinde PFA ile fikse edildiklerinde aktin lifi ve demetlerinin daha iyi ve daha güvenilir şekilde korunduğunu ve PFA'nın epitop korunumunu arttırdığı ortaya konmuştur (6).

2.3. YAYGIN OLARAK KULLANILAN PERMEABİLİZASYON AJANLARI

Hücre fiksasyonu ve permeabilizasyon yönteminin belirlenmesi mikroskopta en iyi sonuçları ortaya koymak açısından önem taşımaktadır. Fiksasyon, hücre yapısının korunmasına yardımcı olmakla birlikte, hücre içi antijen veya nükleik asitlere (DNA veya RNA) ulaşmak için permeabilizasyon aşaması gerekmektedir. Makromoleküllerin hücre içerisindeki lokalizasyonu değerlendirebilmek için hücre zarı geçirgenliğinin artırılması gerekmektedir. Bu geçirgenliği daha fazla arttırmak için permeabl ajanlar kullanılır (18). Çalışılan örneğe göre hücre içine girebilen ajanlar üçe ayrılmaktadır;

1. **Solventler:** Alkol ve aseton en basit permeabilizasyon ajanıdır. Zardaki lipidleri çözerek, hücre zarını antikorlara karşı geçirgen hale getirirler.
2. **Saponin ve Lysolecithin:** Saponin bitkisel kaynaklı olup genellikle sitoplazmik antijen lokalizasyonu çalışmalarında kullanılan en iyi deterjandır. Hücre zarında fosfolipidler ile kolesterol arasındaki etkileşimi kırarak açıklıklar oluşturur. Lysolecithin ise kolesterolleri çözerek, zarda büyük miktarda sterol kaybına neden olur.
3. **İyonlaşmamış deterjanlar:** Triton-X100, Tween-20 gibi deterjanlar proteinleri denatüre etmedikleri için immünohistokimyasal çalışmalarda çok sık kullanılırlar. İyonlaşmış deterjanlar fosfolipid çift katmanlı zar yapısının arasında girerek lipid ve proteinler ile etkileşerek zar yapısını bozarlar. Hidrofobik proteinler deterjanlar ile kolayca muamele edildikten sonra yıkanır. Ama çekirdek ve mitokondriyon zarındaki antijenler,

iyonlaşmamış deterjanlar ile geçirgen hale gelirler. Çünkü bunların zar yapıları kolesterol içermez (16).

2.4. KÖK HÜCRE

Kök hücre uzun süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyen, germ hücreleri de dahil olmak üzere vücudun somatik hücrelerine farklılaşabilen hücrelerdir. Kendini yenileme, buldukları yerlerde sayılarını koruma ve yeni kök hücreler oluşturmak için bölünmesi olarak tanımlanır. Kök hücreler sayısının aynı kalması için bölünen her hücrenin bir yedeğinin bu sayıyı korunmasına yardımcı olması ve diğerinin farklılaşma yeteneğini devam ettirmesini gerektirir. En yüksek farklılaşma yeteneğine sahip olan kök hücre bölündüğü zaman iki tip hücre meydana gelir. Bunlardan biri kök hücre yeteneğini korurken, diğeri farklılaşmak üzere yoluna devam eder. Bu tür bölünmeye asimetrik hücre bölünmesi denir.

Organizmanın oluşumunun başlangıcında var olan embriyo kök hücreleri, kısa ömürlü olup embriyonun diğerkatmanlarına farklılaşırlar. Yetişkin kök hücreler ise organizmanın yaşı boyunca devam eden yenilenme ve onarım gibi yaşamsal süreçle görevli kök hücrelerdir.

2.4.1. MEZENKİMAL STROMA HÜCRELERİ

“Mezenkim” epiblastın farklılaşmasından başlayıp embriyonun gelişmesinde ve fetüsün yaşamı için önemli yer tutan gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. Bu dokuyu oluşturan hücrelerin fenotipi gevşek yapılı ve bol sulu hücre dışı matriks içinde görece serbest hareket eden çok yüzlü, ince uzantılı hücrelerdir. Yetişkin ve embriyonun özellikle bağ dokusu yapısındaki birçok dokudan elde edilmektedir. Temelde bu hücreler buldukları ortama tutunmaları ve in vitro koşullarda çoğalabilmelerinden dolayı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılırlar. Bu durumda, bir hücrenin mezenkimal kök hücre olduğu CD serisi bazı belirteçlerin (CD73, CD90, CD105) yüksekliği, bazılarının ise yokluğu ya da azlığı, plastik yüzeye yapışarak büyümeleri ve /veya çoğalmaları, in vitro koşullarda üç farklı hücreye farklılaşabilmeleri kabul edilmektedir (19)

İnsan Göbek Kordonu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Göbek kordonu, 1-2 cm kalınlığında, 50-60 cm uzunluğunda ve yaklaşık 40 g olan, içinden iki arter ve bir ven geçen esnek ve şeffaf görünüme sahiptir. Dış tarafı amniyon zarı ile örtülü olan göbek kordonu stroması embriyoya özgü müköz bağ dokusu içeren Wharton peltesidir. İçinde bulunan damarlar stroma içindedir.

Göbek kordonu, embriyonun 13. gününde mezoderm dokusunun ileri gelişimiyle oluşur. Mezoderm kaynaklı bir doku olmasından dolayı diğer mezoderm hücreleri ile karşılaştırılarak yapılan çalışmalarda üç farklı hücreye farkedildiği bulunmuştur. Göbek kordonu stroması yer alan kök hücreler multipotent hücreler olup mezenkimal kök hücre tanımına uymaktadırlar. Bu hücrelerin in vitro farklılaşma yetkinlikleri, hücre yüzeyi belirteçlerine sahip olmaları, en az 50 pasajlama boyunca sabit bir karyotipe sergilemeleri ve teratom oluşturmama gibi özellikleri vardır (19).

2.5. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BELİRTEÇLER

2.5.1. HÜCREYE ÖZGÜ BELİRTEÇLER

2.5.1.1. N-Cadherin (N-Cad)

Hücre-hücre adezyonu embriyonik gelişimde ve doku oluşumunda önemli bir süreçtir. Hücre adezyon moleküllerinin aracılık ettiği hücre etkileşimlerinin bozulması embriyogenezde doku ya da organların gelişiminde yapısal sorunlara yol açmaktadır (20). Bu moleküller hücre adhezyonu, hücre bölünmesinin kontrolü, migrasyon, farklılaşma ve morfogenezde rol olan hücre yüzeyi glikoproteinlerdir ve bunlar içerisinde Ca^{+2} bağlı transmembran proteinleri kadherinler ailesinden E-Cadherin (epitelyal kadherin), N-Cadherin (nöronal kadherin) ve P- Cadherin (plasental kadherin) en iyi karakterize edilen moleküllerdir. İsimleri doku özgünlüğü çağrışımları yapsa da N-Cad mezenşim orijinli dokular, kaslar, damar endotelyal hücreleri ve fibroblastlarda da ifade edilmektedir (21).

2.5.1.2. CD73

5'ekto-nükleotidaz olarak bilinen CD73, 70 kDa ağırlığında bir hücre yüzeyi proteindir. Bir nükleotidaz olarak, ATP'nin AMP ve fosfata yıkımını katalize eder ve ekstraselüler matriks bileşeni olan laminin ve fibronektin ile birlikte hücre etkileşimini düzenleyen

sinyal bir moleküldür (22). Mezenkimal kök hücreler, rejeneratif ve immünmodülatör özelliklerinden dolayı kardiyovasküler, gastrointestinal, kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu durumda tedavi kullanımları açısından güvenli ve etkili olması nedeniyle 2006 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği tarafından mezenkimal kök hücre kriteri olarak kök hücrelerin bulunduğu kültür koşullara uyum sağlaması ve farklanmasının yanı sıra CD73, CD90, CD105 hücre yüzeyi belirteçlerini ifade etmesi gerektiğini önerilmiştir (19).

2.5.1.3. Mitotracker™

Mitotracker, mitokondriyon zar potansiyelini kullanarak canlı hücreler içinde mitokondriyonu etiketleyen flüoresan bir boyadır ve mitokondriyon içindeki protein ve peptidlerin tiyol gruplarına kovalent olarak bağlanır. Böylece mitokondriyon boyayı korur ve boya hücreler öldükten ya da fıkse edildikten sonrada varlığını devam ettirir (23).

2.5.2. HÜCRE İSKELETİ BELİRTEÇLERİ

2.5.2.1. Pericentrin (PCN)

Sentrozom, sentriol ve pericentrioler materyalden (PCM) oluşan hücresel bir organeldir. PCM, sentrozom ile ilişkili işlevler için gerekli proteinleri içeren bir matrikstir. PCM ve sentriolün ana bileşeni pericentrin, evrimsel olarak korunmuş, çift katlanmış bir proteindir (24). PCN, birçok protein ve protein kompleksi için çok işlevli iskele görevi görmekte ve mikrotübül organizasyonu, hücre döngüsü, hücre döngüsünün ilerlemesi gibi hücresel süreçlerde önemli görevlere sahiptir (25).

2.5.2.2. Vimentin (Vim)

Hücre iskeleti mikrofilamanlar, mikrotübüller ve ara filamanlar olmak üzere üç tip protein gruplarını içermektedir. Hücre iskeleti mimarisini ve hücresel süreçlerin devamlılığını sağlamak için birlikte hareket ederler. Bu gruplar arasında ara filamanlar hücreleri mekanik strese direnç göstererek, mekanik bütünlüğünün devam etmesini sağlar (26).

Vim, 57 kDa ağırlığında tip 3 ara filaman proteinleri arasında en yaygın ifade edilen ve korunmuş bir proteindir. Trofoblastik dev hücreler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kan damarları, makrofajlar, nötrofiller gibi pek çok hücrelerden ifade edilmekte ve aynı

zamanda epitel hücrelerinin mezenkimal bir fenotip kazanması olarak bilinen epitel-mezenkim geçişi sürecinde temel bir belirteç olarak önem kazanmıştır (27).

2.5.3. ÇEKİRDEK BELİRTEÇLERİ

2.5.3.1. Nucleostemin (NS)

Nükleosteminin yapısı, çekirdek plazması ve çekirdekçik arasındaki mekiğin düzenlenmesinde yer alan iki GTP bağlayıcı domain ile karakterizedir (28). Nükleoler bir protein olan NS, hücre döngüsü kontrolü, tümör oluşumu ve hücre senesense rol almakta ve aynı zamanda çoğalan kök hücre ve kanser hücre tiplerinden ifade edilmektedir. Hücreler farklılaşma sürecine girdiğinde NS ifadenmesi azalmaktadır (29).

2.5.3.2. Sentromerik Protein- A (CENP-A)

CENP-A, histon H3 varyantı olarak bilinen, DNA dizilerinden bağımsız olarak sentromerde bulunur (30). Kinetokorun yapısal ve işlevsel temelini oluşturmasının yanı sıra sentromer oluşumunda epigenetik bir belirteç olma özelliği de taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, CENP-A'nın sessizleştirilmesinin kromozom ayrılmalarında hatalara, kinetokor bütünlüğünde bozulmalara yol açtığı saptanmıştır (31).

2.5.3.3. Lamin A+C

Laminler nükleer laminayı oluşturan ara filaman proteinleridir. Nükleer lamina ve nükleoplazmada stabil yapılar oluşturur, nükleer şekil ve büyüklüğü belirler ve deformasyona karşı hücreyi korur. Doğrudan ya da dolaylı olarak nükleer zarf proteinlerini çekirdek iç zarında bağlar ve tutundurur (32).

Laminler, protein ağı olarak iç çekirdek zarında bulunur. A ve B tipi olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Lamin A ve C olmak üzere iki izoforma sahip Lamin A farklılaşmış hücrelerde ifade edilirken, Lamin B her tip hücreden ifade edilmekte ve ifade seviyeleri dokulardan hücrelere değişmektedir (33).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Fiksasyon, histoloji ve patoloji alanlarda doku ya da hücreleri canlı haline en yakın kalacak şekilde korunan ön basamaktır. Bu işlemde amaç biyolojik örneklerin yapısında yer alan makromolekülleri koagüle ederek boyama işlemi başlayana kadar zararlı etkenlerden korumaktır

Fiksasyon işlemi fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Çalışmamızda özellikle kimyasal fiksasyonda kullanılan aldehit grubu fiksatiflerine yer verdik. Bu fiksatifler proteinlerin üçüncül yapısını bozmadan onlara çapraz bağlanarak fiksasyon işlemini gerçekleştirir. Özellikle en çok kullanılan FA ve FA'in polimerleşmesiyle oluşan PFA'nın yanı sıra 2017 yılında Richter ve ark. tarafından yayınlanan araştırmada bilimsel araştırmalarda çok sık kullanılmayan Gly ve PFA'nın karşılaştırılması farklı hücrelerin belirli yerlerinde ifade edilen proteinler üzerinde denenmiştir. 2006 Dapson ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise Gly'in immünohistokimyasal çalışmalarda kullanılabileceği gösterilmiştir.

Tüm bu deneyimler doğrultusunda, fiksasyon sonrası hücrelerin belli lokasyonlarında yer alan proteinlerin immünoflüoresan işaretlenmesiyle hücrede oluşturduğu boyanma deseni ve sinyal şiddetinin fiksatif grupları ile olan ilişkisini saptamayı amaçladık. İmmünoflüoresan işaretlemelerden yola çıkarak, hipotezimiz, "hücrede belli lokasyonlarda yer alan proteinleri belirlemek için bir ön basamak olan fiksasyonda kullanılan FA ve Gly, PFA'dan daha iyi fiksasyon gerçekleştirerek hücresel proteinleri daha güçlü korur." olarak kurduk. Bu hipotez bilim literatüründe ilk kez üç farklı fiksatif ve fiksatif kokteylleri kök hücreler üzerinde uygulandığı bir araştırma olarak gelecekte fiksatifler ile ilgili yapılacak araştırmalara yön verecektir. Hipotezin doğruluğu ispatlanırsa hücrenin farklı lokasyonlarında yer alan proteinleri tespit etmek için en uygun fiksatif ve/veya fiksatif kokteyllerini kullanarak mikroskoba yansıtacak en iyi görüntü kalitesini de belirlemiş olacağız.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. GEREÇ

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı kök hücre araştırma laboratuvarlarında yürütüldü.

4.1.1. İGK-MKH'LERİN LABORATUVAR TRANSFERİ

1. Transfer sonrası yapılacak işlemlerden önce tüm cam malzemeler steril edildi.
2. Hücreler, +4°C'lik ortamda hücre kültürü laboratuvarına getirildi.

4.1.2. İGK-MKH'LERİN KÜLTÜR EDİLMELERİ

1. Ticari olarak satın alınan İGK-MKH'ler pasaj-3'te getirildi.
2. Hücreler gelmeden önce 24 kuyuculuklu plakalar içindeki lameller, 1:10 oranında distile su içerisinde dilüe edilmiş poly-L lizin ile kaplandı.
3. Gelen hücrelerin sayımı yapıldı.
4. Canlı görüntüleme için cam Petri kaplarına (World Precision Instruments, ABD) ve immunhistokimyasal boyamalar için kullanılacak 24 kuyuculuklu plakalara içerisinde %10 FBS içeren DMEM-HAM'S F12 kültür ortamı içinde 5000 hücre/cm² olacak şekilde hücreler ekildi. % 5 CO₂ ve 37°C inkübatörlerde kültür edildi.
5. Ekim yapıldıktan sonra hücrelerin bulunduğu yüzeye tutunma değeri yaklaşık %50 olduğunda canlı görüntüleme için, %70-90 aralığında fiksasyon için uygun morfolojiye sahipti.

4.1.3. ARAŞTIRMADA KULLANILAN FİKSATİFLER VE HAZIRLANIŞLARI

Aşağıdaki Çizelge 4.1’de fiksatif gruplarının açıklamaları ve Çizelge 4.2’de marka numarası, stok ve çalışma konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fiksatif gruplarının formül açıklamaları

Gruplar	Açıklama
PFA Gly FA	Deterjan etkisinin incelenmediği gruplar
PFA+TX Gly+TX FA+TX	Fiksasyon sonrası, deterjan (TX) ile muamele edilen gruplar
PFA/TX Gly/TX FA/TX	Fiksatif hazırlandıktan sonra içeriğine deterjan (TX) eklenen gruplar

Çizelge 4.2. Fiksatiflerin ve deterjanın marka ve katalog numarası, stok konsantrasyonu ve çalışma konsantrasyonu

Gruplar	Marka ve Katalog Numarası	Stok Konsantrasyonu	Çalışma Konsantrasyonu
FA	Sigma, 15512	% 34,5	Fosfat Tamponu içerisinde % 3,5
PFA	Merck, K41530205041	% 10	PBS içerisinde % 3,5
Gly	Merck, S7255410734	% 40	Distile su içerisinde % 3
TX	Sigma, 114H0521	% 10	PBS içerisinde % 0,1

4.1.4. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BELİRTEÇLER

Aşağıdaki çizelge 4.3.'te yer alan İGK-MKH'lerin belirli yerlerinde ifadelen proteinler verilmiştir.

Çizelge 4.3. Hüresel belirteçlerin marka ve katalog numarası, çalışma dilüsyonları ve hücre lokalizasyonları

Belirteçler	Marka ve Katalog Numarası	Çalışma Dilüsyonu (PBS içerisinde)	Hücre Lokalizasyonu
Lamin A+C	Abcam, ab108595	1:100	Çekirdek Zarı
CENP-A	Abcam, ab45694	1:100	Kromozom
Nucleostemin	Chemicon İnternational- AB5689	1:250	Çekirdekçik
Pericentrin	Abcam, ab4448	1:1000	Sentrozom
Vimentin	Sigma, V6630	1:50	Hücre İskeleti Ara Filamanı
N-Cadherin	Sigma, C3865	1:100	Hücre Zarı
CD73	Abcam, ab54217	1:100	Hücre Zarı
MitoTracker	Molecular Probes, M7512	0,1 µM % 10 FBS içeren DMEM HAM'S F12 içinde	Mitokondriyon

4.2. YÖNTEM

4.2.1. FİKSATİF VE DETERJAN HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

4.2.1.1. % 3,5 FA hazırlama

Stok konsantrasyonu % 34,5 FA'dan önce % 10'luk formalin elde etmek için A ve B olarak isimlendirilen çözeltilerden B çözeltilisine pH değeri 7.3 -7.4 arasında olana kadar A çözeltisi eklendi.

A çözeltisi:

100 mL Stok % 34,5 FA

900 mL Distile su

4 g Sodyum Fosfat Monobazik (Sigma, 04270)

B çözeltisi:

40 mL stok % 34,5 FA

360 mL Distile su

1 g Sodyum Fosfat Dibazik (Sigma, 04272)

Tampon çözelti hazırlamak için A ve B çözeltilerine FA ekmeden, B çözeltisinin pH değeri 7,3 -7,4 oluncaya kadar A çözeltisi eklenerek tampon çözeltisi elde edildi. Sonuç olarak % 3,5 FA elde etmek için 6,5 mL tampon çözeltisine 3,5 mL %10 formalin eklendi.

4.2.1.2. % 3,5 PFA Hazırlama

%10 PFA çözeltisi hazırlanırken 50 g toz haldeki PFA ile 450 mL distile su manyetik karıştırıcı ile birlikte solusyon sıcaklığı 60°C oluncaya kadar karıştırıldı. Karışımın sonunda PFA'nın tamamen çözünmesi için 50 µL 1 N NaOH eklendi. Son hacim 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra pH değeri yaklaşık 7,2 olacak şekilde ayarlandı.

% 3,5 PFA elde etmek için ise stok çözeltiden 3,5 mL alınıp, 6,5 mL PBS içerisine eklendikten sonra pH aralığı 7,2 -7,3 olacak şekilde ayarlandı.

4.2.1.3. % 3 Gly Hazırlama

100 mL %3'lük Gly hazırlamak için 71,375 mL distile su, 19,725 mL saf etanol (Merck, K46867483533), 7,950 mL stok % 40 Gly (Merck, S7255410734) ve 0,75 mL asetik asit (Merck, K44004063244) karıştırılıp pH derecesi 5 olana kadar 1 N NaOH eklendi.

4.2.1.4. % 0,1 TX deterjanının Hazırlanması

% 10'luk stok Triton X-100 deterjan çözeltisinden 100 µL alındı ve 9900 µL PBS ile tamamlanarak % 0,1'lik Triton X-100 elde edildi.

Çizelge 4.4. Fiksatif gruplarının uygulama değişkenleri

Gruplar	Fiksatif konsantrasyonu	Ortam Sıcaklığı (°C)	Fiksasyon Süresi (dk)	pH
PFA	% 3,5	Oda Isısı (22°C)	15	7,2-7,3
PFA+TX	% 3,5 + % 0,1		15+5	
PFA/TX	% 3,5 / % 0,1		15	
Gly	% 3		15	5,0
Gly+TX	% 3 + % 0,1		15+5	
Gly/TX	% 3 / % 0,1		15	
FA	% 3,5		15	7,3-7,4
FA+TX	% 3,5 + % 0,1		15+5	
FA/TX	% 3,5 / % 0,1		15	

4.2.2. İGK-MKH'lerin FİKSASYON ÖNCESİ ve SIRASINDA SÜPER ÇÖZÜNÜRLÜK MİKROSKOBUNDA GÖRÜNTÜLENMESİ

İGK-MKH 35 mm cam Petri kaplarında yaklaşık % 50 konfluent olduktan sonra % 5 CO₂ ve 37°C de 15 dakika boyunca 5 saniye aralıkla görüntüler alınarak diferansiyel interferans kontrast (DIC) mikroskobu tekniği kullanılarak Zeiss Axio Observer İvert Mikroskobu ile donatılmış Zeiss LSM 880 konfokal sistemi ile canlı kayıt alındı. Işık kaynağı olarak 633 nm kırmızı lazer hattı kullanıldı. Zeiss 20x plan apo/NA 0,8 özellikli objektif kullanıldı ve lazer gücü 1,97 mW olarak ölçüldü. Görüntü alınırken örneklerin zarar görmemesi için eksitasyon salınımını mümkün olduğu kadar düşük tutmak için lazer gücü % 1,2 olarak ayarlandı. Bu durum göz önünde bulundurularak hücreler 0,023 mV ile tarandı.

Çizelge 4.5. Canlı görüntüleme ve fiksasyon sırasında gerçekleştirildiği sıcaklık değerleri, alınan kayıtların süresi ve interval aralığı

Gruplar	Ortam Sıcaklığı (°C)	Süre (dk)	İnterval (sn)
Canlı Görüntüleme	37°C	15	5
PFA	Oda ısısı (25°C)	15	5
PFA+TX	Oda ısısı (25°C)	15+5	5
PFA/TX	Oda ısısı (25°C)	15	5
Gly	Oda ısısı (25°C)	15	5
Gly+TX	Oda ısısı (25°C)	15+5	5
Gly/TX	Oda ısısı (25°C)	15	5
FA	Oda ısısı (25°C)	15	5
FA+TX	Oda ısısı (25°C)	15+5	5
FA/TX	Oda ısısı (25°C)	15	5

4.2.3. Fiksasyon sonrası hücrelerin immünohistokimyasal işaretlenmesi

Hücreler dokuz adet 24 kuyucuklu plakalarda kültür edildikten sonra bulunduğu yüzeye tutunma değeri yaklaşık % 70-90 olduğunda fiksasyon yapıldı ve hücrenin belli kompartmanlarında yer alan ya da hücreye özgü belirteçlerle işaretlenerek fiksasyonun immün boyamaya olan etkisi Lazer Taramalı Süper Çözünürlük Konfokal mikroskopunda her bir protein için her fiksatif grubundan 10'ar adet görüntü alınarak morfolojik olarak değerlendirildi.

Hücreler fiksasyon tamamlandıktan sonra aşağıda verilen immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak flüoresan problemlerle işaretlendi;

N-Cad İşaretlemesi

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- N-Cadherin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma- C3865, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, gece boyu (+4°C, buzdolabında)
- Ertesi gün 37°C'de 2 saat bekletme
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüv)

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

CD73 İşaretlemeesi

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- CD73 fare monoklonal anti-insan IgG (Abcam, ab54217, ABD) 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

CENP-A İşaretlemeesi

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- CENP-A tavşan monoklonal anti-insan IgG (Abcam, ab45694, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, gece boyu (4°C buzdolabında)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi antitavşan IgG (Abcam, ab6717, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

Lamin A+C İşaretlemeesi

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Bloklama (normal keçi serumu) 30 dk (oda ısısında)

- Lamin A+C tavşan monoklonal anti-insan IgG (Abcam, ab108595, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi antitavşan IgG (Abcam, ab6717, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

NS İşaretlemeesi

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Nucleostemin tavşan monoklonal anti-insan IgG (Chemicon International-AB5689 ABD), 1:250 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi antitavşan IgG (Abcam, ab6717, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

Vim İşaretlemeesi

- Yıkama (1 kez PBS' e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Vimentin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma,V6630, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama

- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

PCN İşaretlemeesi

- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Pericentrin tavşan monoklonal anti-insan IgG (Abcam, ab4448, ABD), 1:1000 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- FITC-konjuge keçi anti tavşan IgG (Abcam, ab6717, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 2 saat (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (1 kez PBS'e daldırıp çıkarma)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

Mitotracker™ İşaretlemeesi

- Kültür ortamı aspire edilip D-PBS ile yıkama
- %10 FBS içeren DMEM-HAM'S F12'nin içerisinde 0,1 µM mitotracker ile 30 dk (37°C, %5 CO₂ inkübatörde) inkübasyon
- Yıkama (%10 FBS içeren DMEM-HAM'S F12 ile 3 kez)
- Yıkama (3 kez DPBS ile)
- Fiksasyon (15 dk, oda ısısında)

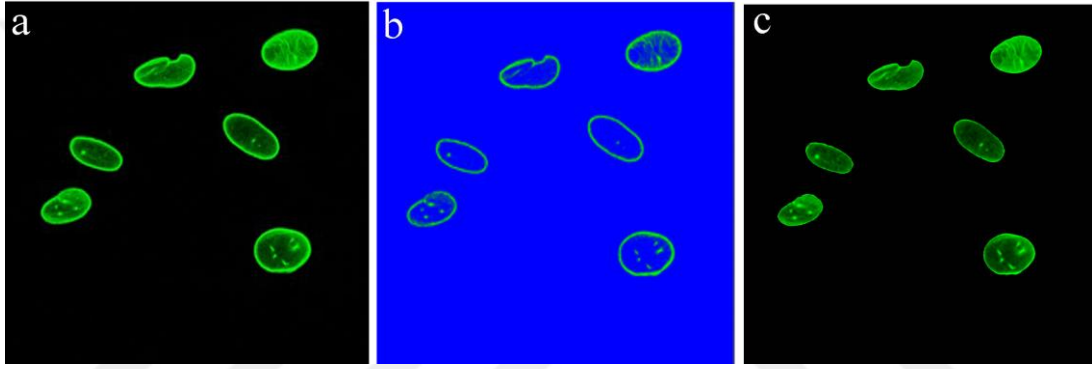
4.2.4. FİKSE EDİLEN İGK-MKH'LERİN SÜPER ÇÖZÜNÜRLÜK MİKROSKOBUNDA GÖRÜNTÜLENMESİ

Dokuz farklı fiksatif çözeltisi ile ayrı ayrı fikse edilen İGK-MKH, Lamin A+C, CENP-A, NS, PCN, Vim, N-Cad ve CD73 belirteçleri ile işaretlendi. İşaretlemeiş hücreler lazer taramalı süper çözünürlük konfokal mikroskobu ile gözlemlendi. Flüoresan problara uygun 405 nm ve 488 nm lazerler kullanıldı. Her protein için referans histogram kullanılarak tüm lazer ve tarama parametreleri aynı olacak şekilde ayarlandı. 40X sulu objektif ve hücrelerden gelen sinyalleri belirlemek için galyum-arsenik fosfit ve airyscan dedektörler kullanıldı. İki boyutlu ve üç boyutlu görüntüler için piksel çözünürlüğü otomatik olarak ayarlandı.

4.2.5. FLÜORESAN SİNYALLERİN ANALİZİ VE KANTİTASYONU

Flüoresan işaretli her örnek lazer taramalı süper çözünürlük konfokal mikroskobu altında gözlemlenerek, her fiksatif grubu için 10 adet görüntü alındı. Lamin A+C, CENP-A, NS, PCN, Vim, N-Cad ve CD73 belirteçleri analiz edilirken Zen Blue v2.3 histogram programı kullanılarak sinyal değeri ölçümleri hesaplandı. Her belirteç için aşağıdaki formül kullanarak 10 görüntüden sinyal değerleri elde edildi. Ham görüntü (a) üzerinden toplam flüoresan şiddeti (b) hesaplanırken CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) formülü kullanıldı. Arka plan boyanmalarından elde edilen flüoresan şiddeti (c) üç farklı alandan alınan daireler olarak gösterildi (34).

$$\text{CTCF} = \text{Mean İntensity} - (\text{area of selected cell} \times \text{fluorescence of background readings})$$



Şekil 4.1. Mikrograflar üzerinden CTCF değerinin hesaplanması

4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS for Windows v20.0 (SPSS, Chicago IL, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Flüoresan işaretli örneklerden alınan görüntülerden elde edilen CFCT değerlerinin normal olarak dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler için gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis testi ile test edildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenler ortalama (minimum ve maksimum) olarak belirtildi ve istatistiksel olarak P değeri < 0,05 olarak anlamlı kabul edildi.

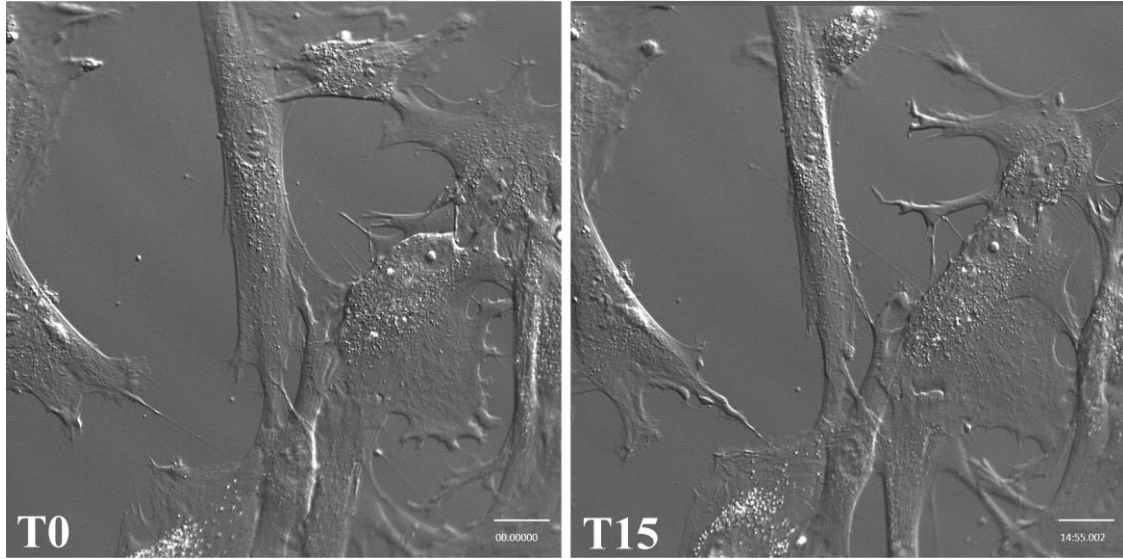
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. İGK-MKH'LERİN FİKSASYON SÜRECİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

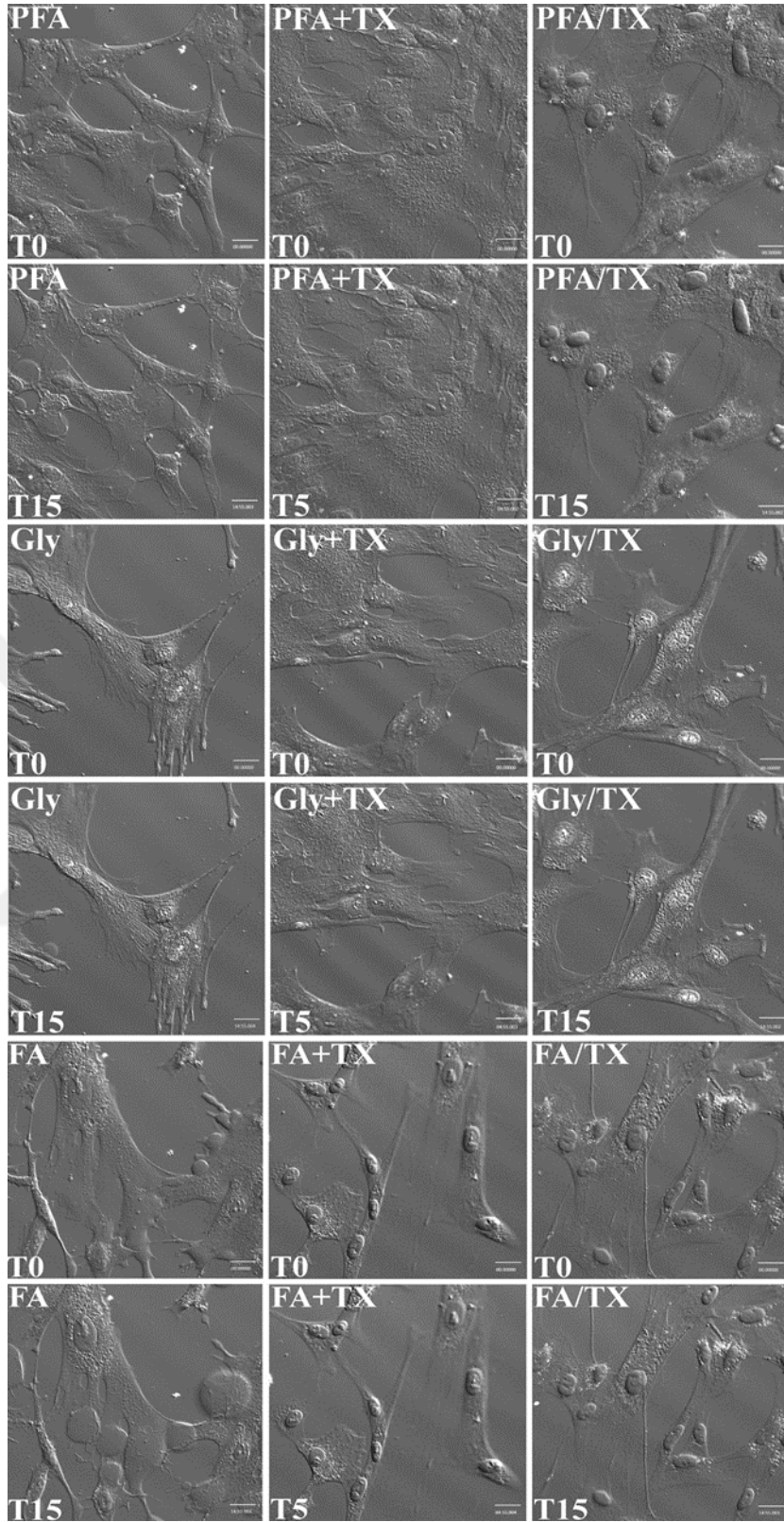
Ticari olarak satın alınan İGK-MKH, pasaj-3'te laboratuvara teslim edilmiş ve sonrasında canlı görüntüleme yapılmak üzere cam Petri kaplarına 5.000 hücre/cm² olarak ekilip kültür edildi. Hücrelerin ekildikleri alana tutunma değeri yaklaşık % 50 olmasıyla birlikte canlı görüntüleme için uygun olduğu belirlendi. İlk olarak kültür ortamı içinde kayıt alındı ve daha sonra fiksatif grupları ile fiksasyon süreleri boyunca görüntüledi (Çizelge 4.5.) Kültür ortamının fiksatif çözelti ile değiştirilmesiyle doğrudan fiksasyon prosedürü uygulandı ve canlı kayıtlar, DIC mikroskopi tekniği kullanılarak lazer taramalı süper çözünürlük konfokal mikroskobu ile alındı.

Çizelge 5.1. Canlı görüntüleme ve fiksasyon sırasında alınan canlı kayıtların morfolojik sonuçları

Canlı Görüntüleme	Düz ve geniş hücre gövdelerinde olağan vezikül ve organel hareketi, hücre sitoplazmasında zaman zaman büzülme meydana geldi.
PFA	Büyük sitoplazmik kabarcıkların oluşumu dolayısıyla sitozol kaybı gözlemlendi.
PFA+TX	Sitoplazmik kabarcık veya sitozol kaybı gözlemlenmedi.
PFA/TX	Hücre zarı bütünlüğünde yok denecek kadar az bir değişim ve küçük sitoplazmik veziküllerin hücre dışında kalan akışı görüldü.
Gly	Sitozol kaybına neden olmayan küçük ve az sayıda kabarcık oluşumu vardı.
Gly+TX	Belirgin bir değişiklik gözlemlenmedi.
Gly/TX	Hücre zarı bütünlüğünde bir değişim ve sitozol kaybı yoktu.
FA	Hücre zarı bütünlüğünde bozulma, büyük ve çok sayıda kabarcık oluşumu ve sitozol kaybı gözlemlendi.
FA+TX	Belirgin bir değişiklik yoktu.
FA/TX	Az miktarda vezikül akışı, zar bütünlüğünde bir değişiklik yoktu.



Şekil 5.1. Kültür ortamı içerisinde İGK-MKH'lerin canlı kayıtların başlangıç (T0) ve bitiş (T15) zamanları. **Ölçek çubuğu:** 20 µm



Şekil 5.2. İGK-MKH'lerin her fiksatif grubu ile yapılan canlı kayıtların başlangıç (T0) ve bitiş (T5, T15) zamanları. **Ölçek çubuğu:** 20 μ m

5.2. FİKSASYON SONRASI İGK-MKH'LERİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

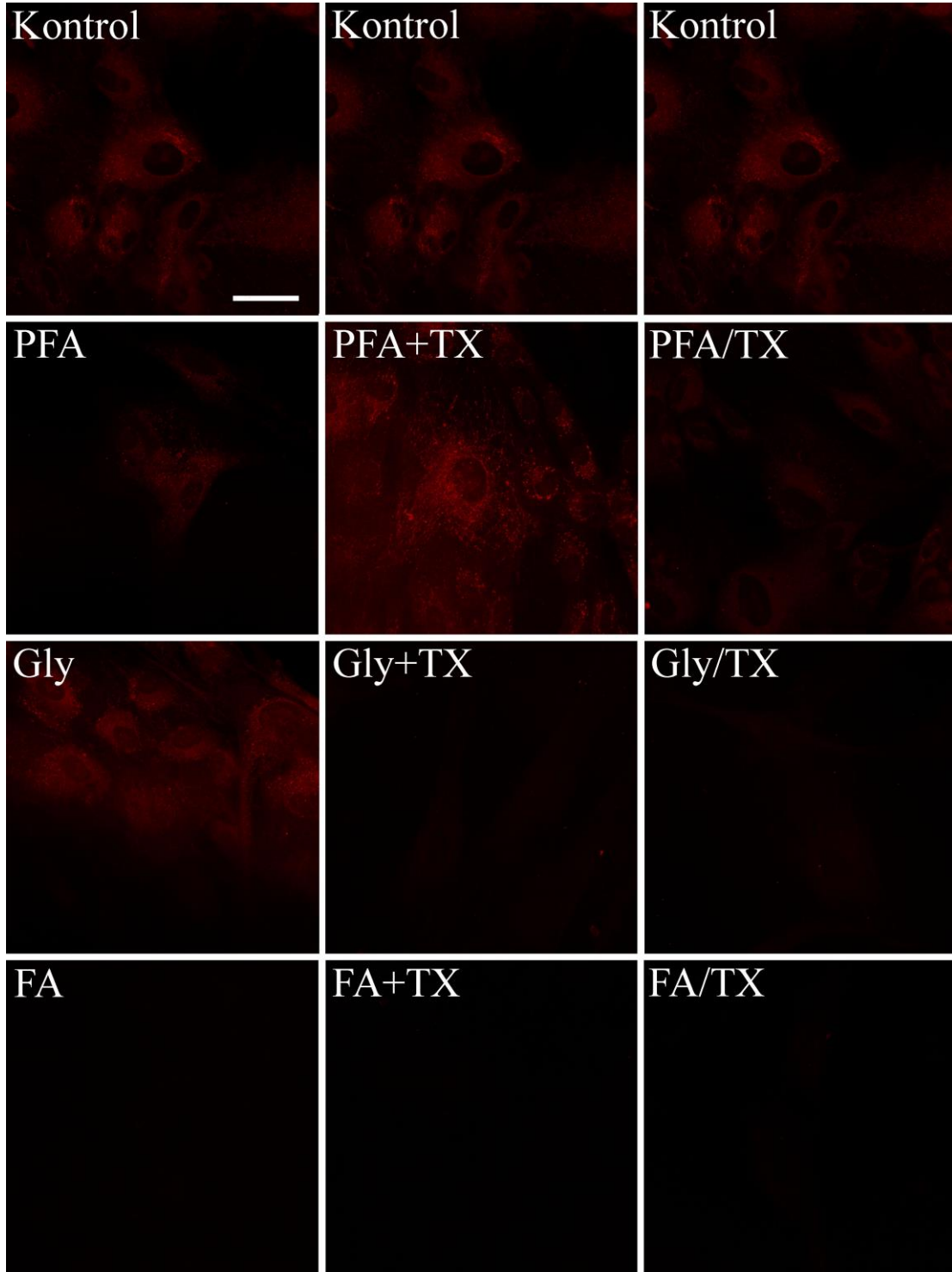
Fiksasyon aşaması tamamlandıktan sonra poly-L lizin kaplı lameller üzerindeki hücreler immünhistokimya yöntemleri kullanılarak lazer taramalı süper çözünürlük konfokal mikroskopu kullanılarak immünflüoresan analizler yapıldı.

Her fiksatif grubu için sekiz farklı hücre belirteci hücrelerin spesifik bölgelerinden gelen sinyallerin yoğunluğu ve boyama desenlerine göre değerlendirildi.

5.2.1. CANLI HÜCRELERDE MİTOKONDRIYON İŞARETLEMESİ ÜZERİNE FİKSASYONUN KORUYUCU ETKİSİ

Canlı hücrelerde MitoTracker™ 30 dk boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra hücrelerde sitoplazma boyunca dağıldı ve sayısız mitokondriyonun nokta veya çubuk şeklinde desenler oluştu.

MitoTracker inkübasyonundan sonra hücreler fikse edildi. PFA fiksasyonu, sitoplazmada donuk bir görünüme neden olmuş, minimal düzeyde mitokondriyal boyanma sağlandı. PFA/TX grubunda neredeyse hiç boyanma gözlenmedi. PFA+TX grubunda anlamlı derecede net ve parlak hücre içi tanecikler tespit edildi. Gly fiksasyonu tek başına mitokondriyonlarda yüksek yoğunlukta net sinyaller ortaya çıkarmasına rağmen arka plan boyanmasında da artış gözlemlendi. PFA/TX grubunda olduğu gibi, Gly/TX grubunda mitokondriyon boyanması gözlenmedi. Gly+TX grubunda ise mitokondriyal boyanmasının yanı sıra göreceli olarak arka plan boyanması daha yüksekti. FA, FA/TX, FA+TX gruplarında mitokondriyal boyanma izlenmedi.



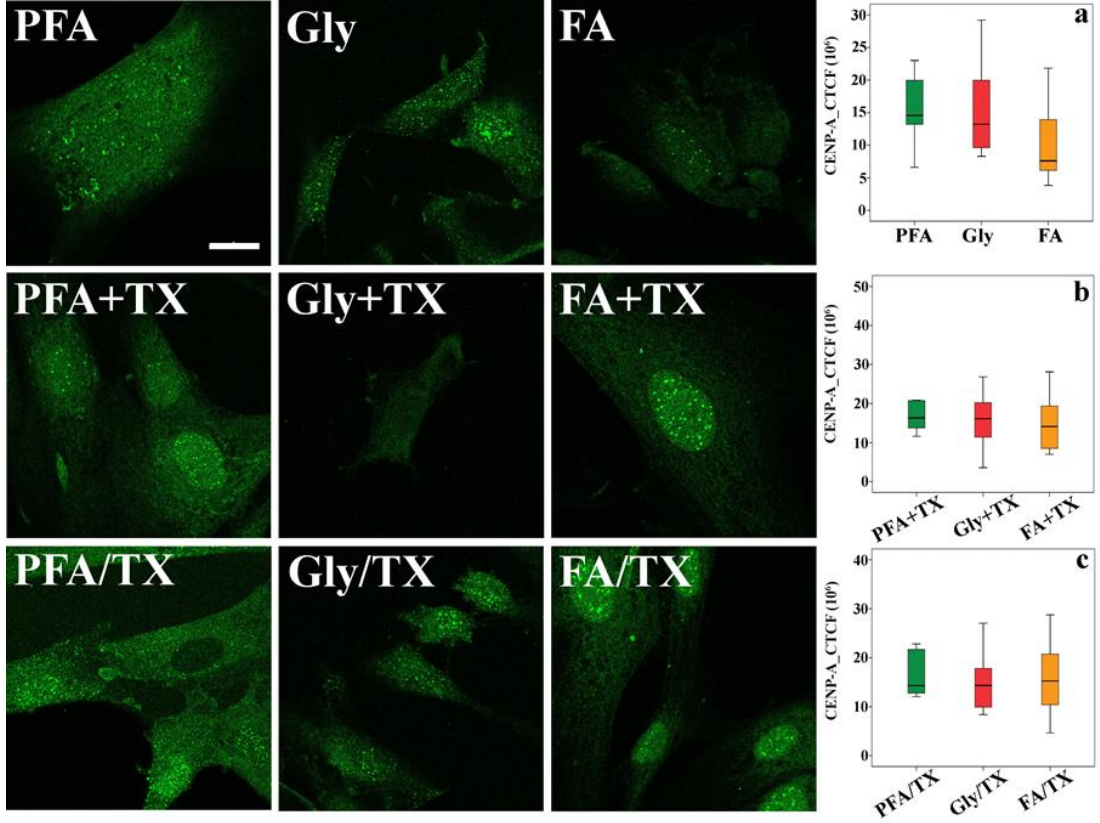
Şekil 5.3. Canlı İGK-MKH'lerin fiksasyon sonucunda izlenen MitoTracker desenleri.

Ölçek çubuğu: 50 µm

5.2.2. FİKSASYON SONRASI İGK-MKH'LERİN İMMÜNFLÜORESAN İŞARETLENMESİ

İGK-MKH'leri dokuz farklı fiksatif kokteyli ile fikse edildikten sonra seçilmiş nükleer belirteçler (Lamin A+C, CENP-A) ve özellikle bazı progenitör/kök hücrelere özgü olan (NS gibi) proteinler işaretlenerek boyanma desenleri ve flüoresan sinyal yoğunluğu analiz edildi.

5.2.2.1. CENP-A



Şekil 5.4. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası CENP-A desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). **Ölçek çubuğu:** 20 µm

CENP-A ile işaretlenen hücreler, PFA ve PFA/TX gruplarında nükleoplazmik noktalar ve biraz daha yüksek arka plan boyanması ortaya çıkarken PFA+TX gruplarında daha spesifik boyanma deseni oluştu. Tüm Gly gruplarında spesifik olmayan nükleer/ nükleolar boyanmanın yanı sıra arka plan boyanması gözlemlendi. Gly+TX gruplarında daha az arka plan boyanması dikkat çekti. FA gruplarının tümünde genel olarak spesifik boyanma gözlenirken, FA grubu spesifik boyanmanın yanı sıra sitoplazmik arka plan boyanmasına

da sahipti. En iyi boyanma deseni ve en parlak sinyal FA+TX grubunda gözlemlendi. FA/TX grubunda ise iyi bir boyanma deseninin yanı sıra arka plan boyanması da dikkat çekti.

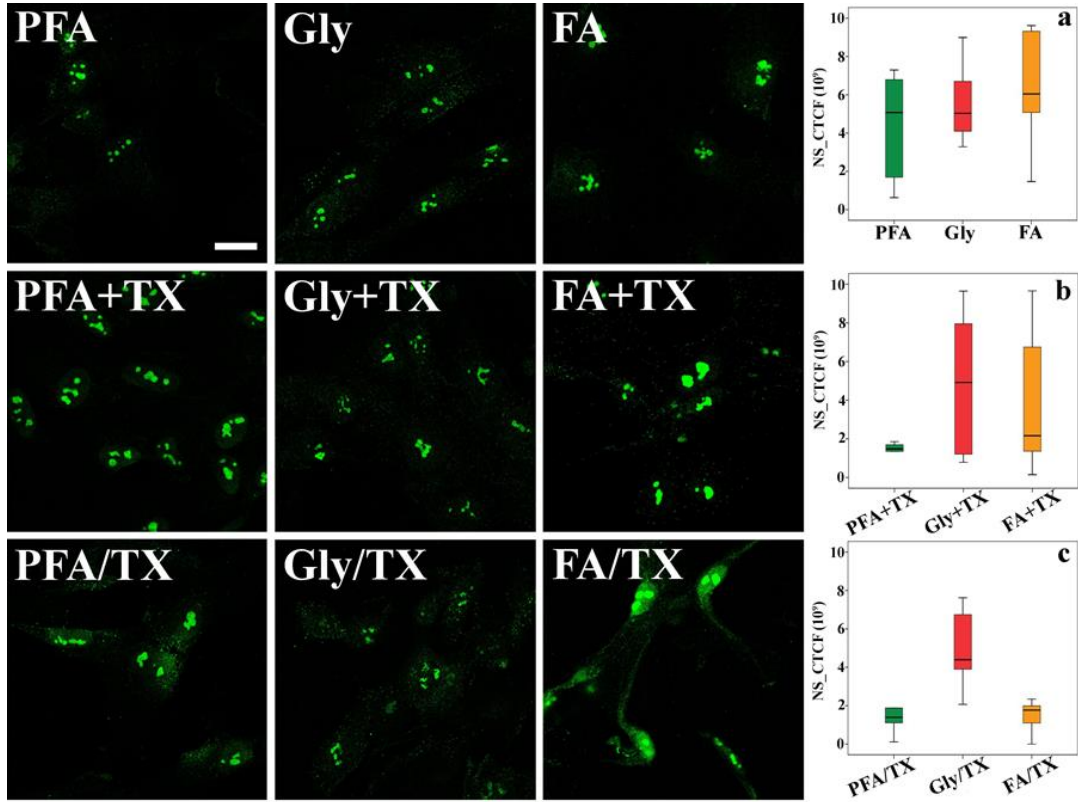
İGK-MKH'lerde CENP-A ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) değerleri istatistiksel olarak gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı bir fark çıkmadı. Ancak grup içi karşılaştırmalarda fark bulunmasına rağmen, ikili karşılaştırmalar sonucunda farklı gruplar belirlenemediği için grup içi karşılaştırmalar arasında da fark olmadığı kararlaştırıldı.

İGK-MKH'lerinde NS ifadelerinden elde edilen CTCF değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı analizleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 5.2. CENP-A ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
		PFA- Gly	1,000
		Gly - FA	0,151
		FA -PFA	0,062
		PFA+TX – Gly+TX – FA+TX	0,618
		PFA/TX – Gly/TX – FA/TX	0,698

5.2.2.2. NS



Şekil 5.5. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası NS desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). **Ölçek çubuğu:** 20 μm

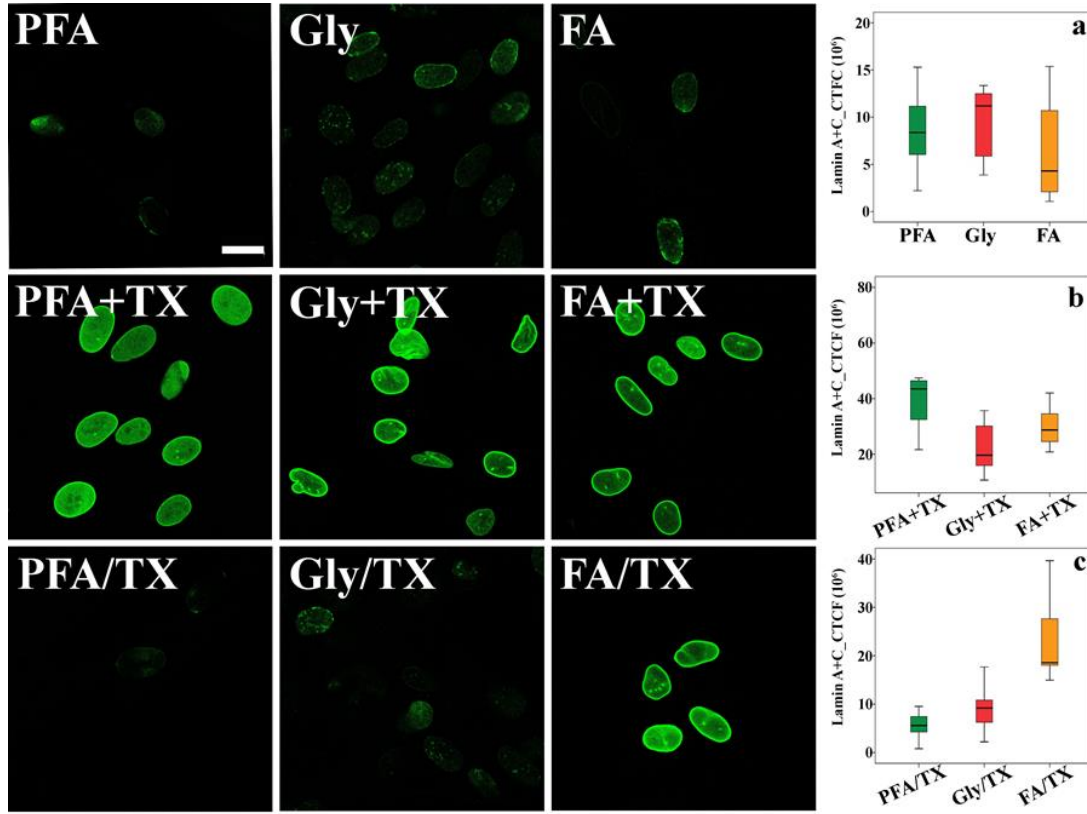
Daha önce İGK-MKH'lerinde gösterilmiş (32), çekirdekte ifade edilen ve multilobüler protein olan NS, PFA ve PFA+TX gruplarında daha güçlü sinyallere ve iyi bir boyanma desenine sahipti. PFA/TX grubu ise diğer iki PFA grubuna kıyasla daha zayıf bir boyanma deseni oluşturdu. Gly grupları, PFA'ya göre daha zayıf sinyale sahipti. Gly+TX diğer Gly gruplarına göre daha güçlü sinyal ve spesifik nucleostemin boyanma desenine sahipti. FA ve FA+TX'te en güçlü sinyal ve iyi bir boyanma deseni oluşturdu. FA/TX grubunda NS sinyallerinin yanı sıra çekirdek dışından alınan sinyaller de vardı.

İGK-MKH'lerinde NS ifadelerinden elde edilen CTCF değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları çizelge 5.3.'te verilmiştir.

Çizelge 5.3. NS ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
FA/TX – PFA+TX	1,000	PFA – Gly – FA	0,326
FA/TX – PFA/TX	1,000		
FA/TX – FA+TX	1,000	PFA+TX – Gly+TX – FA+TX	0,167
FA/TX – PFA	1,000		
FA/TX – Gly+TX	1,000	FA/TX – PFA/TX	1,000
FA/TX – Gly/TX	0,185	PFA/TX – Gly/TX	0,009
FA/TX – FA	0,019	FA/TX – Gly/TX	0,004
FA/TX – Gly	0,081		
PFA+TX – PFA/TX	1,000		
PFA+TX – FA+TX	1,000		
PFA+TX – PFA	1,000		
PFA+TX – Gly/TX	0,216		
PFA+TX – Gly	0,096		
PFA+TX – FA	0,023		
PFA/TX – FA+TX	1,000		
PFA/TX – PFA	1,000		
PFA/TX – Gly/TX	0,470		
PFA/TX – Gly	0,222		
PFA/TX – FA	0,059		
FA+TX – PFA	1,000		
FA+TX – PFA	1,000		
FA+TX – Gly+TX	1,000		
FA+TX – Gly/TX	1,000		
FA+TX – Gly	1,000		
FA+TX – FA	1,000		
PFA – Gly+TX	1,000		
PFA – Gly/TX	1,000		
PFA – Gly	1,000		
PFA – FA	1,000		
Gly+TX – Gly/TX	1,000		
Gly+TX – Gly	1,000		
Gly+TX – FA	1,000		
Gly/TX – Gly	1,000		
Gly/TX – FA	1,000		
Gly – FA	1,000		

5.2.2.3. Lamin A+C



Şekil 5.6. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası Lamin A+C desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). Ölçek çubuğu: 20 μm

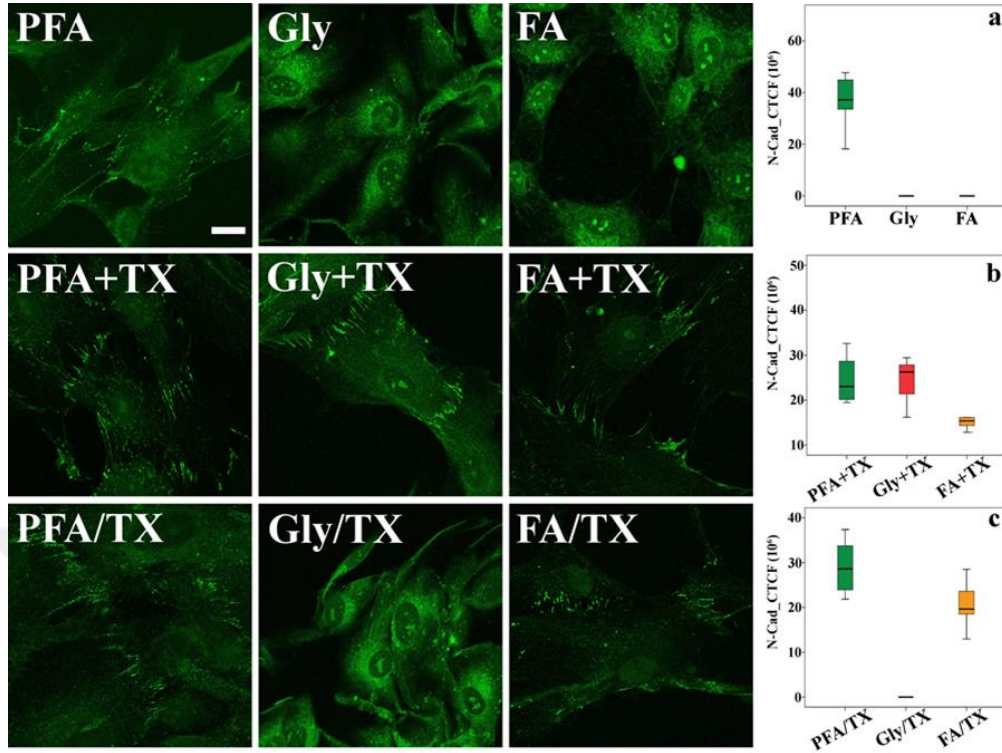
Çekirdek iç zarında ifadelenen ve ara filament proteini olan Lamin A+C ile dokuz farklı fiksatif grupları arasında özellikle +TX gruplarında çok güçlü bir sinyal, oldukça homojen ve iyi bir boyanma deseni ortaya çıkardı. Diğer gruplarda zayıf ve heterojen bir boyanma gözlemlendi. Ancak FA/Tx ile FA+TX grupları benzer boyanma deseni belirgindi. Sonuç olarak Lamin A+C'nin en iyi boyanma deseni fiksasyon sonrası TX uygulamaları yapılan gruplarda belirginleşti.

İGK-MKH'leri Lamin A+C ifadelerinden elde edilen CTCF değerleri istatistiksel analiz sonuçları çizelge 5.4.'te verilmiştir.

Çizelge 5.4. Lamin A+C ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
PFA/TX – FA	1,000	PFA – FA – Gly	0,195
PFA/TX – PFA	1,000		
PFA/TX – Gly/TX	1,000	Gly+TX – FA+TX	0,329
PFA/TX – Gly	1,000	Gly+TX – PFA+TX	0,001
PFA/TX – Gly+TX	0,006	FA+TX – PFA+TX	0,099
PFA/TX – FA/TX	0,004		
PFA/TX – FA+TX	< 0,001	PFA/TX – Gly/TX	0,422
PFA/TX – PFA+TX	< 0,001	PFA/TX – FA/TX	< 0,001
FA – PFA	1,000	Gly/TX – FA/TX	0,008
FA – Gly/TX	1,000		
FA – Gly	1,000		
FA – Gly+TX	0,014		
FA – FA/TX	0,009		
FA – FA+TX	< 0,001		
FA – PFA+TX	< 0,001		
Gly/TX – Gly	1,000		
Gly/TX – Gly+TX	0,234		
Gly/TX – FA/TX	0,162		
Gly/TX – FA+TX	0,009		
Gly/TX – PFA+TX	< 0,001		
Gly – Gly+TX	0,610		
Gly – FA/TX	0,437		
Gly – FA+TX	0,030		
Gly – PFA+TX	0,001		
Gly+TX – FA/TX	1,000		
Gly+TX – PFA+TX	1,000		
Gly+TX – FA+TX	1,000		
FA/TX – FA+TX	1,000		
FA/TX – PFA+TX	1,000		
FA+TX – PFA+TX	1,000		
PFA– Gly/TX	1,000		
PFA– Gly	1,000		
PFA– Gly+TX	0,157		
PFA– FA/TX	0,107		
PFA– FA+TX	0,005		
PFA– PFA+TX	< 0,001		

5.2.2.4. N-Cad



Şekil 5.7. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası N-Cad desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). Ölçek çubuğu: 20 μm

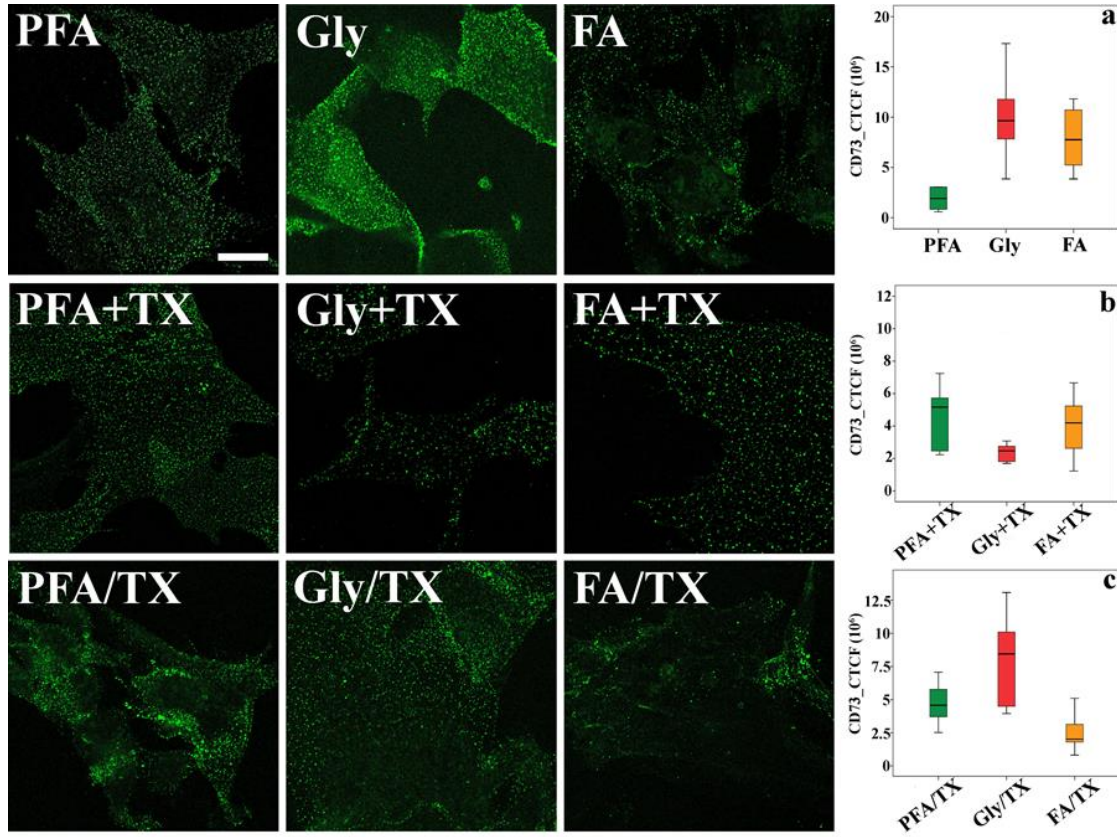
Hücre-hücre adezyon molükülü olan N-Cad plazma zarı boyunca ince çizgisel dizi benzeri olarak tanımlandı. Tüm PFA gruplarında ve Gly+TX'te bu çizgisel dizi belirgindi. Diğer iki Gly grubunda boyanma deseni çok zayıftı. FA+TX ve FA/TX gruplarında N-Cad ifadesi korunmasına rağmen FA grubunda fiksasyon sonrası N-Cad ifadesi korunmadı.

İGK-MKH'leri N-Cad ifadelerinden elde edilen CTCF değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları çizelge 5.5.'te verilmiştir.

Çizelge 5.5. N-Cad ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
Gly – Gly/TX	1,000	FA – PFA	< 0,001
Gly – FA	1,000	Gly – PFA	< 0,001
Gly – FA+TX	1,000	Gly – FA	1,000
Gly – FA/TX	0,063		
Gly – PFA+TX	0,004	PFA+TX – Gly+TX	1,000
Gly – Gly+TX	0,001	FA+TX – PFA+TX	0,010
Gly – PFA/TX	< 0,001	FA+TX – Gly+TX	0,003
Gly – PFA	< 0,001		
Gly/TX – FA	1,000	Gly/TX – FA/TX	0,009
Gly/TX – FA+TX	1,000	Gly/TX – PFA/TX	< 0,001
Gly/TX – FA/TX	0,063	PFA/TX – FA/TX	0,210
Gly/TX – PFA+TX	0,004		
Gly/TX – Gly+TX	0,001		
Gly/TX – PFA/TX	< 0,001		
Gly/TX – PFA	< 0,001		
FA – FA/TX	0,063		
FA – FA+TX	1,000		
FA – PFA+TX	0,004		
FA – Gly+TX	0,001		
FA – PFA/TX	< 0,001		
FA – PFA	< 0,001		
FA+TX – FA/TX	1,000		
FA+TX – PFA+TX	1,000		
FA+TX – Gly+TX	1,000		
FA+TX – PFA/TX	0,382		
FA+TX – PFA	0,017		
FA/TX – PFA+TX	1,000		
FA/TX – Gly+TX	1,000		
FA/TX – PFA/TX	1,000		
FA/TX – PFA	0,443		
PFA+TX – Gly+TX	1,000		
PFA+TX – PFA/TX	1,000		
PFA+TX – PFA	1,000		
Gly+TX – PFA/TX	1,000		
Gly+TX – PFA	1,000		
PFA/TX – PFA	1,000		

5.2.2.5. CD73



Şekil 5.8. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonrası CD73 desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). **Ölçek çubuğu:** 20 μm

Hücre zarı proteini olan CD73, hücre zarı üzerinde ince granül şeklinde boyanma deseni oluşturdu. Gruplar arasında iyi boyanma deseni ve en güçlü sinyal fiksasyon sonrası TX uygulaması yapılan gruplardan elde edildi (PFA+TX, Gly+TX, FA+TX). Sadece fiksasyon yapılan gruplarda en iyi boyanma deseni PFA grubundaydı. Gly ve FA gruplarında heterojen bir boyanma gözlemlendi. FA grubunda sitoplazmik arka plan boyaması da vardı. FA/TX grubunda en zayıf boyanma ortaya çıktı. İlginç olarak Gly/TX grubunda CD73 sinyali hücre zarı ve sitoplazma gözlemlendi. Bunun nedeninin TX inkübasyonundan kaynaklanan CD73 translokasyonu olabileceği düşünüldü.

Flüoresan işaretlemeler sonrası sinyal şiddetinden elde edilen CTCF değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları çizelge 5.6.'da verilmiştir.

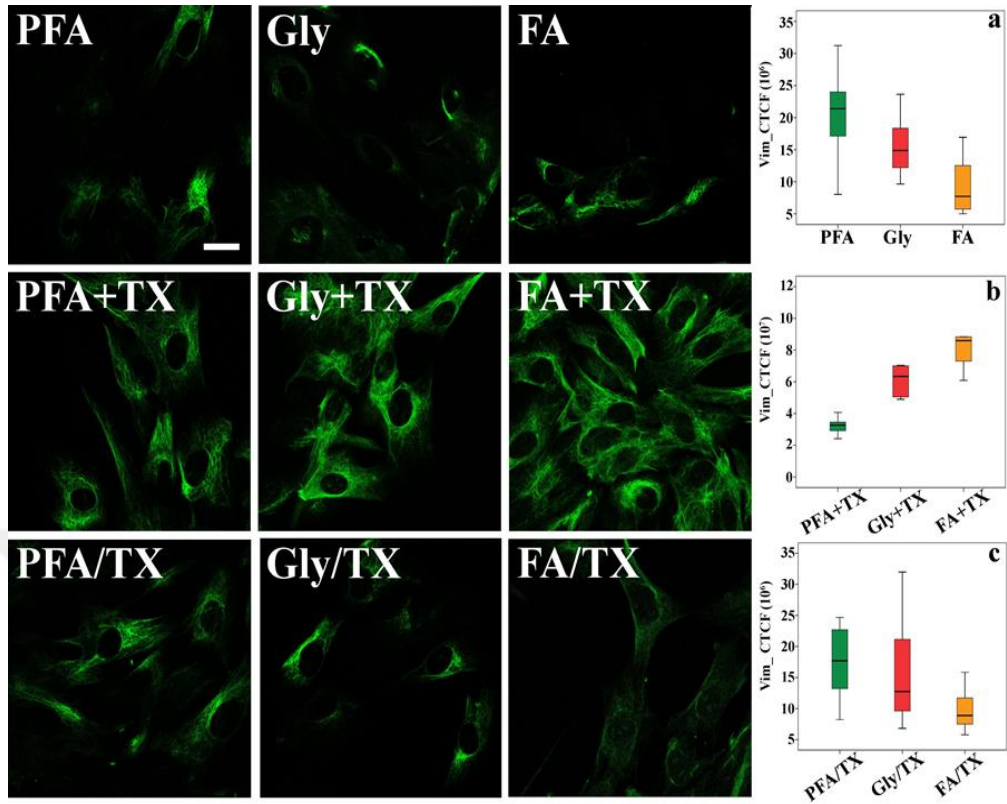
Çizelge 5.6. CD73 ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
FA/TX – PFA	1,000	FA – PFA	0,044
FA/TX – Gly+TX	1,000	Gly – PFA	0,003
FA/TX – FA+TX	1,000	Gly – FA	1,000
FA/TX – PFA+TX	1,000		
FA/TX – PFA/TX	0,980	PFA+TX- Gly+TX - FA+TX	0,072
FA/TX – Gly/TX	0,012		
FA/TX – FA	0,010	Gly/TX – FA/TX	0,001
FA/TX – Gly	0,001	Gly/TX – PFA/TX	0,402
Gly/TX – FA	1,000	PFA/TX – FA/TX	0,071
Gly/TX – Gly	1,000		
FA – Gly	1,000		
PFA – Gly+TX	1,000		
PFA – FA+TX	1,000		
PFA – PFA +TX	1,000		
PFA – PFA/TX	1,000		
PFA – Gly/TX	0,018		
PFA – FA	0,015		
PFA – Gly	0,001		
Gly+TX – FA+TX	1,000		
Gly+TX – PFA+TX	1,000		
Gly+TX – PFA/TX	1,000		
Gly+TX – Gly/TX	0,027		
Gly+TX – FA	0,023		
Gly+TX – Gly	0,001		
FA+TX – PFA+TX	1,000		
FA+TX – PFA/TX	1,000		
FA+TX – Gly/TX	0,959		
FA+TX – FA	0,858		
FA+TX – Gly	0,113		
FA/TX – PFA	0,443		
PFA+TX – Gly	0,555		
PFA+TX – PFA/TX	1,000		
PFA+TX – FA	1,000		
PFA+TX – Gly/TX	1,000		

PFA/TX – FA	1,000
PFA/TX – Gly	1,000
PFA/TX – Gly/TX	1,000



5.2.2.6. Vim



Şekil 5.9. İGK-MKH'lerde fiksasyon sonra vimentin desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) değerlerinin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). **Ölçek çubuğu:** 20 μm

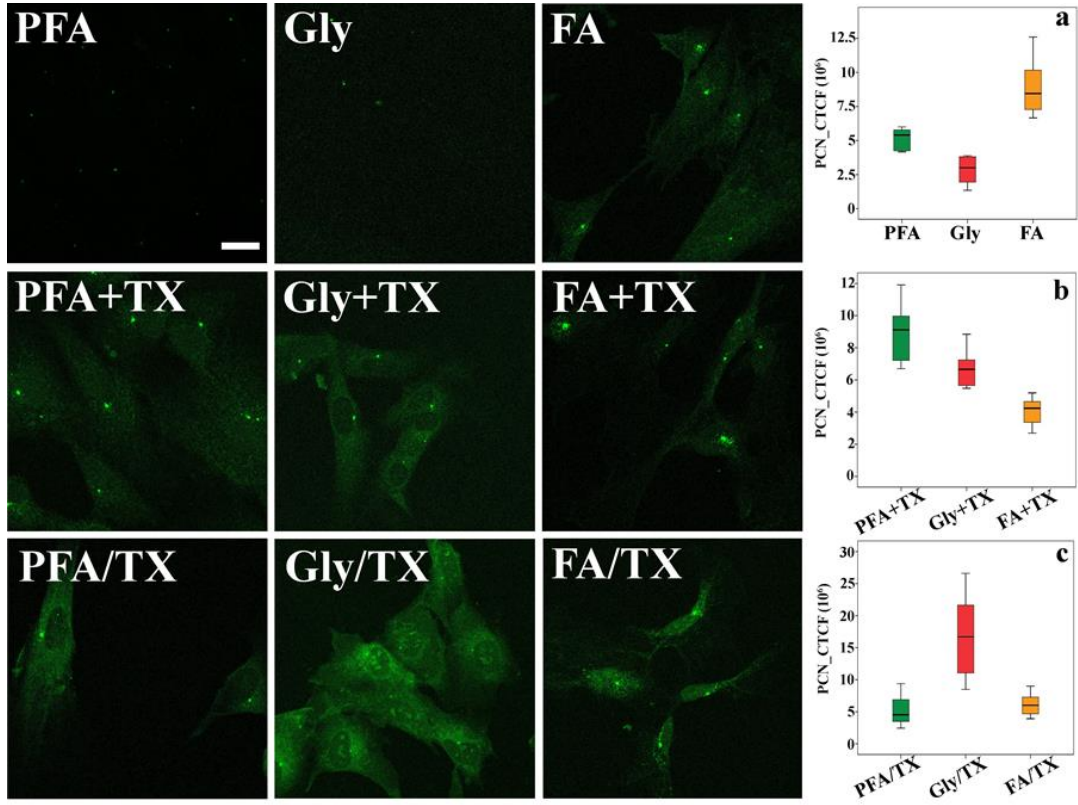
Mezenkim kaynaklı hücrelerde bol bulunan ve ara filament proteini olan Vim, fiksasyon sonrası TX eklenen gruplarda en iyi şekilde korunurken bu gruplar arasında en güçlü sinyali veren ve en iyi boyanma deseni ortaya çıkaran grup FA+TX'ti. En düşük sinyal PFA ve Gly gruplarından alındı. Bu gruplara kıyasla FA biraz daha güçlü sinyale sahipti. Fiksatifler grupları tümü arka plan veya spesifik olmayan boyanmalara neden olmadı.

Fiksasyon sonrası İGK-MKH'lerinin Vim ifadelerinden elde edilen CTCF değerlerinin istatistiksel değerlendirmeleri çizelge 5.7.'de verilmiştir.

Çizelge 5.7. Vim ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
FA/TX – PFA	0,654	FA – PFA	< 0,001
FA/TX – Gly+TX	< 0,001	Gly – PFA	0,383
FA/TX – FA+TX	< 0,001	Gly – FA	0,067
FA/TX – PFA+TX	0,010		
FA/TX – PFA/TX	1,000	PFA+TX – Gly+TX	0,010
FA/TX – Gly/TX	1,000	PFA+TX – FA+TX	< 0,001
FA – FA/TX	1,000	Gly+TX – FA+TX	0,402
FA – Gly/TX	1,000		
FA – Gly	1,000	Gly/TX – PFA/TX	1,000
FA – PFA/TX	1,000	Gly/TX – FA/TX	0,202
FA – PFA	0,280	PFA/TX – FA/TX	0,029
FA – PFA+TX	0,003		
FA – FA+TX	< 0,001		
FA – Gly+TX	< 0,001		
Gly/TX – Gly	1,000		
Gly/TX – PFA/TX	1,000		
Gly/TX – PFA+TX	0,639		
Gly/TX – Gly+TX	0,006		
Gly/TX – PFA	1,000		
Gly/TX – FA+TX	0,001		
Gly+TX – FA+TX	1,000		
PFA – PFA+TX	1,000		
PFA – Gly+TX	0,266		
PFA – FA+TX	0,052		
PFA+TX – FA+TX	1,000		
PFA+TX – Gly+TX	1,000		
PFA/TX – PFA	1,000		
PFA/TX – PFA +TX	1,000		
PFA/TX – Gly+TX	0,042		
PFA/TX – FA +TX	0,006		
Gly – PFA/TX	1,000		
Gly – PFA	1,000		
Gly – PFA+TX	1,000		
Gly – Gly+TX	0,012		
Gly – FA+TX	0,001		

5.2.2.7. PCN



Şekil 5.10. İGK-MKH’lerde fiksasyon sonra PCN desenleri ve sinyal şiddeti (CTCF) ölçümlerinden elde edilen değerlerin gruplar arasındaki dağılım grafikleri (a, b, c). **Ölçek çubuğu:** 20 μm

Sentrozomda bulunan PCM’de korunmuş bir proteini olan PCN, en net sinyali ve en belirgin boyanma desenini fiksasyon sonrası TX uygulaması yapılan gruplarda oluşturdu. Sadece fiksasyon yapılan gruplarda en güçlü sinyal PFA ve en zayıf sinyal Gly’de görüldü. Fiksatif çözeltisi içeriğine TX eklenen gruplarda arka plan boyanmaları gözlemlendi.

İGK-MKH’lerde PCN ifadesinden elde edilen CTCF değerlerinin karşılaştırmalı analizleri çizelge 5.8.’de verilmiştir.

Çizelge 5.8. PCN ifadelerinden elde edilen sinyal şiddeti (CTCF) ölçümleri sonrasında ikili fiksatif ve grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla elde edilen analiz sonuçları

İkili Fiksatif Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)	Grup Karşılaştırması	Anlamlılık Değeri (P)
Gly – FA+TX	1,000	FA – PFA	0,051
Gly – PFA/TX	1,000	Gly – PFA	0,062
Gly – PFA	1,000	Gly – FA	< 0,001
Gly – FA/TX	0,166		
Gly – Gly+TX	0,120	PFA+TX – Gly+TX	0,062
Gly – FA	< 0,001	PFA+TX – FA+TX	< 0,001
Gly – PFA+TX	< 0,001	Gly+TX – FA+TX	0,266
Gly – Gly/TX	< 0,001		
FA+TX – PFA/TX	1,000	Gly/TX – PFA/TX	< 0,001
FA+TX – PFA	1,000	Gly/TX – FA/TX	0,003
FA+TX – FA/TX	1,000	PFA/TX – FA/TX	1,000
FA+TX – Gly+TX	1,000		
FA+TX – FA	0,024		
FA+TX – PFA+TX	0,015		
FA+TX – Gly/TX	< 0,001		
PFA/TX – PFA	1,000		
PFA/TX – FA/TX	1,000		
PFA/TX – Gly+TX	1,000		
PFA/TX – FA	0,180		
PFA/TX – PFA+TX	0,120		
PFA/TX – Gly/TX	0,001		
PFA – FA/TX	1,000		
PFA – Gly/TX	1,000		
PFA – FA	0,294		
PFA – PFA+TX	0,200		
PFA – Gly/TX	0,001		
FA/TX – Gly+TX	1,000		
FA/TX – FA	1,000		
FA/TX – PFA+TX	1,000		
FA/TX – Gly/TX	0,030		
Gly+TX – FA	1,000		
Gly+TX – PFA+TX	1,000		
Gly+TX – Gly/TX	0,044		
FA – PFA+TX	1,000		
FA – Gly/TX	1,000		
PFA+TX – Gly/TX	1,000		

Çizelge 5.9. İmmünflüoresan işaretlemeler sonrasında fiksatif gruplarının genel performansı

	PFA	PFA+TX	PFA/TX	Gly	Gly+TX	Gly/TX	FA	FA+TX	FA/TX
Çekirdek Belirteçleri	Lamin A+C	✓	✓✓✓	✓	✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓✓✓
	Lamin A	Ø	Ø	×	Ø	Ø	×	Ø	Ø
	CENP-A	★	★★★	★	★	★★	★	★★★	★★★
	NS	✓	✓✓✓	✓✓✓	✓✓	✓✓✓	✓	✓✓	✓✓✓
	NS	×××	×	××	××	×	××	Ø	××
	NS	★★	★★★	★★★	★★	★★★	★	★★	★★★
	NS	✓	✓✓✓	✓✓✓	BY	✓✓✓	BY	BY	✓✓✓
	NS	××	××	××	×××	××	×××	×××	××
	NS	★★	★★★	★★★	BY	★★★	BY	BY	★★★
	NS	✓	✓✓✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓✓✓	✓✓	✓✓✓
Hücreye Özgü Belirteçler	N-Cad	××	××	××	×××	××	×××	××	×××
	CD73	××	Ø	×	××	Ø	×	Ø	×
	Mitotracker	✓✓	✓✓✓	BY	✓✓✓	✓	BY	BY	BY
	Mitotracker	Ø	Ø	Ø	××	××	Ø	Ø	Ø
	Mitotracker	★★★	★★★	BY	★★★	BY	BY	BY	BY
	Mitotracker	★★★	★★★	BY	★★★	BY	BY	BY	BY
	Mitotracker	✓✓✓	✓✓✓	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓✓✓
	Mitotracker	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	××	Ø	Ø
	Mitotracker	★★★	★★★	★★★	★★	★★★	★	★★	★★★
	Mitotracker	✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓✓
Hücre iskeleti Belirteçleri	Vim	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	Vim	★	★★	★★	★	★★★	★★	★	★★★
	Vim	✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓✓
	Vim	✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓	✓	✓✓	✓✓

✓: Boyanma yoğunluğu (✓: düşük ✓✓: orta düzeyde ✓✓✓: yüksek)

×: Arka plan boyanma yoğunluğu (×: düşük ××: orta ×××: şiddetli)

Ø: Arka plan boyanması yoktur

★: Boyanma deseninin hücre lokasyonu ile uyumu (★: zayıf ★★: orta ★★★: iyi)

BY: Boyanma yoktur

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre ya da dokuların mikroskop altında gözlemlerinden önce, belirli lokasyonlarının immünsitokimyasal yöntemlerle boyanmasına imkân veren fiksasyon aşaması, bugün hâlâ bilimsel araştırmalarda, rutin laboratuvalarda kullanılan temel basamaktır. Bu işlem için kullanılan fiksatif çözeltilerinin fiksasyon gücü yapılan bir sonraki adımın etkinliğini belirlediği için son derece önemlidir. Her fiksatifin çalışma konsantrasyonu, pH derecesi, osmolaritesi, ilgili dokuya penetre oluşu ve fikse olma süresinin belirlenmesi başarılı bir fiksasyon işlemi için gerekli özelliklerdir. İmmünsitokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan boyama işlemlerinden önce fiksasyon aşaması ilgili epitoplara korunması, antikor-antijen uyumunun sağlanması, materyali mikroskop altında incelerken hücre ya da doku içerisindeki işaretlenmiş lokasyondaki hedef sinyalin varlığını etkilemektedir.

Çalışmamızda insan göbek kordonu kaynaklı kök hücreleri *in vitro* şartlarda çoğaltarak tuttukları yüzeyde göreceli olarak belli çoğunluğa ulaştıktan sonra fiksasyon sürecini başlattık. Araştırmaya başlamadan önce üç farklı fiksatif ve hücre permeabilizasyonunda etkili olan bir deterjan olan TX'i kullanarak farklı kombinasyonlar halinde hücrelere uygulamak üzere belirledik. Bu kombinasyonlar, sadece fiksasyon yapılan gruplar, fiksatif çözeltileri hazırlandıktan sonra içeriğine TX eklenenler ve fiksasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra TX uygulamasını yapılan gruplar olmak üzere fiksasyon planımızı yapıp hücrelerin belirli lokasyonlarında ifadelenen ve hücrelere özgü proteinleri belirledikten sonra mikroskop altında görüntülerden elde edilen sinyal şiddeti değerlerinin analizlerini yapmak üzere deney planımızı oluşturduk.

Literatüre yaptığı önemli katkılarıyla araştırma grubumuz, mezenkimal kök hücrelerin belirli lokasyonlarında yer alan proteinlerin varlığını hem morfolojik gözlemlere hem de sinyal şiddetinden elde edilen sayısal değerlere dayalı veriler üzerinden hücre iskeleti, çekirdek ve hücreye özgü proteinler için uygun fiksasyon yöntemini tanımlayan bir ilk çalışmayı tamamlamıştır.

6.1. İGK-MKH'LERİN FİKSASYON SÜREÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kültür ortamı içerisinde kayıt altına alınan canlı görüntülemeler sırasında düz ve geniş hücre gövdelerinde süregelen vezikül ve organel hareketleri gözlemlenirken zamana zaman hücre sitoplazmasında büzülme meydana gelmiştir. Ardından dokuz farklı fiksatif grubunun hücre morfolojisi üzerindeki değişimler değerlendirilmiştir. PFA ve FA'da büyük sitoplazmik kabarcıkların oluşumu ve sitozol kaybı oluşurken, Gly fiksasyonunda kabarcık oluşmamış ve nispeten sağlam bir vezikül korunması gözlenmiştir. Sonradan TX eklenen üç fiksasyon grubunda (PFA+TX, Gly+TX, FA+TX) önemli bir değişiklik gözlenmezken, fiksatif çözeltisi içeriğine TX katılan gruplarda (PFA/TX, Gly/TX, FA/TX) hücre zarı bütünlüğü bozulmamıştır. Bu durum fiksatif içeriğine ya da sonradan TX eklenmesi zar bütünlüğünü korumaya yardımcı olduğunu düşündürmüştür. Üç fiksatif kendi içinde kıyaslandığında, PFA ve FA'nın tüm kombinasyonları benzer olayları sergilerken Gly'nin fiksasyon boyunca hücre zar bütünlüğüne zarar vermediği, kabarcık oluşturmadığı, vezikül hareketlerinin sık görülmediği kayıtlar arasında yer almıştır. İGK-MKH'lerin Gly fiksasyonu sırasında canlı kayıtlardan elde ettiğimiz gözlemler, Richter ve ark. (2017) tarafından da raporlanan Gly'in hücre zarına çok hızlı penetre olması, vezikül akışına neden olmadığı gözlemleri ile desteklenmektedir.

6.2. İGK-MKH'LERİN İMMUNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER SONRASINDA MORFOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda üç farklı aldehit grubuna ait fiksatifler kullandık. Bunlar içerisinde bilimsel araştırmalarda Gly'in kullanımı eski ve nadirdir. 1970'li yıllarda PFA'nın elektron mikroskobu çalışmalarındaki fiksasyon etkinliğinin (35) ve 1980'li yıllarda immünohistokimya çalışmaları için daha iyi tanımlandığı tarihten itibaren, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji çalışmalarda mikroskobik gözlemler için en yaygın kullanılan aldehit grubu fiksatifi olmuştur.

Bu çalışmada eski ve daha az bilinen bir fiksatif olan Gly ve özellikle doku fiksasyonunda daha çok kullanılan FA'in hücresel proteinler üzerinde PFA'ya göre herhangi bir üstünlüğünün olup olmadığını belirlemek için süper çözünürlük konfokal mikroskobu ile üç farklı fiksatif karışımını karşılaştırdık. Çok yakın zamanda Richter ve ark. tarafından Gly ve PFA fiksasyonu ile ilgili geniş kapsamlı ve iyi tasarlanmış bir veri serisi

yayınlanmış ve 51 hücrel proteinin Gly fiksasyonu sonucunda daha iyi korunduğu ortaya korunduğu sonucuna varılmıştır. 2011 yılında Wang ve ark. tarafından deri üzerine yapılan çalışmada FA ve Gly fiksasyonunun histomorfolojik değişimler üzerine etkisi değerlendirilmiş ve her iki aldehit grubu ile yapılan fiksasyon sonrası yapılan boyamalar sonucunda deri morfolojisinde benzer sonuçlar olduğu raporlanmıştır (36). Çalışmamızda İGK-MKH'lerinde ifadelenen sekiz farklı protein belirledik. Bu proteinlerin mikroskop gözlemleri sırasında elde sonuçlar boyanma yoğunluğu, arka plan boyanması ve hücre bulunduğu yer ile uyumlu sinyal verme durumu Çizelge 5.9'da özetlenmiştir.

Aldehit grubu fiksatifleri, serbest amino grupları aracılığıyla metilen köprüleri kurarak çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirir. Böylelikle çapraz bağlı bir antijen ağı oluştururlar. Çapraz bağlayıcı moleküller, etanol, metanol gibi organik çözücülere göre hücre yapısını daha iyi korur. Ancak bazı bileşenlerin antijenite özelliklerini azaltabilir. Hücrede işaretlenmek üzere seçilen antikorum antijene erişimine izin vermek için permeabilizasyon olarak adlandırılan bu işlem hücre zarı üzerindeki lipitleri çözerek por yapısı oluşarak ilgili antikorum hedef antijene ulaşması kolaylaştırır (37). Bu işlemin gerçekleşmesi için en sık kullanılan iyonik olmayan deterjan olan TX kullanılmaktadır. Bu tür deterjanların lipid-lipid ve lipid-protein molekülleri arasındaki etkileşimi ortadan kaldırdığı için denatüre edici etkisi olmadığı düşünülmektedir (38). Bu nedenle hücrelerde ve moleküler biyoloji uygulamalarında membran proteinlerinin izolasyonunda kullanılmaktadır (39). Çalışmamıza fiksatif içeriğine TX eklenen ve fiksasyon sonrası TX uygulaması yapılan grupların sonuçlarından elde edilen verilere göre hücrel proteinleri TX eklenen grupların, sadece fiksasyon yapılan gruplara göre daha iyi koruduğunu gözlemledik.

Fiksasyon sonrası immünohistokimya yöntemleri kullanılarak hücrelerin belli yerlerinde lokalize olmuş proteinlerin *in situ* olarak işaretlendikten sonra mikroskop gözlemleri sırasında Gly'nin PFA ve FA'ya göre daha etkili sonuç vermediği, çok sayıda boyanmamış epitoplarn varlığı, güçlü bir arka plan boyanması oluşturduğu gözlemlendi Ancak bazı durumlarda Gly'nin PFA ve FA'ya göre daha iyi sinyal yoğunluğuna sahip olduğu bulundu.

Gly ilk kez 1943 yılında Wicks and Suntzeff tarafından sunulmuş ve % 10 formalinden (%3,7 FA çözeltisi) daha verimli çalıştığı ve inhalasyon açısından daha az zararlı olduğu rapor edilmiştir (40, 41). Bu nedenle Gly'in hücresel fiksasyonda FA yerine kullanabileceği düşünülmüştür. Bununla birlikte, farklı hücresel hedeflerin korunmasında FA ve Gly'in fiksasyon etkinliğini karşılaştıran çalışmalarda doku morfolojisinin korunması sırasında FA'in Gly'ye göre daha üstün olduğu (42) ve Gly genellikle belirgin bir şekilde zayıf boyanma ve/veya spesifik olmayan boyanmalar ortaya çıkardığı rapor edilmiştir (43, 44).

Fiksatif grupları arasında hücreye özgü belirteçlerde en iyi boyanma desenini PFA ve en zayıf boyanma deseni ve nispeten spesifik olmayan boyanma görünümü Gly gruplarından elde edilmiştir. En parlak sinyal şiddeti fiksasyon sonrası TX eklenen gruplarda, zayıf sinyal şiddeti ise sadece fiksasyon yapılan gruplarında gözlenmiştir. Özellikle kök hücrelerde ifadelenen yüzey belirteci ve hücre zarında lokalize bir glikoprotein olan CD73, literatür ile uyumlu boyanma deseni fiksasyon sonrası TX uygulaması yapılan gruplarda, en zayıf boyanma desenini fiksatif çözeltisine TX eklenen gruplarda oluşmuştur. Bu durumun sonucu olarak fiksasyon sonrası TX uygulaması yapılan grupların CD73 ifadesini koruduğunu düşünebilir.

Hücre adezyon molekülü olan, genellikle nöronal hücrelerde ifadelенmesinin yanı sıra mezenkim kaynaklı hücrelerden ifade edilen N-Cad'in fiksasyon sonrası TX uygulanan gruplarda belirgin bir şekilde varlığı korunurken, Gly, Gly/TX ve FA gruplarında spesifik boyanma gözlenmemiştir. N-Cad proteinin en iyi boyanma deseni PFA gruplarında ortaya çıkarken, özellikle PFA+TX grubunda elde edilen görüntü, 2015 yılında Coşkun ve Can tarafından (34) explant kültür yöntemi ile izole edilen İGK-MKH'leri % 3,5 PFA fiksasyonu sonrası % 0,1 TX ile inkübe edilmiş ve ardından N-Cad proteini ile işaretlenmesi sonrası ortaya çıkan boyanma deseninin araştırmamızda yer alan PFA+TX gruplarından elde edilen boyanma deseni ile benzer olduğu görülmüştür.

İGK-MKH'leri MitoTracker ile yapılan işaretlemesi sonrasında dokuz farklı grup ile fiksasyon yapıldığında FA gruplarında boyanma gerçekleşmediği, Gly gruplarında en iyi boyanma deseni ve en fazla arka plan boyanması Gly grubunda gözlenmiştir. Mitotracker ifadesinin en iyi korunduğu grup PFA fiksasyonu sonrası TX uygulaması yapılan grupta

gözlemlenmiştir. Richter ve ark tarafından yapılan çalışmada hücre kültürlerinde yapılan Mitotracker işaretlemesinde Gly'in PFA'ya göre daha fazla arka plan boyanması yaptığı bulunmuştur. Bu bulgu araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla desteklenmektedir.

Hücre içi yapısal bir protein olan vimentin 50 kDa'luk bir protein olup, mezodermal kökenli hücrelerde bulunmaktadır (45). Boyanma deseni ve sinyal şiddeti açısından değerlendirildiğinde fiksasyon sonrası TX uygulanan gruplar en net ve parlak sinyal şiddetine sahipken, sadece fiksasyon yapılan ve fiksatif içeriğine TX eklenen gruplarda heterojen boyanma yoğunluğu gözlenmiştir. Fiksasyon grupları arasında FA+TX grubunda homojen bir boyanma yoğunluğunun yanı sıra güçlü sinyaller analiz edilmiştir.

Sentrozomda PCM'de ifadelenen PCN proteini her fiksatif grubu içerisinde değerlendirildiğinde en iyi boyanma deseni ve en güçlü sinyal şiddetinin alındığı PFA+TX, Gly+TX ve FA+TX gruplarıdır. Sadece fiksasyon yapılan gruplarda hedef sinyalin parlak ve net olduğu grup PFA iken, Gly'de daha zayıf sinyaller analiz edilmiştir. Ayrıca Gly gruplarında yoğun bir arka plan boyanması meydana geldiği için hedef sinyal şiddeti zayıf kalmıştır.

Hücre çekirdeğinin farklı yerlerinde lokalize olmuş proteinlerden biri olan Lamin A+C, çekirdek iç zarında ifadelenen ve aynı zamanda hücre iskeleti ara filamanıdır. Lamin A+C' ifadesinin en iyi korunduğu gruplar PFA+TX, Gly+TX, FA+TX'tir. Hem boyanma deseni açısından hem de sinyal şiddeti açısından parlak ve çekirdek iç zarı belirgindir. Sadece fiksasyon yapılan gruplarda zayıf boyanma yoğunluğu vardır. Deney tekrarlarından elde edilen bulgulara göre FA/TX ile fikse edilip farklı zamanlarda yapılan işaretlemeler sonucunda boyanmaların zayıf ve heterojen bir yoğunluğa sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak immünflüoresan işaretlemeler sırasında iyi bir Lamin A+C mikrografı elde edilmek isteniyorsa fiksasyon aşamasından sonra TX uygulaması yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Kromozomların sentromer bölgesinde ifadelenen bir diğer protein olan CENP-A için en iyi boyanma deseni FA gruplarının tümünde ve PFA+TX grubunda gözlenmiştir. Gly gruplarının tümünde spesifik boyanma gerçekleşmemiş ve arka plan boyanması çok yoğun olup, çekirdekte spesifik olmayan boyanmalara rastlanmıştır. Hedef CENP-A sinyali için,

Gly'nin uygun bir fiksatif olmadığı, ancak FA'nın tüm grupları bu protein için uygun fiksatif olabileceği düşünülmektedir.

Çekirdekçikte lokalize olan bir kök hücrelerin çoğalma sürecinde ifadelenen bir protein olan Nucleostemin, boyanma deseni açısından nispeten tüm gruplarda benzerlik göstermektedir. Ancak Gly gruplarında NS ifadelenmelerinden hariç spesifik olmayan boyanmalara da rastlanmıştır. En iyi ve en tutarlı boyanma yoğunluğu PFA gruplarından elde edilmiştir. FA+TX ve FA/TX gruplarından sinyal yoğunluğunun aşırı parlak olması sebebiyle antikor dilüsyonunun azaltılması yönünde uygulamalar yapılabileceği düşünülmektedir. 2011 yılında Oktar ve ark. tarafından İGK-MKH'lerde hücre döngüsü boyunca nucleostemin ifadeleneğini değerlendiren çalışmada % 4'lük PFA kullanılarak oda ısısında fikse edilen hücreler NS ile işaretlendikten sonra elde edilen görüntülerin araştırmamızda % 3,5 PFA ile fikse edilmiş NS ile işaretlenmiş İGK-MKH'lerinden elde edilen görüntüler ile uyumlu olduğu görülmüştür (32).

6.3. SONUÇ

Yapılan değerlendirmeler ile üç farklı fiksatifin literatür bulguları ile karşılaştırılması sonucunda hücrelerin farklı lokasyonlarında ifadelenen proteinleri işaretlemeye önce uygun fiksasyon yönteminin kullanılması mikroskop altında gözlem sırasında elde edilen mikrografın kalitesini etkilediği için kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda 3 farklı fiksatif üzerinden elde ettiğimiz sonuçları özetlemek gerekirse;

Gly, İGK-MKH'lerde farklı lokalizasyonlarda yer alan sekiz proteinin ifadelerini ortaya çıkarırken zayıf boyanma, güçlü arka plan ve spesifik olmayan boyanmalar oluşturmuştur. Genel olarak Gly+TX gruplarında protein ifadelerinin korunduğu, ancak Gly ve Gly/TX gruplarında (N-Cad, CENP-A) ise korunmadığı gözlemlenmiştir.

FA ile yapılan fiksasyon sonuçları PFA ile benzer olduğu bulunmuştur. Ancak bazı çekirdek belirteçlerinde (özellikle CENP-A'da) FA'nın tüm gruplarında spesifik boyanmalar oldukça belirgin ve sinyal şiddetleri kuvvetlidir. Gly ile karşılaştırıldığında daha az yoğunlukta arka plan boyanması sergilemektedir. Mitotracker boyanması hariç, tüm proteinlerin belirgin boyanma deseni ve sinyalin parlak olduğu grup FA+TX 'tir. FA fiksasyonu tek başına homojen bir boyanma sergileyemezken, TX inkübasyonu yapılan

gruplarda protein ifadesi güçlü ve korunmuştur. Bu durum TX'in ilgili antikorun ilgili hedef antijene bağlanması için fiksasyon basamağı sonrasında permeabilizasyonun etkili bir adım olduğunu düşündürmüştür.

Özellikle immünflüoresan işaretleme öncesi fiksasyonda en sık ve hâlâ kullanılmakta olan PFA çalışmamızda da etkinliğini sürdürmüştür. Özellikle Gly'e göre üstün özellikleri bulunmaktadır. Çekirdek belirteçlerinde (Lamin A+C, CENP-A, NS) PFA ve PFA/TX gruplarında homojen bir boyanma sağlanamazken, PFA+TX gruplarında çekirdekte ifadelenen proteinlerde belirgin boyanma deseni ve parlak sinyaller gözlenmiştir. Hücreye özgü belirteçlerde (CD73, N-Cad) PFA'nın gruplarının tümünde spesifik boyanma gözlenmiştir. Ancak PFA/TX gruplarında yer yer daha parlak sinyaller alınmıştır. Hücre iskeleti proteinlerinde (Vimentin, PCN) boyanma deseni ve sinyal şiddeti açısından değerlendirildiğinde en iyi grup PFA+TX olduğu gözlenmiştir.

Tüm bu sonuçlarla ilgili yapılan kalitatif ve kantitatif değerlendirmeler, Gly'in İGK-MKH'lerinin fiksasyonu kullanabilecek uygun bir fiksatif olmadığı, ancak FA'nın hücrelerin fiksasyon basamağında kullanılabilir bir fiksatif olabileceğini düşündürmüştür. PFA, Gly ve FA'nın Çizelge 5.9'da belirtilen proteinler arasında boyanma yoğunluğu, arka plan boyanma yoğunluğu ve hücrede ifadelendiği yer ile olan uyumu çerçevesinde değerlendirilmesi sonucunda fiksatif ya da fiksatif kokteyllerinden hangisinin bu hücrel proteinlerin ifadesini daha güçlü koruduğunun belirlenmesi, gelecekte hücrel proteinlerle ilgili yapılan araştırmalara ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014;70(1):12-9. Epub 2014/02/25. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.01.022. PubMed PMID: 24561827; PubMed Central PMCID: PMC4240801.
2. Marcon N, Bressenot A, Montagne K, Bastien C, Champigneulle J, Monhoven N, et al. [Glyoxal: a possible polyvalent substitute for formaldehyde in pathology?]. *Ann Pathol*. 2009;29(6):460-7. Epub 2009/12/17. doi: 10.1016/j.annpat.2009.09.011. PubMed PMID: 20005432.
3. Hoffman EA, Frey BL, Smith LM, Auble DT. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem*. 2015;290(44):26404-11. Epub 2015/09/12. doi: 10.1074/jbc.R115.651679. PubMed PMID: 26354429; PubMed Central PMCID: PMC4646298.
4. Puchtler H, Meloan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry*. 1985;82(3):201-4. Epub 1985/01/01. PubMed PMID: 3997553.
5. Robinson RW, Snyder JA. An innovative fixative for cytoskeletal components allows high resolution in colocalization studies using immunofluorescence techniques. *Histochem Cell Biol*. 2004;122(1):1-5. Epub 2004/06/09. doi: 10.1007/s00418-004-0656-2. PubMed PMID: 15185086.
6. Leyton-Puig D, Kedziora KM, Isogai T, van den Broek B, Jalink K, Innocenti M. PFA fixation enables artifact-free super-resolution imaging of the actin cytoskeleton and associated proteins. *Biol Open*. 2016;5(7):1001-9. Epub 2016/07/06. doi: 10.1242/bio.019570. PubMed PMID: 27378434; PubMed Central PMCID: PMC4958280.
7. Kim SO, Kim J, Okajima T, Cho NJ. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano Converg*. 2017;4(1):5. Epub 2017/04/08. doi:

10.1186/s40580-017-0099-9. PubMed PMID: 28386525; PubMed Central PMCID: PMC5359366.

8. Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ, Helm MS, Sarkar D, Saleeb RS, et al. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *EMBO J.* 2018;37(1):139-59. Epub 2017/11/18. doi: 10.15252/embj.201695709. PubMed PMID: 29146773; PubMed Central PMCID: PMC5753035.

9. Dapson RW. Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotech Histochem.* 2007;82(3):161-6. Epub 2007/11/08. doi: 10.1080/10520290701488113. PubMed PMID: 17987441.

10. Bancroft JD, LD, Suvarna SK *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.* 7th, editor2012.

11. Hassan U, BM, Mushtaq S. Importance of pH of Fixatives Used for Fixation of Histopathology Specimens – An Un-Recognized Issue. *Journal of Islamabad Medical & Dental College.* 2015;4(3).

12. Stranz M, Kastango ES. A Review of pH and Osmolarity. *International journal of pharmaceutical compounding.* 2002;6(3):216-20. Epub 2002/05/01. PubMed PMID: 23979188.

13. Huang BQ, Yeung EC. Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview. In: Yeung ECT, Stasolla C, Sumner MJ, Huang BQ, editors. *Plant Microtechniques and Protocols.* Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 23-43.

14. Klockenbusch C, O'Hara JE, Kast J. Advancing formaldehyde cross-linking towards quantitative proteomic applications. *Anal Bioanal Chem.* 2012;404(4):1057-67. Epub 2012/05/23. doi: 10.1007/s00216-012-6065-9. PubMed PMID: 22610548.

15. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):400-5. Epub 2012/12/19. doi: 10.4103/0973-029X.102496. PubMed PMID: 23248474; PubMed Central PMCID: PMC53519217.

16. Melan MA. Overview of cell fixation and permeabilization. *Methods Mol Biol.* 1994;34:55-66. Epub 1994/01/01. doi: 10.1385/0-89603-285-X:55. PubMed PMID: 7711871.
17. Fujiwara K. Techniques for localizing contractile proteins with fluorescent antibodies. *Curr Top Dev Biol.* 1980;14(Pt 2):271-96. Epub 1980/01/01. PubMed PMID: 6161755.
18. Amidzadeh Z, Behbahani AB, Erfani N, Sharifzadeh S, Ranjbaran R, Moezi L, et al. Assessment of different permeabilization methods of minimizing damage to the adherent cells for detection of intracellular RNA by flow cytometry. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2014;6(1):38-46. Epub 2014/02/14. PubMed PMID: 24523954; PubMed Central PMCID: PMC3895578.
19. Can A. Kök Hücre. Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Yayınevi; 2014. 720 p.
20. Giampietro C, Taddei A, Corada M, Sarra-Ferraris GM, Alcalay M, Cavallaro U, et al. Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood.* 2012;119(9):2159-70. Epub 2012/01/17. doi: 10.1182/blood-2011-09-381012. PubMed PMID: 22246030.
21. Heymann R, About I, Lendahl U, Franquin JC, Obrink B, Mitsiadis TA. E- and N-cadherin distribution in developing and functional human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol.* 2002;160(6):2123-33. Epub 2002/06/12. doi: 10.1016/s0002-9440(10)61161-3. PubMed PMID: 12057916; PubMed Central PMCID: PMC1850842.
22. Gao Z-w, Dong K, Zhang H-zJBri. The roles of CD73 in cancer. 2014;2014.
23. Kholmukhamedov A, Schwartz JM, Lemasters JJ. Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats: mitotracker probes and mitochondrial membrane potential. *Shock (Augusta, Ga).* 2013;39(6):543. Epub 2013/05/18. doi: 10.1097/SHK.0b013e318292300d. PubMed PMID: 23680774; PubMed Central PMCID: PMC3759289.

24. Delaval B, Doxsey SJ. Pericentrin in cellular function and disease. *J Cell Biol.* 2010;188(2):181-90. Epub 2009/12/03. doi: 10.1083/jcb.200908114. PubMed PMID: 19951897; PubMed Central PMCID: PMCPMC2812529.
25. Muhlhans J, Giessl A. Pericentrin in health and disease: Exploring the patchwork of Pericentrin splice variants. *Commun Integr Biol.* 2012;5(4):304-7. Epub 2012/10/13. doi: 10.4161/cib.20363. PubMed PMID: 23060948; PubMed Central PMCID: PMCPMC3460829.
26. Esue O, Carson AA, Tseng Y, Wirtz D. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30393-9. Epub 2006/08/12. doi: 10.1074/jbc.M605452200. PubMed PMID: 16901892.
27. Arun S, Shulin LJCMLS. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. 2011;68(18):3033-46.
28. Romanova L, Grand A, Zhang L, Rayner S, Katoku-Kikyo N, Kellner S, et al. Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem.* 2009;284(8):4968-77. Epub 2008/12/25. doi: 10.1074/jbc.M804594200. PubMed PMID: 19106111; PubMed Central PMCID: PMCPMC2643513.
29. Oktar PA, Yildirim S, Balci D, Can A. Continual expression throughout the cell cycle and downregulation upon adipogenic differentiation makes nucleostemin a vital human MSC proliferation marker. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2):413-24. Epub 2010/11/11. doi: 10.1007/s12015-010-9201-y. PubMed PMID: 21063916.
30. Hasson D, Panchenko T, Salimian KJ, Salman MU, Sekulic N, Alonso A, et al. The octamer is the major form of CENP-A nucleosomes at human centromeres. *Nature Structural & Molecular Biology.* 2013;20:687. doi: 10.1038/nsmb.2562
<https://www.nature.com/articles/nsmb.2562#supplementary-information>.
31. Mehta GD, Agarwal MP, Ghosh SKJMG, Genomics. Centromere identity: a challenge to be faced. 2010;284(2):75-94.

32. Lammerding J, Fong LG, Ji JY, Reue K, Stewart CL, Young SG, et al. Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. 2006;281(35):25768-80.
33. Zhang B, Yang Y, Keyimu R, Hao J, Zhao Z, Ye R. The role of lamin A/C in mesenchymal stem cell differentiation. *J Physiol Biochem*. 2019;75(1):11-8. Epub 2019/02/02. doi: 10.1007/s13105-019-00661-z. PubMed PMID: 30706289.
34. Coskun H, Can A. The assessment of the in vivo to in vitro cellular transition of human umbilical cord multipotent stromal cells. *Placenta*. 2015;36(2):232-9. Epub 2014/12/20. doi: 10.1016/j.placenta.2014.11.024. PubMed PMID: 25524058.
35. Smit JW, Meijer CJ, Decary F, Feltkamp-Vroom TM. Paraformaldehyde fixation in immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Preservation of tissue and cell surface membrane antigens. *Journal of immunological methods*. 1974;6(1-2):93-8. Epub 1974/12/01. PubMed PMID: 4215836.
36. Wang YN, Lee K, Pai S, Ledoux WR. Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal. *Biotech Histochem*. 2011;86(5):359-65. Epub 2010/09/22. doi: 10.3109/10520295.2010.520275. PubMed PMID: 20854226; PubMed Central PMCID: PMC4227596.
37. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Veterinary pathology*. 2014;51(1):42-87. Epub 2013/10/17. doi: 10.1177/0300985813505879. PubMed PMID: 24129895.
38. Fonfría V.L. MAP, Padrós E., Lazarova T. Solubilization, Purification, and Characterization of Integral Membrane Proteins. 2011. doi: 10.1002/9783527634521.ch12.
39. Bhairi S. M. MC, Ibryamova S., LaFavor T. Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA: Merck KGaA; 2017.
40. Wicks LF, Suntzeff V. GLYOXAL, A NON-IRRITATING ALDEHYDE SUGGESTED AS SUBSTITUTE FOR FORMALIN IN HISTOLOGICAL FIXATIONS.

Science (New York, NY). 1943;98(2539):204. Epub 1943/08/27. doi: 10.1126/science.98.2539.204. PubMed PMID: 17843715.

41. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol.* 1963;17:19-58. Epub 1963/04/01. doi: 10.1083/jcb.17.1.19. PubMed PMID: 13975866; PubMed Central PMCID: PMCPMC2106262.

42. Titford ME, Horenstein MG. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2005;129(4):502-6. Epub 2005/03/30. doi: 10.1043/1543-2165(2005)129<502:Haofsf>2.0.Co;2. PubMed PMID: 15794674.

43. Umlas J, Tulecke M. The effects of glyoxal fixation on the histological evaluation of breast specimens. *Hum Pathol.* 2004;35(9):1058-62. Epub 2004/09/03. PubMed PMID: 15343506.

44. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(7):893-901. Epub 2004/06/23. doi: 10.1369/jhc.3A6195.2004. PubMed PMID: 15208356.

45. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells.* 2007;25(2):319-31. Epub 2006/10/21. doi: 10.1634/stemcells.2006-0286. PubMed PMID: 17053211.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı; Ceren MUNGAN

Doğum Yılı: 1992
Yazışma Adresi: Arama Sokak 23/4 Aydınlikevler/ Ankara
Telefon: 0 506 438 72 25
Faks:
e-posta: cerenmungan@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ankara Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Bölüm İkincisi	2015

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Ankara Üniversitesi	TR	Ankara	Biyoteknoloji Enstitüsü	Yüksek Lisans	2015-2019

UZMANLIK ALANLARI

Kök hücre ve kök hücre biyolojisi

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Çelikkan FT, Mungan C, Sucu M, Ulus AT, Çınar Ö, İli EG, Can A. Optimizing the transport and storage conditions of current Good Manufacturing Practice-grade human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation (HUC-HEART Trial). *Cytotherapy* 21: 64-75, 2019

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. Çelikkan FT, Mungan C, Sucu M, Çınar Ö, Ulus AT, Can A. Hipoksik koşulların insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin kök hücre özellikleri üzerine etkileri. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Çeşme, İzmir. 29 Nisan 2 Mayıs 2016.
2. Can Alp, Topal Celikkan Ferda, Sucu Merve, Mungan Ceren, Gulhan Yigman Zeynep, Ulus Ahmet, Cinar Ozgur, Erturk Murat. Optimizing the transport, storage and attachment conditions of cGMP-grade human umbilical cord mesenchymal stromal cells (HUC-MSCs) for transplantation (HUC-HEART trial). The International Society for Stem Cell Research (ISSR) Annual Meeting, 14-17 June, 2017, Boston, USA.
3. Can Alp, Ulus Ahmet, Topal Celikkan Ferda, Mungan Ceren, Sucu Merve, Kurtoglu Murat, Simsek Erdal, Cinar Ozgur. Preliminary results of the human umbilical cord mesenchymal stromal cell (HUC-MSCs) transplantation in myocardial ischemia (HUC-HEART trial). The International Society for Stem Cell Research (ISSR) Annual Meeting, 14-17 June, 2017, Boston, USA.

4. Mungan C., Özgür EG., Can A., Miyokard Enfarktüsü Geçiren ve Kalp Kasına Kök Hücre Nakli Yapılan Bireylerin Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, P129, S57, 10-13 Mayıs 2018, Antalya – Türkiye
5. Sucu M., Mungan C., Kahveci S., Çelikkan FT., Can A., cGMP Koşullarda Üretilen İnsan Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerinde (iGK-MKH) PFA ve Gliyoksal Fiksasyonunun Morfolojik Etkisi, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, P160, S79, 10-13 Mayıs 2018, Antalya – Türkiye
6. Kahveci S., Sucu M., Mungan C., Çelikkan FT., Çınar Ö., Can A., HeLa Hücrelerinde Mikrotübülüs, F-aktin ve Çekirdek İmmün Boyamasının Farklı Fiksatiflerle Karşılaştırması: Süper Çözünürlük Mikroskobu Çalışması, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, P162, S81, 10-13 Mayıs 2018, Antalya – Türkiye

