

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İNSANDA GÖBEK KORDONU DOKU BİLEŞENLERİNDEKİ HÜCRELERİN
KÖK HÜCRE ÖZELLİKLERİNİN TANIMLANMASI

Deniz Balcı

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alp Can

Eylül

2013

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.

Deniz BALCI

İmzası



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ DEĞERLENDİRME VE SINAV
TUTANAĞI

BIYOTEKNOLOJİ

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Deniz Balcı

NUMARASI: 09420101

ANABİLİM DALI: Temel Biyoteknoloji Doktora

DANIŞMANI: Prof. Dr. Alp Can

PROGRAMI: YÜKSEK LİSANS DOKTORA

TEZİN ADI: İnsanda Göbek Kordonu Doku Bileşenlerindeki Hücrelerin Kök Hücre Özelliklerinin Tanımlanması

II. TOPLANTI BİLGİLERİ

İLGİ : Enstitü Yönetim Kurulunun 18/09/2013 tarih
ve sayılı toplantısında oluşturulan jüri
TOPLANTI TARİHİ : 25/09/2013
SAATİ : 11: 00
TOPLANTI YERİ : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji
ABD Konferans Salonu

III. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

- Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunan ve aday tarafından başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**
 Kişisel raporların tartışılması sonucunda tezin **DÜZELTİLDİKTEN** sonra savunulmasına
 Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunmayan tezin **REDEDEDİLMESİNE**

OY BİRLİĞİ

OY ÇOKLUĞU ile karar verildi.

Prof. Dr. Aykut Özgül
ÜYE
(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Prof. Dr. Nedime Serbalkıncı
BAŞKAN
(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Prof. Dr. Hilal Özdağ
ÜYE
(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Doç. Dr. Özgür Çınar
ÜYE
(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

Prof. Dr. Alp Can
ÜYE
(Unvan, Ad, Soyad, İmza)

EK: 1) Kişisel Raporlar
2) Tez savunma sınav duyurusu
3) Katılım Listesi

Detaylı Bilgi için : TEL: Santral: 0(312) 215 90 01-08

WEB: <http://www.biotek.ankara.edu.tr/>

Ens.Sek. 3446; Öğr.İşl. 3449-3459;

e-mail: biotek@ankara.edu.tr

Evrak 3442

Mali İşl. 3458

ÖZET

Doktora Tezi

İnsanda Göbek Kordonu Doku Bileşenlerindeki Hücrelerin Kök Hücre Özelliklerinin Tanımlanması

Deniz BALCI

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Alp CAN

İnsan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri (İGK-MKH) hücrel tedavilerde başarıyla kullanılabilir önemli bir MKH kaynağıdır. İGK-MKH'leri enzimatik işlemle izole edilip plastik yüzeyde kültüre edildiğinde heterojen bir fenotip ve farklılaşma potansiyeli sergilemektedir. Bu bulgular İGK-MKH popülasyonunda farklı köklülük seviyelerinin var olabileceğini göstermektedir. Daha önceki çalışmalarımızda gösterdiğimiz gibi, hücrelerin enzimatik yöntemle izole edilmesiyle *in vivo* protein profilinin dramatik bir biçimde değiştiği görülmüştür. Bu çalışmada, İGK bölgelerinden eksplant yöntemiyle izole edilen hücrelerin değişen karakteristik özelliklerini gösterilmiştir. Perivasküler (PV), intervasküler (İV), subamniyon (SA), ve göbek kordonu arteri (GKA) bölgeleri başarılı bir şekilde ayrılarak, plastik kültür kabında büyütülmüştür. Yüzey belirteçleri P₀ sonunda, hücre morfolojisi, proliferasyon dinamikleri, majör hücre iskeleti proteinlerinin dağılımı, yapısal genlerin ifadeleri ve farklılaşma özellikleri P₀-P₁₃ boyunca incelenmiştir. Dört grup arasında eksplant kültüre en iyi yanıtı veren, en hızlı yapışan ve konfluensiye ulaşan SA ve İV grupları olmuştur. GKA ve PV bölgeleri daha yavaş konfluensi oranı sergilemiştir. En heterojen hücre grubu 2 tip morfolojiyle (tip 1 ve tip 2) İV alanında gözlenmiş. PV hücreleri daha küçük ve fusiformken, SA hücreleri epitelooid görünümündedirler. Diğerlerinden farklı olarak GKA hücreleri ince uzun, düz kas görünümünde homojen bir yapı sergilemişlerdir. Hücre yüzey belirteçlerinin analizi sonucunda, İV, PV, SA, GKA hücreleri birbirlerinden ayrılarak kültüre edildiğinde MKH özelliklerini korumaktadırlar. PV hücreleri diğer gruplara göre farklılık göstermektedir. Dört alandan elde edilen hücrelerdeki hücre iskeleti proteini dağılımı köken aldıkları dokudaki durumlarıyla karşılaştırılmıştır. Desmin, İV, PV, SA hücreleri kültüre edildiğinde (GKA hariç) yok olan tek proteindir. α -SMA, vimentin, sitokeratin (CK) ve CD146 (NCAM) profili P₁-P₁₃ boyunca değişen pozitivite göstermiştir. Özellikle CK daha çok küçük hücrelerde görülürken, α -SMA daha çok dev hücrelerde izlenmiştir. Kendini iki katına çıkarma süresi (PDT) en kısa PV hücrelerindeyken en uzun İV hücrelerindedir. GKA hücreleri diğer gruptakilere oranla daha çabuk senesence girmektedir. GKA ve İV-MKH'lerinin kardiyak rejenerasyon yönünde yapılacak çalışmalarda kullanılabilir önemli bir hücre kaynağı oldukları gözlenmiştir. İGK'nun İV, PV, SA, GKA bölgelerine ayrılarak hücrelerin kültüre edilmeleri sahip oldukları pluripotent özellikleri kaybetmelerine neden olmaktadır. PV-MKH'lerinin nestin ifadesi onların nöron yönünde yapılacak çalışmalarda başarıyla farklılaşabileceğini göstermektedir. İV, PV, SA, GKA hücrelerinin hedefleme yeteneklerinin göstergesi SEMA-3C ifade etmeleri, bu hücre gruplarının anti-kanser çalışmaları için önemli bir kaynak olduklarını göstermektedir. PV hücreleri adipojenik farklılaşmada daha başarılıyken, SA ve İV hücreleri osteojenik farklılaşmada daha iyi bir sonuç vermiştir. İlginç olarak GKA birçok duruma GK-MKH'leri gibi yanıt vermiştir. Sonuç olarak, GK içindeki doku bölgeleri değişen köklülük özelliği göstermektedir. Dört farklı bölgeden elde edilen hücrelerin farklı hücrel özelliğe sahip olmalarından dolayı, doku mühendisliğinde ve hücrel tedavilerde kullanılırken bir bütün olarak nitelendirilmemelidirler.

2013, 128 sayfa

Anahtar kelimeler: Farklılaşma, İnsan göbek kordonu, Kök hücre

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

Human Umbilical Cord-Derived Stem Cells From Four Different Tissues
Subcompartments Having Distinct Stemness Properties Retain Their Characteristics

Deniz BALCI

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Alp CAN

Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) are considered as a promising type of MSCs to be successfully used in cellular therapies. When isolated by an enzymatic procedure and cultured on plastic surfaces, hUC-MSCs show a highly heterogeneous phenotype and differentiation potential suggesting that these populations may have different stemness grades. We have previously shown that *in vitro* protein profiles are dramatically changed when cells were extracted from tissues of origin using enzymatic digestion procedures. In the present study, we demonstrate varying characteristics of hUC-MSCs originated from different UC compartments that have been differentially isolated using nonenzymatic procedure. Perivascular (PV), intervascular (IV), subamnion (SA), and arteries (UCA) compartments were carefully excised, and then explanted onto plastic culture flasks. Surface markers were determined by the end of P₀. Cell morphology, proliferation dynamics, major cytoskeletal protein distribution and differentiation potentials were differentially evaluated during P₀-P₁₃. Among four explant cultures SA and IV have the highest and the fastest seeding rate that reached to confluency in P₀. GKA and PV showed slower confluency rates. The most heterogeneous group of cells was noted in IV containing two major cell phenotypes (type 1 and type 2). PV cells were smaller and more fusiform; whereas SA cells displayed more epithelial phenotype. Distinct from the others UCA cells were slender and homogeneous. Surface marker analyses demonstrated that Depending on the CD markers analyzed, IV, PV, SA, GKA cells retain their MSC properties when separated from each other. PV cells exist as a distinct population among the other groups. The distribution of cytoskeletal proteins in all cells from four compartments was then documented as compared to their tissue of origin. Desmin was the only protein that diminished (excluding UCA cells) when IV, PV and SA cells were cultured. α -SMA, vimentin, cytokeratin (CK) and CD146 (NCAM) profiles showed varying degrees of positivity throughout P₁-P₁₃. Specifically, CK was dominantly found in young cells, while α -SMA was prominent in giant cells. Population-doubling time (PDT) was the shortest in PV and the longest in IV. UCA cells remarkably entered to senescence earlier than the other cells. UCA and IV are an important source of cells used in cardiac regeneration. IV, PV, SA, GKA cells loss their pluripotent properties when separated from each other. PV cells nestin expression shows their neuronal properties. PV cells were differentiated into adipocytes more effectively than the other groups, while SA and IV had more potential to osteogenic differentiation. Interestingly, in many aspects, UCA cells responded similar to sUC-MSCs. Conclusively, tissue compartments within the human UC possess varying degrees of stem cell properties as indicated by the present study. As cells from four tissue compartments displayed distinct cellular features they should not be considered as a cohort in tissue engineering and cell-based therapies.

2013, 128 pages

Keywords: Differentiation, Human umbilical cord, Stem cell

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Günümüzde kök hücrelerin rejeneratif tedavide kullanımlarının ümit vaat edici bir biçimde ortaya çıkmasıyla, bu hücreleri keşfetmeye yönelik yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Kök hücrelerin kendine özgü özelliklerinin ortaya konması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir, bunlardan biri de hücrelerin kültür ortamındaki davranışının incelenmesidir. Doku içerisinde gerektiğinde işlevini yerine getirmek üzere hazır bulunan bu hücreler doku dışına çıkarılarak kültüre edilmektedir. Hücrelerin *in situ* ortamdaki davranışlarını *in vitro* ortamda sürdüreceği öngörülerek hücre kültürü ortamına alınır, fakat unutulmamalıdır ki doku içerisindeki nişinden ayrılan hücreler özelliklerini ancak sınırlı sayıda koruyabilir.

Bu çalışmada insan göbek kordonu doku içerisinde bulunan subamniyon, perivasküler, intervasküler ve göbek kordonu arteri bölgelerinde yerleşmiş olan hücrelerin özelliklerinin ortaya çıkarılmasıyla, insan göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* kültür ortamındaki fenotipik farklılığın nedeninin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bilgi ve önerileriyle bu güne gelmemi sağlayan, çalışma disiplininin yanı sıra sosyal yönünden de örnek edindiğim, değerli tez danışmanım Prof. Dr. Alp Can'a; eğitim sürecim boyunca bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ'a; yedi senemi birlikte geçirdiğim tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı ve Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyesi ve yardımcılarına; birlikte çalışmaktan zevk aldığım, destek ve sevgilerini hep hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma ve dostlarıma,

Bugünlere gelmem de her türlü destek ve teşvikini esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Aliye Balcı ve babam Tuncay Balcı'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Deniz BALCI

Ankara, Eylül 2013

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Kök Hücreler ve Karakteristik Özellikleri	3
2.2. Hücrelerde Genel Gelişim Basamakları ve Belirteçleri	7
2.2.1. Hipoblastın (ilkel endoderm) gelişimi.....	9
2.2.2. Epiblastın (ilkel ektoderm) gelişimi	11
2.2.3. Ektodermin gelişimi	12
2.2.4. Mezodermin gelişimi	14
2.2.5. Endodermin gelişimi	15
2.3. İnsan Göbek Kordonu Gelişimi	15
2.4. İnsan Göbek Kordonunun Barındırdığı Hücreler	22
2.5. İGK-MKH'lerinin Farklılaşma Özellikleri.....	25
2.6. İGK-MKH'lerinin Kemik İliği (Kİ) MKH'leriyle ve Kordon Kanı (KK) MKH'leriyle Kıyaslanması	27
3. GEREKÇE VE AMAÇ	29
4. MATERYAL ve YÖNTEM	31
4.1. İnsandan Göbek Kordonunun Elde Edilmesi, Laboratuvara Transferi ve Ön İşlem Aşamaları	31
4.2. İnsan Göbek Kordonu Hücrelerinin İzolasyonu Ve Elde Edilen Hücrelerin Farklılaştırılmadan Çoğaltılması (Ekspansiyon).....	31
4.3. Hücrelerin Akım Sitometri yöntemiyle Hücre Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi.....	32
4.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Farklılaştırılması.....	33
4.4.1. Adipojenik farklılaştırma	33
4.4.2. Osteojenik farklılaştırma	34
4.4.3. Kondrojenik farklılaştırma	34
4.5. (İmmün) Histokimyasal İşaretlenmeler	35
4.5.1. Doku boyaması (Parafin kesit boyamaları)	35
4.5.2. Doku boyaması (Dondurma kesit boyamaları).....	36
4.5.3. Farklılaştırılmamış hücrelerinin işaretlenmesi.....	37
4.5.4. Adipojenik farklılaştırılmış hücrelerin işaretlenmesi	41
4.5.5. Osteojenik farklılaştırılmış hücrelerin işaretlenmesi.....	41
4.5.6. Kondrojenik farklılaştırılmış hücrelerin işaretlenmesi	44
4.6. Gen İfadesinin Analizi.....	45
4.6.1. RNA izolasyonu	45
4.6.2. RNA'ların kalite kontrolü.....	47

4.6.3. cDNA sentezi	47
4.6.4. QRT-PCR (Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	48
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
5.1. Hücrelerin Sağ kalım Oranları ve Büyüme Karakterleri.....	52
5.2. Hücre Morfolojisi	57
5.3. Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi	60
5.4. Hücrelerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi.....	62
5.5. Hücrelerde Yapısal Gen İfadelerinin İncelenmesi	76
5.6. Hücrelerin İn Vitro Farklılaşma Yetkinlikleri	91
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	101
6.1. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin Büyüme, Çoğalma Sürecinin ve Morfolojilerinin Değerlendirilmesi	101
6.2. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Belirteçlerinin Değerlendirilmesi	105
6.3. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin Yapısal Özelliklerinin Değerlendirilmesi..	106
6.4. İGK Bölgelerindeki Hücrelerde İfade Edilen Yapısal Genlerin Değerlendirilmesi.....	109
6.5. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin İn Vitro Farklılaşma Yetkinliklerinin Değerlendirilmesi.....	112
6.6. Sonuç.....	114
KAYNAKLAR.....	117
ÖZGEÇMİŞ	124

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1 Hücrelerde gelişim	10
Şekil 2.2.2 Hücrelerde gelişim	13
Şekil 2.3.1 Embriyon dışı dokuların erken ve geç dönemde gelişimi.	17
Şekil 2.3.2 İnsan Göbek Kordonu Histolojisi.....	20
Şekil 2.3.3 İnsan göbek kordonunu dokusu hücrelerindeki hücre iskeleti proteinlerinin dağılımı.....	21
Şekil 5.1.1 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku ve bu bölgelerden izole edilen toplam hücre miktarı	53
Şekil 5.2.1 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültürdeki P ₀ hücre morfolojisi	58
Şekil 5.2.2 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültürdeki P ₁ hücre morfolojisi	59
Şekil 5.4.1 İGK dokusundan mekanik olarak çıkarılan İV, PV, SA ve GKA bölgeleri izlenmektedir	63
Şekil 5.4.2 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde vimentin filamanlarının değerlendirilmesi	65
Şekil 5.4.3 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin vimentin molekülünce değerlendirilmesi	66
Şekil 5.4.4 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde sitokeratin filamanlarının değerlendirilmesi	67
Şekil 5.4.5 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin sitokeratin molekülünce değerlendirilmesi.....	68
Şekil 5.4.6 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde α -SMA molekülünün değerlendirilmesi	69

Şekil 5.4.7 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin α -SMA molekülünce değerlendirilmesi.....	70
Şekil 5.4.8 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde desmin filamanlarının değerlendirilmesi	71
Şekil 5.4.9 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin desmin molekülünce değerlendirilmesi.....	72
Şekil 5.4.10 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinin CD146 molekülünce değerlendirilmesi.....	73
Şekil 5.5.1 Örnek RNA'larının agaroz jel görüntüsü	77
Şekil 5.5.2 İfadesi incelenen genlerin agaroz jel görüntüsü	78
Şekil 5.5.3 İfadesi QRT-PCR yöntemiyle incelenen genlerin erime, amplifikasyon ve standart eğrileri	80
Şekil 5.5.4 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen insan EKH belirteçleri olan Nanog, Rex1, Oct4 ve TERT ifadeleri	83
Şekil 5.5.5 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen mezenkimal bir belirteç olan vimentin ve α -SMA'nın ifadesi	85
Şekil 5.5.6 İGK-MKH ve PV, İV, SA, GKA-H'lerinde ifade edilen endodermal bir belirteç olan GATA4 ifadesi	86
Şekil 5.5.7 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen ektodermal bir belirteç olan Nestin ifadesi.....	87
Şekil 5.5.8 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen mezodermal bir belirteç olan desmin ifadesi.....	88
Şekil 5.5.9 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen SEMA3C	89
Şekil 5.6.1 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek adipojenik farklılaşmış hücreler	93

Şekil 5.6.2 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerde kalsiyum depozitlerinin yerleşimi.....	95
Şekil 5.6.3 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin osteopontin (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi	96
Şekil 5.6.4 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin osteonektin (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi.....	97
Şekil 5.6.5 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin BSP2 (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi.....	98
Şekil 5.6.6 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin osteokalsin (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.1 Vücut içinde kökenlerine, farklılaşma etkinliklerine veya farklılaşma yönlerine göre kök hücre örnekleri.....	5
Çizelge 4.6.1 Agaroz jel elektroforezi (RNA Elektroforezi).....	46
Çizelge 4.6.2 cDNA reaksiyonu	47
Çizelge 4.6.3 QRT-PCR koşulları	48
Çizelge 4.6.4 QRT-PCR programı	49
Çizelge 4.6.5 Agaroz jel elektroforezi.....	49
Çizelge 4.6.6 Deneylerde kullanılan primer çiftleri	50
Çizelge 4.6.7 Amplifikasyonun verimliliği (E) ve gen ifadesinin bağlı olarak ölçümünde kullanılan formüller	50
Çizelge 5.2.1 Eksplant ve mekanik izolasyon sonucu elde edilen İGK-MKH morfolojilerinin karşılaştırılması	57
Çizelge 5.2.2 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültürdeki P ₁ hücre morfolojisi	60
Çizelge 5.3.1 İGK bölgelerinden elde edilen hücrelerdeki hücre yüzey belirteçlerinin düzeyi oransal (%) olarak verilmiştir	60
Çizelge 5.3.2 İGK bölgelerinden elde edilen hücrelerin immünofenotipleri	61
Çizelge 5.5.1 Deneylerde kullanılan örneklerin RNA derişimleri	76
Çizelge 5.5.2 İfadesi QRT-PCR yöntemiyle incelenen genlerin amplifikasyon verimliliği(E)	81
Çizelge 5.5.3 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH ve GKA-H'lerinde ifade profilleri incelenen genlerin KI-MKH'lerine (1) oranla kıyaslanması.....	90

SİMGELER DİZİNİ

dk.	Dakika
M	Molar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
s	Saniye
sa.	Saat
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar

Kısaltmalar

AF	Alkalin fosfataz
bç	Baz çifti
BMP	Kemik morfogenetik proteini
BSP	Kemik sialoprotein
CFU-F	Fibroblast koloni oluşturma birimi
DMEM	Değiştirilmiş Eagle besi yeri
EkaH	Embriyo karsinoma hücresi
EKH	Emriyonik kök hücre
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FKH	Fetüs kök hücre

GKA	Göbek kordonu arteri
IBMX	3 izobutil metil ksantin
İCH	İlkel cinsiyet hücresi
İGK	İnsan göbek kordonu
İHK	İç hücre kitlesi
iPSCs	Uyarılmış pluripotent kök hücreler
İV	İntervasküler
Kİ	Kemik iliği
MHC (HLA)	Temel doku uyumluluğu kompleksi (insan lökosit antijeni)
MKH	Mezenkimal kök hücre
PE	Pariyetal endoderm
PV	Perivasküler
SA	Subamniyon
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
TF	Transkripsiyon faktörü
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
VE	Visseral endoderm
YKH	Yetişkin kök hücre
α -SMA	Alfa düz kas aktini

1. GİRİŞ

McElreavey ve ark.'larının (1) 1991'de insan göbek kordonundan (İGK) fibroblast benzeri hücreler izole ettiğini rapor etmesinden sonra günümüze kadar yapılan çalışmalar İGK stromasındaki hücrelerin karakterizasyonu ile ilgili pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar ışığında bu hücrelerin tedavi amacıyla kullanılabilir yeni bir multipotent kök hücre kaynağı olduğu belirtilir. İGK-MKH'leri fenotipik görünümü, plastik yüzeye yapışması ve multipotent özelliğiyle mezenkimal kök hücre (MKH) özelliği sergiler. Uygun uyarılma koşulları altında *in vitro* ortamda mezenkimal seri hücreleri olan adiposit, kondrosit, osteosit ve myosite olan farklılaşma yetisi bu hücrelerin hücresel tedavilerde kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Bazı araştırmalarda işlevsel sinir hücrelerine dek varan farklılaşma gerçekleştirilmiştir (2-6). Bunların yanı sıra germ hücrelerine benzer farklılaşma yetenekleri ortaya konmuştur (7). Bu hücre birçok özelliğiyle diğer MKH'lerden ayrılarak öne çıkar. Bunlardan ilki etik bir probleme neden olmadan bireylerden acısız, hızlıca alınabilir olmasıdır. İkincisi bu hücrelerin ksenotransplantasyonlarında bile (insandan fareye veya domuzdan sıçana) alıcıda immün yanıt oluşmaması ve doku reddi ile karşılaşılmasıdır (8-10). Üçüncü olarak İGK hücreleri ürettikleri birçok sitokin ve büyüme faktörüyle immün düzenleyici etki gösterirler (10). Bunların yanı sıra kemik iliği (Kİ) kaynaklı MKH'lere kıyasla yüksek fibroblast koloni oluşturma birimi (CFU-F) ve kısa kendini yenileme süresine sahiptir (11). Gen tedavisinde kullanılabilir özelliği olması (12, 13), embriyonik kök hücrelerin (EKH) aksine, tümör oluşturmamaları (14), kriyojenik olarak depolanıp, çözülüp, tedavi edici amaçlı çoğaltılabilir potansiyele sahip olmalarıyla önem taşımaktadırlar (15).

Bugün İGK intervasküler bölgesinin (İV) (Wharton peltesi), perivasküler bölgesinin (PV), subamniyon (SA), göbek kordonu arteri (GKA) alanının veya tüm kordonun işlenmesiyle MKH özelliği sergileyen hücreler elde edilebilir. İGK-MKH'lerini elde ederken birçok izolasyon yöntemi, kültür ortamı ve besiyeri kullanılmıştır. Bu izolasyon yöntemlerine ve *ex vivo* kültür koşullarına göre İGK-MKH'leri oldukça heterojen bir fenotip, kendini yenileme kapasitesi, immüno-fenotip ve farklılaşma özelliği sergiler, bu durum GK bölgeleri içine dağılmış farklı köklülük özelliği sergileyen hücre popülasyonlarının var olabileceğini

düşündürür. Bu çalışmada farklı GK bölgelerinden (İV, PV, SA, GKA) elde edilen İGK-MKH'lerinin kök hücre özelliklerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kök Hücreler ve Karakteristik Özellikleri

Kök hücreler uzun süreyle kendini yenileme, farklı hücelere farklılaşma yetkinliği (potensi), klon oluşturma yeteneği (klonalite) olan ve hasarlı dokuya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen hücreler olarak tanımlanmışlardır (16, 17). Farklı sınıflamalar olmakla birlikte kök hücreleri, embriyo kök hücreleri (EKH), fetüs kök hücreleri (FKH) ve yetişkin kök hücreleri (YKH) olarak sınıflandırabiliriz (18).

Zigotun birbirini izleyen beş altı kez bölünmesiyle blastokist oluşur, bu aşamadaki hücreler sırayla önce ara oluşumları, sonra da kalıcı olan bütün dokuları ve organları oluşturmak üzere giderek çoğalır (proliferasyon), kararlanır (commitment, determinasyon) ve farklılaşır (diferansiyasyon). İnsanda 5–6 günlük bir blastokistin iç hücre kütesinde (İHK) yer alan hücreler embriyo kök hücresi (EKH) olarak isimlendirilir, EKH'ler embriyoya ait bütün hücre tabakalarını ve buradan köken alacak doku ve organ sistemlerini oluşturma yetkinliğine sahiptir (totipotent) (18). EKH üzerindeki araştırmalar 1981 yılında fare blastokistindeki İHK'den veya epiblasttan elde edilen hücreler *in vitro* ortamda fare fibroblastları üzerinde çoğaltılarak EKH elde edilmiştir (19). Kültür ortamına alındıklarında bu hücrelerin farklılaşma yetilerinde bir azalma görülmez. Bu hücrelerin pluripotent olarak nitelendirilmeleri, tekrar blastokiste verildiklerinde *in vivo* olarak İHK yapısına katılıp tüm germ hücresi türlerine farklılaşabilmeleriyle ortaya konur (20). EKH, *in vitro* koşullarda germ hücreleri de dahil olmak üzere birçok somatik hücre türüne farklılaşabilen hücrelerdir.

Kök hücrelerin tanımlanması için hücredeki özgün yüzey işaretleyicileri ve moleküller kullanılır. Fare kaynaklı EKH'de en belirgin işaretler, SSEA-1, gp130, Oct4, alkalın fosfataz (AF) ve telomeraz enzimi etkinliğidir (21). Özellikle blastokiste oluşumu sırasında Oct4'ün ortaya çıkması ve İHK hücrelerine özgü hâle gelmesi, EKH'in pluripotensi özelliğini kazandığını gösterir. Oct4'ün pluripotensi düzeyinin yarı düzeyine yakın

düşmesi hücrelerin ilkel endoderm ve mezoderm, tamamen kaybolmasıysa trofoektoderm yönünde farklılaşmaya ve pluripotensinin kaybına neden olur. Diğer bir belirteç ise pluripotenside görev alan Nanog'dur. İmplantasyon öncesi embriyolarda Nanog ifadesi sadece epiblast hücrelerinde bulunur. Nanog'un ifade edilmesiyle hücreler kendini yenileme özelliği kazanır. O nedenle Nanog, Oct4'ün farklılaşmayı uyarma özelliğini sınırlandıran bir faktör olarak kabul edilir (18).

İnsan EKH'nin de uzun süre bozulmadan kalabilen sabit karyotipleri ve çoğalma yetenekleri vardır. İnsan EKH'leri proteoglikan yapısında bazı moleküller sentezler (TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM-2) ve farklı yüzey antijenleri ifade ederler (SSEA-3 ve SSEA-4) (22). İnsan EKH'nin sayılarını ikiye çıkarma hızı faredekilere oranla daha uzundur (30-35 sa.). İnsan EKH'nin farklılaşmadan kalmasını sağlamak için fare veya insandan elde edilen somatik (çoğunlukla fibroblast) hücreler üzerinde kültür etmek gerekir (23). İnsan EKH'nin kültürü ve kök hücre özelliklerinin korunmasında hücrelerarası matriks proteinlerin özel bir önemi vardır. İnsan EKH'nin pluripotensi ve kendini yenileme özelliklerini belirlemede FGF2 ve activin A rol oynar.

Gelişmekte olan organizmada embriyo kök hücrelerinin varlığından söz etmek mümkün değildir. Ancak, başta kemik iliği olmak üzere, çeşitli organlarda ve bu organların belirli doku bölgelerinde, gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen ve farklılaşabilen hücreler bulunur. Bunlara yetişkin kök hücreler (YKH) veya dokuya özgü kök hücreler adı verilmektedir. Derideki epidermisi yenileyen kök hücreler, bağırsak epitelini yenileyen kök hücreler veya kan hücrelerini yenileyen hematopoetik kök hücreler en tipik yetişkin kök hücre örnekleri arasında sayılır. Bu hücreler totipotent özelliğe sahip olmadıkları için daha sınırlı sayıda hücre türüne farklılaşırlar. Dolayısıyla, çoğalma ve farklılaşma yetenekleri ele alındığında, kök hücreler kendi aralarında da hiyerarşik bir sınıflandırma içinde değerlendirilirler (Çizelge 1.1.1.) (18, 24, 25). Hücrenin sadece bir hücre türüne farklılaşabilmesi, onun kök hücre olarak tanımlanmasına yetebilir (unipotent hücreler). Örneğin iskelet kası liflerinin hemen dışında yer alan uydu (satellite) hücreler vücut içi koşullarda sadece kas lifine farklılaşırlar. Öte yandan, bu hücrelerin unipotent hücreler olmaları kök hücre değil de öncü hücre (progenitör, prokürsör) oldukları anlamına gelir.

Kök hücrelerin bir bölümü ise özellikle son yıllardaki onarımsal tıptaki yerlerinin giderek artmasıyla birlikte embriyo dışı dokular olan plasenta, amniyon zarı ve göbek kordonundan elde edilen kök hücrelerdir. Bu hücelere fetüs kök hücreleri de denir. Çeşitli yönleriyle embriyo kök hücreleriyle yetişkin kaynaklı kök hücreler arasında çoğalma ve farklılaşma yeteneklerine sahiptir. Bu hücrelerin diğer bir ortak özelliği de fetüse zarar vermeden gebelik süresince veya doğum esnasında kolaylıkla ve etik problemlere yol açmadan elde edilebilir olmalarıdır. Bu hücrelerin yüzey işaretleyicileri açısından hem embriyo hem de yetişkin kök hücre özellikleri barındırdıkları ortaya konmuştur (26-28).

Çizelge 2.1.1 Vücut içinde kökenlerine, farklılaşma etkinliklerine veya farklılaşma yönlerine göre kök hücre örnekleri

İsim	Bulunduğu Yer/Evre	Farklılaşma Etkinliği	Farklılaşma Yönü
Blastomer	2-16 hücreli embriyo (2-3. günler) Morula evresindeki embriyo (4. gün)	Totipotent	İç hücre kütleli Trofoblastlar
İç hücre kütleli hücreleri	İç hücre kütleli (5-6. günler)	Pluripotent	Endoderm, mezoderm, ektoderm hücreleri
Epiblast hücreleri	Gastrula aşamasındaki epiblast tabakası (7-9. günler)	Pluripotent	Endoderm, mezoderm, ektoderm hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri, amniyoblastlar
İlkel cinsiyet hücreleri	Vitellus kesesi - Aorta-Gonad-Mezonefroz bölgesi	Pluripotent	Embriyo karsinoma hücreleri Embriyo germ hücreleri (endoderm, mezoderm, ektoderm hücreleri)
Hematopoetik kök hücreler	Kemik iliğinde 4. aydan itibaren	Multipotent	Tüm kan hücreleri
Mezenkimal kök hücreler	Embriyo gövdesinde 16. günden itibaren	Multipotent	Bulunduğu organa özgü hücreler
Yetişkin kök hücreleri	Fetüs ve yetişkin organizma	Oligopotent	Bulunduğu organa özgü hücreler
Trofoblast kök hücreleri	5. günden itibaren embriyoda; doğuma kadar plasentada	Bipotent	Sinsityo- ve sitotrofoblastlar

(Can, 2014'den alınmıştır)

Bir hücrenin kendini yenilemesi, kendisini onarmasından çok kök hücre havuzunu yenilemesi anlamına gelir. Bu nedenle kök hücre havuzunun sabit kalabilmesi için her bölünen kök hücrenin en az bir yedeğinin oluşturulması gerekir. Farklılaşma yeteneği fazla olan bir kök hücre bile bölündüğünde en fazla iki farklı yapıda hücre oluşturur; hücrelerden birisi kök hücrenin yedeği olarak kalırken diğeri farklılaşmaya doğru değişime uğrar, bu tür bölünmeye asimetrik hücre bölünmesi denir. Asimetrik hücre bölünmesi ya çevre asimetrisi ya da bölünme asimetrisi olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşir (29). Çevre asimetrisinde ortaya çıkan yavru hücrelerin kaderi çevre faktörleriyle belirlenir, bu durumda hücrelerin en az %50'si kök hücre olarak kalır. Bölünme asimetrisi daha seyrek görülen bir durumdur, ortaya çıkan hücrelerin fenotip ve moleküler yapıları birbirinden farklı olabilir, birisi daima kök hücre durumunda kalmayı sürdürürken diğeri yapısı gereği farklılaşma yoluna girer. Bu bölünme tipinde mevcut kök hücreler sayılarını hiçbir zaman artıramazlar. Her iki bölünme de hücrenin bulunduğu mikro çevre koşullarından (kök hücre nişi) etkilenir.

Kök hücrelerin bir kısmı kök hücre olarak kalmayı seçerken diğeri bir grup hücre bir dizi bölünme sürecine daha girer ve bunun sonucunda farklılaşmadan bölünen bir takım hücreler ortaya çıkar; bunlara çoğalan geçici hücreler (transit amplifying cells) denir. Sayıları belli olan bu hücreler, gerektiği durumlarda geometrik olarak çoğalarak geçici çoğalan hücreleri oluştururlar. Kök hücrenin ilk bölünmesi sonunda ortaya çıkan hücrelerden birisi tekrar kök hücre havuzuna dönerek eksilen kök hücre sayısını tamamlar. Öte yandan geçici çoğalan hücreler, belli bir sayıya ve anatomik bölgeye ulaştıklarında farklılaşmaya giderler ve böylece sonuna kadar farklılaşan (terminally-differentiated) hücrelere dönüşürler. Kök hücrenin her seferinde bölünmesi yerine geçici çoğalan hücrelerin bu gereksinimi karşılaması, özellikle mitoz bölünmeler sırasında ortaya çıkma olasılığı olan mutasyonu sadece geçici çoğalan hücrelerde sınırlamış olur ki; bu hücrelerin mutant olanları biz dizi mekanizmayla ortadan kaldırılabilir. Böylece kök hücrelerde mutasyon olasılığına izin verilmemiş olur. Vücutta kanserin engellenme mekanizmalarından birisinin de bu olduğu düşünülmektedir (18).

Kök hücrelerin farklılaşma yetkinliği incelendiğinde tek bir hücre türüne farklılaşabilen (unipotent) hücreleri veya öncü hücre (progenitör, prokürsör) olarak değerlendirilirken, bu hücreler kök hücrelerden köken almış olup çoğunlukla bir veya iki farklı hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip, sınırlı sayıda çoğalabilen hücrelerdir. Günümüzde, bir hücrenin farklılaşmasında rol oynayan en önemli faktörü epigenetik mekanizmalar oluşturur.

Farklılaşma, ileri ve geri farklılaşma yönlerinde olabilir. Bir hücrenin farklılaşma yolunda ileri giderken gerektiğinde farklılaşmaya başladığı noktaya kısmen veya tamamen geri dönmesi geriye farklılaşma (dediferansiyasyon) olarak adlandırılır. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (induced-Pluripotent Stem Cells; iPSCs), bu mekanizmanın gerçekleştiği en tipik örneklerden biridir. Farklı dokularda yer alan yetişkin kök hücrelerin hangi yönde ve ne derece farklılaşacağını buldukları niş ortamıyla belirlenir.

Klon oluşturma yeteneği (klonalite), kök hücrelerin bir diğer önemli özelliğidir. Tek bir hücreden çok sayıda yeni kök hücrenin üremesi olarak tanımlanan klonalite, klonun büyüklüğüne göre (içerdiği hücre sayısı) ve klon oluşturma hızına göre kök hücreler arasında yapılacak kıyaslamalarda kullanılan ölçütlerdir.

2.2. Hücrelerde Genel Gelişim Basamakları ve Belirteçleri

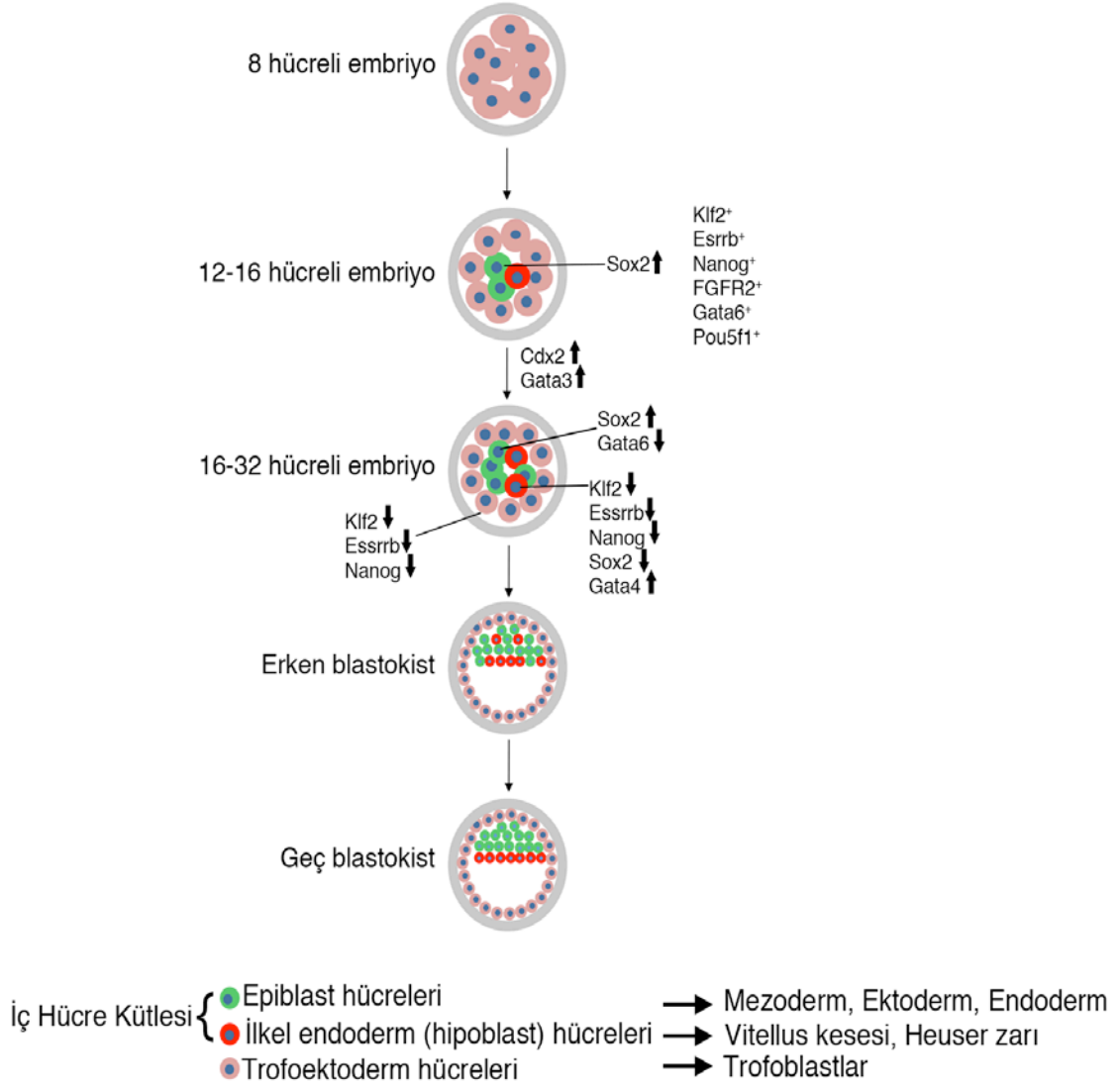
Zigottan başlayarak yetişkin kök hücrelerin oluşumuna kadar geçen süreçte, farklılaşan hücrelerin gelişiminin izlenmesi kök hücrelerin karakteristik özelliklerinin ve davranışlarının anlaşılmasında bizlere ışık tutmaktadır. İki haploid gametin (spermatozoon ve ovosit) bir araya gelişiyle meydana gelen hücre zigot adını alır ve yaşam döngüsünün başlangıcını oluşturur. Bu hücrenin mitozla bölünerek çoğalması sonucu ortaya çıkan her hücreye blastomer denir. Döllenmeden 3 gün sonra morula evresi görülür ve bu evreyi 32 hücreli aşamadan sonra blastokist evresi izler. Blastokist, dışarıda dış hücre kütlesi (trofoblast) ve içeride iç hücre kütlesi (İHK-embriyoblast) olmak üzere insanda yaklaşık

107-110 hücreden oluşur. Hücrelerin arasına uterus sıvısının sızmasıyla blastosöl denen bir sıvı kesesi oluşur. Embriyo, döllenmeyi izleyen birkaç gün içinde yataklanmadan önce iki kez hücre kararlanması geçirir. Birincisi, 16-32 hücreli (blastomerli) evrede bulunan hücrelerin transkripsiyon faktörü olan *cdx2*'nin etkisiyle simetrik bölünmeyle kardeş TE hücrelerini oluştururken bazısında da asimetric bölünmeyle yavru hücrelerden birisi TE, diğeri ise İHK'ni oluşturacak olan embriyoblastlara dönüşür. Hücrelerin bu uzaysal yerleşimleri, bundan sonraki farklılaşma yollarının da belirlenmesi anlamına gelir. İHK'ni oluşturacak olan hücreler, ikinci bir kararlanma evresine ulaşırlar. Bu önemli aşamada bir grup hücre, ikinci bir embriyo dışı hücre tabakası olan ilkel endodermi (hipoblast, embriyo dışı endoderm) meydana getirmek üzere İHK'nin diğeri hücrelerinden ayrılır ve blastokist boşluğuna bakacak şekilde tek sıra dizilir. Hipoblast hücrelerinin tanımlayıcı belirteçlerinden birisi, bir transkripsiyon faktörü olan *Sox17*'dir. Buna karşın, İHK'nin diğeri hücreleri ise ileride embriyo gövdesini meydana getirecek olan epiblast (ilkel ektoderm) tabakasını oluşturmak üzere farklılaşırlar (30-32).

Erken göç eden İHK hücrelerinde pluripotent belirteci olan transkripsiyon faktörü *Sox2* ortaya çıkar (33). Erken embriyo gelişiminde rol oynayan bir diğeri transkripsiyon faktörü *Oct4* önemli bir düzenleyicidir. *Oct4* morula evresine kadar tüm hücrelerde ifade edilir, 6. günde İHK hücrelerine özgü bir protein hâline gelir. Hücrelerin farklı hücre türlerine dönüşmek üzere kararlanmaya başlamasıyla *Oct4* ifadesinde düşüş başlar. Düşüşün ilk görüldüğü hücreler, trofoblastlardır. Bu evrede *Oct4* ifadesinin kaybolmadığı tek hücre türü, ilkel cinsiyet hücreleridir. Pluripotent olmayı uyaran bir diğeri transkripsiyon faktörü de *Nanog*'dur. *Nanog* da, İHK hücrelerinin kararlanmasında önemli rol oynar (34). *Nanog*, ilk olarak geç morula evresinde ortaya çıkarak, *Oct4* ile birlikte İHK'nin bütünlüğünü sağlar. *Nanog* işlev görmezse İHK hücreleri hipoblastlara farklılaşır (Şekil 2.2.1.).

2.2.1. Hipoblastın (ilkel endoderm) gelişimi

Kısa süreyle ortaya çıkan hipoblast tabakası, gastrülasyon öncesinde visseral endoderm (VE) ve pariyetal endoderm (PE) olarak farklılaşır. VE blastosöl ile komşu olup, bu hücreler blastosöldeki gıda maddelerini epiblastlara taşıma görevi üstlenirken bunun yanısıra üstündeki epiblast üzerine bir takım sinyaller göndererek epiblast farklılaşmasını da kontrol eder. PE ise, farklılaşarak blastosöl (bu evreden sonra koryon kesesi adını alır) içinde trofoektoderm hücrelerinin altında koryon kesesini çevreler. Bu yapı önce Heuser zarı denen ince tabakayı oluşturur; daha sonra tip IV kollajen ve laminin salgılayarak embriyo dışı retikulum denen gevşek dokuyu ortaya çıkarır (35). PE hücrelerinin farklılaşmasıyla embriyon dışı mezodermin ilk hücreleri oluşur, bunlara kısa süre sonra, ilkel çizgiden kaynaklanan hücreler eşlik eder. Embriyo dışı mezoderm, koryon zarı ve plasentanın bir bölümünün ve önce bağlayıcı sapı'ı, daha sonra bunun ileri gelişmesiyle göbek kordonu gibi önemli dokuları oluşturur (Şekil 2.2.2).



Şekil 2.2.1 Hücrelerde gelişim

Fare embriyonları üzerinde yapılan gözlemlere göre blastokist oluşmadan önce, embriyoda dışarıdan içeriye doğru 8–12 hücreli evreden başlayıp, 32–64 hücreli evreye kadar süren üç hücre göçü dalgası meydana gelir. İçeriye göç eden hücreler, iki farklı hücre türüne dönüşürler, ya ilkel endoderm (hipoblast) hücrelerine dönüşerek blastokist boşluğuna yakın yerleşirler, ya da iç hücre kütlelerinin intramural hücreleri olan epiblastları oluştururlar. İmplantasyondan hemen sonra epiblastlardan ektoderm, mezoderm ve endoderm ortaya çıkar. Tek hücreden yapılan RNA analizlerinde ve tek hücre izleme yöntemleriyle, farklılaşan trofoektoderm, epiblast ve ilkel endoderm hücrelerinin her birine özgü protein profillerinin oluştuğu gözlenir; bunlar hücreleri birbirinden ayırt etmede ve izlemede belirteç olarak kullanılırlar. (Can, 2014'den alınmıştır)

2.2.2. Epiblastın (ilkel ektoderm) gelişimi

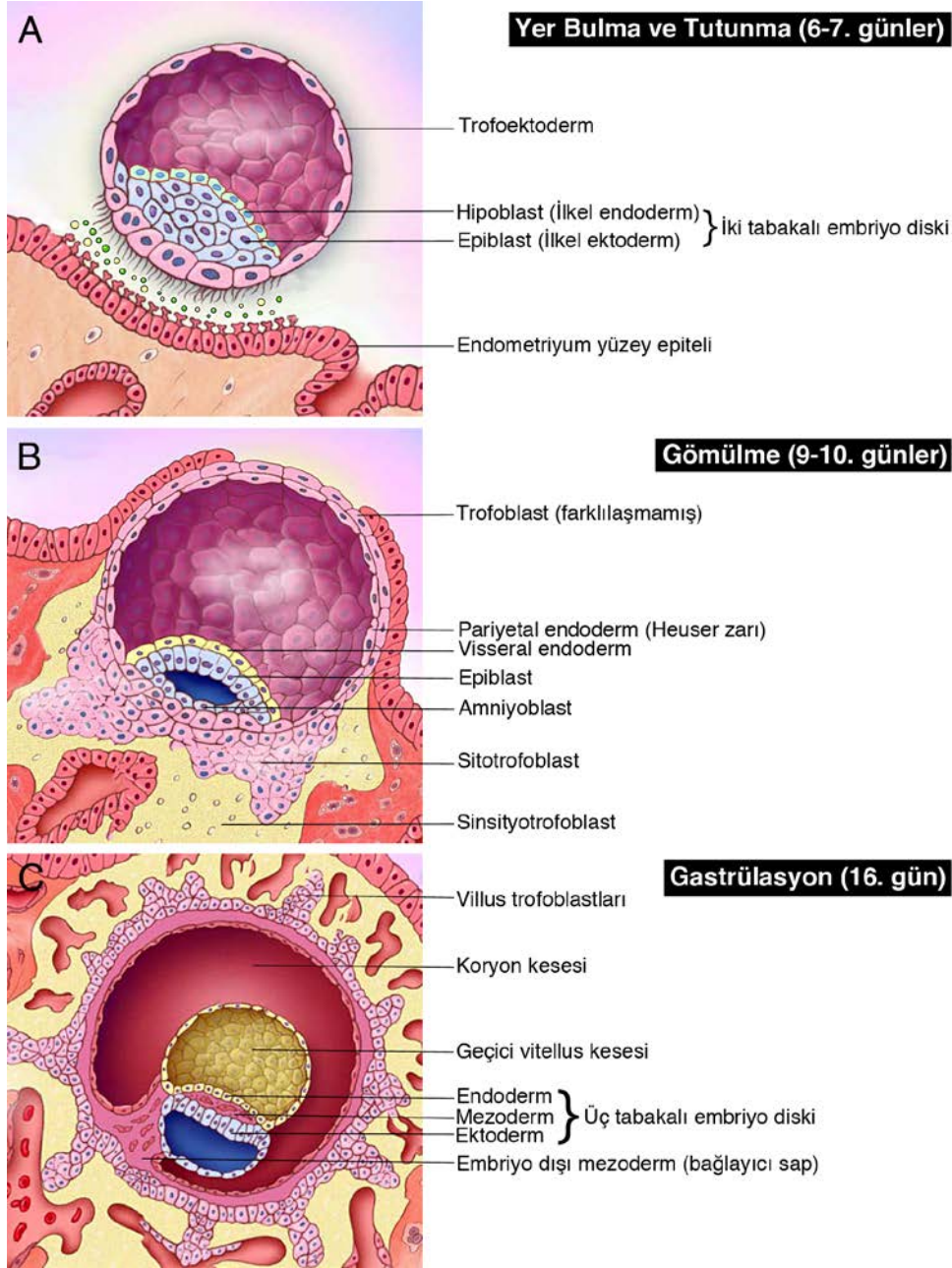
Epiblast tabakasındaki hücreler pluripotent olarak kabul edilir. İnsanda 15–16. günler arasında, epiblast tabakasını oluşturan hücreler, gastrülasyon adı verilen üç germ tabakasının oluştuğu döneme girer (36). Gastrülasyon, epiblast hücrelerinin mitoz bölünmelerle hızla çoğalarak jelatin benzeri gevşek bir ortam içinde kutuplaşmayan hücrelere dönüşmeleri (mezenkim) ve aşağıya doğru göç etmeleridir. Epiblastın yayılması için iki önemli hücrelerarası proteininin sentezlenmesi gerekir; bunlar hyarülonik asit ve fibronektin'dir. Her ikisi de epiblastlar tarafından salgılanarak göç eden mezenkim hücreleri için gevşek-sulu bir ortam oluşturulur. Bu hücrelerin bir bölümü mezodermi yapmak üzere göç ederken, diğerleri hipoblast hücrelerini ortadan kaldırarak endoderm tabakasını; üst tabakadaki hücreleri ortadan kaldırarak ektoderm tabakasını oluşturur. Böylece embriyo üç hücre tabakasından oluşan oval bir biçim alır. Epiblast hücrelerinin farklılaşmaya uzun eksene paralel, orta duruşlu ve kuyruğa yakın gelişen bir ilkel çizgi ve bunun içeri doğru çökmesiyle ortaya çıkan ilkel oluğun oluşumuyla başlar. İlkel oluktan başlayarak mezenkim hücreleri yanlara ve öne doğru yayılarak göç ederler. Büyümekte olan embriyo gövdesinde ortaya yakın bir noktada, ilkel düğüm (Hensen düğümü) adı verilen bir noktada son bulur. İlkel çizginin, fertilizasyondan sonra 18. güne kadar baş yönünde uzadığı görülür. Bundan sonra, giderek geriler ve kalıntıları dördüncü haftaya kadar sürer. Bu noktadan başlayarak, ektoderm ile endoderm tabakası arasında göç eden hücreler, yoğun bir kordon biçiminde gelişen notokord'u meydana getirir. Notokord, omurgalılarda (Chordata) ortaya çıkan bir yapı olup temel görevi, gövde eksenini belirlemektir. Notokord, embriyo ve fetüs dönemi boyunca, komşusu olan nöral plâka ile birlikte kafatası, vertebra kolonu, beyin zarları ve omuriliğin gelişimine katılır.

Epiblast hücreleri, gastrülasyonla eş zamanlı olarak amniyoblast olarak farklılaşarak amniyon kesesi ve amniyon sıvısına kaynaklık eder. Buna ilaveten erkek ve kadında gametlerin öncüsü olan ilkel cinsiyet hücreleri (İCH) ne de farklılaşırlar (Şekil 2.2.2B).

2.2.3. Ektodermin gelişimi

Üçüncü haftanın başında embriyo, ektoderm tabakası üstte olacak şekilde ovalimsi bir disk şeklini andırır, ancak baş bölümü kuyruk bölümüne oranla daha geniştir. Notokordun ve prekord plâkasının ortaya çıkışı, üstündeki ektodermin kalınlaşmasını ve nöral plâkanın oluşmasını uyarır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF)'nün artışıyla birlikte TGF β ailesi üyesi olan BMP4'ün baskılanması, ektoderm ve mezodermin içeriye doğru göçünü başlatır ve nöral plâkanın oluşumu için bir başlatıcı (indüktör) görevi yapar (37). Nöral plâkanın hücreleri nöroektodermi, bu tabakanın da ileri doğru gelişmesi de nörolasyonu meydana getirir (38). İlkel nöral kök hücre belirteci olan Nestin nöron öncüsü hücrelerde bulunmasının yanı sıra deride kıl folikülündeki dış kök kılıfında, nöron olmayan post-mitotik hücrelerde de bulunur

Ektodermin gelişimiyle, merkez sinir sistemi, çevre sinir sistemi, göz, kulak ve burnun duyu epiteli, saç ve tırnaklarla beraber tüm epidermis ve dermisin bir bölümü, deri altı ter ve yağ bezleri, meme bezleri, hipofiz, epifiz, dişin mine tabakası, sürrenal bezin medullası, bir takım bezlerin stroması (mezoderm ile birlikte) ektodermden köken alan yapılardır.



Şekil 2.2.2 Hücrelerde gelişim

İmplantasyon aşamasına gelen insan embriyonu, 5,5-6. günlere eriştiğinde (A), yer bulma ve tutunma işlemiyle endometriyum yüzey epiteline yapışır. Embriyo, 9-10. günlere eriştiğinde (B) gömülme üzeredir. Bu aşamada epiblast ve hipoblast, üst üste yerleşmiş iki hücre tabakası olarak iyice belirginleşmiştir. Hemen sonrasında epiblasttan ayrılan bir grup hücre amniyoblast olarak farklılaşarak ilkel amniyon kesesini oluşturur. Gelişimin 16. gününe gelindiğinde (C) epiblast tabakasındaki hücrelerin farklılaşmasıyla önce mezoderm, hemen sonrasında endoderm ve ektoderm ortaya çıkar (gastrülasyon) (Can, 2014'den alınmıştır)

2.2.4. Mezodermin gelişimi

Yaklaşık on yedinci günde, orta hatta yakın duran hücreler çoğalarak paraksiyel mezoderm adı verilen bölgeyi oluşturur. Bu bölge somitomer adı verilen bölümlere ayrılarak başın mezenkim dokusunu ve gövdenin çeşitli yapılarını oluşturur. somitlerin ventral ve mediyal duvarlarında yer alan hücreler, notokorda doğru yönelirler. Bu hücreler topluluğuna sklerotom, oluşturdukları dokuya da mezenkim denir (39). Bu hücrelerden bazıları tendonları oluştururken, bir bölümü de omuriliğin ve notokordun etrafında yer alarak vertebra sütununu oluşturur. Sklerotom hücreleri Pax1'i salgılar, bu da omurganın oluşması için gerekli olan kıkırdak ve kemik yapımından sorumlu genleri uyarır. Somitlerin dorsolateral bölgelerinde yer alan hücrelerse ileride ekstremiteleri ve vücudun kas hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşırlar. Kas hücrelerine farklılaşacak olanlar, somitin dorsolateral bölgesindeki miyotom denen kümeyi ve onun üzerinde dermis hücrelerine farklılaşacak olanlar ise dermatom denen kümeyi meydana getirirler.

Simetrik olarak notokordun her iki tarafında yer alan bu dokunun dış ve yan bölgelerinde ise lateral mezoderm ortaya çıkar. Kısa süre sonra lateral mezoderm içinde küçük boşlukların belirmesiyle birlikte doku, üst ve alt olmak üzere iki yaprağa ayrılır, üstteki yaprak somatik veya pariyetal mezoderm, alttaki yaprak ise splanik veya visseral mezoderm olarak gelişir. Her iki yaprak birlikte embriyon gövdesine yakın yerleşimli bir boşluğu çevrelemeye başlar. Bu embriyo içi gövde boşluğudur. pariyetal yaprak altındaki ektodermle birlikte, ince doku tabakaları hâlinde mezotelyumu veya seröz zarları oluşturur. Bunlar da periton, plevra ve perikard boşluklarını çevreleyen ve seröz sıvı salgılayan hücrelerden oluşur. Visseral yaprak ise altındaki endodermle birlikte bağırsak duvarını oluşturur. Visseral yaprağın mezoderm hücreleri ise her organı saran seröz zarları meydana getirir. Son olarak, pariyetal mezoderm ile lateral mezoderm arasında bir ara mezoderm parçası belirir ve ürogenital yapılara farklılaşır (40).

Kan hücreleri ve kan damarları eşzamanlı gelişen oluşumlardır. İlk kan adacıkları üçüncü haftada vitellüs kesesi duvarını döşeyen mezoderm içinde görülür. Bu adacıklar mezoderm

hücrelerinin hemanjiyoblast'lara dönüştükleri bölgelerdir. Hemanjiyoblastlar damarların ve kan hücrelerinin ortak öncüsü kabul edilirler. Kalıcı hematopoetik kök hücreler ilkel aortanın çevresini saran ve Aort-Genital çıkıntı-Mezonefroz (AGM) bölgesi olarak adlandırılan mezoderm tabakasından gelişirler. Buradaki hücreler fetüsteki en büyük hematopoetik organ olan karaciğere kaynaklık ederler. Daha sonra karaciğerdeki kök hücreler kalıcı kan yapıcı doku olan kemik iliğine kaynaklık eder.

2.2.5. Endodermin gelişimi

Endoderm tabakasından gelişen temel yapı, gastrointestinal sistemdir. Bu tabaka, embriyonun ventral yüzünü döşer ve vitellüs kesesinin de tavanını oluşturur. Beyin keseciklerinin gelişmesi ve büyümesiyle birlikte amniyon boşluğunun oluşması, embriyonun baş-kuyruk ekseninde büyümesini sağlar. Bu uzamaya paralel olarak eş zamanlı olarak embriyonun içe bakan yüzünde de bir büyüme gerçekleşir. Bu büyüme başa yakın bölümde ön bağırsak, kuyruğa yakın bölümde arka bağırsak, ikisinin arasında ise orta bağırsak bölümlerini oluşturur. Orta bağırsak bölümü geçici olarak vitellüs kanalı (ductus vitellinus) yoluyla vitellüs kesesine bağlıdır.

Endoderm tabakası, gelişmekte olan sindirim sisteminde iç yüzeyi döşeyen epitel olarak farklılaşır. Endoderm farklılaşmasının ilk belirteçlerinden biride GATA4 molekülüdür. Gelişme ilerledikçe solunum sisteminin epiteli, tirod, paratiroid, karaciğer ve pankreasın parankimi, tonsilla ve timusun retiküler stroması, mesane ve üretranın epiteli, timpan boşluğu ve östaki borusunu döşeyen epitel meydana gelir.

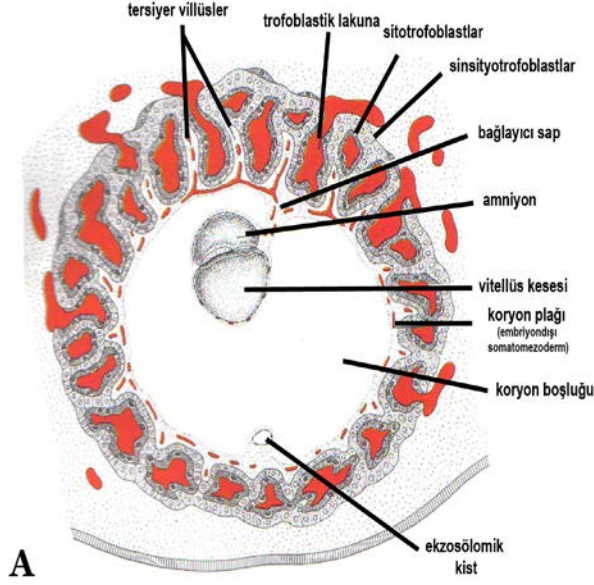
2.3. İnsan Göbek Kordonu Gelişimi

Döllenmeden sonraki epiblast ve hipoblast oluşumundan sonra gebeliğin üçüncü haftasıyla birlikte gastrulasyon, üç germ tabakasının oluşumuyla embriyonun sırtında bulunan

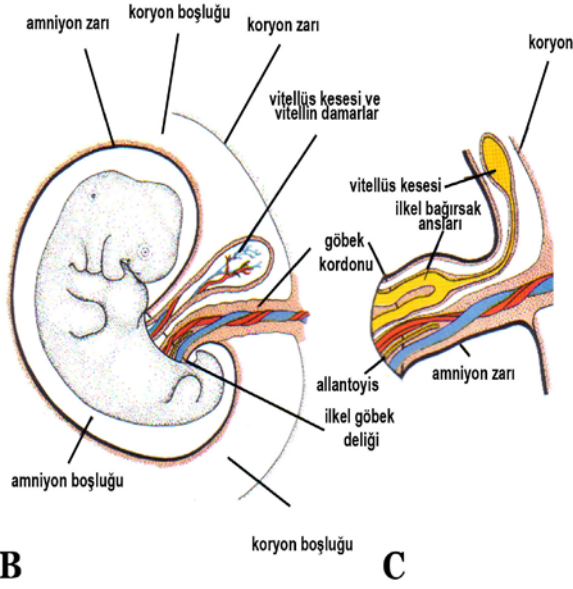
hücrelerin ilkel çizgiyi oluşturmak üzere bir araya gelir. Gastrulasyonun en belirgin özelliklerinden biri mezoderm oluşumudur.

Embriyonun 12-13. gününde ilkel çizgiden göç eden bazı hücreler embriyon dışı mezodermi oluştururlar. Embriyon dışı mezodermin büyük bir kısmı, embriyonu embriyon dışı dokulara bağlayan bağlayıcı sapı oluşturur (Şekil 2.3.1A.). Embriyon kaudal kısmından bağlayıcı sap ile trofoblastik dokulara bağlanır. Embriyon büyüdükçe ve dolaşım sistemi gelişmeye başladıkça embriyonun kan damarları bağlayıcı saptan geçerek plasentaya ulaşır ve bu dönemde bağlayıcı sap göbek kordonu adını alır (Şekil 2.3.1B.).

Gelişim sırasında amniyotik kavite hızla genişler ve amniyon, bağlayıcı sap ve vitellüs kesesi sapını sararak ilkel göbek kordonunu oluşturur. Distalde kordon, vitellüs kesesi sapını ve umbilikal damarları içerir. Proksimalde ise bağırsak anslarını ve allontois artıklarını içerir. Vitellüs kesesi koryon boşluğunda bulunur ve göbek kordonuna sapı ile bağlıdır. Üçüncü ayın sonunda amniyon koryonla temas edecek kadar genişler ve koryon boşluğunu doldurur. Vitellüs kesesi ise bu sırada büzülür ve giderek oblitere olur. Karın boşluğu hızla gelişen bağırsak ansları için oldukça dardır. Bu nedenle bazı bağırsak ansları göbek kordonundaki embriyon dışı boşluğa itilir (Şekil 2.3.1C.). Bu dönemde fizyolojik umbilikal herni gözlenir. Üçüncü ayın sonunda anslar embriyon gövdesine alınır ve kordondaki boşluk silinir. Allontois ve vitellüs sapı da oblitere olduktan sonra doğumda göbek kordonunda sadece umbilikal damarlar ve Wharton peltesi kalır (41).



A



B

C

Şekil 2.3.1 Embriyon dışı dokuların erken ve geç dönemde gelişimi.

On ikinci günde embriyon koryon boşluğunda bağlayıcı sap ile asılı halde durmaktadır (A). Beşinci haftanın sonunda ilkel göbek deliğinden göbek kordonu, vitellüs kesesi ve vitellin damarlar geçmektedir (B). Onuncu haftada barsak ansları göbek kordonundaki embriyon dışı boşluğa itilir (C) (Sadler TW. Langman's Medical Embryology'den alınmıştır).

İGK yaklaşık 40 gram ağırlığında, 50–60 cm uzunluğunda 1–2 cm kalınlığında olan bir dokudur. Hamilelik süresince anne ve fetus arasında vasküler bağlantıyı sağlar ve fetüsten biyolojik atıkların toplanmasını ve kan akışını sağlayan kan damarlarını dış etkilere korur.

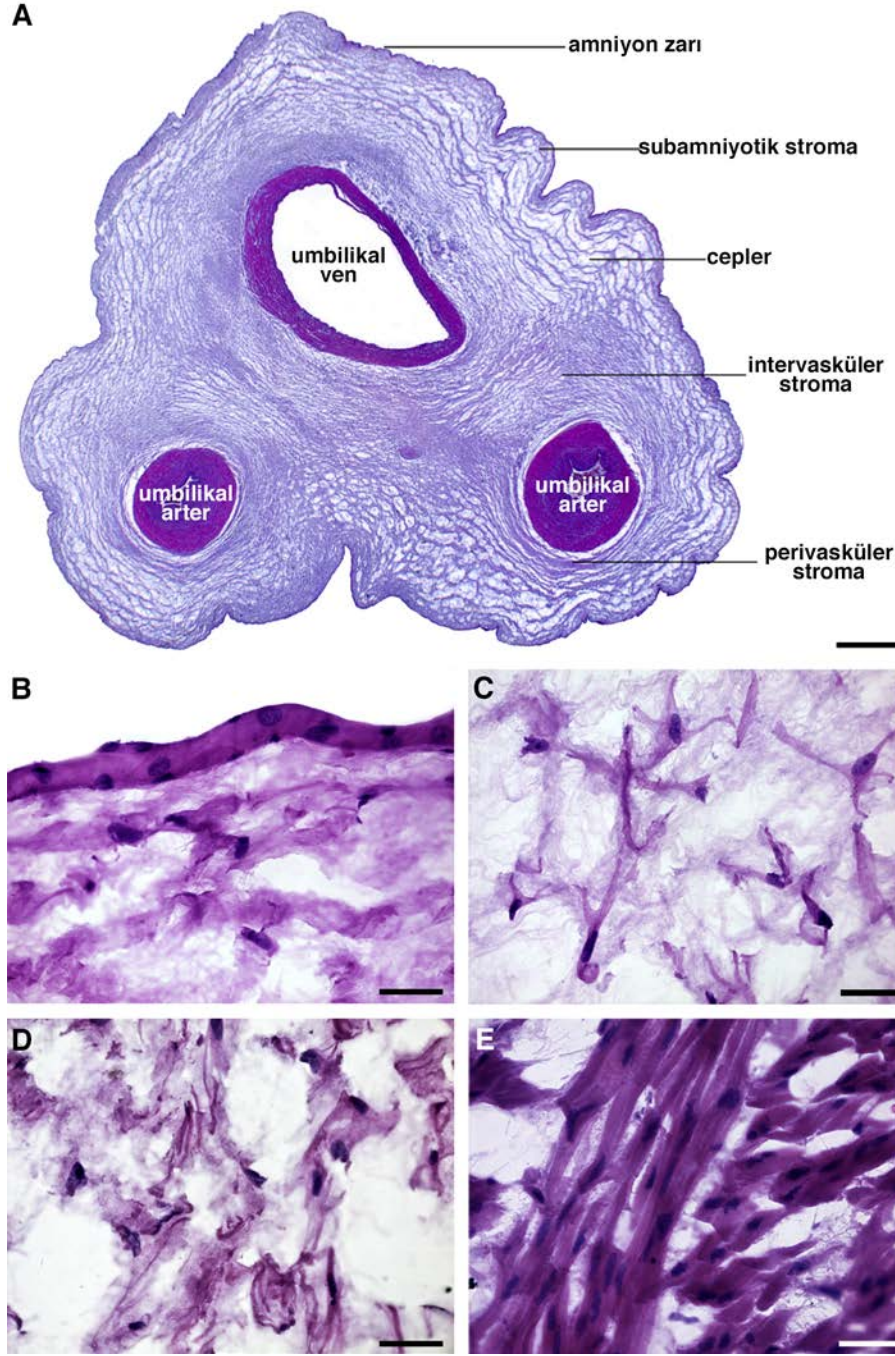
Göbek kordonunun stroması, Wharton peltesi (jölisi) adı verilen embriyona özgü müköz bağ dokusu ile çevrelenmiş iki arter ve bir ven içerir (Şekil 2.3.2A). Kordonun etrafı amniyon zarından köken alan epitel ile kaplıdır (Şekil 2.3.2B). Umbilikal arterler iç ve dış elastik laminadan yoksundur ve adventisyanın yerini müköz bağ dokusu almıştır. Umbilikal damar değişik yönelimli düz kas lifleri içeren kalın bir muskularis tabakası ile karakterize edilir (Şekil 2.3.2E). Tüm damarlar sola doğru sarmal dönüşler yaparak organize olmuştur. Kapiler ve lenfatik yapılar mevcut değildir.

Wharton peltesi basınçtan koruyucu etkisiyle doku bütünlüğünün devamını sağlayan hiyalüronik asitten zengin immatür kollajen lifleri çevreleyen bağ dokusu matriksi ve miyofibroblastlardan oluşur (42). Damarsız olan stroma dokusu anatomik olarak homojen gibi gözükse de, özellikle son yıllarda bu doku içindeki farklı bölgelerden alınan hücrelerin farklı çoğalma ve farklılaşma özelliklerinin belirlenmiş olması, stromayı en azından üç ayrı başlık altında irdelemeyi gerektirir (43). Buna göre bir bazal membran üzerine oturan ve tek katlı yassı-kübik epitel olma özelliğine sahip olan amniyon zarının altında kalan stromaya subamniyotik stroma adı verilir (Şekil 2.3.2B). Stromanın bu bölümünde az sayıda stroma hücresi, dağınık ve ince kollajen lif demetleriyle (tip I, III ve VI kollajen) birlikte son derece bol hücrelerarası sıvı içeren bir ortamda bulunurlar. Buradaki stroma hücrelerinin diğer alanlardaki hücrelere oranla daha az farklılaşmış olduğu ve çoğalma yeteneğinin de o denli yüksek olduğu belirlenmiştir (44). Subamniyotik stromanın hemen altında içi sıvı dolu cepler (yarıklar) yer alır. Bunlar kordonun gerilme ve sıkışmalarında arter ve venlere yastıkçık görevi yaparlar.

Stromanın ikinci ve en çok alan kaplayan bölgesi intervasküler stroma olarak adlandırılmış olan (15) ve eskiden beri Wharton peltesi olarak bilinen bölümüdür (Şekil 2.3.2C.). Burada

yer alan stroma hücreleri, doku içinde uzun uzantılara olan, miyofibroblast özelliklerine sahip hücrelerdir. Miyofibroblast olarak ifade edilmelerinin nedeni ise sitoplazmada aktin, miyozin, vimentin ve desmin gibi filamanların gösterilmiş olmasıdır (45). Hücreler arasında özellikle tip I ve tip III kollajen yapısında lifler kalın demetler yapar. Wharton peltesini, çeşitli kuvvetlere ve kollajeni eriten enzimlere dirençli hale getiren yapı tip III kollajendir. Buna karşın stromada sanıldığı gibi tersine elastin bulunmaz. Hücreler arası maddenin temel elemanı olan glikozamino glikan (GAG) moleküllerinin yoğunluğu, bu dokuyu vücuttaki en yüksek GAG içeren organlardan birisi yapar, öyle ki, göbek kordonu stromasındaki GAG'ın %70 ini hyalüronik asit (HA) oluşturur ve bu sayede göbek kordonu, insanda en yüksek HA içeren doku olma özelliği kazanır. Göbek kordonu anomalilerin önemli bir bölümü hücreler arası matriks bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Stromada az sayıda saptanan mast hücrelerinin belli oranda GAG kaynağı olduğu bilinmekle birlikte, kuşkusuz, matriks proteinlerin esas kaynağı stroma hücreleridir. Bu durum, özellikle *in vitro* ortamda farklılaştırma çabası içinde olan deneylerde göz önüne alınmalı, kıkırdak ve kemik gibi yoğun hücreler arası madde sentezi gerektiren kültür koşullarında kültür ortamına salınması gereken hücreler arası lif proteinleri ve GAG'lar ölçülerek farklılaştırma ortamının başarısı değerlendirilmelidir.

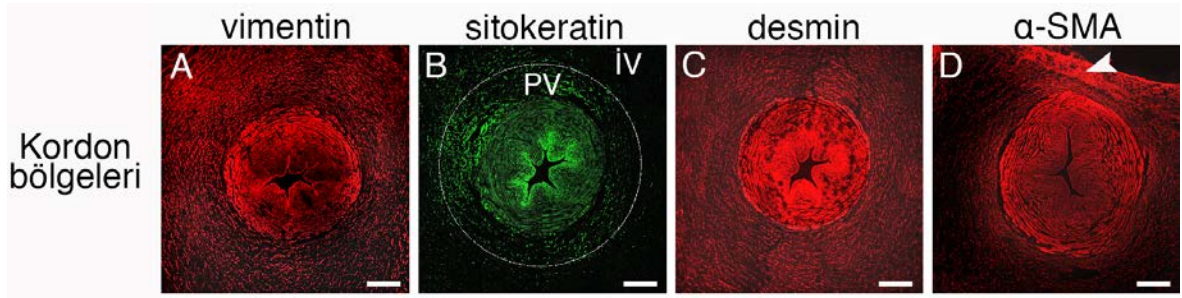
Stromanın üçüncü tabakası, damarların etrafındaki dar stroma alanındaki hücreler ve hücreler arası madde olan perivasküler stroma'dır (Şekil 2.3.2D). Bu bölgeyi intervasküler stromadan ayıran bazı özellikler nedeniyle ayrı bir doku bölgesi olarak isimlendirmek gerekmiştir. Buradaki stroma hücreleri daha sıkışık bir alanda daha dar ve küçük sitoplazma bölümlerine sahiptir. Perivasküler stroma hücrelerinin kemik hücrelerine dönüşme yetisi diğerlerine göre daha yüksektir (46).



Şekil 2.3.2 İnsan Göbek Kordonu Histolojisi

İnsanda göbek kordonu içinden seyreden iki umbilikal arter ve bir umbilikal ven, oldukça gevşek bir bağ dokusu içinde (Wharton jölesi, intervasküler stroma) yer alır (A). Dışarıdan göbek kordonunu saran tek-iki katlı kübik epitel yapısındaki amniyon zarı, hemen altında subamniyotik stroma ile devam eder (B). Kordon stromasının büyük bölümü intervasküler stromadan oluşur ve buradaki hücreler (C) kordon stromasının temel hücrelerini oluşturur Arter ve venin çevresini saran stroma, perivasküler stroma olarak adlandırılır ve farklı özellikte kök hücreler barındırır (D). Arter duvarındaki hücreler ise E mikrografında izlenmektedir. Ölçüm çubukları: 200 µm. (A); 30 µm. (B-E). (Can, 2014'den alınmıştır)

Bu hücrelerin gebelik süresince belirli farklılaşma aşamalarından geçtiği gösterilmiştir. İlk trimesterde α -SMA filamanı izlenmezken ikinci ve üçüncü trimesterlerde α -SMA'nın varlığı ortaya konmuş ve bu da Wharton peltasindeki hücrelerde postnatal farklılaşmaların olabileceği konusunu gündeme getirmiştir (47). Temporal farklılığın yanı sıra hücre dışı matriks elemanları ve hücre iskeleti filamanlarının ekspresyonunun göbek kordonunda bulunan subamniyotik, intervasküler ve perivasküler hücrelerde bölgesel farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Termde göbek kordonunda perivasküler ve intervasküler hücreler vimentin, desmin, α -SMA, γ -düz aktini, düz kas miyozini eksprese eden iyi farklılaşmış hücrelerken subamniyotik bölgedeki hücrelerin genellikle düz kas miyozini ve γ -düz aktini eksprese etmeyen daha az farklılaşmış hücreler olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.3.3.) (44). İGK dokusundaki hücrelerin vimentin ve desmin açısından varlığı ve yerleşimi incelendiğinde hem perivasküler hem de intervasküler alanda ifade bulur. Endodermal ve ektodermal epitel hücrelerinde ifade olduğu bilinen (48) bir diğer ara filaman olan sitokeratin stroma hücrelerinde pozitifdir (28, 44, 49). İGK dokusundaki hücreler sitokeratin ve α -SMA açısından değerlendirildiğindeyse perivasküler alanda dominant olarak izlenirken ayrıca α -SMA subamniyotik bölgede de ifade bulur (28). Bu farklılık hücrelerin ince yapılarında da gösterilmiştir. Daha az farklılaşmış hücrelerde belirgin GER, sitoplazmik filamanlar ve devamlılığı olmayan bazal lamina izlenirken iyi farklılaşmış hücrelerde düz kas hücrelerine benzer şekilde artmış sitoplazmik filamanlar, kaveola ve kesintisiz bazal lamina bulunduğu belirtilmiştir (50).



Şekil 2.3.3 İnsan göbek kordonunu dokusu hücrelerindeki hücre iskeleti proteinlerinin dağılımı

(A): Vimentin tüm kordon stromasında gözlenir (B): Pansitokeratin PV de İV ye göre daha fazla gözlenir. (C): Desmin varlığı vimentine benzer, tüm kordon stroması boyunca gözlenir. (D): α -SMA PV ve subamniyotik bölgede gözlenir (Beyaz ok). (Karahüseyinoğlu, 2007'den alınmıştır)

2.4. İnsan Göbek Kordonunun Barındırdığı Hücreler

Günümüzde insan göbek kordonunun belirli bölgelerinden mezenkimal kök hücreler elde edilebilir. MKH'ler özellikle göbek kordon kanı, göbek kordon veni subendoteli ve wharton peltasinden izole edilebilir. Wharton peltasindeki MKH'ler birbirinden kesin sınırlarla ayrılmamış farklı alanlardan elde edilebilir. Bunlar; amniyon epiteli, arter duvarı çevresindeki perivasküler alan, subamniyon ve bu iki bölge arasında kalan intervasküler alandan oluşur. Bu farklı alanlardan elde edilecek olan MKH popülasyonlarının birbirinden farklı olup olmadığı henüz bilinmemektedir (28). Göbek kordonundaki damarlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan dokudan elde edilen MKH'ler İGK-MKH'leri olarak adlandırılır. Bu hücrelerin MKH'lere özgü yüzey belirteçlerini ifade ediyor olmaları onların MKH ailesinin bir üyesi olduğunun göstergesidir (51).

Birçok araştırma grubu MKH miktarını arttırmak için tüm kordon dokusunu kullanırken bazı gruplarda belirli bir bölgesini kullanmaktadır. Gruplar arasında kullanılan izolasyon yöntemleri ve kültür koşulları farklılık göstermektedir. Kültür besiyerinin içerisine bazı gruplar VEGF, EGF, bFGF gibi büyüme faktörleri eklerken bazı gruplarda büyüme faktörü kullanmamaktadır. Bunun yanı sıra izolasyon yöntemi olarak enzimatik ve eksplant yönteminin kullanılması elde edilen hücre fenotipleri arasında farklılık yaratmaktadır (52).

Damarları çıkarılan tüm kordon dokusundan elde edilen İGK-MKH hücreleri *in vitro* ortama alındıklarında iki farklı morfolojide gözlenir: fusiform yapıda, fusiform çekirdekli, kollajen sentezleyen hücreler (tip-2) ve daha köşeli sitoplazmalı, yuvarlak, girintili-çıkıntılı çekirdekli ve belirgin çekirdekçikli hücreler (tip-1) olmak üzere (28). Bu hücrelerin telomeraz etkinlikleri yüksektir ve bölünme sayıları 20-80 arasındadır. Ayrıca bu hücreler kök hücre özelliklerini en az 9-10 pasaj sürdürebilme yeteneğindedir. İGK-MKH'leri *in situ* miyofibroblastlara benzer özellik gösterirler (53). Hücre içi glikojen ve yağ damlacıkları, prokollajen salgı granülleri, iyi gelişmiş endoplazma retikulumları, çok sayıda mitokondriyon ve golgi kompleksine sahiptirler (44, 47, 54). Hücre yüzeyi kısmen heparan sülfatlı proteoglikanlardan oluşmuştur (44). Miyojenik hücrelere benzer şekilde,

10 nm kalınlığında çok sayıda hücre içi filamanları vardır. Hücre sitoplazmasındaki bu filamanların immün flüoresan boyamalarla desmin ve α -SMA gibi miyojenik hücrelere özgü filamanlar olduğunun görülmesi, bu hücrelerin hem düz kas hem de fibroblast özelliklerini taşıdığına işarettir (28, 55). Düz kas ve fibroblast ince yapısını birlikte gösteren hücreler miyofibroblast olarak tanımlanmışlardır (44, 47, 56). Kontraktil proteinler olan aktin, desmin ve α -düz kas aktini miyofibroblastlara özgüdür (57). Bu proteinlerin stroma hücrelerince de ifade edildiği gösterilmiştir (28, 45, 47). Bu hücrelerin lif sentezinde ve organize olmuş hücrelerin haberleşmesinde ve kasılmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Mezenşim kökenli hücrelerde ifade olduğu bilinen (48) ve bir ara filaman proteini olan vimentinin bu hücrelerdeki varlığı (28, 44, 47, 49) bu görüşü destekler. İGK-MKH'lerinin %50 si sitokeratin (SK) 8, 18, 19 açısından pozitifdir.

Mezenkimal kök hücreleri karakterize etmek için çeşitli belirteçler kullanılmaktadır. İGK elde edilen MKH'ler birçok CD proteini ifade eder. İGK-MK hücrelerinin CD105, CD73, CD90 gibi MKH'lere özgü belirteçleri ifade ettiği gösterilmiştir (58). Bunun yanında MKH de olmadığı bilinen fetal fibrosit belirteçleri insan lökosit antijeni (HLA)-DR, CD163, CXCR4, makrofaj ve monosit belirteci olan CD14, ITGAM (CD11b), ITGB2 (CD18), CSF1R (CD115) bakımından negatiftirler (58). Bu sonuçlar fetal dönemde sirkülasyonda olan fibrosit ve makrofajların göbek kordonuna göç etmiş olabileceği hipotezini ortadan kaldırır. Ayrıca kordon kanı ve ven endotel hücrelerinde pozitivitesi bilinen VWF, CDH5, ICAM2, PECAM1 (CD31), KDR, FLT1, CD33, hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45 ve CD34 belirteçlerini ifade etmezler (59).

Embriyonik kök hücre belirteci olan Oct4 (A ve B) ün her iki formunu düşük düzeyde de olsa ifade ederken (60, 61), Nanog (62) gibi bazı transkripsiyon faktörlerini ve SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 ve Tra-1-81 gibi pluripotent kök hücrelere özgü belirteçleri m-RNA ve protein seviyesinde ifade ederek 9. pasaja kadar bu ifadeyi sürdürdükleri belirtilir (63). Ancak multipotent özellikleri için, az miktardaki Oct4 düzeyi yeterli olabilir. Fakat pluripotent kök hücre belirteçlerinden olan Oct4 (B), Sox2, Nanog ve Lin28 ifade etmedikleri ya da çok düşük seviyede ettikleri bir diğer çalışmada gösterilmiştir (64). İGK-MKH'leri immün defekti olan fareye verildiğinde teratom oluşturmazlar (65) bunun yanı

sıra immün olarak baskılanmamış sıçan beynine enjekte edildiğinde tümör oluşturmazlar (66). Bu hücrelerin sahip oldukları bu özellik belki de pluripotent belirteçleri az ya da hiç ifade etmemesinden kaynaklanabilir (67).

Bu hücre popülasyonu üzerinde yapılan geniş çalışmalar immün sistem, nöroektodermal ve endodermal farklılaşma yönünde MKH'lerin immün tanımayla ilişkili tümör bağlantılı çeşitli belirteçleri ifade ettiğini gösterir (61). İGK-MKH'lerinin karsino-embriyonik antijen (CEA) ve Ras onkogeninin embriyonik formu olan Eras ifade etmemeleri bu hücrelerin hücrel tedavide tümörojenik bir risk oluşturmadan kullanılabilmesinin bir ifadesidir (14). İGK-MKH'lerinin immün toleransta önemli olan HLA-G ifade ederken ve CD86 açısından negatiftirler. HLA Class I pozitifken HLA Class II negatiftirler. Bunların yanı sıra vimentin, α -SMA ve prolyl-4-hydroxylase gibi mezenkimal belirteçler yönünden pozitifken, nöroektodermal ve endodermal farklılaşma belirteçlerini ifade eder. Bu hücrelerin sahip olduğu özellikler onların bu yollara doğru farklılaşabileceğinin bir göstergesidir.

Mezoderm kaynaklı bir doku olması nedeniyle, göbek kordonu stroması hücrelerinin de diğer mezoderm hücreleriyle ortak özelliği olabileceği düşüncesiyle bu hücrelerin farklılaşmasında ilk denenen seriler, doğal olarak mezenkimal hücre serileri olan osteoblastlar, kondroblastlar ve adipositler olmuştur (6, 28, 68).

İGK-MKH'lerinde belirlenen diğer belirteçlere bakacak olduğumuzda hücre adezyonu ve migrasyonu ile ilgili olduğu görülür. İntegrinlerle kompleks yapan hücre yüzey glikoproteini CD9, CD49b, integrin α altbirimi ve CD62 olarak bilinen E-selektin. Bunların yanında çalışma gruplarındaki farklı sonuçlar ışığında CD117 ve CD106 pozitivitesi olabileceği söylenebilir. İGK-MKH'lerinin immünomodülatör özellikleri diğer MKH kaynaklarına göre öne çıkar IL-6, IL-8, IL12, SCF, Flt-3 gibi sitokinleri ifade eder. Hücre migrasyonunu teşvik eden ve birçok tümör hücresinde bulunan neuropilin/plexin reseptörünün ligandı olan yüksek SEMA3C pozitiviteleri bu hücrelerin hedefleme (homing) özelliğini açıklayabilir (64).

2.5. İGK-MKH'lerinin Farklılaşma Özellikleri

İGK-MKH'nin farklılaşma yetisi, diğer hücre serileri yönünden sınıandığında, ektodermal hücrelerden sinir hücrelerine, özellikle tirozin hidroksilaz enzimi içeren dopamin sentezleyen hücrelere dönüşebildiği (69) ve deneysel Parkinson modelinde vücut içine nakledilirse Parkinson'un tipik belirtilerini büyük oranda giderebildiği belirlenmiştir (60, 70). İGK-MKH, *in vitro* ortamda sinir hücresine dönüşüm uyarısını aldığında nöron veya nöron öncüsü hücreye farklılaşmanın birçok yapısal özelliğini (β -III tubülin, nörofilamin, GFAP, MAP2, NeuN ve nestin vb) kazanır (28). Bunlardan bazıları nörotrofik faktörler (GDNF, BDNF) salgılamaya başlar (60, 71). Sıçanda gerçekleştirilen deneysel serebrovasküler tıkanmada, yaklaşık bir milyon İGK-MKH hücresinin bir süre sonra orta serebral arter tıkanıklığına bağlı nörolojik semptomları düzelttiği ve korteksteki sinir etkinliğini artırdığı görülmüştür (72). Verilen hücrelerin tıkanma bölgesine giderek gliya, nöron ve endotel hücrelerine dönüştüğü gözlenmiş, yeni damar oluşmasına yardımcı olarak iskemi semptomlarını azalttığı gösterilmiştir. Bu ve benzeri çalışmaları yürüten araştırmacıların ortak görüşü, verilen kök hücrelerden köken alan makrofaj/mikroglia hücrelerinin ve ayrıca β 1 integrin ifadesinin bu süreçte etkili olduğu şeklindedir. Benzer şekilde, sıçanda beyin içi kanama olgularında verilen İGK-MKH'nin semptomları geriletici etkisi olmaktadır (73). İGK-MKH'nin tedavi etkisinin sınıandığı bir başka örnek de medulla spinalis kesileridir. Hücrelerin verilisinden haftalar sonra sıçanda kortikospinal liflerde yenilenme, lökomotor etkinlikte artış kaydedilmiş, lezyon bölgesinde kontrol gruba göre daha az sayıda astrosit ve daha fazla etkin mikroglia saptanmıştır. Hücreler, nakilden 16. hafta sonra bile varlığını korumakta, bunun yanı sıra akson yenilenmesinde rol alan çeşitli faktörleri (NT3, NAP2, FGF2) salgılamaktadır (74). İGK-MKH'leri sıçanda retinadaki fotoreseptör hücrelerinin rejenerasyonunda da denenmiş, nörona farklılaşmaksızın salgılamış olduğu IL-6 ve BDNF gibi moleküller sayesinde büyük oranda fotoreseptör yenilenmesi gerçekleştirmiştir (71). Subendotelial bölgeden elde edilen hücrelerin nöronal hücre farklılaşmasında ve sağ kalımında rol oynayan nestin (61), sinir büyüme faktörü (75) ve nöron hücrelerinde adezyon molekülü olan CD56 (63) ifadesi bu hücrelerin nöronal yönde farklılaşma potansiyeli gösterir. Bu hücrelerin kültür ortamında nörona farklılaştırıldığında bu hücreler yüksek oranda nöron spesifik enolaz açısından pozitifdir (76).

İGK-MKH'nin bir başka farklılaşma yolu da endoderm kökenli hücrelerdir. Bu alandaki birçok çalışmadan en yetkin olanı Chao ve ark. tarafından *in vitro* koşullarda dört aşamalı olarak hücrelerin pankreasın Langerhans adacıklarına benzer hücreler üretilip deneysel diyabet modeli geliştirilen sıçanların karaciğerine nakletmek olmuştur. İnsan kaynaklı bu adacık hücreleri *in vitro* koşullarda C peptid ve insülin salgılamış, pankreasın β hücreleriyle ilgili birçok gen ifadesi göstermiştir (77). Nakil sonrasında sıçanda her hangi bir immün baskılayıcı kullanılmaksızın dokuz hafta süresince normal kan glikoz düzeylerine ulaşılmıştır. İGK-MKH'nin diğer bir endoderm türevi hücresi olan hepatosit başarıyla farklılaştığı bilinir. Üç aşamalı bir farklılaştırma protokolüyle hücreler yapısal ve işlevsel olarak hepatositlere dönüştürülebilirler (2). Bu hücreler çeşitli karaciğer belirteçlerini gösterir, glikojen depolar, üre, albümin ve AFP üretir (78). Hepatosite farklılaştırılmış hücrelerin SCID farenin dalağına yapılan enjeksiyonu sonucunda albümin ve AFP ürettikleri saptanmıştır.

Mezoderm türevlerinden bir diğeri de özellikle klinikte çok önemli olan kardiyomiyositlerdir. İGK-MKH'lerinin kardiyomiyosite dönüşümü birbiriyle çelişen sonuçlar göstermiştir. 5-azasitidin (5-aza) gibi miyojenik farklılaşmayı sağlayan bir kimyasal maddeyle yapılan girişimlerde kasılma etkinliğinin sağlandığı veya sağlanmadığı gruplar olmuştur. İGK-MKH'nin Myf5 ve MyoD ifade eden iskelet kası hücrelerine dönüşümü ya 5-aza ile (14) ya da daha fizyolojik bir yol olan eş-kültürlerle veya gen nakliyle başarılmıştır (79). Henüz bu hücreler klinik kullanımdan uzaktır.

İGK-MKH, yukarıda sayılanların dışında CD34 ve CD31 barındıran endotel hücrelerine dönüştürülmüş, hematopoetik sistemde çeşitli sitokinler salgılayarak HKH işlevlerini kolaylaştırmış, doğal öldürücü hücrelerin sitotoksik etkilerini artırarak GVH hastalığında kullanılabilmesi, EKH çoğalmasını artırabileceği gösterilmiştir. Bu hücrelerin prelinik deneylerdeki kullanımlarına ilişkin ayrıntılar Fan ve ark.'nın derlemesinde bulunabilir (80).

2.6. İGK-MKH'lerinin Kemik İliği (Kİ) MKH'leriyle ve Kordon Kanı (KK) MKH'leriyle Kıyaslanması

Lu ve ekibi kemik iliği mezenkimal kök hücrelerindeki (Kİ-MKH) gibi İGK-MKH'lerinin de sitokin ürettiğini, bunun yanı sıra Kİ-MKH'lerinin üretemediği granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörleri (GM-CSF) ve granülosit koloni uyarıcı faktörleri (G-CSF) ürettiğini göstermiştir (76). Bu özellikleri ve sahip oldukları diğer özellikleri insan göbek kordon kanından (İGKK-MKH) elde edilen MKH'lerle benzerdir.

İGKK-MKH, İGK-MKH ve Kİ-MKH'leri arasında farklar vardır. Bunlardan ilki İGK-MKH'lerinin koloni oluşturan birimlerin izolasyon frekansı (CFU)-F İGKK-MKH ve Kİ-MKH'lere kıyasla daha fazladır (46). Bunların yanında İGKK-MKH ve İGK-MKH'lerinin kendini eşleme süresi Kİ-MKH'lerine kıyasla daha kısadır (28, 71, 81). Hızlı kendini eşleme süresi yeteneği, göbek kordonundan, göbek kordon kanından ve fetal kandan elde edilen MKH'lerin ortak özelliğidir. Bu özellikleri onların Kİ-MKH'lerine oranla daha primitif bir doğaya sahip olduklarının bir göstergesi olabilir. İGKK-MKH'leriyle İGK-MKH'leri arasındaki en önemli fark örneğin %100'üne yakınından izole edilebilir olmalarıdır dokunun işleme alınması 48 saati bulsa bile elde edilen hücre sayısında büyük bir değişim gözlenmez (60). İGKK-MKH'lerinin izole edilmesi ve prosedürün optimize edilmesi daha zordur. En uygun koşullarda elde edilen hücre miktarı örneğin %63'ünü geçmez.

Osteopontin hematopoetik kök hücre (HKH) nişinin majör bileşenidir ve hematopoetik öncü hücrelerin regülasyonunda görevlidir (82). Hiyalüronik asitte (HA) HKH nişinin bir diğer bileşenidir. İGK da HA ce zengin bir dokudur ve İGK-MKH'leri HA açısından iyi bir kaynaktır (83).

Bu hücrelerin farklılaşma yetileri çoğunlukla kemik iliği kaynaklı MKH ile kıyaslanmış, başarı sonuçları bu hücrelere kıyasla verilmiştir. Örneğin, üç boyutlu kollajen tip I/III jel

oluşturularak kemik yapımı kıyaslandığında her iki hücre grubunun da yeterli kemik yapımını sağlayabildiği gösterilmiştir (84). İGK-MKH'nin Kİ-MKH'ne kıyasla üç kat daha fazla kıkırdak yapımı yetisinin olduğu da bildirilmiştir (85). Aynı şekilde adipositlere farklılaşma yetisi Kİ-MKH'den çok daha yüksektir (6).

Gelişim süreci açısından değerlendirildiğinde, epiblasttan kaynaklanan embriyon dışı mezodermin bir türevi olan İGK-MKH Kİ-MKH'ne kıyasla daha ilkel, bir başka deyişle daha fazla EKH'e yakın bir konumda yer alıyor olabilir. Gerçekten de İGK-MKH'leri diğer birçok MKH'ye oranla daha fazla kök hücre ve germ hücresi belirteci barındırır. Yanı sıra Kİ-MKH'ne oranla daha hızlı çoğalma özelliğine sahiptir ve dolayısıyla birim zamanda daha fazla sayıda hücre elde edilebilme olanağı sunar (81). Telomeraz etkinlikleri yüksektir ve bölünme sayıları 20-80 arasındadır. Ayrıca bu hücreler kök hücre özelliklerini en az 9-10 pasaj sürdürürken Kİ-MKH'de bu durum genellikle daha erken pasajlarda sona erer (86).

İGK-MKH'leri adipojenik (6), kondrojenik, osteojenik, kardiyomyojenik ve işlevsel sinir hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip kök hücreler barındırırlar (28, 47, 87). Ksenotransplantasyonlarında bile alıcıda immün yanıt oluşturmamış ve doku reddi ile karşılaşılmamıştır (60, 70). Kemik iliği kökenli MKH kıyasla daha etkin bir kök hücre kaynağıdır (88). Gen tedavisinde kullanılabilir özelliği olması (12, 13), embriyonik kök hücrelerin (EKH) aksine, tümör oluşturmamaları (14), bireylerden acısız, hızlıca alınabilir ve daha az etik probleme neden olmaları, düşük maliyetle doğumda toplanabilir, kriyojenik olarak depolanıp, çözülüp, tedavi edici amaçlı çoğaltılabilir potansiyele sahip olmalarıyla önem taşımaktadırlar (15).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

İnsan göbek kordonunun farklı bölgelerinden elde edilen İGK-MKH'leri *in vivo* ve *in vitro* ortamda sergiledikleri karakteristik özellikleriyle klinik çalışmalarda kullanılacak önemli bir kök hücre kaynağıdır. Bu hücrelerin sergilediği birçok dokuya farklılaşabilme yeteneği bunların doku ve hücre kayıpları için doku mühendisliğinde (89) ve hücre sel tedavilerde (90) kullanılabilceğini göstermektedir. İGK-MKH'lerinin, hayvan modellerindeki beyin iskemisinde angiogenezi arttırdığı (72), hepatektomi sonrası karaciğer yenilenmesini arttırdığı (2) ve Parkinson modellerinde nöron yapılarının yerini aldığı görülmüştür (60). İGK-MKH'lerinin Kİ-MKH'leri gibi hematopoetik kök hücrelerin çoğalmasını desteklediği ve NOD-SCID farelerde engraftmanı arttırdığı izlenmiştir (91). Son çalışmalar, İGK-MKH'lerinin kanser sitoterapisinde kullanılabilceğini destekler niteliktedir (92). İGK-MKH'lerinin sergilediği bu özellikler birçok faktör tarafından yönetilmektedir. Araştırmacıların en önemli görevlerinden biri bu faktörlerin anlaşılabilmesi için MKH özelliklerinden sorumlu mekanizmaları tam olarak aydınlatmasıdır. Bu alanda yapılan çalışmalardan birisinde de İGK-MKH'lerinin detaylı transkriptom profilinin çıkarılarak özelliklerinin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır (64). Bu çalışma sonucunda ifadesi artan genlerin immünomodülatör özellik için gereken immün sistemin gelişimi ve aktivasyonunu sağlayacak olan antijen oluşumu ve üretimiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Diğer yandan, tümör hücrelerinde fazla miktarda olduğu bilenen bir reseptöre afinitesi olan, böylece hücre göçünü arttıran semaforin E'nin varlığı bu hücrelerin tümör hücrelerine hedeflenmesinde kullanılabilceğini göstermektedir. Bu hücrelerin bazı tümör baskılayıcı genleri ifade etmesi *in vitro* ortamda teratom gelişimini engelleyebilir.

Son yıllarda İGK-MKH'leri üzerinde yapılan birçok çalışmaya rağmen hücrelerin elde edilmesinde, kültüre edilmesinde ve analizindeki heterojen yöntemler bu hücrelerin tam olarak tanımlanmasını engellemektedir. Sonuç olarak sadece kordon bölgeleri arasında değil aynı zamanda aynı kordon bölgesinden elde edilen hücrelerde de farklı fenotipik profillere rastlanmaktadır (60, 64, 70). Elde edilen bilgiler ışığında İGK-MKH'leri farklı derecelerde köklülük özelliğine sahip, kendine özgü bir hücre topluluğunu içeriyor olabilir. Hücre izolasyonu ve kültürü yöntemlerinin standardize edilmesi bu hipotezin

doğrulanmasını ve hücre gruplarının aydınlatılmasını sağlayabilir. Bu şekilde hücre grupları içinde en primitif hücrelerin belirlenmesiyle klinik çalışmalarda en etkin sonuca ulaşılabilir.

Önerilen bu çalışma çok önemli bir hücre kaynağı olarak kabul edilen ve kemik iliğı kök hücrelerine göre birçok avantajı ortaya konan göbek kordonu hücrelerinin bulunduğu İV, PV, SA, GKA göbek kordonu bölgelerinin göbek kordonu dokusundan ayrılarak ayrı kültüre edilmeleri ve kök hücre özelliklerinin ortaya çıkarılmasını amaçlamaktadır.

Sonuç olarak, kök hücrelerin davranışlarını anlamada etik soruna neden olmadan araştırma çalışmalarına kaynaklık eden ve tedaviye yönelik çalışmalarda otojenik hatta allojenik olarak kullanılabilir bu doku içinde yerleşmiş olarak bulunan kök hücrelerin heterojen yapısının sebebinin ortaya çıkarılmasıyla, homojen bir kök hücre kaynağı elde edilebilmiş olacaktır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. İnsandan Göbek Kordonunun Elde Edilmesi, Laboratuara Transferi ve Ön İşlem Aşamaları

Bu çalışmada insan kök hücresi eldesi amacıyla göbek kordonu bağ dokusu kullanıldı. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 121-3211 no'lu kararla onaylanmıştır. Komplikasyonsuz bir hamilelik dönemi geçiren ve herhangi bir sistemik hastalığı olmayan anne adayının bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup onaylamasından sonra peroperatuvar sezaryen sırasında 15 cm uzunluğunda göbek kordonu parçası alındı. Bu materyal doğum sonrasında göbek kordonu bağlandıktan sonra kordonun plasenta tarafında kalan bölümünün kesilerek hızla taşıma ortamına (3% Penisilin-Streptomisin (Sigma; P0781), 7,5 µg/mL Amphotericin B (Sigma; A2942) içeren steril Leibovitz L15 (Hyclone; SH 30525.02) kültür ortamına aktarılmasıyla elde edildi ve laboratuara ulaştırıldı. Bu işlemler için 3 adet kordon (ortalama anne yaşı: 29) kullanıldı. Göbek kordonu laboratuara getirildikten hemen sonra steril odada stereo mikroskop altında steril koşullarda İV, PV, SA, 2 arter ve ven damarları çıkarılarak elde edilen kordon dokusu parçaları mekanik olarak ayrıştırıldı ve bu doku grupları laminar akışlı kabin içinde makas ve bisturi yardımıyla çok küçük parçalara bölündükten sonra 3 kez PBS (fosfat tamponlu tuzlu su, Sigma; P 4447) ile yıkayıp 250g'de 10 dk. santrifüj edildi.

4.2. İnsan Göbek Kordonu Hücrelerinin İzolasyonu Ve Elde Edilen Hücrelerin Farklılaştırılmadan Çoğaltılması (Ekspansiyon)

Ön işlem aşamalarından sonra elde edilen doku parçaları, doku miktarının üç katı miktarda %0,1 kollajenaz tip B (Roche; 1088831) içeren kültür ortamında (DMEM-F12 Ham's Sigma; D0547), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma; P0781), 2,5 µg/mL Amphotericin B (Sigma; A2942) içeren 2-3 sa. 37°C su banyosunda sallanarak sindirildi. Daha sonra son konsantrasyon %2,5 olacak şekilde tripsin eklenerek 30 dk. 37°C su banyosunda sallanarak ileri sindirme işlemi yapıldı. Doku homojenizasyonu sağlandıktan

sonra en az üç katı %10 FBS içeren PBS eklenip 500g'de 10 dk. santrifüj edildi. Elde edilen çökeleği kültür ortamıyla karıştırılıp 75 cm² polistren kültür kabına ekildi. Üç gün sonra kültür kabına yapışmamış hücreler dPBS (Dulbecco's PBS) ile yıkanıp kültür ortamı her üç günde bir değiştirildi.

Enzimatik hücre izolasyonunun yanı sıra eksplant kültür yöntemi kullanılarak da hücrelerin izolasyonu sağlandı. Bu yöntemde ön işlem aşamalarından sonra elde edilen doku parçalarına, doku miktarının 3 katı kültür ortamı eklenerek ve 250g'de 10 dk. santrifüj edilerek dokuların yıkanması sağlandı. Santrifüj sonrası üst faz atılarak elde edilen doku çökeleği 75 cm²'lik kültür kabına eşit miktarda dağıtılarak dokuların kültür kabına yapışması için üzerine 1 mL FBS eklendi. On iki saat sonra üzerine %10 FBS içeren kültür ortamı eklendi ve 5 gün süreyle kıpırdatılmadan izlendi. Beş gün sonra kültür kabına yapışmamış doku ve hücreler dPBS (Dulbecco's PBS) ile yıkanıp kültür ortamı her üç günde bir değiştirildi.

Her iki yöntemle izolasyon sonrası hücreler %100 çoğalma düzeyine ulaştığında tripsin EDTA (Sigma; T3924) ile 3 dk. 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kaldırılıp, hücre sayımı yapıldı. Pasajlama işleminde 75 cm²'lik kültür kabına 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin 5-7 gün süresince çoğalmaları sağlandı. Her pasaj sonunda hücreler kaldırılıp Vicell[®] cihazı (Beckman Coulter) ile tripan mavisi tekniğine dayanarak hücre sayımı yapıldı.

4.3. Hücrelerin Akım Sitometri yöntemiyle Hücre Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

Birinci pasajın sonunda IV, PV, SA, GKA bölümlerinden elde edilen hücreler tripsinize edilerek %10 FBS'li kültür ortamı içinde tekrar süspansiyon hale getirildi. Her antikor için en az 1x10⁵ hücre kullanıldı. Flüoresan konjuge antikorlarla CD29-FITC, CD34-APC, CD45-FITC, CD54-FITC (Becton Dickinson San Jose, Calif., USA), CD73-APC, CD90-APC,

CD105-FITC, CD133-FITC (eBioscience, Inc., San Diego, CA) 30 dk. buz üzerinde inkübasyonun ardından hücreler 3 defa %10 FBS'li kültür ortamında 130g'de 10 dk. santrifüj edilerek bağlanmayan antikorların yıkanarak uzaklaştırılması sağlandı ve 1 mL %10 FBS'li kültür ortamında süspense edildi. Hücrelerin hücre yüzey belirteçlerini (CD) belirlemek için akım sitometri BD Accuri® C6 akım sitometri cihazı kullanıldı. Analizler BD Accuri C6 yazılım programıyla yapıldı.

4.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Farklaştırılması

4.4.1. Adipojenik farklılaştırma

İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilen hücreler üçüncü pasajın sonunda TE ile kaldırılarak pasajlandı. Tek tabaka halinde 24 kuyulu tabakalarda poli-L-lizin (Sigma; P8920) kaplı yuvarlak lamellere tutunan hücreler %70 çoğalma düzeyine ulaştıktan sonra altı hafta süresince adipojenik farklılaştırma ortamında tutuldu. Kültür ortamının yarısı 2 günde bir değiştirildi.

Adipojenik farklılaştırma ortamı:

1 µM Dekzametazon (Sigma; D4902)

60 µM İndometazin (Sigma; I7378)

500 µM IBMX (Sigma; I5879)

5 µg/mL İnsülin (Sigma; I6634)

%10 FBS (Sigma; F9695)

%1 Penisillin-streptomisin/amfoterisin B

DMEM-LG (Sigma; D5523)

4.4.2. Osteojenik farklılaştırma

İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilen hücreler üçüncü pasajın sonunda TE ile kaldırılarak pasajlandı. Tek tabaka halinde 24 kuyulu tabakalarda poli-L-lizin kaplı yuvarlak lamellere tutunan hücreler %70 çoğalma düzeyine ulaştıktan sonra dört hafta süresince adipojenik farklılaştırma ortamına tabi tutuldu. Kültür ortamının yarısı 2 günde bir değiştirildi.

Osteojenik farklılaştırma ortamı:

100 nM Dekzametazon (Sigma; D4902)

0,2 mM Askorbik asit (Sigma; A4544)

10 mM B-gliserofosfat (Sigma; G9891)

%10 FBS

%1 Penisillin-streptomisin/amfoterisin B

DMEM-LG (Sigma; D5523)

4.4.3. Kondrojenik farklılaştırma

İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilen hücreler üçüncü pasajın sonunda TE ile kaldırıldı ve her gruptaki hücreler ikiye bölünerek her tüpte 5×10^5 hücre olacak şekilde 15 mL polipropilen (PP) tüplere alındı. Tüpler 130g de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üst faz atılarak çökelti dağıtılmadan üzerine 5 mL %10 FBS içeren kültür ortamı eklendi ve 2 gün inkübasyona bırakılarak hücre küresi oluşması sağlandı. Hücre küresinin dağılmamasını sağlamak amacıyla her gruptan bir PP tüpün üzenine yavaşça 5 mL farklılaştırma ortamı eklendi. Dört hafta süresince kondrojenik farklılaştırma ortamına da bırakıldı. Kültür ortamının yarısı 2 günde bir değiştirildi. Diğer PP tüp kontrol grubu olarak %10 FBS içeren kültür ortamında dört hafta süresince inkübasyona devam etti. Kültür ortamı 2 günde bir değiştirildi.

Kondrojenik farklılaştırma ortamı:

100 nM Dekzametazon (Sigma; D4902)

50 µg/mL Askorbik asit (Sigma; A4544)

10 ng/mL TGFβ3 (Sigma; T5425)

5 µg/mL ITS-premix (BD; 354350)

1,25 mg/mL Bovin serum albümin (BSA) (Sigma; A2058)

5,35 mg/mL Linoleik asit (Sigma; L1012)

%1 Penisilin-streptomisin/amfoterisin B

DMEM-HG (Sigma; D7777)

4.5. (İmmün) Histokimyasal İşaretlenmeler

4.5.1. Doku boyaması (Parafin kesit boyamaları)

İV, PV, SA, GKA olarak bölümlere ayrılan dokular oda ısısında %3,5 paraformaldehidde (PFA) 24 sa. tespit edildikten sonra şu şekilde takip edildi:

- Yıkama (distile suda, 2 sa.)
- Dehidrasyon (%75, %96, %100 etanol de 2x1 sa.)
- Şeffaflama (ksilen ile)
- 1:1 ksilen: sıvı parafin, 30 dk., 60°C'de
- Parafinizasyon (sıvı parafinde, 2x1 sa., 60°C'de)
- Gömme ve bloklama (katı parafinde)

Mikrotomda 8 µm kalınlığında alınan parafin kesitlere hematoksilin-eozin (HE) boyaması yapıldı.

HE boyama protokolü:

- Ksilen
- Etanol serisi ile hidrasyon (%100, %96, %75)
- Yıkama (suda)
- Hematoksilin, 1 dk.
- Yıkama (suda)
- Eozin, 4 dk.
- Yıkama (suda)
- Etanol serisi ile dehidrasyon (%75, %96, %100)
- Şeffaflama (ksilenle)
- Kurulama
- Kapama (Entellan ile)

4.5.2. Doku boyaması (Dondurma kesit boyamaları)

İV, PV, SA, GKA olarak bölümlere ayrılan dokular %3,5 paraformaldehitte 24 sa. oda ısısında tespit edildikten sonra şu şekilde takip edildi:

- 1,2 M sükröz + %0,1 PFA, distile su içinde, 4°C'de (doku dibe çökene kadar)
- Distile sudan geçirilip, kurutma kağıdıyla kurutuldu

- Çöken doku kriyomatrik[®] se alındı, metal yüzey üzerinde -60°C’de donduruldu
- Kriyomikrotomda (çalışma ısı: -26°C) 8 µm’lik kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alınarak immunhistokimya boyamaları yapıldı.

4.5.3. İGK doku bölgelerinin ve farklılaştırılmamış hücrelerinin işaretlenmesi

İV, PV, SA, GKA doku bölgeleri ve hücreleri oda ısısında %3,5’luk PFA ile 30 dk. tespit edildikten sonra immün histokimyasal yöntemle flüoresan proplarla işaretlendi.

Desmin boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 10 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Desmin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma; D1033), 1:100 PBS’te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS’te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüv)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10 µm), 20 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

α -SMA boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- α -SMA fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma; A5228), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10 μ m), 20 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 μ g/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

Vimentin boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Vimentin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma; V6630), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)

- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10 µm), 20 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

Sitokeratin boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Sitokeratin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma; C2562), 1:100PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10 µm), 20 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

CD146 (Thy-1) boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- CD146 fare monoklonal anti-insan IgG (ABCAM, Ab24577), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10 µm), 20 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

4.5.4. Adipojenik farklılaştırılmış hücrelerin işaretlenmesi

İV, PV, SA, GKA hücreleri oda ısısında %10 tamponlu formalin ile 10 dk. tespit edildikten sonra işaretlendiler.

- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama
- %1 Oil red O (Sigma; 75087) (10 dk., oda ısısında)

- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

4.5.5. Osteojenik farklılaştırılmış hücrelerin işaretleme

IV, PV, SA, GKA hücreleri oda ısısında %3,5 PFA ile 30 dk. tespit edildikten sonra immün histokimyasal yöntemle flüoresan problemlarla işaretleme.

Kemik sialoprotein (BSP) boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- BSP tavşan poliklonal anti-insan IgG (Alexis; 111-165-045), 1:100PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Cy3-konjuge keçi antitavşan IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

Osteokalsin boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Osteokalsin tavşan poliklonal anti-insan IgG (Alexis; ALX-210-308), 1:100PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Cy3-konjuge keçi antitavşan IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

Osteopontin boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Osteopontin tavşan poliklonal anti-insan IgG (Chemicon; AB1870), 1:100PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Cy3-konjuge keçi antitavşan IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)

- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

Osteonektin boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 30 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Osteonektin fare monoklonal anti-insan IgG (Alexis; ALX-804-317), 1:100PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson İmmunoresearch, 115-095-166), 1:100 PBS'te dilüe, 60 dk. (37°C, nemli etüvde)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroL ile)

İV, PV, SA, GKA olarak bölümlere ayrılan dokulardan elde edilen hücreler oda ısısında %10 formalinde 30 dk. tespit edildikten sonra şu şekilde takip edildi:

%10 von Kossa-Safranin O boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama
- 1 mL %1 AgNO₃ (60 dk., parkal ışık altında, oda ısısında)

- Yıkama (distile suda, 2x5 dk.)
- Kurulama
- %1 sodyum thiosülfat (5 dk., oda ısısında)
- Yıkama (distile suda, 2x5 dk.)
- %1 Safranin O (5 dk., oda ısısında)
- Yıkama (distile suda, 2x5 dk.)
- Kapama (1 µg/mL Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

4.5.6. Kondrojenik farklılaştırılmış hücrelerin işaretilenmesi

İV, PV, SA, GKA hücreler küreleri oda ısısında %10 tamponlu formalin ile 24 sa. oda ısısında tespit edildikten sonra şu şekilde takip edildi:

- 1,2 M sükröz+ %0,1 PFA, distile su içinde, 4°C’de (doku dibe çökene kadar)
- Distile sudan geçirilip, kurutma kağıdıyla kurutuldu
- Çöken doku kriyomatrikse alındı, metal yüzey üzerinde -60°C’de donduruldu
- Kriyomikrotomda (çalışma ısısı: -26°C) 8 µm’lik kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alınarak immunhistokimya boyamaları yapıldı.

Toluidine mavisi boyama protokolü

- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)
- Kurulama
- %1 toluidine mavisi (Sigma; 75087) (10 dk., oda ısısında)
- Yıkama (PBS ile 2x5 dk.)

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

İmmün flüoresan görüntülemeler LSM 510 lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeiss, Almanya) sistemi kullanılarak alındı.

4.6. Gen İfadesinin Analizi

4.6.1. RNA izolasyonu

Üç hastadan alınan kordon dokusundan izole edilerek altı kuyulu petri kabına iki tekrarlı ekimi yapılan İV, PV, SA, GKA ve Kİ-MKH hücreleri %90 çoğalma düzeyine ulaştığında ideal RNA izolasyon yöntemi olan TRIzol® (Invitrogen; 15596-026) içerisinde homojenize edilerek -80°C’de saklandı. Bu çalışmada Kİ-MKH’leri kalibratör/kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu örnekler -80°C’den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildikten sonra standart TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu yapıldı. Aşağıda TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu aşamaları verilmiştir:

1. Homojenize edilen hücreler 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
2. 100 µL bromokloropropan (BCP) (Sigma; B9673) eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12000 rpm de 15 dk. 4°C’de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µL izopropanol (Applichem) içeren yeni tüpe alındı.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

6. 12000 rpm de 10 dk. 4°C’de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Çökelti üzerine 1 mL DEPC (DEPC, Applichem) içeren %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. RNA’nın degrades olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk. 4°C’de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol (Merk) döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA çökeltisi kurutuldu.
10. Çökelti miktarına bağlı olarak 35 µL RNaz içermeyen su (%0,1 DEPC’li su) eklendi.
11. Analize kadar -20°C’de, analiz sonrası -80°C’de saklandı.

4.6.2. RNA’ların kalite kontrolü

İzole edilen RNA’lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere agaroz jel elektroforezi (RNA elektroforezi; %1 Agaroz jel) ile incelendi, derişimler Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazında ölçüldü (Çizelge 4.6.1.).

Çizelge 4.6.1 Agaroz jel elektroforezi (RNA Elektroforezi)

Agaroz (Sigma;A7431)	Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
TBE (Trizma Base EDTA) tamponu 5x	Trizma Base (445 mM) Borik Asit (445 mM) EDTA 0,5 M (10 mM)
Red-Safe™ (Intron; 21141)	7 µL/100 mL
Yükleme boyası (Promega; M981A) 5XGreen GoTag	3 µL

4.6.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi için, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche; 05091284001) kullanıldı. Kalıp olarak 1000 ng RNA kullanıldı ve 600 pmol/ μ L Random Hexamer primerinden 2 μ L alınarak (60 μ M) RNaz içermeyen su ile 11,4 μ L'ye tamamlanarak 65°C'de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 5 dk. bekletildi. Aynı bir tüpte 8,6 μ L reverse transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Çizelge 4.6.2 cDNA reaksiyonu

cDNA sentezi (1 reaksiyon için)		
Kalıp–primer karışımı	11,4 μ L	
Revers transkripsiyon karışımı		
Transcriptor High Fidelity tampon (5x)	4 μ L	1x8 mM Mg Cl ₂
Koruyucu RNaz İnhibitörü (40U/ μ L)	0,5 μ L	20 U
dNTP karışımı (her biri için 10 mM)	2 μ L	1 mM (her biri)
DTT	1 μ L	5 mM
Ters transkriptaz	1,1 μ L	10 U
Son hacim	20 μ L	

Toplam 20 μ L olacak şekilde 11,4 μ L (RNA + primer karışımı), 8,6 μ L reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda PCR cihazı (Tetrad; Bio-Rad, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda 20 μ L cDNA sentezlendi. (Çizelge 4.6.2.) cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 100 μ L'ye sulandırıldı (20 μ L cDNA+80 μ L distile su = 100 μ L).

29°C'de 10 dk.

48°C'de 60 dk.

85°C'de 5 dk.

4.6.4. QRT-PCR (Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Göbek kordonunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilen hücrelerde yapısal genlerin ekspresyonu birinci pasajın sonunda alınan örneklerde, LightCycler 480[®] (Roche, İsviçre) cihazında SYBR green tekniği kullanılarak, QRT-PCR yöntemi ile incelendi.

QRT-PCR reaksiyonları hazırlanırken (Çizelge 4.6.3) kullanılan primerlerin (Çizelge 4.6.6) verimlerinin hesaplanabilmesi, standart eğrilerin çizilebilmesi için hücrelerden elde edilen cDNA örneğinden 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı. Ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında LightCycler 480[®] analiz programı ile standart eğriler çizildi. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bununla birlikte Real Time PCR cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için melting curve (erime eğrisi) analizi yapıldı. Deneysel tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde üçer kez çalışılarak analizlerde bu üç ölçümün ortalaması kullanıldı. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. Normalizasyon amacıyla her hücrede aynı miktarda ifade edilen, zorunlu idare geni (housekeeping) RPL13A miktarı, İV, PV, SA, GKA hücrelerinde ifade düzeyleri karşılaştırılarak incelendi. Kalibratör olarak kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kullanıldı. Genlerin ifadelerinin bağıl olarak ölçülebilmesi amacıyla standart eğrilerin eğimi hesaplanarak amplifikasyon verimliliği (E) belirlendi ve Pfaffl yöntemi kullanıldı (Çizelge 4.6.7).

Çizelge 4.6.3 QRT-PCR koşulları

2xSYBR Green karışımı (Roche)	5 µL
Forward primer (10pmol/ µL)	0,5 µL
Reverse primer (10pmol/ µL)	0,5 µL
cDNA	0,5 µL
Distile su	3,5 µL
Toplam:	10 µL

10 µL QRT-PCR reaksiyonu LightCycler 480[®] cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (Çizelge 4.6.4.).

Çizelge 4.6.4 QRT-PCR programı

	Oct4, TERT, VİM, α-SMA, Rex1, SEMA-3C, Desmin, Nestin	Nanog, RPL13A	GATA4
Denatürasyon	95°C'de 5 dk	95°C'de 5 dk	95°C'de 5 dk
Amplifikasyon	94°C'de 10 s	94°C'de 10 s	94°C'de 10 s
	60°C'de 20 s	62°C'de 20 s	58°C'de 20 s
	72°C'de 30 s	72°C'de 30 s	72°C'de 30 s

Çizelge 4.6.5 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz (Sigma)	Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
TBE (Trisma Base EDTA) tamponu 5x	Trizma Base (445 mM) Borik Asit (445 mM) EDTA 0,5 M (10 mM)
Red-Safe [™] (İntron)	7 µL/100mL
Yükleme boyası	3 µL Green GoTag flexi buffer (Qiagen)
Moleküler ağırlık belirleyicisi	100 bç DNA belirteci (Fermentas)

Çizelge 4.6.6 Deneysel olarak kullanılan primer çiftleri

	Gen ismi [Homo sapiens] NCBI Ref Seq	Primer	bç	Ürün bç
1	Nanog homeobox NM_024865.2	F ACAGAAATACCTCAGCCTCCAG	22	153
		R TCGGTCACATCATTCCTATTC	21	
2	Telomeraz ters transkriptaz (TERT) NM_001193376	F TCCTGCGTTTGGTGGATGAT	20	200
		R GGGCATAGCTGAGGAAGGTT	20	
3	POU5F1 variant 1 (Oct4 A) NM_002701.4	F TCGCAAGCCCTCATTTCACC	20	165
		R GAAGCTTAGCCAGGTCCGAG	20	
4	Rex1 ZFP42 zinc finger protein NM_174900.3	F CAGTCCAGCAGGTGTTTGGCT	20	259
		R ATCACATAAGGCCACACCG	20	
5	Vimentin (ViM) NM_003380.3	F AGACGGTTGAAACTAGAGATGG	22	160
		R GCAGAAAGGCACTTGAAAGC	20	
6	alpha 2, smooth muscle, aorta (α - SMA) NM_001613.2	F ACCCGATAGAACATGGCATC	20	193
		R TACATGGCTGGGACATTGAA	20	
7	GATA binding protein (GATA4) NM_002052.34	F TCCAAACCAGAAAACGGAAG	20	187
		R CTGTGCCCGTAGTGAGATGA	20	
8	Nestin (NES) NM_006617.1	F CGCACCTCAAGATGTCCCTC	20	128
		R CAGCTTGGGGTCTGAAAGC	20	
9	Desmin (DES) NM_001927.3	F GAAATCCGGCACCTCAAGGA	20	144
		R GATGGGGAGATTGATCCGGC	20	
10	Semaphorin 3C (SEMA3C) NM_006379.3	F TCGGAACAGATCGGGGTACT	20	224
		R GTCAGCACAGGCTGTACCAT	20	
11	60S ribosomal protein L13a (RPL13A) NM_001270491 (2 varyant)	F CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	22	126
		R TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCA A	22	

Bç; baz çifti

Çizelge 4.6.7 Amplifikasyonun verimliliği (E) ve gen ifadesinin bağıl olarak ölçümünde kullanılan formüller

$$E = 10^{-1/E_{\text{ğim}}} \quad R = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta C_p \text{ Hedef (Kontrol - örnek)}}}{(E_{\text{Referans}})^{\Delta C_p \text{ Ref (Kontrol - örnek)}}$$

Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, RT-PCR sonuçları LightCycler 480® versiyon 1,2 yazılımı ile kantite edildi, korelasyon analizi ise XLSTAT 2013 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler ortanca (minimum-maksimum) biçiminde özetlendi. Her gen için bölgeler içi biyolojik tekrarlar Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. Her gen için bölgeler arası karşılaştırma ise Friedman testi ile gerçekleştirildi. Friedman testi sonucu p değeri anlamlı bulunduğunda, farklılığın hangi bölgeden kaynaklandığına post hoc ikili karşılaştırma testleri ile bakıldı. Analizler Windows için SPSS v15.0 paket programı ile yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

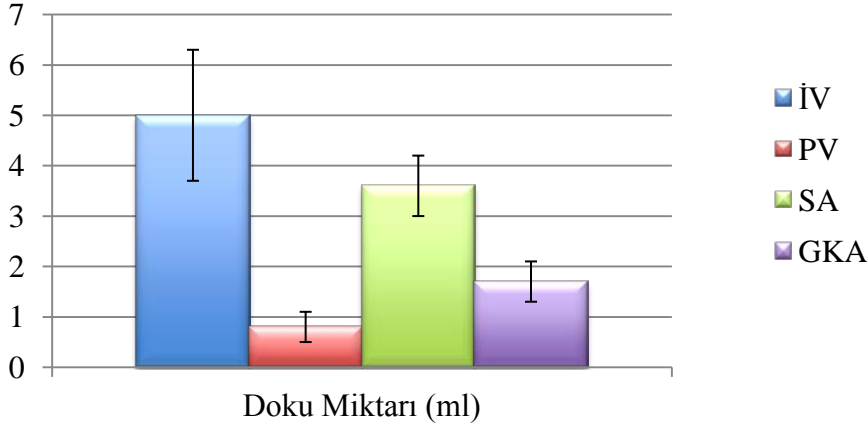
5.1. Hücrelerin Sağ kalım Oranları ve Büyüme Karakterleri

Eksplant kültür yöntemi için, 15 cm'lik üç farklı İGK dokusundan ayrıştırılan İV, SA, GKA, PV bölgelerinden sırasıyla ortama $5\pm 1,3$ mL, $3,6\pm 0,6$ mL, $1,7\pm 0,4$ mL, $0,8\pm 0,3$ mL doku miktarı elde edildi (Şekil 5.1.1A.). Ekspant kültür yapıldığında dokuların kültür kabına yapışma sürelerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi. Hücrelerin dokulardan ayrılarak kültür kabına yayılma süreleri ortanca (min:max) değer olarak ifade edildi. SA dokusundan 6. (min:max=5:7) günde hücrelerin filizlenmeye başladığı gözlenirken, İV dokusundan 8. (min:max=6:10) günde, GKA dokusundan 9. (min:max=8:11) günde, PV dokusundan ise 12. (min:max=11:16) günde hücrelerin dokudan ayrılarak kültür kabında yayıldığı gözlemlendi (Şekil 5.1.2).

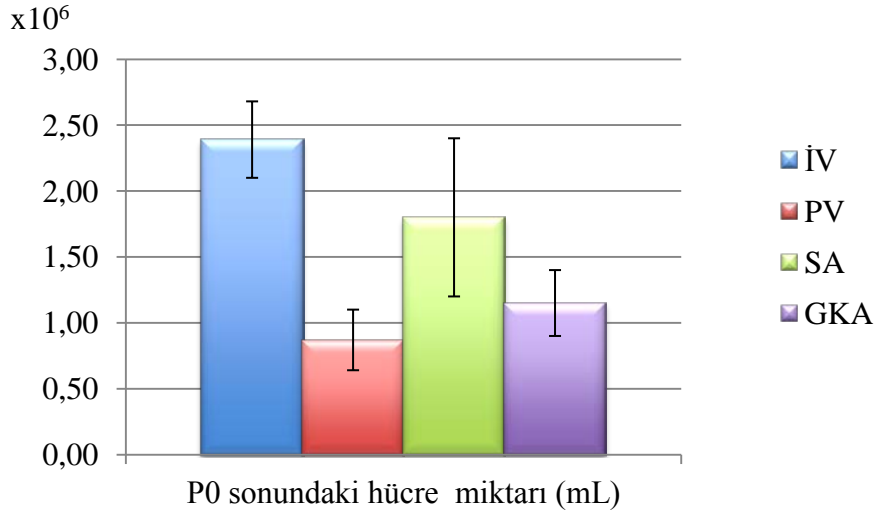
Üç kordondan elde edilen hücreler kültür ortamına alındıkları ilk 17 günlük kültürlerinde (P_0) hücre sayımı yapılarak çoğalma eğrileri saptandı. Bunun sonucu, hücrelerin ilk 6–12 gün boyunca kültür ortamına adaptasyon süresi içinde, büyümenin ilk evresi olan bekleme aşamasını geçirdiği (latent dönem veya lag fazı), bunu izleyen 7–10 günde büyümenin ikinci evresi logaritmik faza (log fazı) geçtikleri gözlemlendi. Hücrelerin dokulardan ayrılarak kültür kabında konfluensiye ulaşma süreleri ortanca (min:max) değer olarak ifade edildi. Hücreler izole edilip kültür ortamına alındıktan SA; 13 (min:max=11:14), İV; 15 (min:max=13:16), GKA; 17 (min:max=14:20), PV; 20 (min:max=19:22) gün sonra %100 çoğalma düzeyine (konfluensi) ulaştı (Çizelge 5.1.3).

15 mL'lik üç farklı kordonun bölgelerinden elde edilen hücrelerin P_0 sonunda ortalama toplam hücre miktarına bakıldığında İV; $2,39\times 10^6\pm 29\times 10^4$, SA; $1,8\times 10^6\pm 60\times 10^4$, GKA; $1,15\times 10^6\pm 25\times 10^4$, PV; $0,870\times 10^6\pm 23\times 10^4$ hücre elde edildi (Şekil 5.1.1B). İGK dokusunun İV, SA, GKA, PV bölgelerinden elde edilen doku miktarları farklı olduğu için, ayrıştırılan 1 mL doku başına elde edilen hücre miktarı hesaplandığında PV; $962\times 10^3\pm 38\times 10^3$ hücre/mL, GKA; $676\times 10^3\pm 11\times 10^3$ hücre/mL, SA; $500\times 10^3\pm 71\times 10^3$ hücre/mL İV; $478\times 10^3\pm 53\times 10^3$ hücre/mL doku, hücre elde edildiği hesaplandı. Bu sonuçlara göre mL doku başına en çok hücre sırasıyla PV, GKA, SA, İV dokusundan elde edildi (Şekil 5.1.4)

A

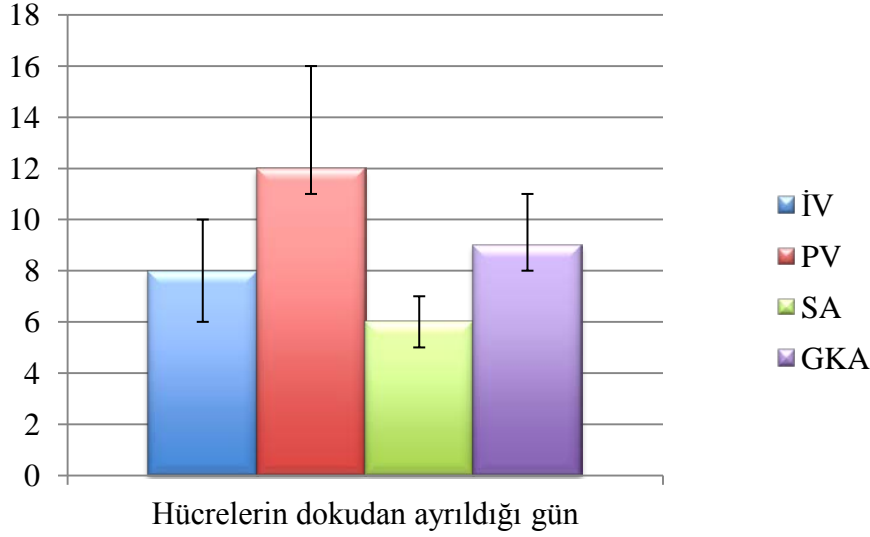


B



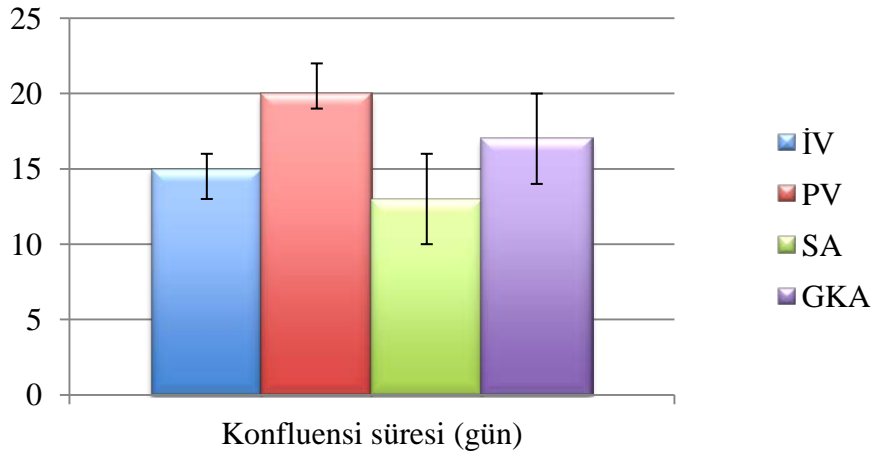
Şekil 5.1.1 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku ve bu bölgelerden izole edilen toplam hücre miktarı

İGK bölgelerinden izole edilen doku miktarıyla (A), eksplant kültürün ilk pasajı sonunda elde edilen hücre miktarının (B) birbiriyle karşılaştırıldı. En fazla doku sırasıyla İV, SA, GKA, PV bölgesinden elde edildi. En çok hücre P₀ sonunda sırasıyla İV, SA, GKA, PV bölgesinden elde edildi.



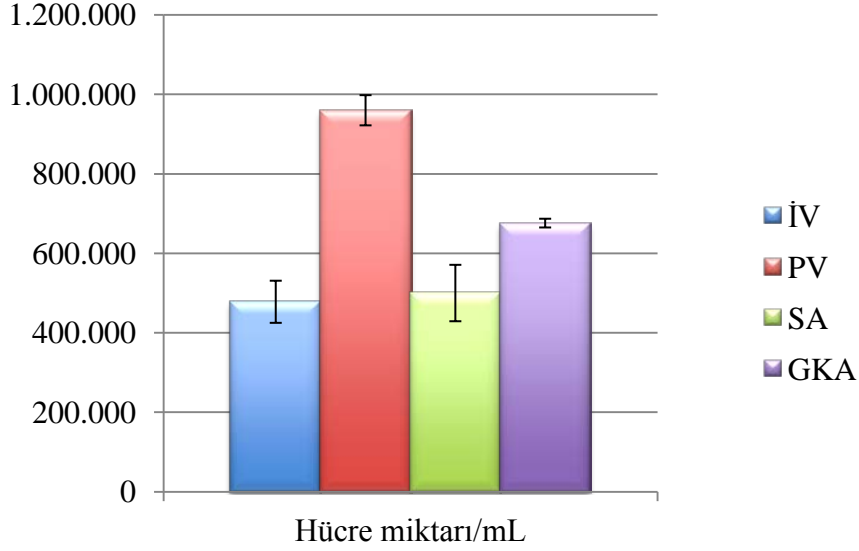
Şekil 5.1.2 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen dokuların kültür kabına yapışma ve dokudan ayrılarak kültür kabına yayılma süreleri

İGK bölgelerinden elde edilen dokulardan kültür kabına SA ve İV bölgesinin en hızlı daha sonra sırasıyla GKA ve PV bölgelerinin yayıldığı gözlemlendi.



Şekil 5.1.3 İGK dokusunun bölgelerinden elde edilen hücrelerin eksplant kültürde konfluensiye ulaşma zamanı

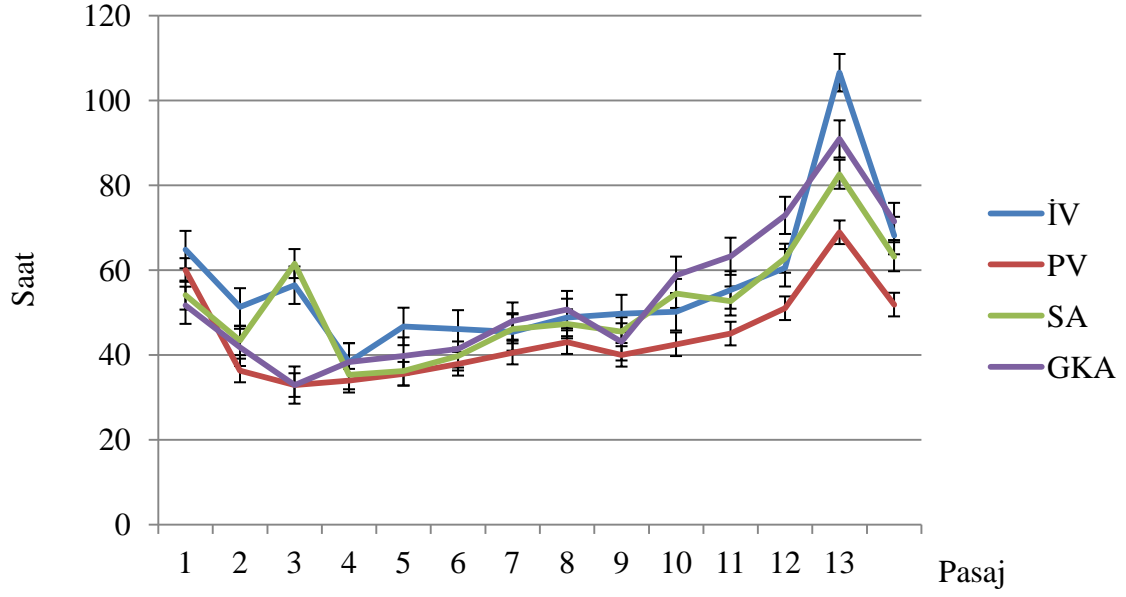
İGK bölgelerinden elde edilen dokular kültür kabına alınıp kültüre edildiğinde en hızlı konfluensiye İV ve SA gruplarının ulaştığı, bunları sırasıyla GKA ve PV gruplarının takip ettiği gözlemlendi.



Şekil 5.1.4 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültür ortamındaki pasajları sonunda (P_0) 1 mL doku miktarı başına düşen hücre miktarı

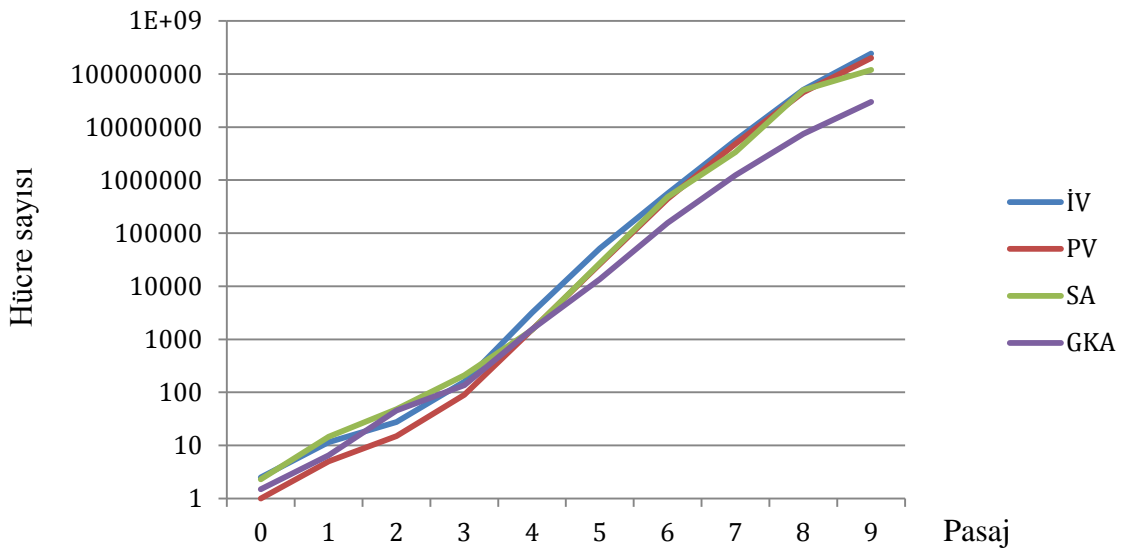
İGK PV, GKA bölgelerindeki 1 mL dokuda bulunan hücre miktarının diğerlerine oranla daha yüksek olduğu, bunları sırasıyla İV ve SA gruplarının takip ettiği gözlemlendi.

İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen hücrelerin kendini iki katına çıkarma zamanı (PDT) pasajlar boyunca karşılaştırıldı (Şekil 5.1.5). PV grubunun diğer bölgelere oranla PDT süresinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Uygulanan yöntemle hücrelerin kümülatif çoğalma eğrisi incelendiğinde, 15 cm'lik İGK dokusundan P_9 sonunda en fazla hücre sırasıyla İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edildi. Başlangıçta elde edilen doku miktarına bağlı olarak en az hücre PV bölgesinden elde edilmesine rağmen PV-MKH'lerinin yüksek proliferasyon yeteneği sayesinde diğer grupları yakaladığı gözlemlendi (Şekil 5.1.6).



Şekil 5.1.5 İGK dokusunun bölgelerinden elde edilen hücrelerin kendini iki katına çıkarma zamanı (PDT)

En düşük kendini yenileme süresi PV-MKH'lerinde izlendi.



Şekil 5.1.6 Hücrelerin pasajlar boyunca kültür ortamındaki kümülatif çoğalma eğrisi

İGK dokusundan P₉ sonunda en fazla hücre sırasıyla İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edildi.

5.2. Hücre Morfolojisi

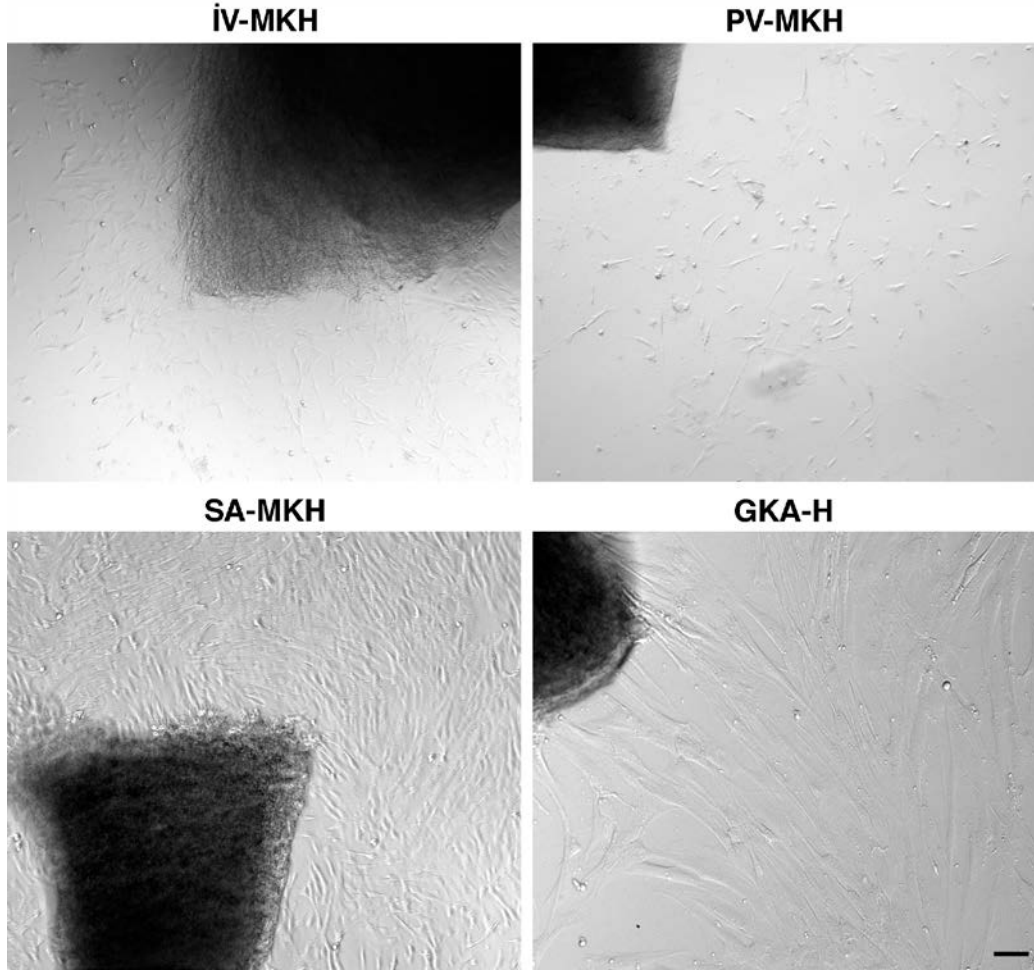
İGK dokusundan elde edilen doku parçalarından hem enzimatik hem de eksplant yöntemiyle izole edilen hücrelerin hücre morfolojileri incelendiğinde, izolasyon yönteminin hücre popülasyonunu değiştirdiği gözlemlendi. Mekanik yöntemle izolasyon sonucu kültür kabına tutunan hücrelerin çoğunluğunun ince-uzun fibroblast görünümündeki tip 2 hücrelerden oluştuğu, tip 1 hücrelerin ise varlığının %10'u geçmediği gözlemlendi. Enzimatik izolasyon yöntemiyle kültüre edilen hücrelerin morfolojileri incelendiğinde tip 1 geniş sitoplazmalı, yassı ve stres liflerince zengin hücrelerin ortamda mekanik yöntemle kıyasla fazla olduğu, bunun yanı sıra tip 2 hücrelerin de ortamda bulunduğu, pasajlar ilerledikçe tip 2 hücrelerin ortamda baskın hale geldiği gözlemlendi.

Çizelge 5.2.1 Eksplant ve mekanik izolasyon sonucu elde edilen İGK-MKH morfolojilerinin karşılaştırılması

	Tip 1 (yayvan)	Tip 2 (ince-uzun)
Eksplant	%10	%90
Enzimatik	%25	%75

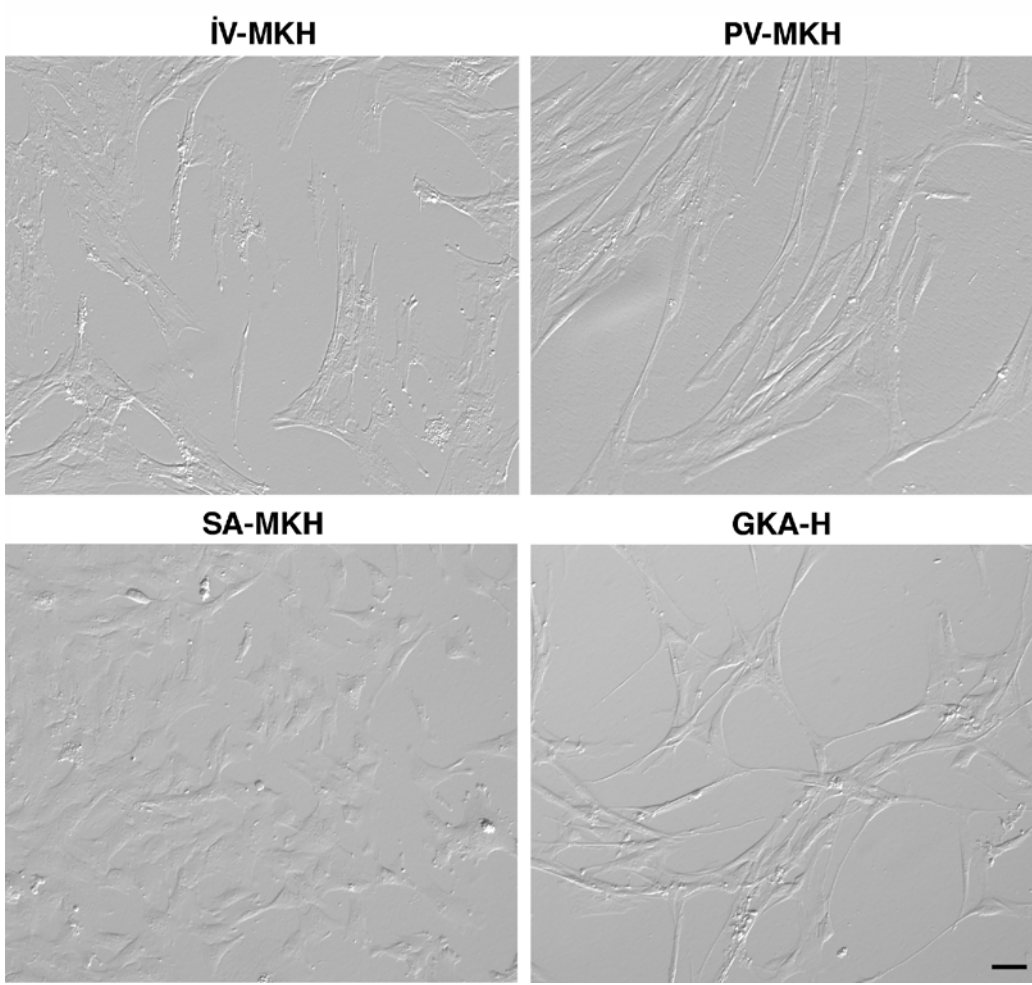
Üç farklı kordon dokusundan elde edilerek kültüre edilen hücrelerin genişleme potansiyelleri ve morfolojileri seri pasajlar yapılarak belirlendi. İV-MKH'leri 8. günde dokudan ayrılarak kültür kabında yayılmaya başladı. Bu yayılan hücrelerin %90'ının tip 2 hücre olarak adlandırdığımız ince uzun, fusiform yapıda ve fusiform çekirdekli, fibroblast benzeri hücreler olduğu, %10'unun ise büyük sitoplazmalı, yayvan, stres lifi bol olan tip 1 olarak adlandırdığımız hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. PV-MKH'leri 12. günde dokudan ayrılarak diğer doku gruplarına oranla daha geç kültür kabında yayılmaya başladı. Bu hücrelerin İV ye kıyasla daha küçük, daha az fusiform yapıda hücreler olduğu gözlemlendi. Tip 1 hücrelerin %10'un altında ortamda olduğu izlendi. SA-MKH'leri diğer doku gruplarına kıyasla en erken dokudan ayrılarak 6. günde kültür kabında yayılmaya başlayan grup olduğu belirlendi. Ayrıca eksplant kültür sırasında en fazla doku yapışması bu grupta gözlemlendi. Bu hücrelerin hücre morfolojileri incelendiğinde epiteloid görünümünde, bir

araya gelme eğiliminde hücreler olduğu ve tip 1 hücrelerin %1'den az varlığı izlendi. GKA hücreleri 9. günde dokudan ayrılarak kültür kabında yayılmaya başladı. Yayılan hücrelerin morfolojileri incelendiğinde aşırı uzun ince uzantılı, saf bir düz kas popülasyonu olduğu gözlemlendi (Şekil 5.1.2).



Şekil 5.2.1 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültürdeki P₀ hücre morfolojisi

SA-MKH'leri 6, İV-MKH'leri 8, GKA-H'leri 9, PV-MKH'leri 12. günde dokudan ayrılarak kültür kabında yayılmaya başladı. Dokudan ayrılarak kültür ortamına yayılan hücrelerin büyüme ve ayrılarak yayılma görünümü. Faz kontrast mikroskobu: Ölçek çubuğu 10 µm, P: Pasaj.



Şekil 5.2.2 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültürdeki P₁ hücre morfolojisi

İV-MKH'leri dokudan ayrıldıklarında hücre çoğunluğunun ince uzun, fusiform yapıda ve fusiform çekirdekli tip 2 hücre hücrelerden oluştuğu, az bir kısmının ise büyük sitoplazmalı tip 1 hücrelerden oluştuğu gözlenirken, PV-MKH'lerinin küçük fusiform yapıda hücreler olduğu, tip 1 hücrelerin ortamda az miktarda olduğu izlendi. SA-MKH'lerinin epitelioid görünümünde hücreler olduğu ve tip 1 hücrelerin %1'den az olduğu izlendi. GKA-H'lerinin saf bir düz kas popülasyonundan oluştuğu gözlemlendi. Faz kontrast mikroskobu: Ölçek çubuğu 10 µm, P: Pasaj.

Çizelge 5.2.2 İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinin eksplant kültürdeki P₁ hücre morfolojisi

Bölgeler	Hücre morfolojisi		
İV	Tip 1 %10	Tip 2 %90	
PV	Tip 1 <%10	Tip 2 >%90	İV ye göre küçük fusiform hücreler
SA	Tip 1 <%1	Tip 2 >%99	Epiteloid görünümde hücreler
GKA			Düz kas görünümünde ince, uzun hücreler

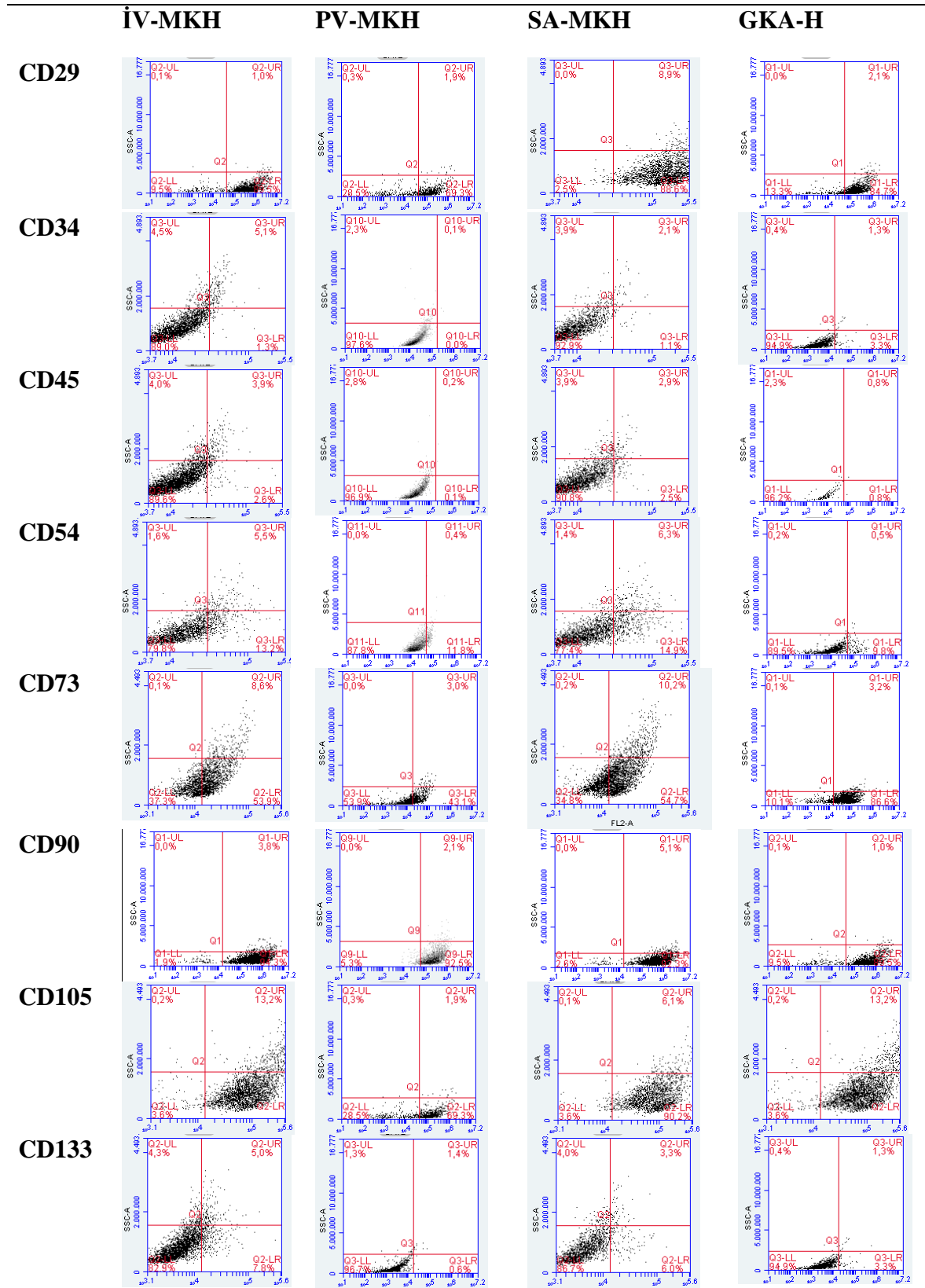
5.3. Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

Hücrelerin karakterinin belirlenmesi için akım sitometri yöntemi ile çeşitli hücre yüzey işaretleyicileri kullanıldı. Bu analiz sonucunda İV, PV, SA, GKA hücrelerinde belirlenen farklı hücre yüzey belirteçlerinin varlığı çizelge 5.3.1 ve 2’de gösterildi. MKH belirteçleri olan CD29, CD90, CD105 tüm gruplarda pozitif olarak bulunurken CD73’ün GKA hariç İV, PV, ve SA gruplarında zayıf pozitif olduğu gözlemlendi. MKH’lerde yapısal olarak düşük seviyede ifade edildiği bilinen CD54’ün bu hücre gruplarında da ifadesi düşük bulundu. Hematopoetik belirteç olan CD34 ve CD45’in tüm gruplarda negatif olduğu belirlendi. Kök hücre özelliğinin sürdürülebilmesinde farklılaşmayı baskılamada rol oynayan CD133 tüm gruplarda negatif olarak belirlendi.

Çizelge 5.3.1 İGK bölgelerinden elde edilen hücrelerdeki hücre yüzey belirteçlerinin düzeyi oransal (%) olarak verilmiştir

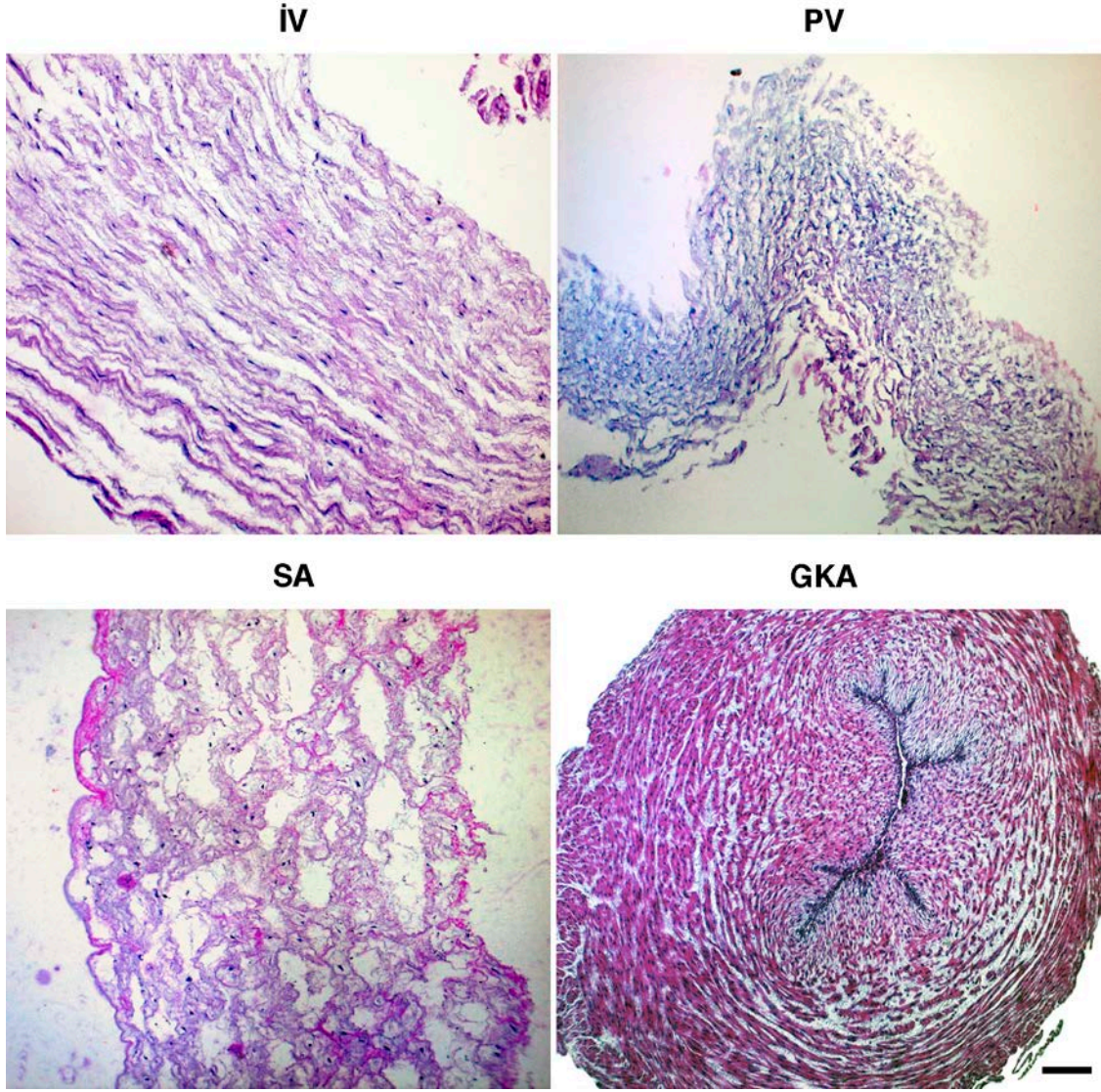
Hücre tipi	CD29	CD34	CD45	CD54	CD73	CD90	CD105	CD133
İV	93±4	4±1	3±1	15±2	56±5	97±5	94±3	10±2
PV	76±4	1,3±1	1,2±1	9±1	40±5	90±6	73±5	2±1
SA	96±4	3,5±2	3±1	14±2	58±6	93±5	90±3	7±1
GKA	90±5	3,6±2	1±1	9±3	83±6	93±4	83±4	5±1

Çizelge 5.3.2 İGK bölgelerinden elde edilen hücrelerin immünofenotipleri



5.4. Hücrelerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

İGK dokusunun İV, PV, SA ve GKA bölgeleri kordon dokusundan çıkarıldıktan sonra elde edilen doku bölmelerinin ilgili alanları temsil edip etmediğini tespit etmek için HE boyaması yapıldı (Şekil 5.4.1). SA bölgesinin bazal membran üzerine oturan ve tek katlı yassı-kübik epitel hücrelerinden ve bol hücrelerarası sıvı içeren, dağınık ve ince kollajen lif demetleriyle çevrili az sayıda stroma hücresinden oluştuğu izlendi. İV bölgesinin diğer bölgelere kıyasla daha çok alan kapladığı izlendi. Bu bölgede bulunan stroma hücrelerinin arasında kalın lif demetleri gözlemlendi. PV bölgesinde ise dar sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin daha sıkışık bir alanda bulunduğu izlendi. GKA'nin iç ve dış elastik laminadan yoksun olduğu ve değişik yönelimli düz kas lifleri içeren kalın bir tabakadan oluştuğu izlendi. Boyama sonucunda elde edilen doku parçalarında diğer doku bölgelerine ilişkin bir doku parçası bulunmadı.

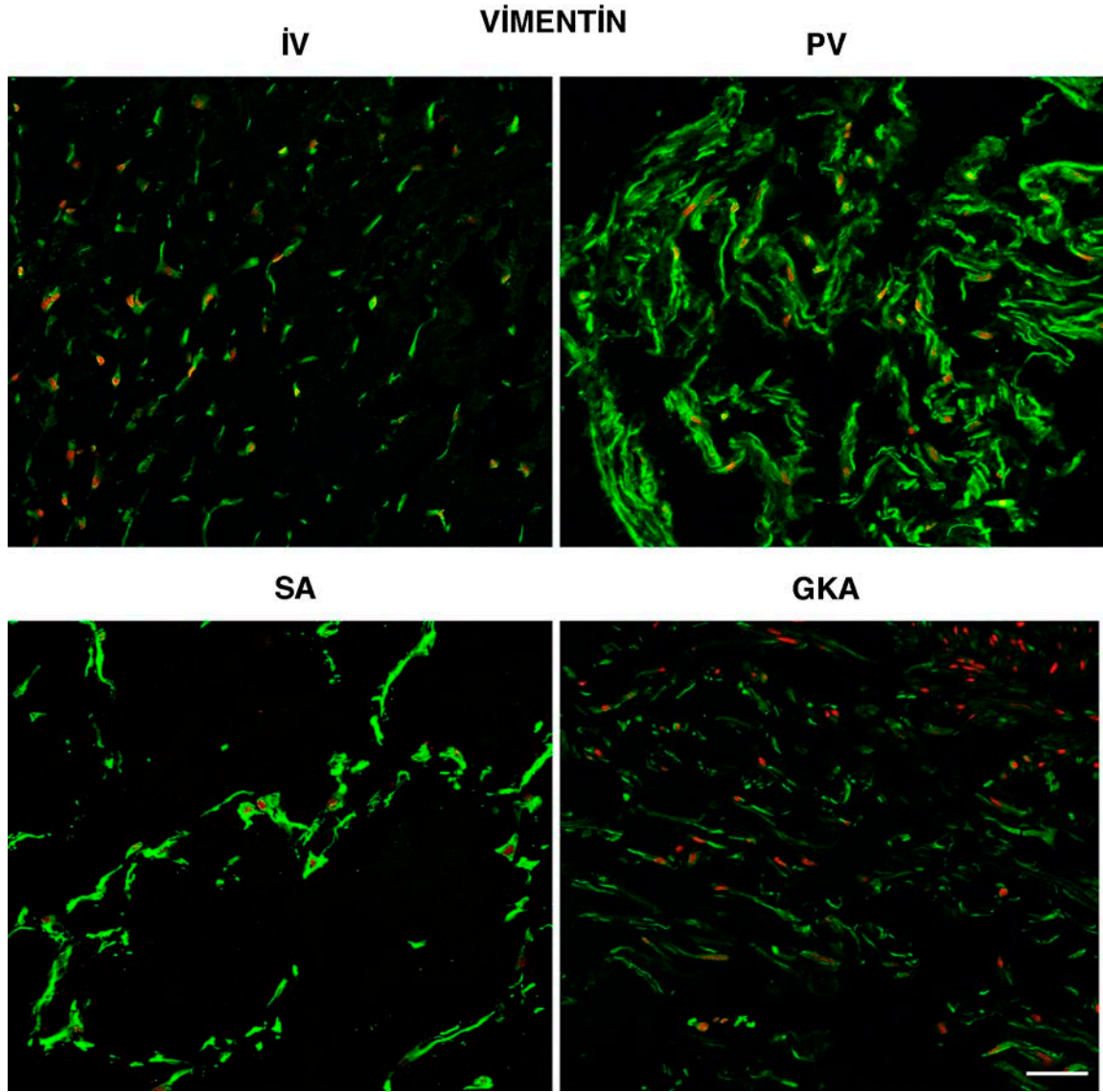


Şekil 5.4.1 İGK dokusundan mekanik olarak çıkarılan İV, PV, SA ve GKA bölgeleri izlenmektedir

Elde edilen doku parçalarında diğer doku bölgelerine ilişkin bir doku parçası bulunmamaktadır. Işık mikroskobu: Ölçek çubuğu 10 µm.

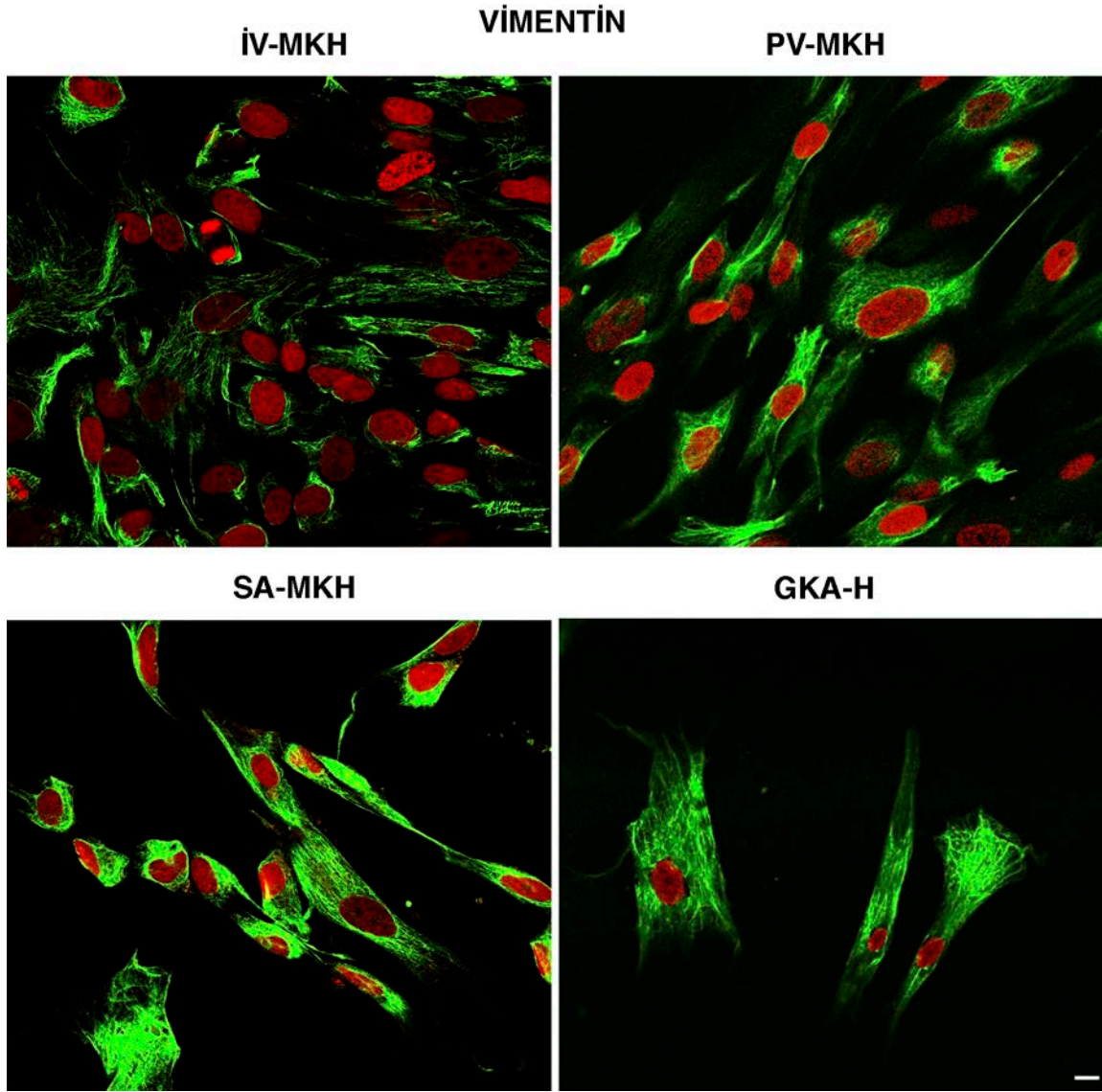
Çalışmanın bu aşamasında İGK dokusunun İV, PV, SA ve GKA bölgelerinde bulunan hücrelerin ve İV, PV, SA ve GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin sahip olduğu yapısal bazı proteinlerin hücre içindeki varlığı ve yaygınlığı immünflüoresan işaretleme sonrası konfokal mikroskobu yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar Şekil 5.4.2.-5.4.11.'te özetlenmiştir.

MKH belirteci olan ve hücre de ara filaman olarak görev yapan vimentin tüm doku bölgelerinde bulunan hücrelerde yaygın halde izlendi (Şekil 5.4.2). Bölgelerden izole edilerek kültür ortamına alınan hücrelerde ise hücre tipi ayırmaksızın tüm gruplardaki hücrelerde sitoplazmada yaygın halde dağıldığı ve kuvvetli pozitif olduğu izlendi (Şekil 5.4.3). Bir diğer hücrede ara filaman olarak görev yapan endo/ektodermal bir belirteç olan sitokeratin (tip 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 ve 19) İV ve PV bölgelerinde pozitif olarak izlendi. SA bölgesinin amniyon epitelinde pozitivite izlenirken, epitel altında pozitiviteye rastlanmadı. Sitokeratin GKA bölgesinde zayıf pozitif olarak gözlemlendi (Şekil 5.4.4). Bölgelerden izole edilerek kültür ortamına alınan hücrelerde sitokeratin incelendiğinde, İV-MKH'lerinde sitokeratin varlığı gözlemlendi. PV-MKH'lerinde erken pasajlarda bir grup hücrede zayıf pozitif olduğu pasajlar ilerledikçe tüm hücrelerde pozitivite gösterdiği saptandı. SA-MKH'lerinde küçük hücrelerde zayıf pozitif olduğu, GKA-H'lerinde de zayıf pozitivite gösterdiği belirlendi (Şekil 5.4.5). Kontraktıl proteinler olan desmin ve α -SMA bakımından incelendiğinde, α -SMA'nın tüm bölgelerde pozitif olduğu, İV bölgesinde diğer bölgelere göre daha az ifadelendiği saptandı (Şekil 5.4.6). Bu bölgelerden izole edilerek kültür ortamına alınan hücrelerde, α -SMA'nın İV-MKH, PV-MKH, SA-MKH'lerinde sitoplazması geniş hücrelerde olduğu, fakat küçük hücrelerde var olmadığı izlendi. GKA-H'lerinde ise çoğu hücrede mevcuttu (Şekil 5.4.7). Desminin PV, SA, GKA bölgelerinde pozitif olduğu izlenirken İV bölgesinde negatif olduğu gözlemlendi (Şekil 5.4.8). Bölgelerde bulunan hücrelerin izole edilerek kültür ortamına alınmasıyla desminin GKA-H'lerinin haricinde hiç bir hücrede var olmadığı gözlemlendi (Şekil 5.4.9). Endotel hücrelerinde ve MKH'lerde varlığı bilinen CD146'nın kordon dokusunda sadece PV ve GKA bölgelerinde bulunduğu gözlemlendi (Şekil 5.4.10). Bölgelerde bulunan hücrelerin izole edilerek kültür ortamına alınmasıyla CD146'nın İV-MKH, SA-MKH'lerinde var olmadığı, PV-MKH ve GKA-H'lerinde ise zayıf pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 5.4.11).



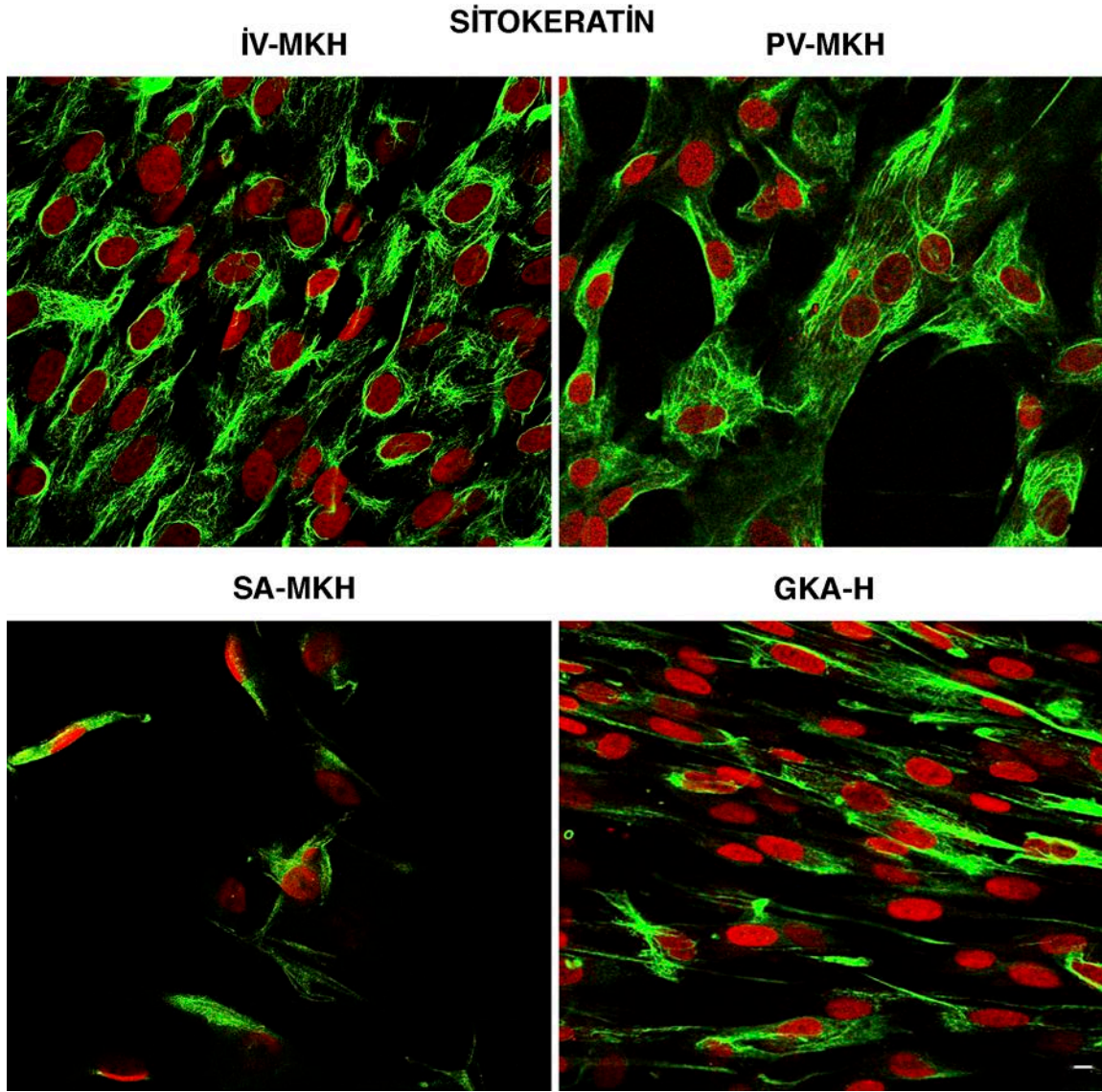
Şekil 5.4.2 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde vimentin filamanlarının değerlendirilmesi

İV, PV, SA, GKA doku bölgelerinde çekirdekler (kırmızı), vimentin (yeşil) ara filaman proteini tüm bölgelerde gözlemlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 50 μ m.



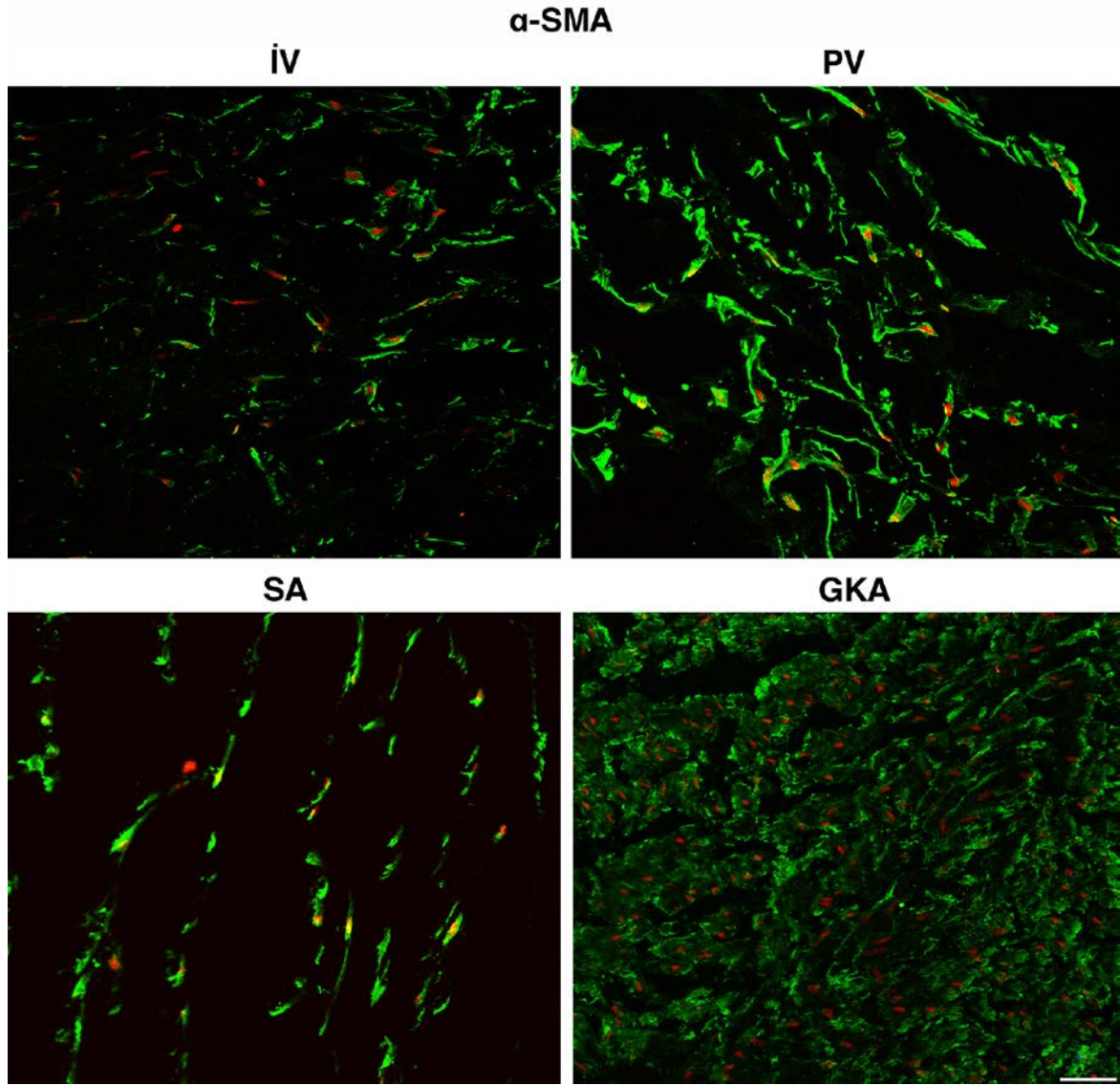
Şekil 5.4.3 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin vimentin molekülünce değerlendirilmesi

Kültüre edilen hücrelerde vimentinin (yeşil) hücre tipi ayırmaksızın tüm hücre gruplarında varlığı gözlemlendi, çekirdekler (kırmızı). Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 10 μm .



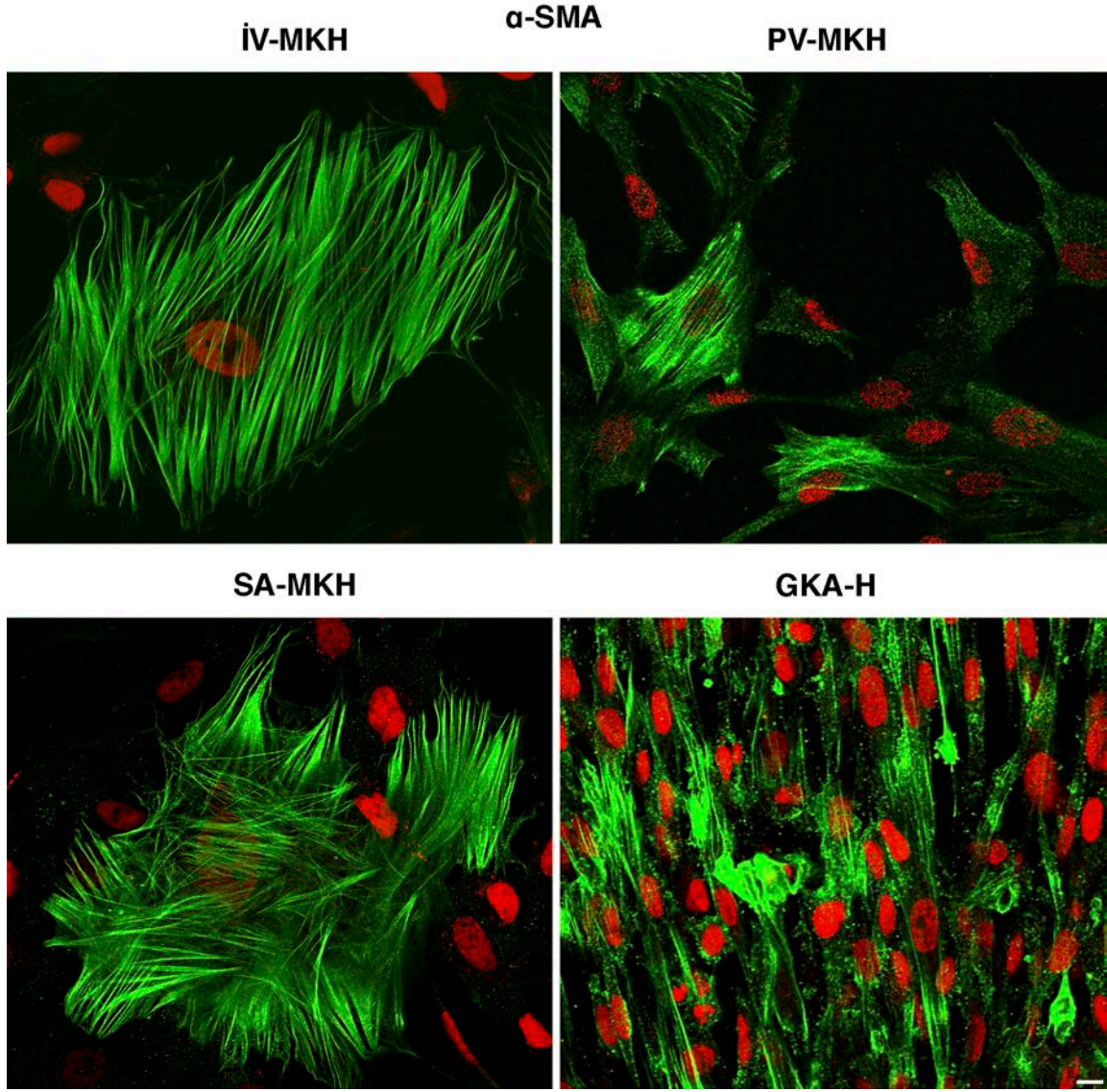
Şekil 5.4.5 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin sitokeratin molekülüne değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), sitokeratinin (yeşil) İV-MKH'lerinin hepsinde, PV-MKH'lerinde ise erken pasajlarda bir grup hücrede zayıf pozitif olduğu pasajlar ilerledikçe tüm hücrelerde pozitif olduğu saptandı. SA-MKH'lerinde küçük hücrelerde zayıf pozitif iken, GKA-H'lerinde zayıf pozitivite belirlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 10 µm.



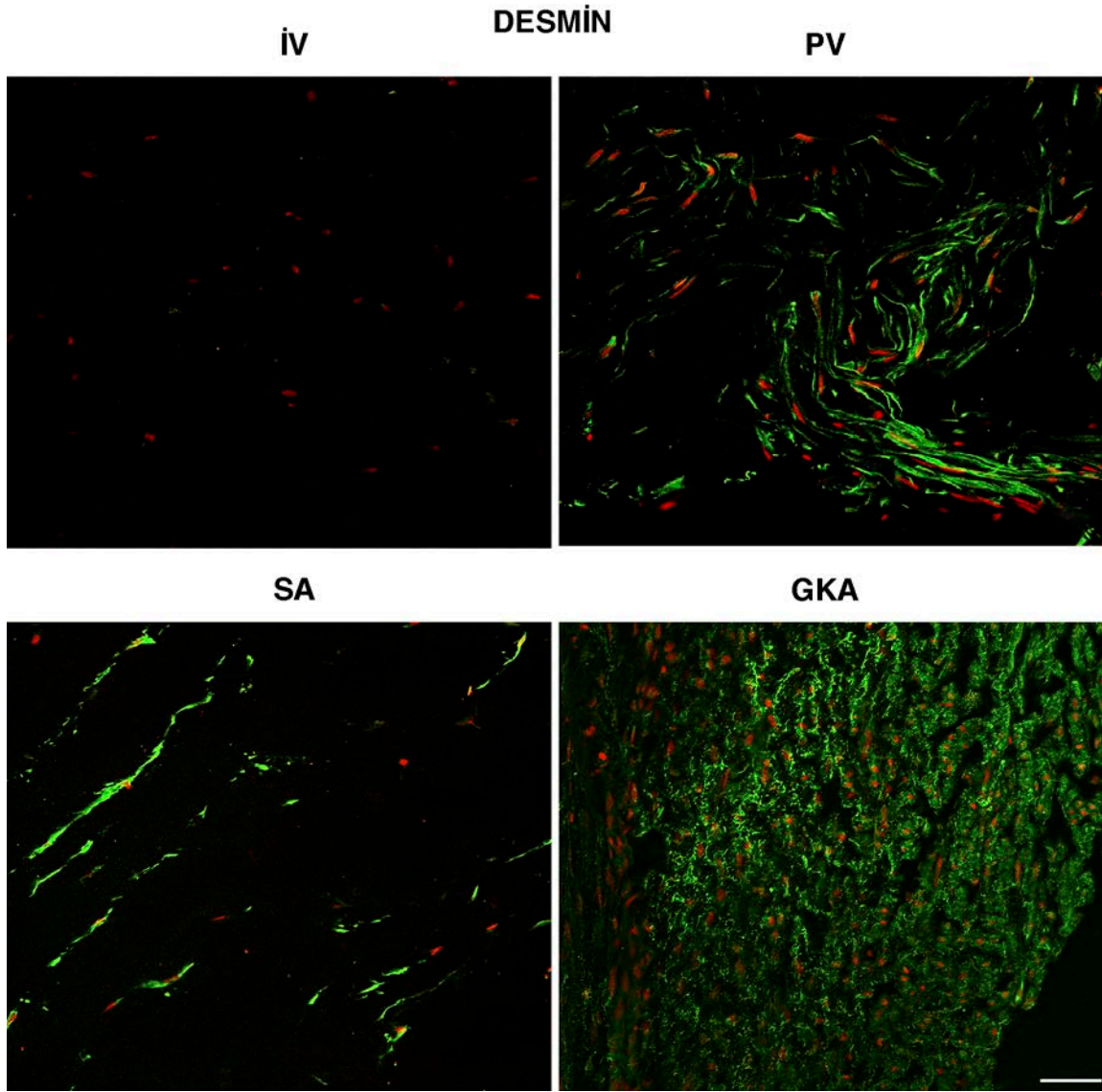
Şekil 5.4.6 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde α -SMA molekülünün değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), α -SMA (yeşil) İV bölgesinde diğer bölgelere göre daha az görülürken, diğer tüm bölgelerde pozitif olduğu izlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 50 μ m.



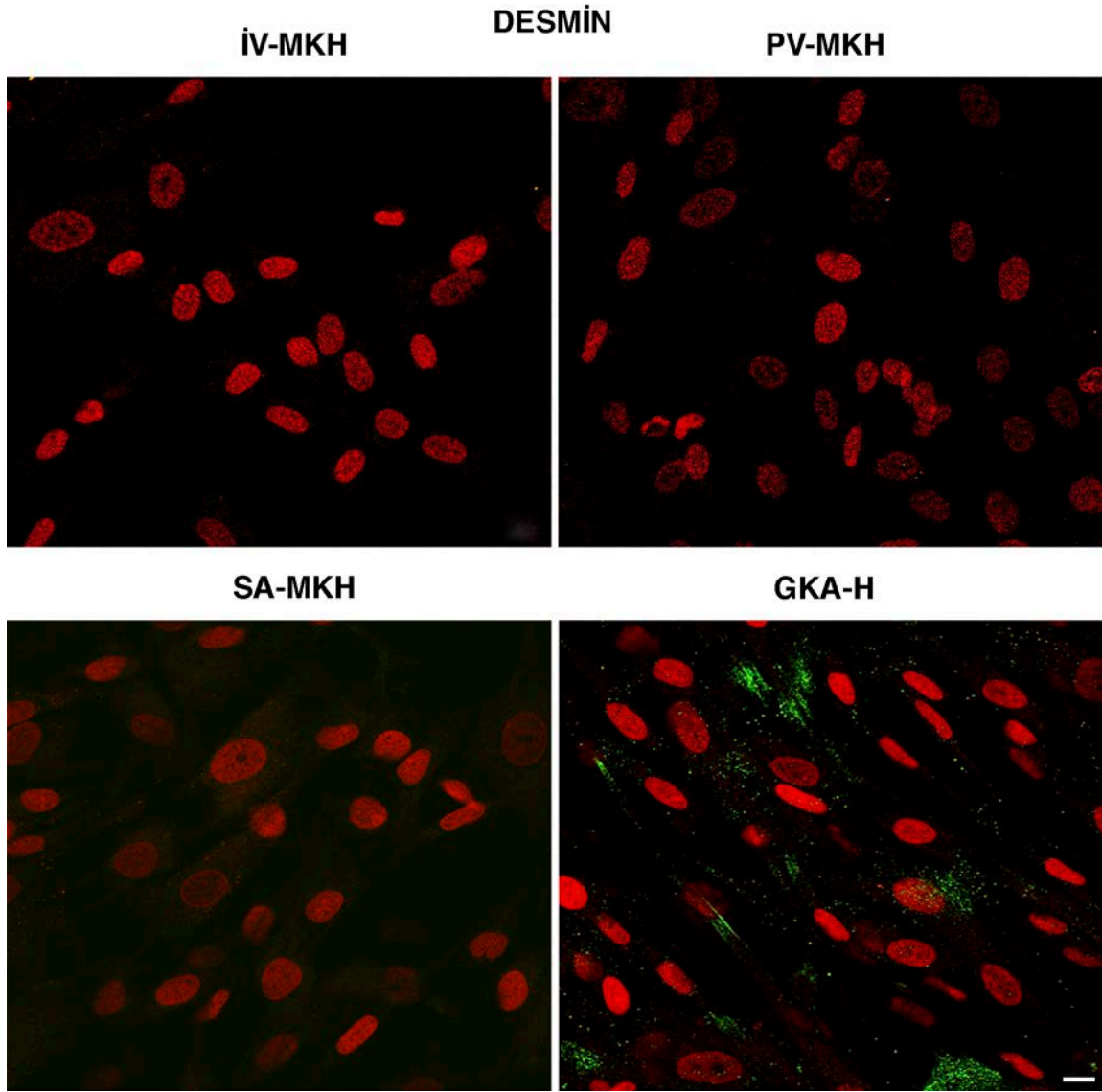
Şekil 5.4.7 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin α -SMA molekülünce değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), α -SMA (yeşil) İV-MKH, PV-MKH, SA-MKH'lerinde sitoplazması geniş hücrelerde gözlenirken, küçük hücrelerde var olmadığı izlendi. GKA-H'lerinde ise çoğu hücrede pozitif. Konfokal mikroskopu: Ölçek çubuğu 10 μ m.



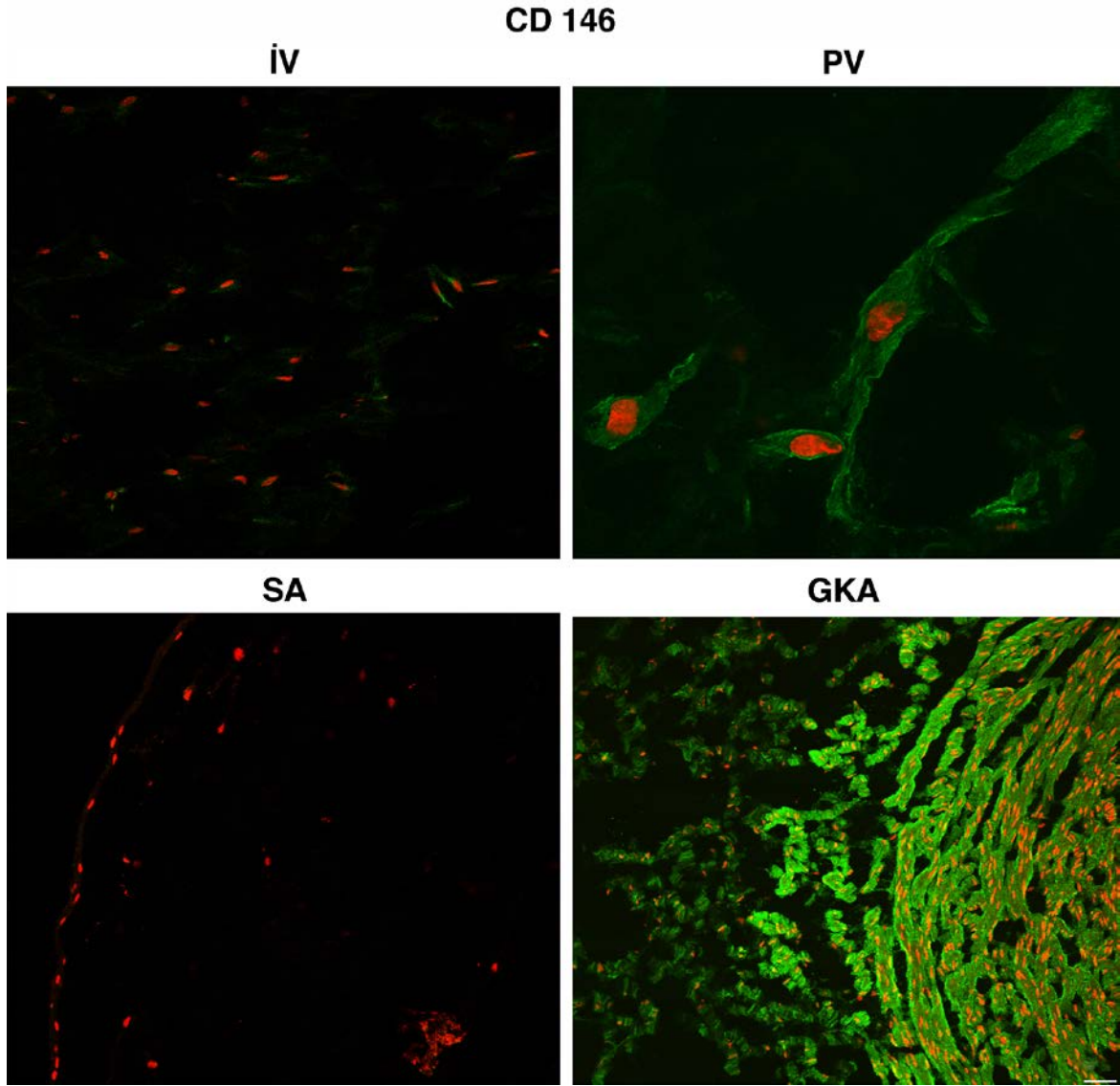
Şekil 5.4.8 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinde desmin filamanlarının değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), desmin (yeşil) PV, SA, GKA bölgelerinde pozitif iken, İV bölgesinde negatif olduğu gözlemlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 50 µm.



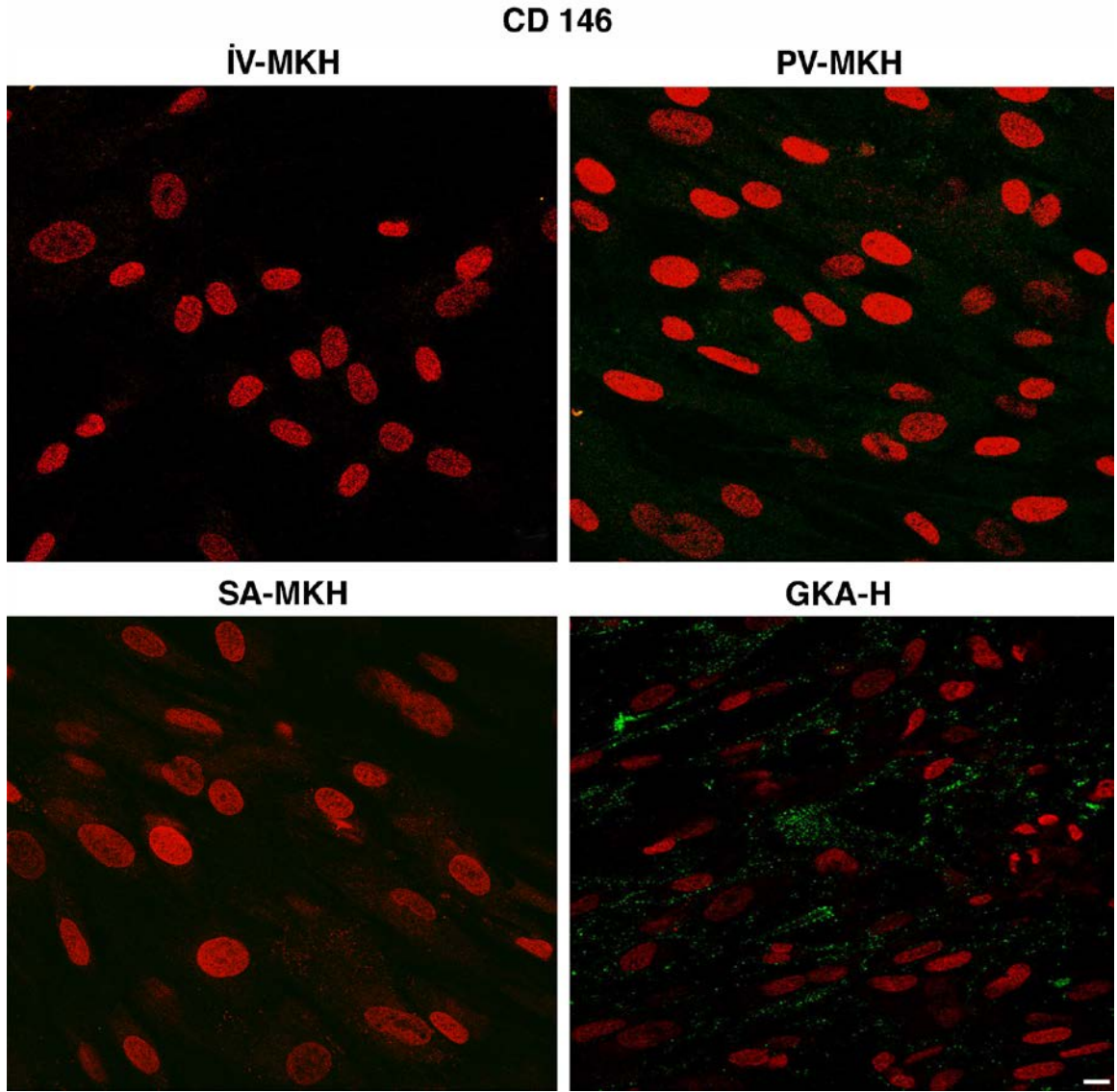
Şekil 5.4.9 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin desmin molekülünce değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), desminin (yeşil) GKA-H'leri dışında hiç bir grupta varlığı izlenmedi. Konfokal mikroskopu: Ölçek çubuğu 10 μ m.



Şekil 5.4.10 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen doku kesitlerinin CD146 molekülünce değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), CD 146 (yeşil) PV ve GKA bölgesinde izlenirken, diğer bölgelerde negatifti. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 50 µm.



Şekil 5.4.11 İV, PV, SA ve GKA bölgelerinden izole edilerek kültüre edilen hücrelerin CD146 molekülünce değerlendirilmesi

Çekirdekler (kırmızı), CD146'nın (yeşil) İV-MKH, SA-MKH'lerinde varlığı gözlenmezken, PV-MKH ve GKA-H'lerinde ise zayıf pozitif olduğu gözlemlendi. Konfokal mikroskopu: Ölçek çubuğu 10 µm.

Çizelge 5.4.1. Yapısal moleküllerin İV, PV, SA, GKA dokularında ve hücrelerindeki dağılımı

Yapısal moleküller	Bölgeler	İV	PV	SA	GKA
Vimentin	<i>Doku</i>	+	+	+	+
	<i>Hücre</i>	+	+	+	+
Sitokeratin	<i>Doku</i>	+	+	Epitel +	±
	<i>Hücre</i>	+	P ₁ 1 grup + P ₃ Hepsi +	SKH +	±
α-SMA	<i>Doku</i>	±	+	+	+
	<i>Hücre</i>	SGH + SKG -	SGH + SKG -	SGH + SKG -	+
Desmin	<i>Doku</i>	-	±	±	+
	<i>Hücre</i>	-	-	-	±
CD146	<i>Doku</i>	-	+	-	-
	<i>Hücre</i>	-	±	-	±

± zayıf pozitif, + pozitif, - negatif, SGH; sitoplazması geniş hücre, SKH; sitoplazması küçük hücre, P; pasaj

5.5. Hücrelerde Yapısal Gen İfadelerinin İncelenmesi

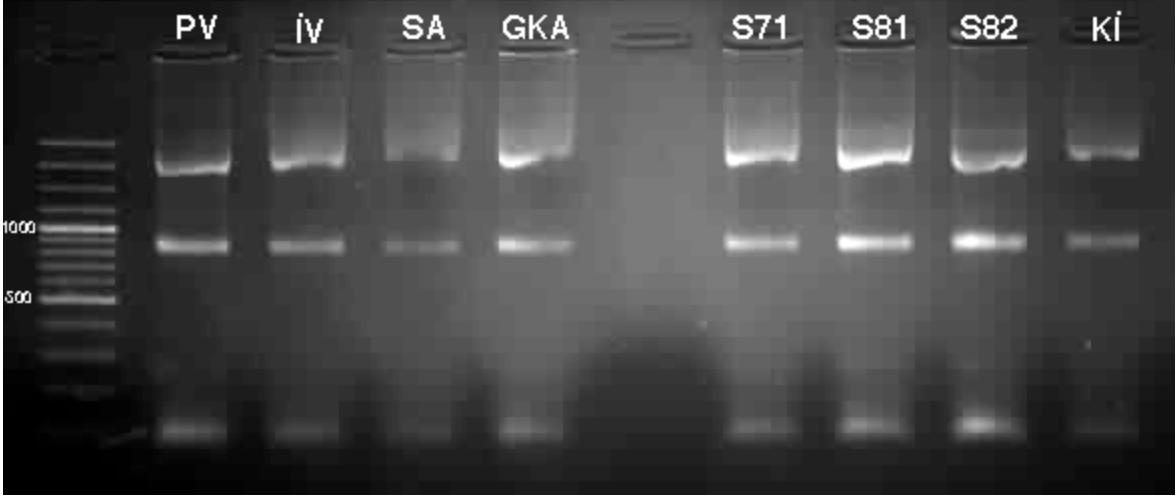
Üç farklı kordondan elde edilen P₁ hücrelerinin (S71P₁-S81P₁-S82P₁) kültür ortamındaki ikili tekrarlarından (S72P1PV-1/2) izole edilen RNA'lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere agaroz jel elektroforezi %1 Agaroz jel ile incelendi (Şekil 5.5.1.), derişimleri Nanodrop ND-1000 cihazında ölçüldü (Çizelge 5.5.1.).

Çizelge 5.5.1 Deneylerde kullanılan örneklerin RNA derişimleri

Örnek	ng/μL	260/280
S71P1	156,33	1,98
S81P1	133,15	1,93
82P1	150,46	1,97
S72P1PV-1	306,63	1,99
S72P1PV-2	122,83	1,9
S81P1PV-1	103,78	1,93
S81P1PV-2	128,01	1,91
S82P1PV-1	378,08	1,93
S82P1PV-2	696,1	1,96
S72P1İV-1	370,62	1,95
S72P1İV-2	416,03	1,96
S81P1İV-1	218,91	2
S81P1İV-2	271,07	1,99
S82P1İV-1	362,62	1,97
S82P1İV-2	171,17	1,99
S72P1SA-1	456,65	1,98
S72P1SA-2	528,38	2,02
S81P1SA-1	295,47	2
S81P1SA-2	125,31	1,84
S82P1SA-1	192,18	1,92
S82P1SA-2	365,66	1,97
S72P1GKA-1	429,42	1,95

S72P1GKA-2	419,99	1,93
S81P1GKA-1	586,5	1,8
S81P1GKA-2	407,93	1,99
S82P1GKA-1	166,1	1,95
S82P1GKA-2	286,38	1,98

S; örnek (sample), P; pasaj

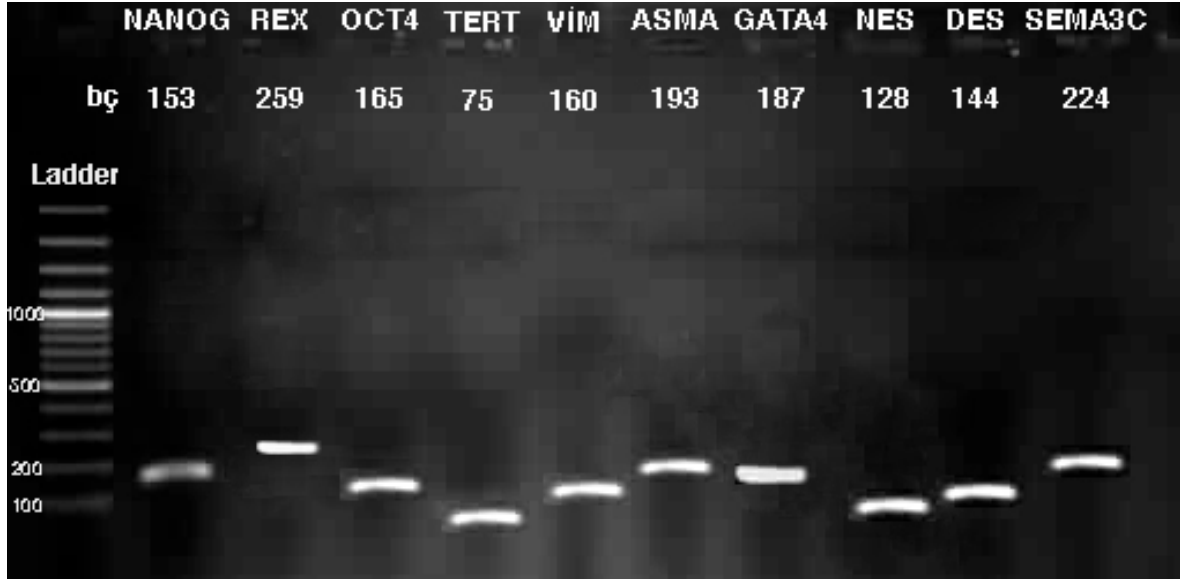


Şekil 5.5.1 Örnek RNA'larının agaroz jel görüntüsü

S; örnek (Sample) Kİ; kemik iliği

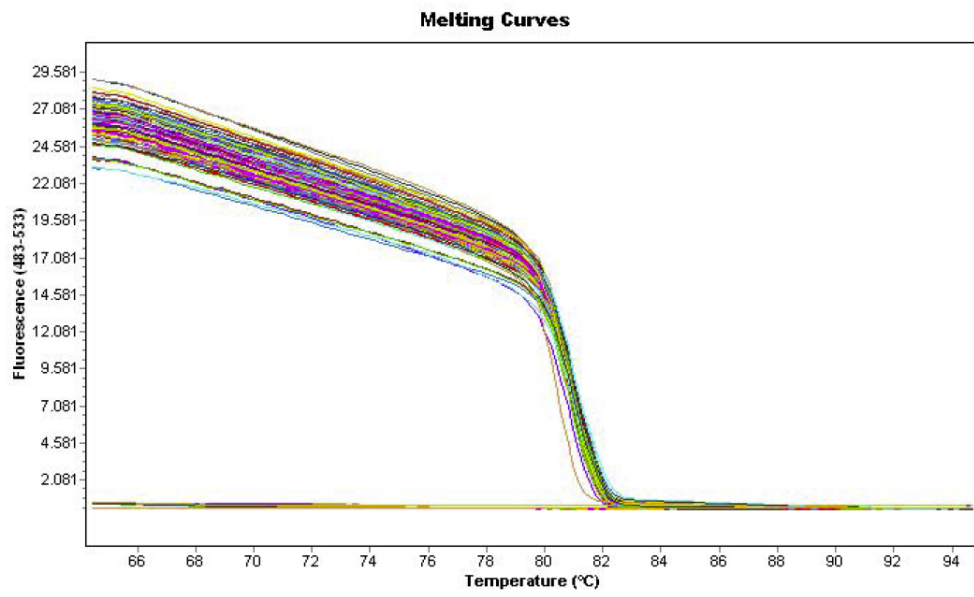
İGK-MKH, İV, PV, SA, GKA bölgelerinde bulunan MKH'lerin ve Kİ-MKH'lerinin sahip oldukları kök hücre pluripotensi belirteçleri 1. pasajın sonunda QRT-PCR yöntemi kullanarak karşılaştırıldı. Bu çalışmada farklılaşmamış kök hücreleri belirlemek için bazı kök hücre pluripotent belirteçler ve bazı erken dönem farklılaşma belirteçleri kullanıldı. Bu çalışmada iyi bilinen ve çok çalışılmış bir MKH olan Kİ-MKH'leri Kalibratör/kontrol grubu olarak kullanıldı. Üç hastadan alınan kordon dokusundan (S71, S81, S82) izole edilen İV, PV, SA ve GKA-H'leri kültür ortamında iki tekrarlı olarak, QRT-PCR'da 3 teknik tekrarlı olarak analiz edildi. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 5.5.2), ürünlerin istenilen gen bölgesine özgü olduğu gözlemlendi. Amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi analizi yapıldığında primer dimeri olmadığı ve ürünlerin özgül olduğu gözlemlendi (Şekil 5.5.3-A-B-C). Kantitasyon aşamasında, örneklerin Cp değerlerinin regresyon eğrisi (standart eğri) (Şekil 5.5.3-D) üzerinde hangi

atfedilen değeri (Çizelge 5.5.2) temsil ettiklerine bakılarak Pfaffl yöntemi kullanılarak bağıl bir miktar belirlendi. Kİ-MKH'lerine göre kat artışları Çizelge 5.5.3'de verildi. Farklılaşmamış insan EKH belirteci olan Nanog, Rex1, Oct4 ve TERT ifadelerine bakıldığında, her gen için bölgeler içi biyolojik tekrarlar Wilcoxon testi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı izlendi. Her gen için bölgeler arası karşılaştırma ise Friedman testi ile gerçekleştirildi.

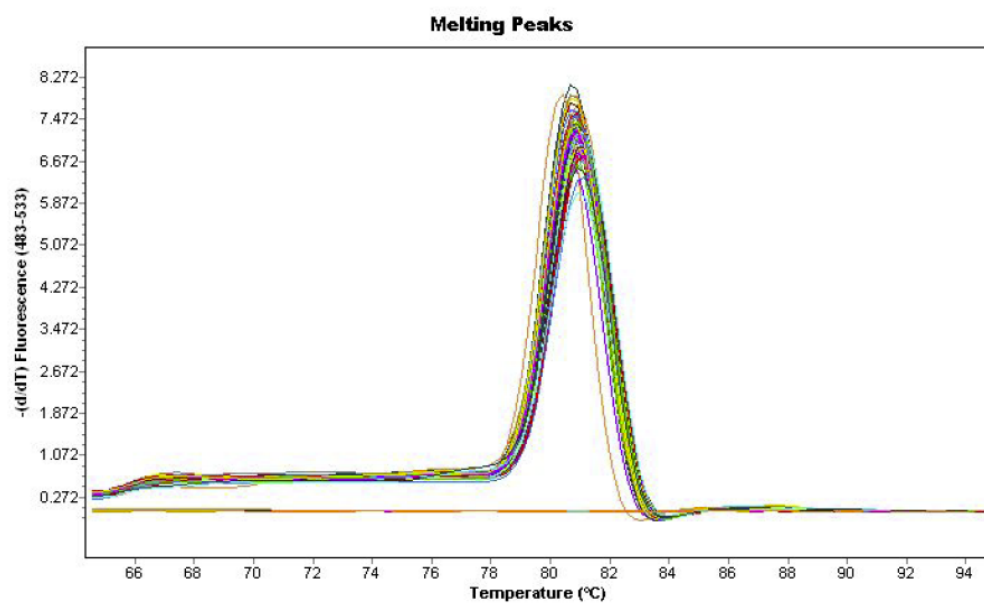


Şekil 5.5.2 İfadesi incelenen genlerin agaroz jel görüntüsü

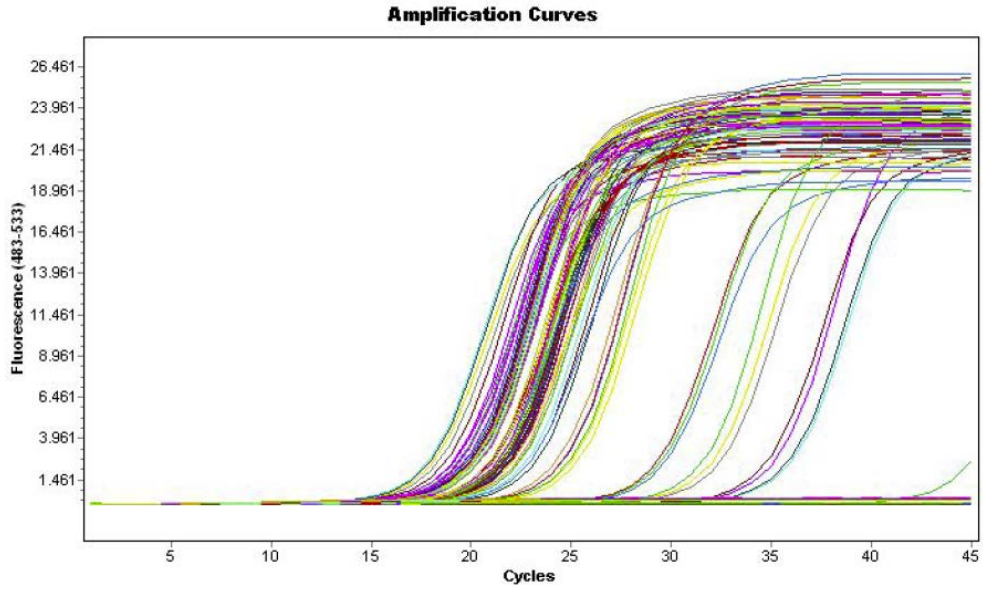
A



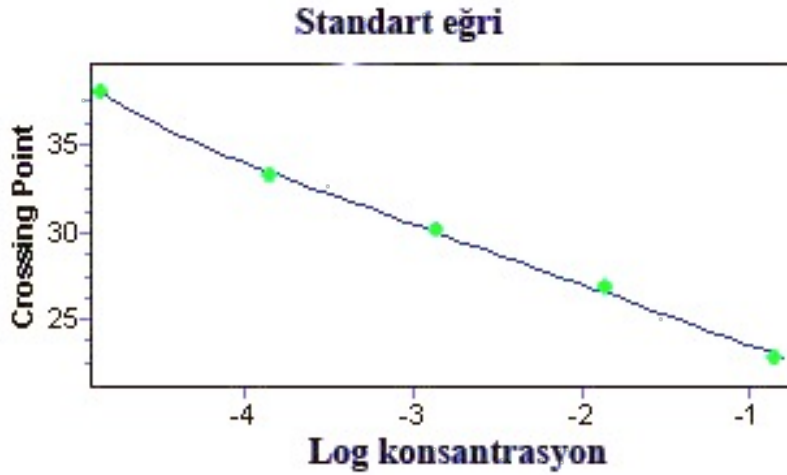
B



C



D



Şekil 5.5.3 İfadesi QRT-PCR yöntemiyle incelenen genlerin erime, amplifikasyon ve standart eğrileri.

Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca interkale olan boya serbest kaldığı için ölçülen floresan miktarı azalmaya başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden (A), (B) yararlanılarak amplifikasyonun özgülüğü belirlenmiştir. Örneklerin amplifikasyon eğrisi (C) ve Cp değerleri (yatay eksen) gösterilmiştir. İGK-MKH'lerin 1 ile 1/32 arasında hazırlanan cDNA miktarlarının seri dilüsyonları ile oluşturulan standart eğrinin eğimine göre hesaplanan amplifikasyon verimliliği 1,9'dur (D).

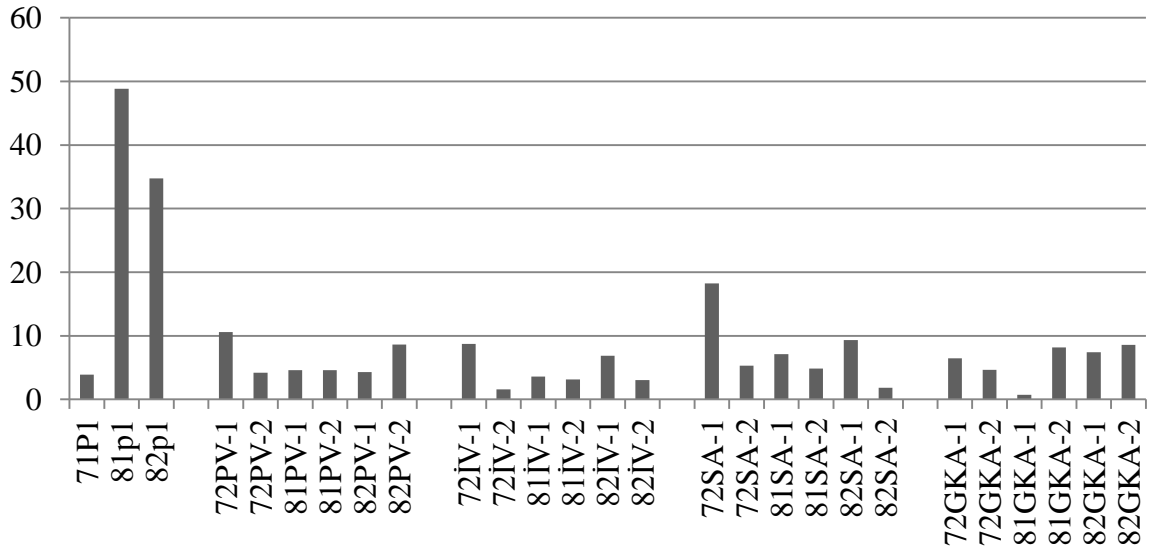
Çizelge 5.5.2 İfadesi QRT-PCR yöntemiyle incelenen genlerin amplifikasyon verimliliği(E)

Genler	E
Nanog	2
Rex1	1,82
Oct4	1.89
TERT	2
Vimentin	2
α -SMA	1.95
GATA4	1.99
Nestin	1.99
Desmin	1.86
SEMA3C	2
RPL13A	1,82

İGK-MKH'lerinde PV, İV, SA, GKA-H'lerine oranla Nanog ifadesinin daha fazla olduğu izlendi. Diğer bir belirteç olan Rex1'in ifadesine bakıldığında İGK-MKH'lerinde en fazla artışa rastlanırken bunu PV ve SA-MKH'leri benzer artış miktarıyla izledi ve en az artışı İV-MKH'leri gösterdi. Bir diğer EKH/pluripotent belirteci olan Oct4 ifadesi İGK-MKH'lerinde en fazla artış gözlenirken SA, ve GKA-H'lerindeki artış PV ve İV-MKH'lerinde fazlaydı. EKH'ler de ifade edildiği bilinen telomerin uzamasından sorumlu olan bir diğer kök hücre olma belirteci olan TERT geni ifadesine baktığımızda İGK-MKH'lerinde en yüksek artışı gözlerken bunu GKA, PV, SA ve İV-MKH'lerinin izlediği görüldü (Şekil 5.5.4). Tüm EKH ve pluripotent olmayla ilişkili genlerin Kİ-MKH'lerine göre daha fazla ifade edildiği saptandı.

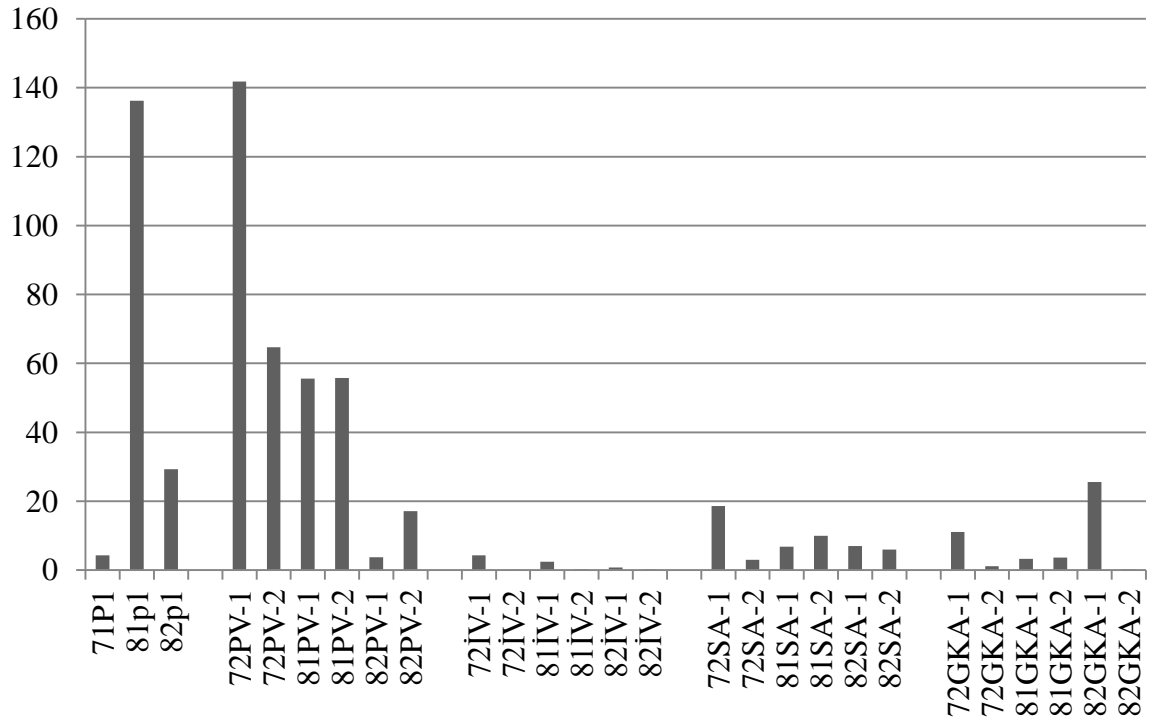
Kat artışı

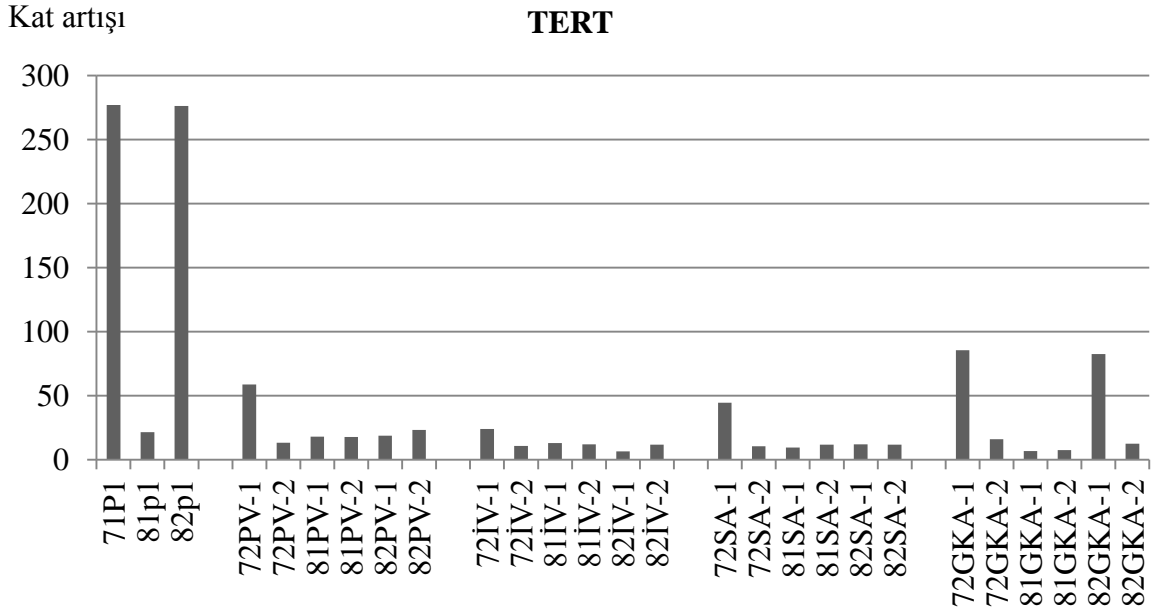
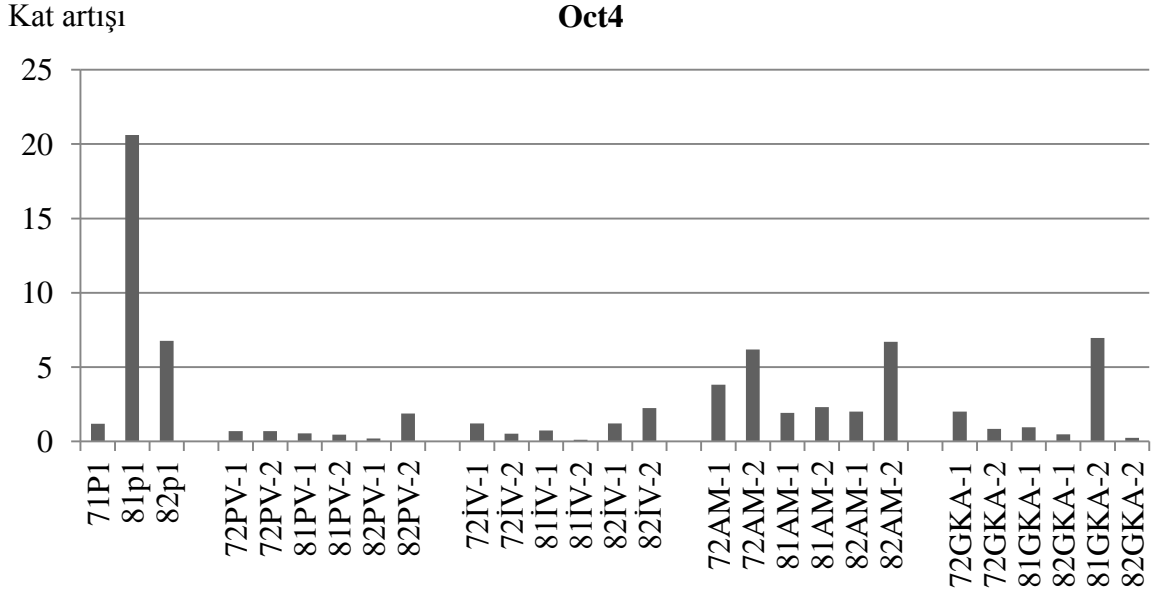
NANOG



Kat artışı

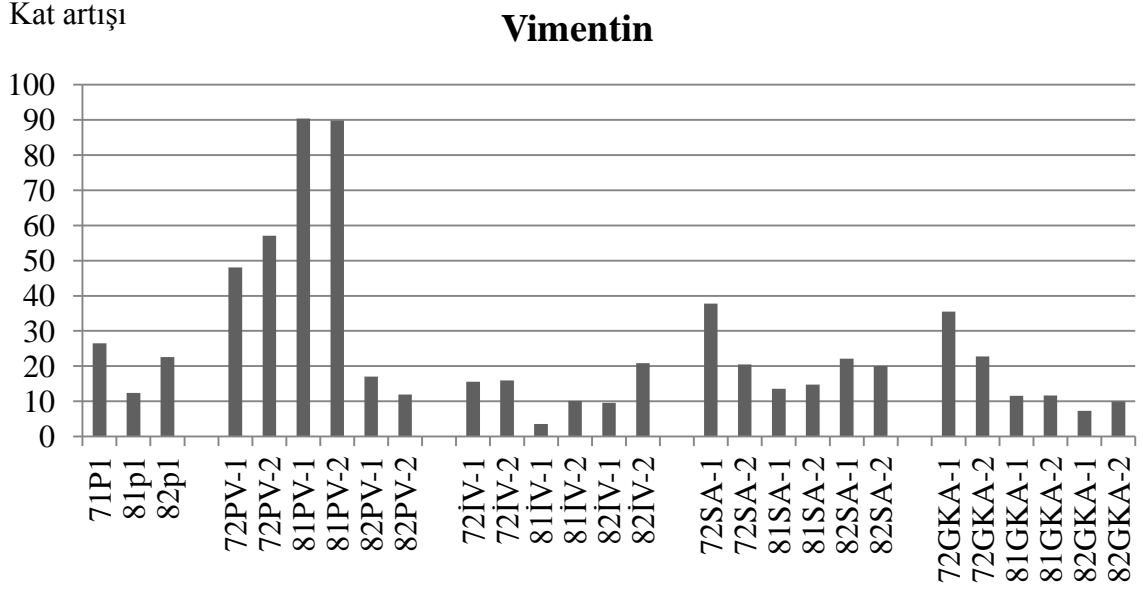
Rex-1





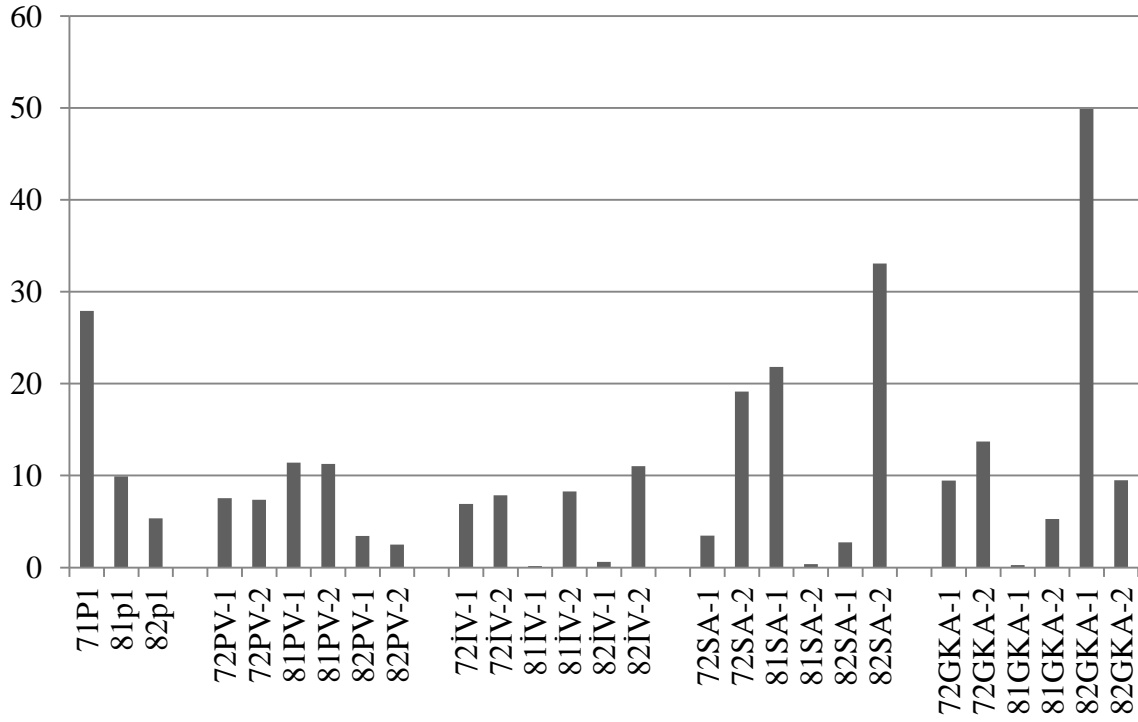
Şekil 5.5.4 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen insan EKH belirteçleri olan Nanog, Rex1, Oct4 ve TERT ifadeleri

Mezenkimal hücreleri saptamada bir belirteç olarak kullanılan vimentin ve α -SMA ifadesi hücrelerde incelendiğinde, vimentin ifadesin PV-MKH'lerinde en fazla görüldü daha sonra sırasıyla İGK-MKH, SA-MKH, GKA-H, İV-MKH'lerde saptandı. α -SMA ifadesinin diğer gruplara göre GKA-H'lerinde biraz daha yüksek olduğu görülürken bu ifadeyi eşit miktardaki ifadeyle diğer gruplar izledi (Şekil 5.5.5).



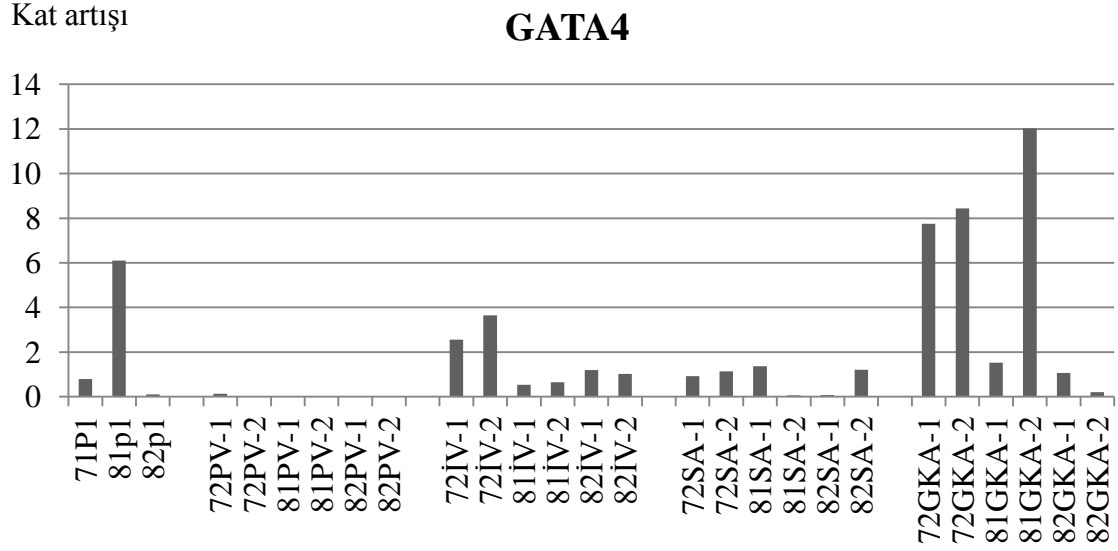
Kat artışı

α -SMA



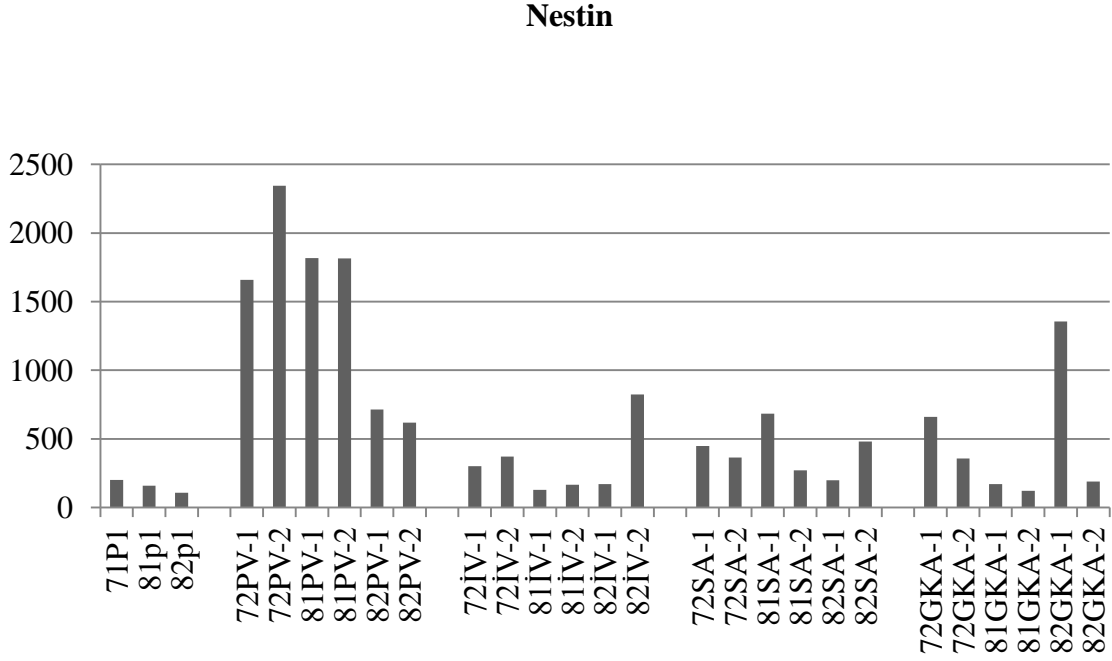
Şekil 5.5.5 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen mezenkimal bir belirteç olan vimentin ve α -SMA'nın ifadesi

Endodermal yönde farklılaşmanın belirteci olarak seçilen GATA4 geni ifadesi GKA-H'lerinde en yüksek seviyede gözlenirken, bunu İV-MKH, İGK-MKH, SA-MKH, PV-MKH'leri izledi (Şekil 5.5.6).



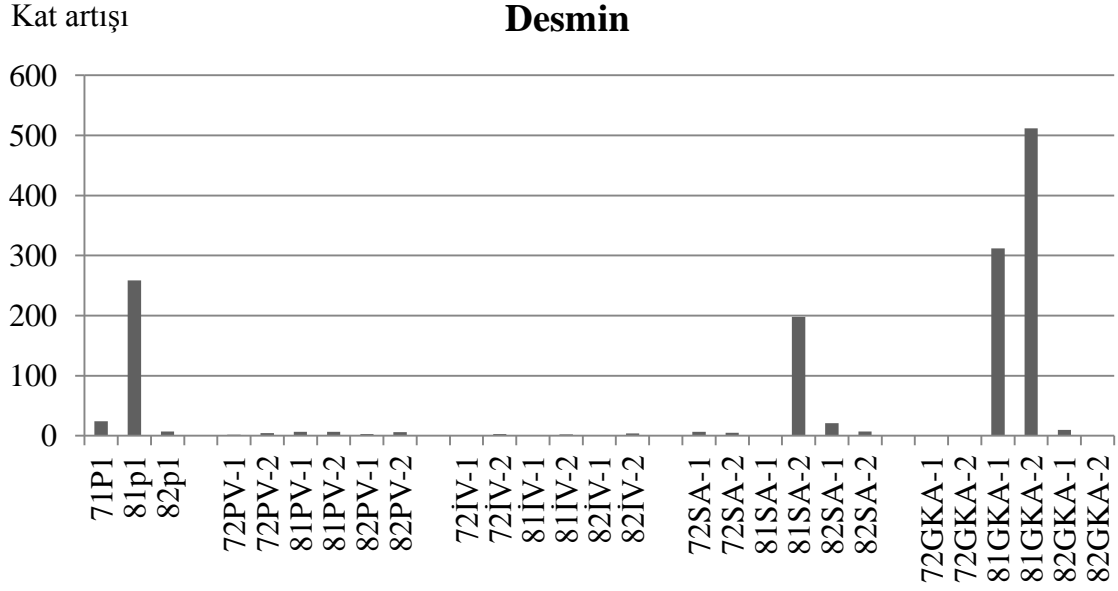
Şekil 5.5.6 İGK-MKH ve PV, İV, SA, GKA-H'lerinde ifade edilen endodermal bir belirteç olan GATA4 ifadesi

Ektodermal ya da nöronal yönde farklılaşmamın belirteçlerinden biri olan nestin ifadesinin PV-MKH'lerinde anlamlı bir farkla öne çıktığı gözlenirken bu ifadeyi SA-MKH, GKA-H, İV-MKH aralarında ifade farkı olmadan izlerken en az ifadeyi İĞK-MKH'leri gösterdi (Şekil 5.5.7).



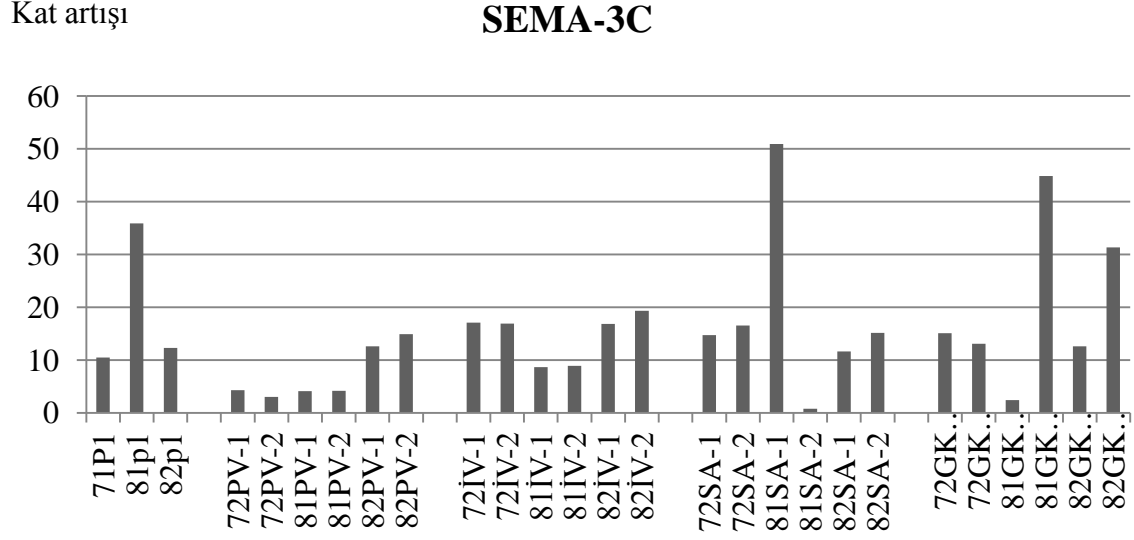
Şekil 5.5.7 İĞK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen ektodermal bir belirteç olan Nestin ifadesi

Mezodermal ya da kas yönünde farklılaşmanın belirteçlerinden biri olan Desmin ifadesinin sadece bir hasta örneğinin GKA-H, SA-MKH, İĞK-MKH'lerinde ifade edildiği gözlemlendi (Şekil 5.5.8).



Şekil 5.5.8 İĞK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen mezodermal bir belirteç olan desmin ifadesi

Tümör hücrelerini hedeflemede rolü olduğu düşünölen SEMA3C ifadesinin tüm gruplarda birbirleri arasında anlamlı bir fark olmadan ifade edildiği saptandı (Şekil 5.5.9).



Şekil 5.5.9 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH, GKA-H'lerinde ifade edilen SEMA3C

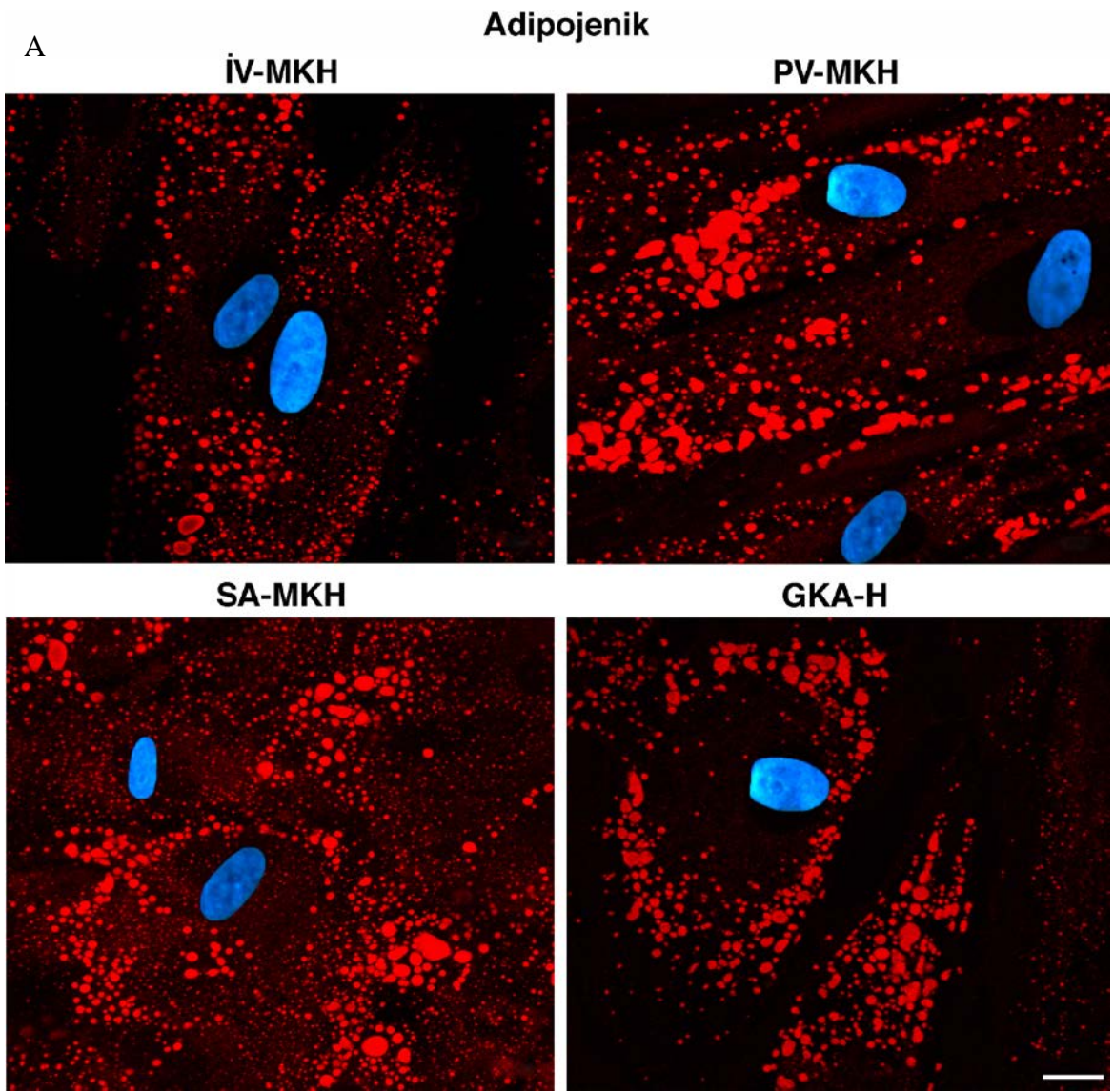
Çizelge 5.5.3 İGK-MKH ve PV-MKH, İV-MKH, SA-MKH ve GKA-H'lerinde ifade profilleri incelenen genlerin Kİ-MKH'lerine (1) oranla kıyaslanması

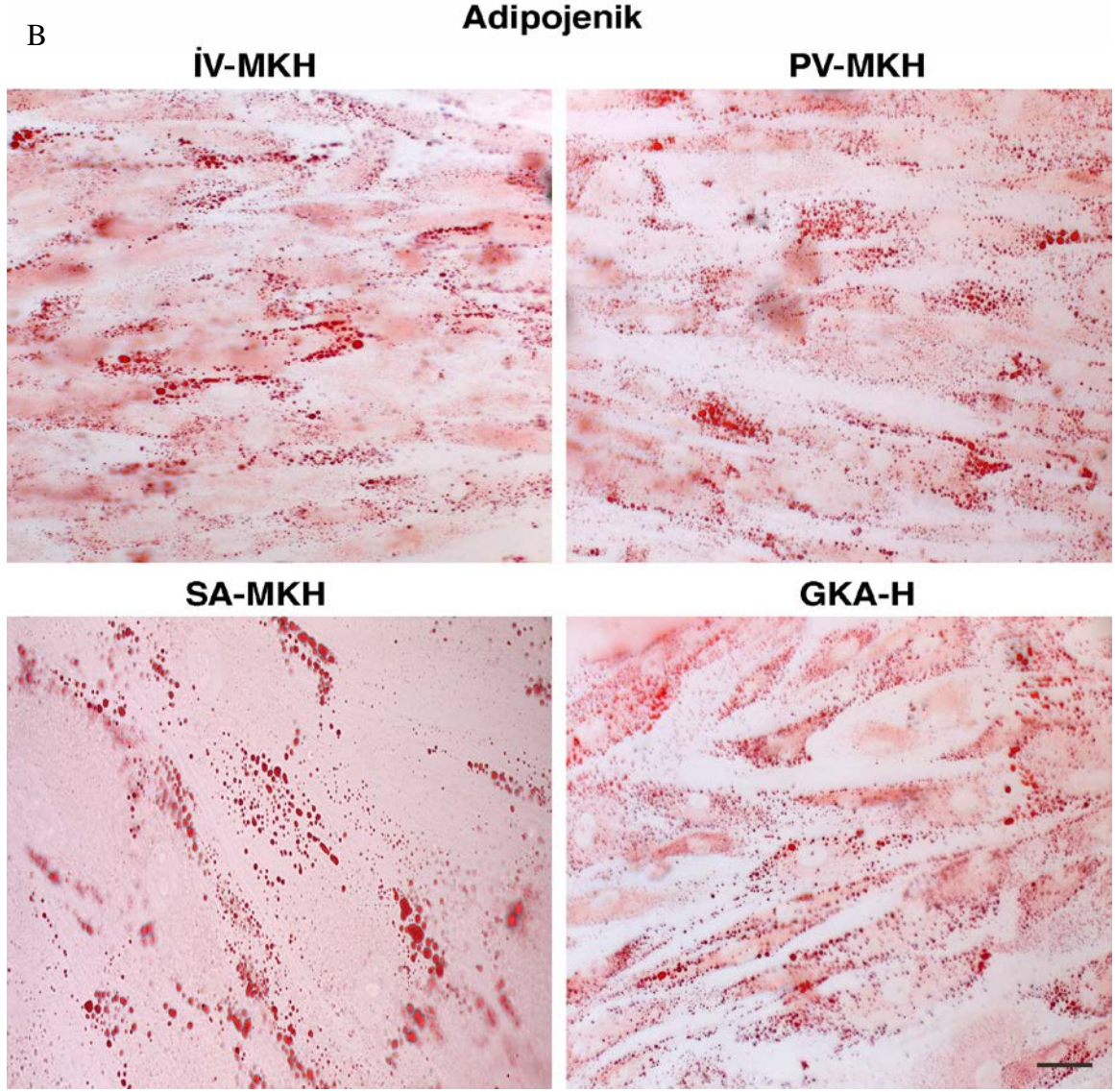
Genler/ Örnek	İGK-MKH	İV-MKH	PV-MKH	SA-MKH	GKA-H
Nanog	34.7 (3.9-195)	4.9 (3.35-5.1)	6.5 (4.6-7.4)	5.9 (5.6-11.8)	5.5 (4.45-7.9)
Rex1	34.73 (3.9-48.8)	1.29 (.5-2.2)	10.4 (3.2-103.2)	6,89 (3-18.6)	6.1 (3.4-12.8)
Oct4	6.7 (1.1-42)	.86 (.42-1.7)	.69 (.57-1)	4.3 (2.1-4.9)	5.5 (4.4-7.9)
TERT	276.9 (21-276.2)	12 (9-17)	18 (18-36)	11 (10-27)	47 (.7-50)
Vimentin	22 (12.3-26.4)	15 (6.8-15.8)	52 (14.-88.5)	21 (14.2-29.2)	11 (8.6-29.2)
α-SMA	9.9 (5.3-27.9)	5.8 (4.2-7.4)	5.2 (2.1-8.3)	11.3 (11-17.9)	11.6 (2.8-29.7)
GATA4	.7 (.1-6)	1.1 (1-3)	0.1 (.14-.14)	0.7 (0.7-1)	6.7 (.6-8)
Nestin	159.2 (106.1-200.6)	336 (147.3-497.6)	1816 (666-2001)	405.4 (339.6-476)	508 (145-772)
Desmin	24 (7-250)	1.5 (1-2.5)	4.5 (3-6)	14 (5-99)	5 (1-411)
SEMA3C	12.3 (10.4-35.8)	17 (8.8-18)	4 (3.6-13.7)	15.6 (13.4-25.8)	21.9 (14.1-23.6)

Ortanca değer (min-max)

5.6. Hücrelerin İn Vitro Farklılaşma Yetkinlikleri

Kültüre edilen hücreler farklı besiyerleri kullanılarak adipojenik, osteojenik ve kondrojenik yönde farklılaştırma ortamlarına maruz bırakıldı. *İn vitro* adipojenik induksiyon kültür ortamı uygulanan hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda küçük, parlak, yuvarlak damlacık izlendi (Şekil 5.6.1.). Bu damlacıklar nötral lipidlere özgün bir boya olan Oil red O ile kırmızı, yuvarlak, düzgün sınırlı, farklı boyutlarda damlacıklar biçiminde boyandı. Adipojenik farklılaşma lipit damlacıkları Oil red O boyasıyla işaretlemeyle incelendiğinde farklılaşma yetisininin PV-MKH, SA-MKH grubunda daha başarılı olduğu gözlenirken İV-MKH, ART-MKH sırasıyla onları izlediği belirlendi. Lipit damlacıkları farklılaşmanın ilk haftalarında küçük 21. haftaya ulaştığında ise damlacıkların büyüdüğü gözlemlendi. Başarı kriteri olarak farklılaşan hücre sayısı ve lipit damlacıklarının sayısı-boyutu dikkate alındı.





Şekil 5.6.1 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek adipojenik farklılaşmış hücreler

Adipojenik yönde indüklenmiş hücrelerin sitoplazmasında 4 hafta sonunda lipid damlacıkları gözlemlendi. Adipojenik farklılaşma konfokal mikroskopunda, lipid damlacıklarının Oil red O boyasıyla (kırmızı), çekirdeklerin (mavi) işaretlenmesiyle incelendiğinde farklılaşma yetisinin sırasıyla PV-MKH, SA-MKH, İV-MKH, ART-MKH daha başarılı olduğu belirlendi (A). Lipid damlacıkları faz-kontrast mikroskop altında parlak, düzgün sınırlı, yuvarlak inklüzyonlar olarak izlenirken, nötral lipid boyası olan Oil red O ile bu damlacıklar kırmızı boyandılar (B). Konfokal mikroskopu: Ölçek çubuğu 10 μ m. Faz kontrast mikroskopu: Ölçek çubuğu 10 μ m.

İGK dokusunun İV, PV, SA, GKA bölgelerinde izole edilen hücreler 3-4 hafta süreyle osteojenik besiyerine maruz bırakıldığında, hücrelerin birbirlerine yakın olduğu bölgelerde genişlemiş bir görünüm sergilediği gözlemlendi. Hücrelerin kalsiyum mineralizasyonuna özel olan von Kossa boyasıyla boyanması sonucu, hücrelerin arasında kalsiyum depozitlerinin olduğu gözlemlendi. Von Kossayla birlikte karşıt boyanan safranin O boyası ise osteoid oluşumlarının olduğunu gösterdi (Şekil 5.6.2.) .

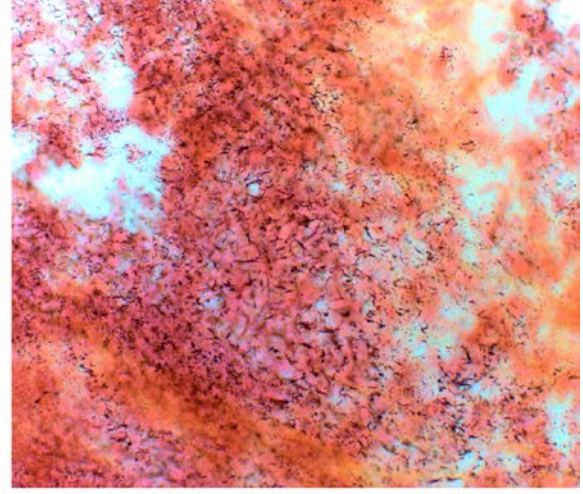
Osteojenik farklılaşmayı göstermek için birçok farklı osteosit proteini kullanıldı. Osteopontin osteojenik farklılaşmanın erken evresinde, yaklaşık birinci haftanın sonunda ortaya çıkan bir protein olarak hücrelerdeki dağılımı incelendiğinde hücre yüzeyinde benekler şeklinde izlendi (Şekil 5.6.3.). Gruplar birbirleriyle kıyaslandığında İV-MKH'lerinde diğerlerine göre daha iyi ifade edildiği gözlemlendi. Farklılaşmanın ikinci haftasından sonra osteonektin, osteokalsin, BSP2'nin (Bone sialoprotein-2) gözlenmeye başlamasıyla farklılaşmanın son aşamasına geldiği izlendi. Osteonektin ve BSP2 proteini osteopontinin gösterdiği paterne benzer bir boyanma gösterdi. Buna göre Osteonektin'in (Şekil 5.6.4.) ve BSP2'nin (Şekil 5.6.5.) farklılaşma başarısı sırasıyla PV-MKH, SA-MKH, İV-MKH, GKA-H olarak belirlendi. Osteokalsin (Şekil 5.6.6.) ise hücreler boyunca düzensiz odaklar şeklinde izlendi. Gruplar birbiriyle kıyaslandığında SA-MKH'lerin diğerlerine göre daha başarılı bir boyanma paterni olduğu gözlemlendi.

Osteojenik

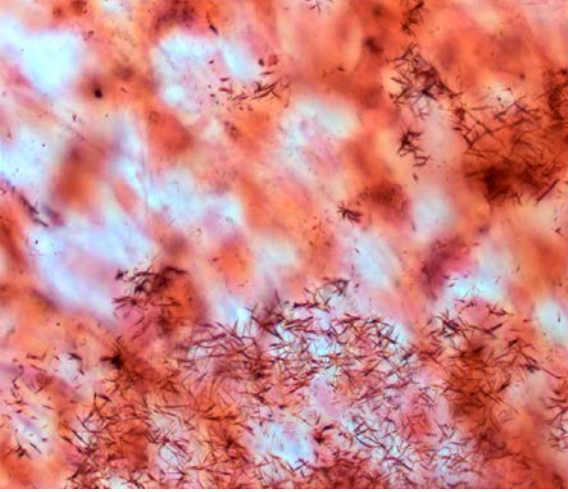
İV-MKH



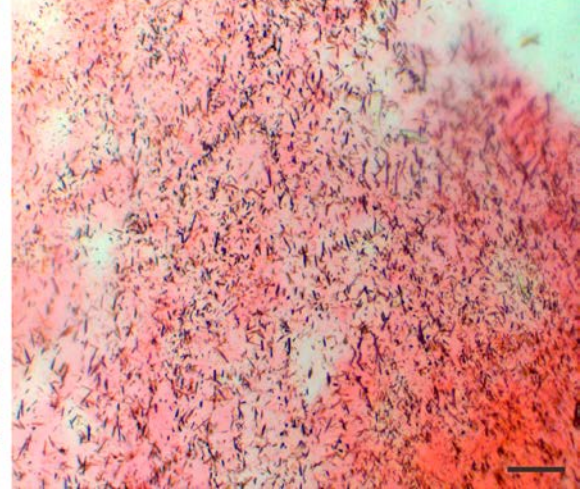
PV-MKH



SA-MKH

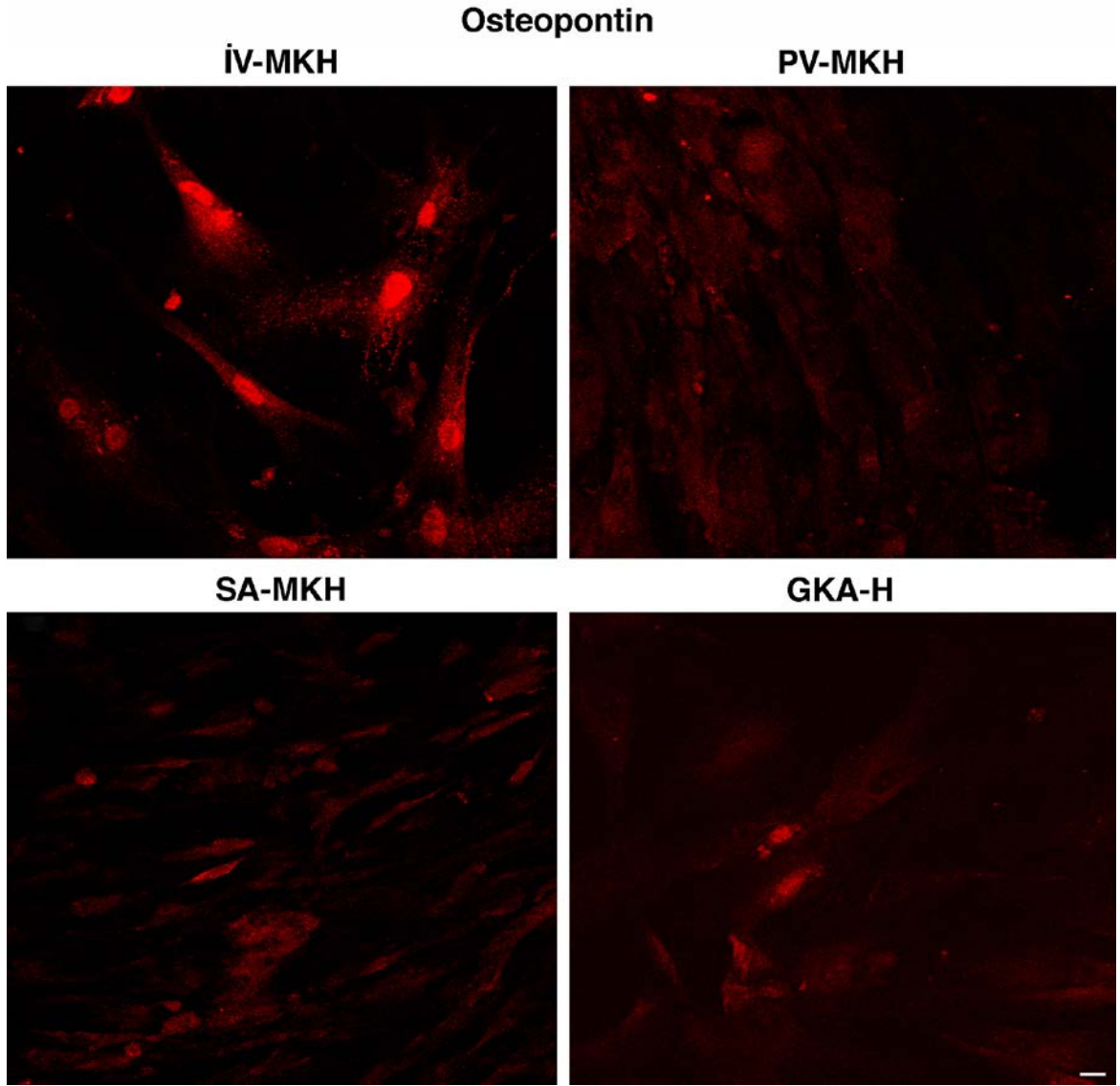


GKA-H



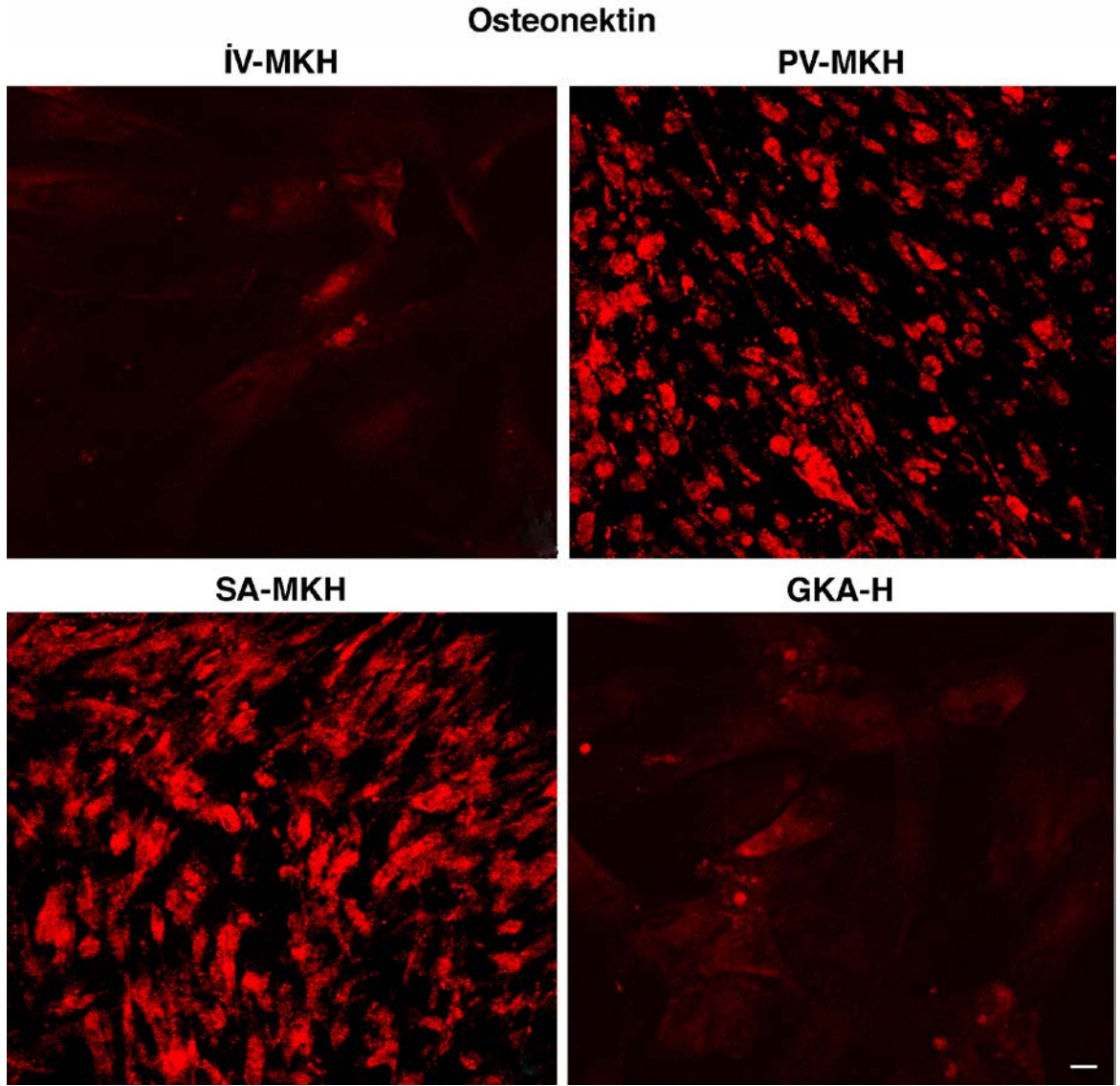
Şekil 5.6.2 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerde kalsiyum depozitlerinin yerleşimi

Osteojenik yönde indüklenmiş hücreler 4 hafta sonra von Kossa/safranin O boyanmasıyla incelendiğinde, osteoid oluşumları ve kalsiyum depozitleri gözlemlendi. Faz kontrast mikroskobu: Ölçek çubuğu 10 µm.



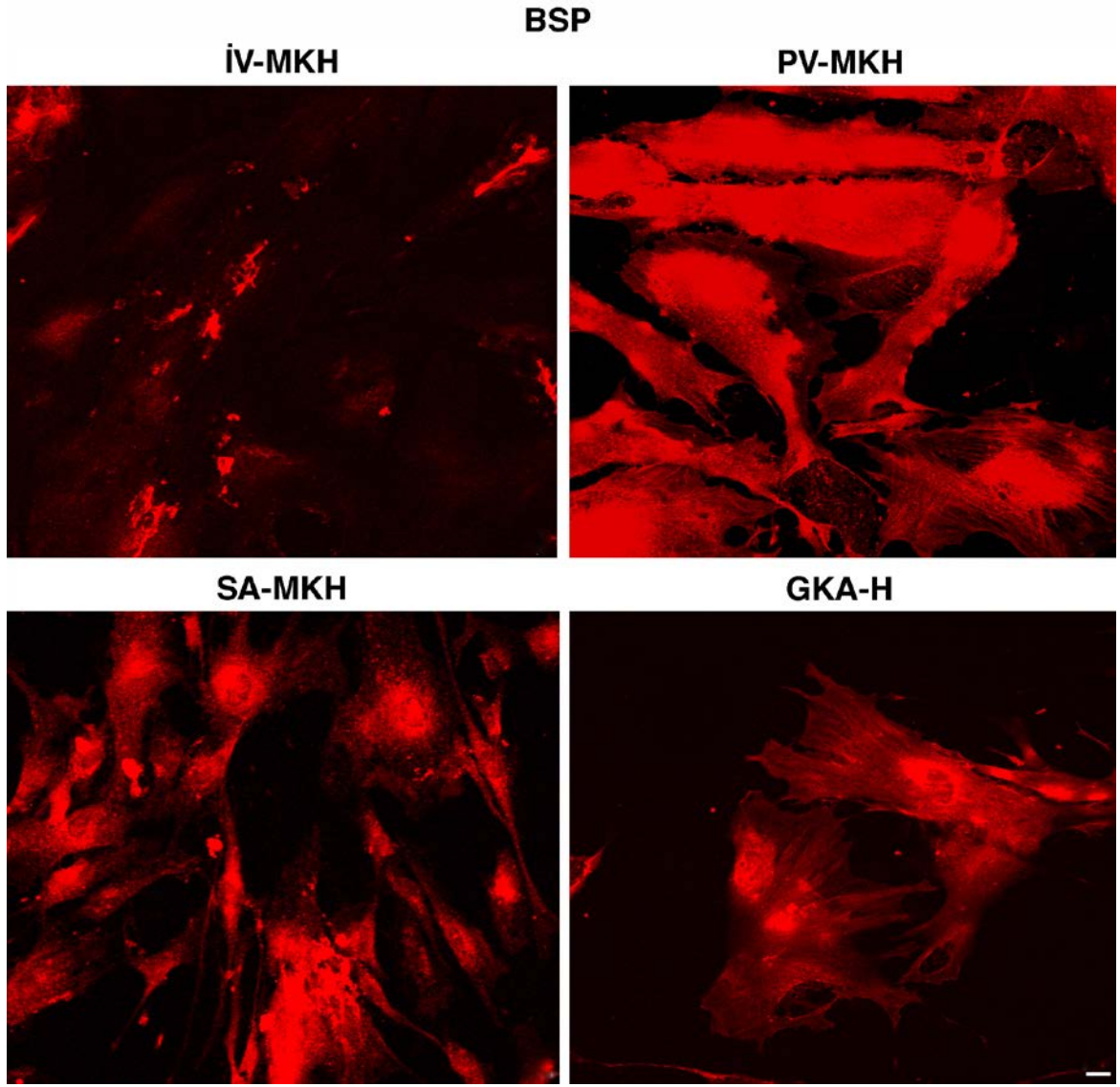
Şekil 5.6.3 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin osteopontin (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi

Osteopontin İV-MKH'lerinin hücre yüzeyinde benekler şeklinde izlenirken, PV, SA, GKA-H'lerine kıyasla daha iyi bir ifadesi olduğu gözlemlendi. Konfokal mikroskopu: Ölçek çubuğu 20 µm.



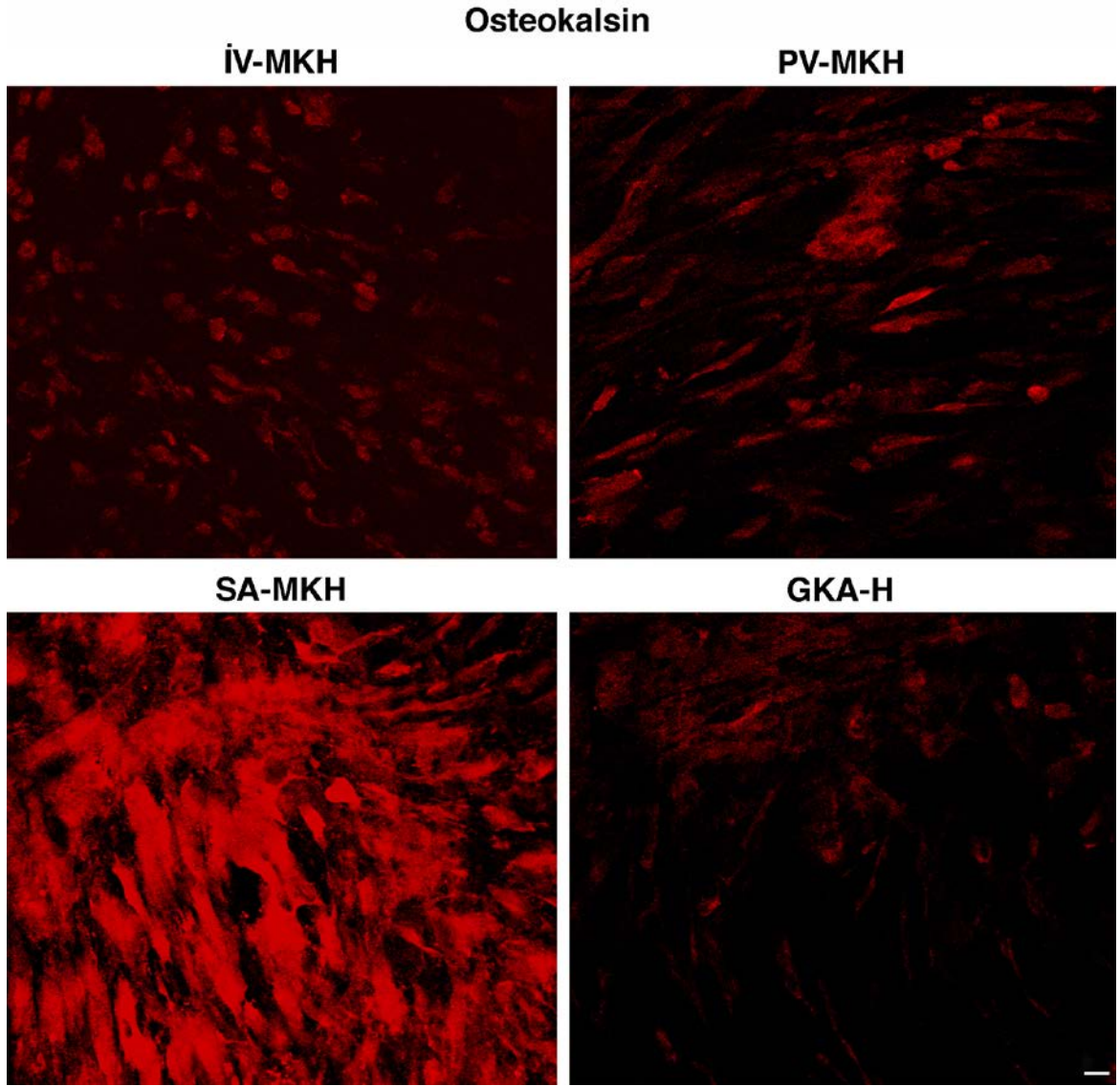
Şekil 5.6.4 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin osteonektin (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi

Osteonektin hücre içinde noktasal olarak izlenirken, farklılaşma başarısı sırasıyla PV-MKH, SA-MKH, İV-MKH, GKA-H olarak belirlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 20 µm.



Şekil 5.6.5 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin BSP2 (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi

BSP2 hücre içinde benek şeklinde gözlenirken, farklılaşma başarısı sırasıyla PV-MKH, SA-MKH, İV-MKH, GKA-H olarak belirlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 20 µm.

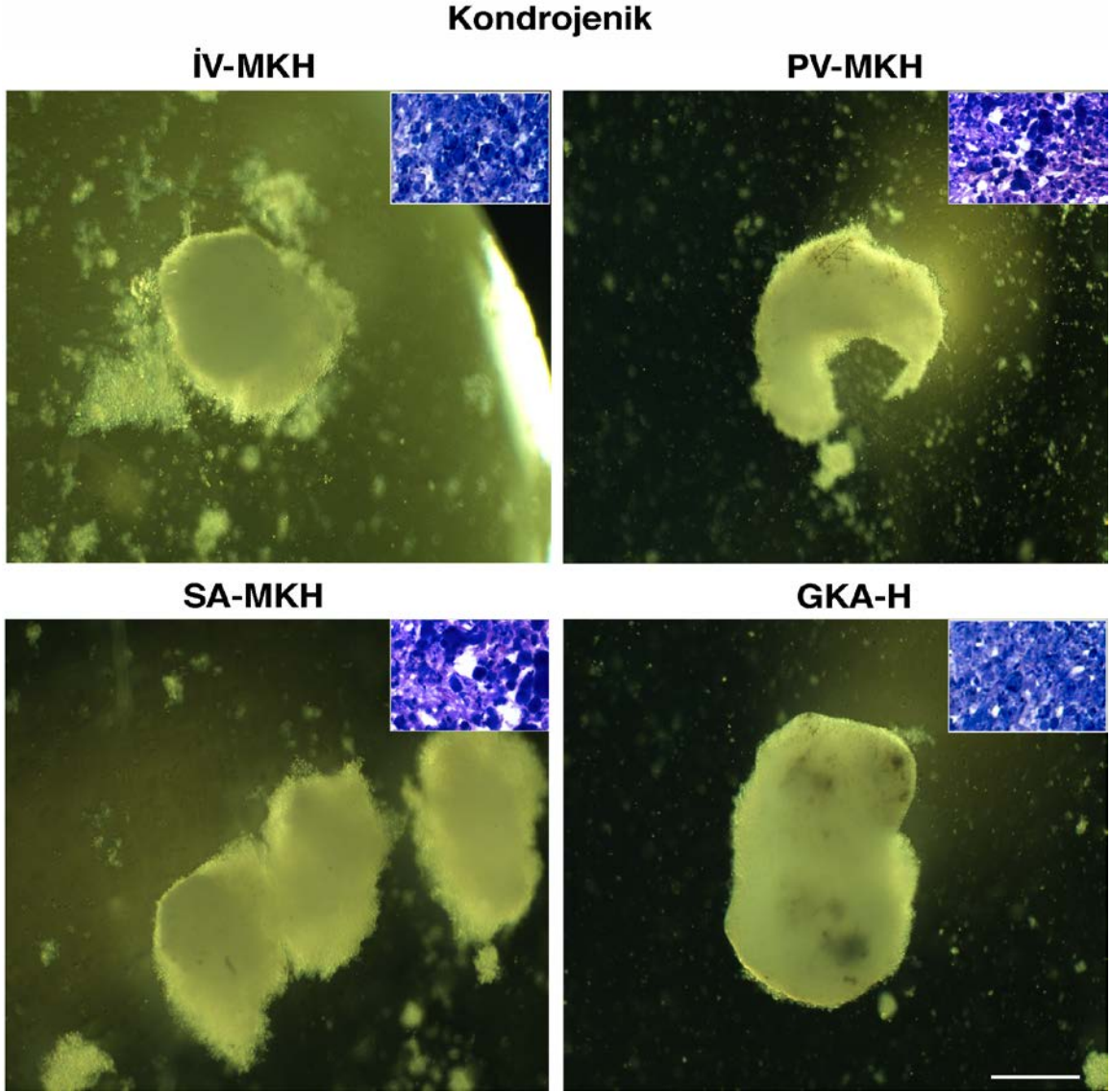


Şekil 5.6.6 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek osteojenik olarak farklılaşmış hücrelerin osteokalsin (kırmızı) molekülünce değerlendirilmesi

Osteokalsin hücreler boyunca düzensiz odaklar şeklinde gözlenirken, SA-MKH'lerin PV, İV, GKA-H'lerine göre daha başarılı işaretlendiği gözlemlendi. Konfokal mikroskobu: Ölçek çubuğu 20 µm.

Üç hafta süreyle kondrojenik olarak farklılaşmış gruplarda, hücrelerin bir araya gelerek toplandığı, 1-2 mm çapında küre şeklini aldığı ve kürelerin etrafının parlak olduğu gözlemlendi. Kondrojenik farklılaşmanın belirlenebilmesi için kondrojenik küreler steromikroskop altında incelendi (Şekil 5.6.7.). Kürelerin büyüklüklerinin ve düzenli şekillerinin bir birlerine benzer olduğu gözlemlendi. Kürelerin kriyo kesitlerinin Toluidine mavisiyle boyanmasıyla, ince küreler içinde heterojen, metakromatik matriks içerisine

gömülü düzensiz hücrelerin bulunduğunu belirlendi (Şekil 5.6.7.). Toluidine mavisi kondrojenik hücre matriksinde bulunan mukopolisakkaritlerin varlığının belirlenmesinde kullanıldı.



Şekil 5.6.7 İV, PV, SA, GKA bölgelerinden izole edilerek kondrojenik olarak farklılaşmış hücreler

İV, PV, SA, GKA-H'leri kıyaslandığında kürelerin büyüklüklerinin ve düzenli şekillerinin bir birlerine benzer olduğu gözlenirken, tüm gruplarda hücre dışı matrikste bulunan toluidin mavisiyle boyanan mukopolisakkaritler ışık mikroskopunda gözlendi (sağ üst). Stereomikroskopu: Ölçek çubuğu 100 µm.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatüre yaptığı önemli katkılarıyla araştırma grubumuz İGK multipotent kök hücrelerinin izolasyon yöntemi, tanımlanması ve farklılaşma özelliklerinin yanı sıra, bu hücrelerin pek çok dinamiğine ilişkin veriye sahip bulunmaktadır. Bu durumda bu hücrelerin hem araştırmacılar hem de klinisyenler tarafından yaygın olarak güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi amacıyla atılması gereken adımların başında bu heterojen karakterdeki hücrelerin tanımlanması ve bu sayede homojen bir hücre popülasyonunun elde edilebilmesi gerekmektedir.

6.1. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin Büyüme, Çoğalma Sürecinin ve Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

İGK bölgelerinden elde edilen doku parçalarının eksplant kültür koşullarında kültür kabı yüzeyine başarıyla yapışması ve hücrelerin dokudan ayrılarak kültür kabında yayılma sürelerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir. Hücreler SA dokusunda 6. günde, İV dokusunda 8. günde, GKA dokusunda 9. günde, PV dokusunda ise 12. günde dokudan ayrılmaya başlamıştır. Gözlenen bu farkın, dokuların barındırdığı hücrelerin yapısal farklarından kaynaklandığı gibi hücreler arası matriksteki protein bileşiklerinin farkından da kaynaklanmaktadır (Şekil 5.1.2). Subamniyotik stroma bölgesi, bazal membran üzerinde bulunan tek katlı yassı-kübik epitelden, amniyon zarının altında kalan az sayıda stroma hücresinden ve bunları çevreleyen bol hücrelerarası sıvı içeren dağınık ve ince kollajen lif demetlerinden (tip I, III ve VI kollajen) oluşmaktadır. Buradaki stroma hücrelerinin diğer alanlardaki hücrelere oranla daha az farklılaşmış olduğu ve çoğalma yeteneğinin de yüksek olduğu belirtilmiştir (44). SA bölgesinin eksplant kültürlerine ilk yanıt veren grup olması (Şekil 5.1.2) ve en hızlı konfluensiye ulaşan hücre (Şekil 5.1.3) olması, bu hücrelerin diğer bölgelere göre daha az farklılaşmış yani çoğalma yeteneğinin daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra hücreler arası matriks bileşenlerindeki yoğunluk ve elde edilen doku miktarındaki fazlalık bu dokunun kültür kabına hızla yapışmasına ve bu nedenle de hücrelerin diğer gruplara göre daha hızlı çoğalmasına neden olmuştur (Şekil 5.1.1A-B, 5.1.2).

İV dokusunun diğer gruplara oranla daha fazla alan kapladığı izlenmiştir. Fakat hücre dışı matriksinin fazla olması nedeniyle (44) birim alana düşen hücre miktarının az olduğu belirlenmiştir. İV dokusunun miktarının fazla olmasına rağmen birim alandaki hücre miktarındaki azlıktan dolayı eksplant kültüre SA hücrelerinden sonra yanıt vermiştir (Şekil 5.1.1A). Hücre miktarıyla uyumlu bir yanıt vermesi (Şekil 5.1.1B) ve bu yanıtın hücreler arası matriks içeriğiyle destekleniyor olması bu sonucu destekler niteliktedir. PV dokusu damarların etrafındaki dar stroma alanındaki hücrelerden ve hücreler arası matriksten oluşmaktadır. Buradaki hücreler diğer bölgelere kıyasla daha sıkışık bir alanda, daha dar ve küçük sitoplazma bölümlerine sahiptir (18). PV dokusu İGK dokusu içerisinde en az yer kaplayan yani en az miktarda elde edilen doku bölgesini oluşturmaktadır (Şekil 5.1.1A). Eksplant kültürde diğer doku bölgelerine göre en geç yanıt veren grup olması doku miktarının ve hücreler arası matriksin azlığından kaynaklanmaktadır (Şekil 5.1.1B). Buna rağmen doku içerisindeki hücrelerin birim alandaki miktarının fazla olması nedeniyle (44) mL doku başına elde edilen hücre miktarının diğer doku bölgelerinden fazla olması bu görüşü destekler niteliktedir (Şekil 5.1.4). GKA iç ve dış elastik laminadan yoksundur ve adventisyanın yerini perivasküler stroma almıştır. Umbilikal damar, değişik yönde sıralanmış düz kas lifleri içeren kalın bir muskularis tabakası bulundurmaktadır. İV dokusundan sonra eksplant kültüre en iyi 3. yanıtı veren doku bölgesidir (Şekil 5.1.1A). İGK dokusundan elde edilen birim alana düşen hücre miktarına bakıldığında PV dokusundan sonra en iyi ikinci gruptur (Şekil 5.1.4). Doku içerisinde az bir alan kaplamasında rağmen yüksek miktarda hücreyi içerisinde barındırmaktadır.

İGK bölgelerinden izole edilerek, kültür ortamına alınan hücreler SA;13, İV; 15, GKA; 17, PV; 20 gün sonra %100 çoğalma düzeyine (konfluensi) ulaşmıştır (Çizelge 5.1.3). SA-MKH'lerinin daha az farklılaşmış olması nedeniyle daha çabuk çoğalmaları ve İV-MKH'lerinin kordonda en fazla alanı kaplaması bu nedenle elde edilen hücre miktarının fazla olması nedeniyle kültür ortamında en hızlı konfluensiye ulaşan gruplar olmuşlardır.

İV, PV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen hücrelerin kendini iki katına çıkarma zamanı (PDT) pasajlar boyunca karşılaştırıldığında (Şekil 5.1.5). PV alanından elde edilen doku miktarı ve buna bağlı olarak hücre miktarı az olmasına rağmen, diğer bölgelere oranla PDT süresinin daha düşük olması yani PV-MKH'lerinin yüksek proliferasyon yeteneği diğer

grupları yakalamasını sağlamıştır (Şekil 5.1.6). Literatüre bakıldığında İGK bölgeleri içinde en çok farklılaşmış alanın sırasıyla PV, İV, SA olduğu söylenmektedir fakat bizim bulgularımız bu sonuçla çelişir. En çok farklılaşmış olduğu söylenen (28) PV bölgesinin kendini çoğaltma süresinin kısa olması beklenirken yaptığımız çalışmada yüksek çoğalma kapasitesine sahip olması farklılık yaratmıştır. PV hücrelerinin doku içerisinden kültür ortamına alınması bu hücrelerin geriye farklılaşmasına neden olmuş olabileceğini düşündürmüştür.

Yaptığımız çalışmayla, İGK dokusundan enzimatik ve eksplant yöntemiyle izole edilen hücrelerin morfolojileri karşılaştırıldığında eksplant yöntemiyle izole edilen hücrelerin fenotiplerinin enzimatik yöntemle elde edilenlere göre daha az heterojen olduğu gözlenmiştir. Mekanik olarak izole edilerek kültür kabına tutunan hücrelerin morfolojileri incelendiğinde tip 2, ince-uzun fibroblast görünümündeki hücrelerin ortamda daha yaygın olduğu, tip 1 hücrelerin ise varlığının %10'u geçmediği gözlemlenmiştir. Enzimatik izolasyon yöntemiyle kültüre edilen hücrelerin morfolojileri incelendiğinde tip 1 geniş sitoplazmalı, yassı ve stres liflerince zengin hücrelerin ortamda mekanik yöntemle kıyasla fazla olduğu, bunun yanı sıra tip 2 hücrelerin de ortamda bulunduğu, pasajlar ilerledikçe tip 2 hücrelerin ortamda baskın hale geldiği gözlenmiştir (Çizelge 5.2.1). Bu sonuca göre, hücrelerin izolasyon tekniğinin hücre morfolojisi üzerindeki etkisinin önemli olduğunu ve enzimatik yöntemin hücre fenotipi üzerine etkisinin olduğunu görmekteyiz. Bu etkinin kullanılan kollajenaz tip 1 enziminin sadece hücreler arası matrikse değil aynı zamanda hücreler üzerinde de etkisinin olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Eksplant yönteminin kullanılmasıyla enzimatik işlem nedeniyle hücre yüzeyindeki moleküllerin hasarlanma ihtimali ortadan kalktığından, bu yöntemin bazı avantajları olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra eksplant yöntemde ortamdaki matriksin varlığı nedeniyle doku içindeki büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu desteklemesi nedeniyle elde edilen hücre miktarını arttırdığı düşünülmektedir. Majore ve ark.'nın (93) yaptığı çalışmayla eksplant yöntemiyle kültür kabına tutunabilen, mezenkimal belirteçleri taşıyan ve fibroblast benzeri morfolojiye sahip İGK-MKH'lerinin yüksek miktarda elde edilebileceği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise İGK-MKH'lerinin eksplant yöntemiyle kolay ve kontaminasyon riski taşımadan güvenle izole edilebileceği belirtilmiştir (94).

Literatürdeki çalışmalarla elde ettiğimiz sonuçların birbirlerini destekledikleri görülmektedir.

Tüm kordonun kullanılmasıyla elde edilen İGK hücreleri *in vitro* ortama alındıklarında iki farklı morfoloji sergiler; köşeli sitoplazmalı, yuvarlak ve girintili-çıkıntılı çekirdekli ve belirgin çekirdekçikli hücreler (tip 1); mekik şeklinde sitoplazması ve buna uyumlu çekirdeği olan, kollajen sentezleyen hücreler (tip 2) olmak üzere tanımlanmıştır. Pasajlar ilerledikçe tip 2'nin morfolojik karakterin baskın hale geldiğini ortaya konmuştur (28). İV-MKH'lerini kültür ortamına aldığımızda hücre çoğunluğunun tip 2 fusiform hücrelerden oluştuğu, erken pasajlarda ise %10 oranında tip 1 hücreye rastlandığı görülmüştür. PV-MKH'leri kültür ortamına alındığında tip 2 hücrelerin genç formlarının tabloya hakim olduğu, tip 1 hücrelerin ise yaklaşık %5 olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla tip 1 ve tip 2 hücreler sadece İV veya PV bölgesine ait değil her iki dokuda da bulunmaktadır. Buna karşın İV bölgesinden elde edilen hücrelerin tip 1 ve 2 bakımından daha heterojen oluşu görülmüştür (Şekil 5.2.2). Bu sonuçlar ışığında çalışmanın başında sorulan İGK hücrelerindeki heterojenitenin sebebinin bölgelerden kaynaklanmadığı görülmüştür.

Majore ve ark. İGK-MKH'lerini Counterflow Centrifugal Elutriation (CCE) ile küçük (11,1 µm) ve büyük (19 µm) hücreler şeklinde ayırmış ve alt popülasyonlar oluşturmuştur (95). Küçük hücrelerin büyük hücrelere göre daha yüksek kendini yenileme özelliğinin olduğu ve MKH belirteçlerini daha fazla ifade ettikleri, buna göre küçük hücrelerin büyük hücrelerin öncüsü oldukları öngörülmüştür. Bu bilgiler ışığında tip 1 ve tip 2 ayrımının farklı bölgeden çok, aynı doku içerisinde hücrelerin farklı hücre seviyelerini ifade ettiği söylenebilir. SA-MKH'leri kültür ortamına aldığımızda hücreler epiteloit morfoloji sergilemiştir, tip 1 hücreler ise neredeyse yok denecek kadar azdır (Şekil 5.2.2). Bu morfolojinin amniyon zarındaki tek katlı yassı-kübik epitelden kaynaklandığı ve daha az farklılaşmış olmasından (44) ileri geldiği düşünülebilir. GKA-H'leri kültür ortamına aldığımızda hücrelerin saf bir düz kas popülasyonundan oluştuğu görülür, tip 1 ya da tip 2 hücreye rastlanmaz (Şekil 5.2.2). Bu sonuç, tip 1 ve 2 hücrenin GKA dokusundan kaynaklanmadığının bir belirtecidir. GKA-H'lerinin saf düz kas hücrelerinden oluşuyor olması onların saf bir düz kas kaynağı olarak kullanılabilmesine işaret eder. Günümüzde birçok araştırmacı düz kas hücresi oluşturmaya çalışırken, doğumda atılan, etik bir probleme neden olmadan elde edilebilen ve kolay ulaşılabilir bir doku olmasıyla İGK

dokusudaki arterlerin yüksek miktarda potansiyel düz kas kaynağı olduğunun ortaya konması literatüre önemli bir katkı sağlamıştır.

İGK-MKH ile ilgili yapılan çalışmalarda hücrelerin izolasyon teknikleri ve kültüre edilme yöntemleri çalışma ekiplerine göre değişiklik göstermektedir. Bu değişim hücrelerin fenotipine ve büyüme özelliklerine yansımaktadır. Kültür ortamında kullanılan büyüme faktörleri ve serum oranları hücrelerin büyüme ve çoğalma etkinliğini değiştirir (14). Bu çalışmada tüm izolasyon tekniklerinin ve kullanılan kültür ortamının aynı olması ve aynı örneğin farklı bölgelerinden elde edilen hücrelerin karşılaştırılması, yöntemden doğacak farkları ortadan kaldırmıştır.

6.2. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Belirteçlerinin Değerlendirilmesi

İGK-MKH'lerinde, MKH'leri karakterize etmek için kullanılan CD29, CD73 CD90, CD105 molekülerinin varlığı birçok grup tarafından gösterilmiştir (94, 96). Schugar ve ark. CD146, CD144 ve CD105 pozitif hücrelerin, genelde damar duvarında ve perivasküler bölgede bulunduğunu belirtir. CD73 ifadesi arterde muskuler tabakada ve endotelde gözlenirken, perivasküler bölgede gözlenmez, amniyon epiteli ve subamniyotik bölgede en yüksek düzeyde ifade edilir. CD90 tüm kordon bölgelerinde ifade bulur (52). CD29, CD90, CD73, CD105 MKH belirteçlerinden CD29 ve CD105'in PV-MKH'lerde %70 pozitif olması dışında, CD29, CD90, CD105 diğer kordon bölgelerinden elde edilen hücre gruplarında pozitif olduğu görülmüştür. CD73 GKA hariç İV, PV ve SA gruplarında zayıf pozitif olarak izlenmiştir. MKH belirteçlerinin İV, SA, GKA bölgelerinden elde edilen hücrelerde ifade ediliyor olması bu hücrelerin mezenkimal karakterini koruduğunu göstermiştir. PV-MKH'leri MKH belirteçlerini diğer gruplara göre daha az ifade ettiği görülür. CD73 de görülen düşüşün eksplant kültürden veya hücrelerin diğer alanlardaki hücre iletişimlerinden ayrılması nedeniyle değişim göstermiş olabileceği düşünülür. Schugar ve ark. izolasyon yönteminin hücre yüzey belirteçlerinde değişime neden olduğunu belirtmiştir (52). Bu bilgi bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Hücre içi adezyon molekülü olan ve stromal olarak uyarılmış immün baskılamada rol alan CD54

MKH'lerde yapısal olarak düşük seviyede ifade edilir (97). İGK bölgelerindeki hücre gruplarında da ifadesinin düşük olduğu görülmüştür. Hematopoetik belirteç olan CD34 ve CD45'in tüm gruplarda negatif olması yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Kök hücre özelliğinin sürdürülebilmesinde farklılaşmayı baskılamada rol oynayan CD133 tüm kordonun kullanılmasıyla elde edilen hücrelerde ifadesine rastlanırken, kordon bölgelerinden elde edilen hücrelerde ifadesi gözlenmez (14). İGK bölgelerinden elde ettiğimiz hücrelerde de negatif olduğunun belirlenmesi yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Bu sonuçlara göre, İGK bölgelerinin ayrılmasıyla elde edilen hücreler belirli özelliklerini korurken diğer yandan sahip oldukları bazı karakterleri kaybederler.

6.3. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin Yapısal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

In vivo ve *in vitro* ortamdaki hücresel farklılaşma hücre morfolojisiyle, diğer bir değişle hücre içi ara filaman proteinlerin yerleşimiyle bağlantılıdır. Hücrelerde ifade bulan ara filamanlar embriyonik gelişim ve hücresel farklılaşma sırasında hücre tipine özgü dağılım göstermektedir (28). Bu durumda belirli hücre iskeleti elemanlarının dokunun belirli bölgelerinde farklı ifade bulması ve bu hücrelerin dokudan izole edildikten sonra aynı özellikleri kültür ortamında koruyup korumadıklarının belirlenmesi bu hücrelerin yapısının incelenmesinde önemlidir.

Hücre içi yapısal protein olan vimentin 50 kDa'luk bir protein olup mezodermal kökenli hücrelerde bulunur (28). İGK dokusunda vimentinin hem perivasküler hem de intervasküler alanda ifade bulduğu ve dokudaki hücrelerin izolasyonu ile kültür ortamına alınan hücrelerde, her iki fenotipteki hücrede ifade edildiği Can ve ark. (28) tarafından gösterilmiştir. Vimentin ifadesinin kültür ortamında da sürdürülüyor olması hücre tarafından mezenkimal özelliklerinin korunduğunu gösteren önemli bir kanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücrede ara filaman olarak görev yapan vimentin tüm doku bölgelerindeki hücrelerde izlenmiştir (Şekil 5.4.2). İGK bölgelerinden izole edilerek kültür ortamına alınan hücrelerde, hücre tipi ayırmaksızın tüm gruptaki hücrelerde sitoplazmada yaygın olarak kuvvetli pozitifdir (Şekil 5.4.3). Bu sonuçlara göre hücrelerin dokudan

ayrılması ve diğer doku bölgelerindeki hücrelerden ayrı kültüre edilmeleri, MKH özelliklerinde bir değişime neden olmamıştır.

Sitokeratinler 55–69 kDa molekül ağırlığındaki proteinlerdir ve ekto-/endodermal kökenli epitel hücrelerinde gözlenirler. Sitokeratin 8, 18, 19 gibi bazı sitokeratin izoformları miyofibroblastik hücrelerde de ifade bulurlar (98) ve pansitokeratin antikoru tarafından tanınırlar. İGK hücreleri de benzer şekilde sitokeratinin ifadesiyle hücrelerin yapısının karakterizasyonu sağlanabilmektedir (99). Sitokeratinin göbek kordonunun perivasküler bölgesinde ifade edildiği ve kültür ortamında tip 1 olarak adlandırılan hücrelerde varlığı ortaya konmuştur (28, 44). Hücrede ara filaman olarak görev yapan sitokeratin (tip 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 ve 19) İGK dokusundan ayrılan İV ve PV bölgelerinde, SA bölgesinde bulunan amniyon epitelinde pozitif fakat epitel altında pozitif olmadığı gözlenmiştir. GKA bölgesinde ise zayıf pozitif olduğu izlenmiştir (Şekil 5.4.4). Bu bulgular ışığında, sitokeratinin daha önce yapılan çalışmalarda İV bölgesinde zayıf gözlenmesinin, bu bölgedeki hücre yoğunluğunun azlığından ileri geldiği düşünülmüştür. İGK bölgelerinin izolasyonu ile kültür ortamına aldığımız hücrelerde İV-MKH'lerinde ve PV-MKH'lerinde pozitif olduğu, fakat PV-MKH'lerinde erken pasajlarda bir grup hücrede zayıf pozitif iken pasajlar ilerledikçe tüm hücrelerde pozitif olduğu saptanmıştır. SA-MKH'lerinde küçük hücrelerde zayıf pozitif olduğu, GKA-H'lerinde de zayıf pozitivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.4.5). Elde edilen bu sonuçlar, SA ve GKA MKH'lerinde miyofibroblastik karakterde olan hücrelerin az olduğunu bize göstermiştir. PV-MKH'lerinde ise erken pasajlarda miyofibroblast olmayan hücrelerin kültür koşullarının ya da ortamdaki miyofibroblast karakterindeki hücrelerin etkisiyle pasajlar ilerledikçe karakter değiştirdiği yönünde bir düşüncüyü akla getirmiştir.

İGK, kontraktıl proteinler olan desmin ve α -SMA bakımından incelendiğinde, Darby ve ark. (100) tarafından yara iyileşmesi sonucu ortaya çıkan miyofibroblastlarda desminin ifadelendiği, sadece α -SMA'nın ifadelendiği belirtilmiştir. α -SMA miyofibroblastlara özgü bir proteindir. İGK dokusunun PV ve SA bölgesinde daha baskın izlenirken ve kültüre edilen hücrelerinde erken pasajlarda kuvvetli pozitif bulunmuş pasajlar ilerledikçe ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (28, 46, 69). İGK bölgelerini ayırıp incelediğimizde α -

SMA ifadesi İV bölgesinde diğer bölgelere göre daha az ifade edilirken, diğer tüm bölgelerde pozitif olduğu görülmüştür (Şekil 5.4.6). α -SMA'nın, İV-MKH, PV-MKH, SA-MKH'lerinde sitoplazması geniş hücrelerde olduğu, fakat küçük hücrelerde var olmadığı izlenmiştir. GKA-H'lerinde ise çoğu hücrede mevcuttur (Şekil 5.4.7). Kültür ortamındaki küçük olarak nitelendirilen hücrelerin daha az farklılaşmış olacağı, yani miyofibroblast özelliklerini korumadığı, bu nedenle bu hücrelerde α -SMA ifadesine rastlanmadığı düşünülmüştür. Dokuda bulunan niş ortamının kültür ortamında bulunmadığı düşünüldüğünde ve bu hücrelere yönelik kültür ortamı kullanılmadığından pasajlar ilerledikçe α -SMA pozitif hücrelerin ortamda tutulmadığı öngörülmüştür.

Bir diğer hücre iskeleti proteini olan desmin miyojenik bir proteindir ve tüm kordon stroması boyunca vimentinle aynı dağılım paternine sahiptir (28). Bu sebeple İGK-MKH'lerinin miyofibroblastik özellikte olduğu düşünülmektedir (47, 101). Sarugaser ve ark. (46) bu hücrelerin dokudan çıkartılıp kültüre edildiklerinde desmin ifade etmediklerini bildirmiştir. Bunun nedeninin izolasyon veya kültür koşulları olabileceği ileri sürülmüştür. Yaptığımız çalışmayla, desminin PV, SA, GKA bölgelerinde pozitif iken, İV bölgesinde negatif olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.4.8). Desmin, İGK bölgelerinden kültür ortamına alınan hücrelerde GKA-H'lerinin haricinde hiç bir hücrede var olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.4.9). Bu sonuç diğer çalışmalarda ifade edilen bilgileri destekler niteliktedir. Hücreler doku içerisindeyken miyojenik karakterini korurken, kültür ortamına alınmasıyla kordondaki kasılma işlevine ihtiyaç duymaması ve hücre nişinin değişmesi sebebiyle hücreler miyojenik özelliklerini kaybetmişlerdir.

PV-MKH'lerinin sitokeratin, α -SMA ve desmin pozitif olması onların şimdiye kadar düşünüldüğü gibi miyofibroblast olmasından çok belki de miyoepitel özelliğinde hücreler olduklarını göstermektedir. Dokudaki İV-MKH'lerinin kontraktıl proteinler olan α -SMA ve desmin ifade etmemeleri onların kasılma özelliğine sahip olmadıklarına işaret etmektedir.

Endotel hücrelerine özgü olan ve endotel olmayan hücrelerde de varlığı ortaya konan (52) CD146'nın, 146+ perisitlerin MKH öncüsü olabileceğine yönelik yapılan çalışma bu molekülün son zamanlarda sahneye çıkmasına neden olmuştur (102). Schugar ve ark. yaptığı çalışmada, GK dokusunun kollajenzla muamelesiyle izole edilen hücrelerin %40-50'sinin CD146 molekülünü taşıdığı, fakat dispaz yada eksplant yönteminin seçilmesiyle CD146 ifadesinin %100'e kadar taşındığını göstermiştir. Bir diğer çalışmada heterojen bir popülasyon olan Kİ mononükleer hücrelerinden multipotent MKH'lerin izolasyonunda bir belirteç olarak kullanılmıştır (103). Yaptığımız çalışmada, CD146'nın sadece PV ve GKA bölgelerinde bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 5.4.10). CD146'nın İGK bölgelerinden hücrelerin kültür ortamına alınmasıyla elde edilen İV-MKH, SA-MKH'lerinde var olmadığı, PV-MKH ve GKA-H'lerinde ise zayıf pozitif olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.4.11). Bu sonuç, CD146 pozitif hücrelerin kültür ortamına alınarak nişten ve komşu hücrelerden ayrılması nedeniyle bu aşamada tutulamadığını düşündürmüştür.

6.4. İGK Bölgelerindeki Hücrelerde İfade Edilen Yapısal Genlerin Değerlendirilmesi

İGK-MKH'leri ve İGK bölgelerindeki MKH'lerinde farklılaşmamış insan EKH ve pluripotensi belirteçleri olan Nanog, Rex1, Oct4, Sox2, LİN28 ve TERT moleküllerinin erken pasajdaki varlığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Buna karşın bazı çalışmalar bu sonuçların tersini ifade eder. Elde edilen bu çelişkili sonuçların hücre izolasyon ve kültür yöntemlerindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülür (64, 90, 104, 105). Yaptığımız çalışmada, İGK yapısında bulunan MKH'lerde ifade edilen pluripotensi belirteçleri QRT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Bu belirteçlerden Nanog ifadesinin İGK-MKH'lerinde PV, İV, SA, GKA-H'lerine oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Rex1'in ifadesi ise İGK-MKH'lerin de en fazla miktarda bulunmuştur. Bir diğer pluripotent belirteci olan Oct4 ifadesi en fazla İGK-MKH'lerinde gözlenmiştir. Diğer gruplar arasında ise, Oct4 gen ifadesinin PV ve İV-MKH'lerinde göre SA ve GKA-H'lerinde daha fazla olduğu gösterilmiştir. EKH'lerde ifade edildiği bilinen telomerin uzamasından sorumlu olan TERT ifadesi İGK-MKH'lerinde en yüksek artışı gösterirken, bunu GKA-H, PV, İV, SA-MKH'leri izlemiştir (Şekil 5.5.4).

İGK-MKH'lerinde çoğu EKH ve pluripotent olmayla ilişkili gen Kİ-MKH'lerine göre daha fazla ifade edilmiştir. Bu sonuçlara göre İGK dokusu bölgelere ayrılarak kültüre edildiğinde EKH ve pluripotensi genlerinin ifadesi kaybolmaktadır. İGK-MKH'leri ayrıştırılmadan kullanıldığında multipotent özelliğini daha iyi koruduğu görülmüştür. İGK-MKH'lerinden sonra PV ve SA-MKH'lerinin pluripotensi belirteçlerini daha çok ifade etmiştir. Elde edilen veriler hücrelerdeki yüksek proliferasyon yeteneğini (Şekil 5.1.5) ve erken konfluensiye ulaşma nedenini (Şekil 5.1.3) bize açıklamaktadır. Bu sonuçlar bize, bölgeler içinde bulunan farklı aşamadaki hücrelerin birbirlerine destek görevi sağlayarak, hücrelerin belirli aşamada kalmasını sağladığını düşündürebilir.

İGK bölgelerinden izole edilerek kültür ortamına alınan hücrelerde, MKH belirteci olan vimentin ifadesinin, PV-MKH'lerinde en fazla, daha sonra sırasıyla İGK-MKH, SA-MKH, İV-MKH, GKA-H'lerde ifade edildiği bulunmuştur. Vimentinin tüm kordon bölgelerindeki varlığı birçok çalışmada ortaya konmuştur. Fakat aynı kordondan elde edilip bölgelere ayrılarak kültüre edilen hücrelerin ifade miktarı şimdiye kadar hiç bir çalışmada ortaya konmamıştır. Bu nedenle, vimentinin en çok PV-MKH'lerinde görülüyor olması (Şekil 5.5.5) bu doku bölgesinin sanıldığı aksine kültür ortamına alındığında en faklılaşmış bölge olmadığını göstermiştir.

Miyofibroblastlara özgü olan (100) α -SMA ifadesine bakıldığında diğer gruplara göre GKA-H'lerinde daha yüksek olduğu görülürken, diğer gruplarda ifadesinin daha az olduğu bulunmuştur (Şekil 5.5.5). Yapılan çalışmalarda, α -SMA'nın İGK doku kesitlerinde ve erken pasajlardaki hücrelerde ifade edildiği gözlenirken ileri pasajlarda ifadesinin azalması, izolasyon ve kültür koşullarına bağlanmıştır (46, 69). PV bölgesindeki hücrelere oranla daha immatür olduğu söylenen SA ve İV bölgesindeki hücrelerin kültür ortamına alınması, sahip oldukları zayıf miyofibroblastik karakterin yok olmasına neden olur (28). Bu bilgi SA ve İV bölgesindeki hücrelerin düşük α -SMA ifadesine kanıt teşkil eder. GKA-H'lerinin diğer gruplara kıyasla düz kas yönünde farklılaşmış olması, α -SMA'nın ifadesindeki yüksekliği açıklar.

Endodermal yönde farklılaşmanın belirteci olan ve kardiyomiyosite farklılaşmada transkripsiyon faktörü olarak görev yapan GATA4 (106) ifadesi GKA-H'lerinde en yüksek seviyede ifade olurken, bunu İV-MKH, İGK-MKH, SA-MKH, PV-MKH'leri izlemiştir (Şekil 5.5.6). Dünya Sağlık Örgütü'nün 1999 raporuna göre ölümlerin %28-34'ünü (erkek ve kadın) kardiyovasküler hastalıklar oluşturmaktadır (107). Günümüzde kalp yetmezliğinin epidemik boyutlara ulaştığı, kalp ve damar hastalıklarının bir numaralı ölüm nedeni olduğu gözlenmektedir. Memeli kalbini oluşturan hücreler kardiyojenik mezodermden köken alır ve miyokardiyal (kardiyomiyositler ve kalp ileti hücreleri), endotelial, düz kas hücreleri ve postnatal kardiyak öncül hücrelerden oluşmaktadır (108). Bu hücrelerin rejenerasyonu yönünde yapılacak çalışmalarda, GKA-H ve İV-MKH'lerinin kullanılmasının başarıyı arttıracacağı düşünülmüştür. GKA-H'leri etik bir probleme neden olmadan kolaylıkla sağlanabilen önemli bir düz kas kaynağıdır. Bu çalışmada, bu hücre grubunun tedavi amaçlı çalışmalarda kullanılacak potansiyel bir kaynak olduğu gösterilmiştir.

Ektodermal ya da nöron yönünde farklılaşmanın belirteçlerinden biri olan nestini İGK subendotel bölgesinde bulunan MKH'ler (109), wharton peltesinden ve tüm kordondan elde edilen MKH'ler ifade eder (14). Nöral kök hücrelerde ve nöral öncü hücrelerde ifade edilen nestin, yaptığımız çalışmada PV-MKH'lerinde anlamlı bir farkla öne çıkmıştır. Nestin en az İGK-MKH'lerinde ifadelenmiştir (Şekil 5.5.7). PV-MKH'lerindeki anlamı fark bu hücrelerin diğer hücrelere göre nöron yönünde daha kolay farklılaşabileceğini göstermektedir.

Mezodermal ya da kas yönünde farklılaşmanın ve İGK-MKH'lerinin miyofibroblastik karakterini gösteren belirteçlerinden biri olan desmin (47, 101), İGK dokusunun tüm bölgelerinde görülürken bu hücrelerin kültür ortamına alınmasıyla ifadesi kaybolur (28). İGK bölgelerinden elde edilen hücrelerde desmin ifadesini incelediğimizde, sadece bir hasta örneğinin GKA-H, SA-MKH, İGK-MKH'lerinde ifade edildiği gözlenmiştir (Şekil 5.5.8). Bu sonuç, desmin ifadesinin örneğe, kültür ortamına yada izolasyon yöntemine göre değişim gösterebileceğini göstermektedir.

İGK-MKH'lerinin anti-kanser ve hedefleme özelliğinden sorumlu mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. SEMA3C hücre göçünü sağlar (Semaforin E), ayrıca tümör hücrelerinde ve anjiogenik endotel hücrelerinde olduğu bilinen nörofilin/pleksin reseptörüne yüksek miktarda afinitesi vardır. Bu davranış belki de, İGK-MKH'lerinin hedefleme özelliğini açıklayabilecek bir mekanizmadır. SEMA3C ifadesinin İGK-MKH'lerinde yükseldiği Fong ve ark. tarafından ifade dizini çalışmasında gösterilmiştir (64). SEMA3C ifadesi ilk defa İGK bölgelerinden elde edilen MKH'lerde incelendiğinde, tüm gruplar arasında anlamlı bir fark olmadan ifade edildiği saptanmıştır (Şekil 5.5.9). Buna göre İGK içinde barınan tüm hücrelerin bu özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir ve anti-kanser çalışmalarında kullanılabilir önemli bir kaynak ortaya konmuştur.

6.5. İGK Bölgelerindeki Hücrelerin İn Vitro Farklılaşma Yetkinliklerinin Değerlendirilmesi

İGK-MKH'leri ekstraembriyonik mezoderminden köken aldığı için adipojenik, osteojenik, kondrojenik, kardiyomyojenik ve miyojenik farklılaştırma bu hücrelerde en çok çalışılan yollar arasındadır (28). İGK-MKH'lerinin küçük çok odaklı yağ damlacıkları oluşturarak prematür adiposit meydana getirdiği gösterilmiştir (6). İGK-MKH'lerinin Kİ-MKH'lerinden daha çok yağ içeren hücre meydana getirdiği (81), Lu ve ark. göre ise bu iki hücre arasında bir fark olmadığı ortaya konmuştur (11). Kültür içeriğinin, *in vivo* farklılaşma ve adipojenik yolağın başlaması için gerekli ortamı taklit etmesiyle, adipojenik olarak uyarılan hücrelerin adiposit spesifik genleri, lipoprotein lipaz, plazminojen aktivatör inhibitör-1 ifade ettiği göstermiştir (11). Yaptığımız deneyler sonucunda *in vitro* adipojenik indüksiyon uygulanan hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda küçük, parlak, yuvarlak farklı boyutlarda yağ damlacıkları izlenmiştir (Şekil 5.6.1A-B.). Adipojenik farklılaşma yetisi yağ damlacıklarının boyutu ve sayısına göre değerlendirildiğinde, PV-MKH, SA-MKH grubunda daha başarılı bulunurken, İV-MKH, GKA-H sırasıyla onları izlediği belirlenmiştir. Lipit damlacıkları farklılaşmanın ilk haftalarında küçük, 21. güne ulaştığında ise damlacıkların büyüdüğü gözlenmektedir. Adipojenik hücre indüksiyonu çalışacak ekiplerin PV ve SA-MKH'lerini tercih ettiklerinde bu yolda başarı oranını arttırabileceği öngörülmüştür.

İGK-MKH'lerinin osteojenik farklılaşma potansiyeli ilk Wang ve ark. tarafından 2004 yılında gerçekleştirilmiştir (68). Osteojenik farklılaşmayı göstermek için alkalın fosfataz pozitif agregat oluşumları ve nodüllerde von kossa ve osteojenik ilişkili protein (osteopontin) boyamaları kullanılır. Osteoid oluşumu ve kalsiyum birikimi 4. haftaya kadar giderek artar, BSP2, osteonektin, osteokalsin moleküllerinin varlığı bu farklılaşmayı destekler (28). PV-MKH'lerinin Kİ-MKH'lerine oranla osteojenik farklılaşma potansiyeli daha yüksektir (81) ve PV-MKH'leri 300–800 µm çapında mineralize kemik nodülleri oluşturur (110). Osteopontin osteojenik farklılaşmanın erken evresinde yaklaşık birinci haftanın sonunda ortaya çıkan bir protein olarak hücrelerdeki dağılımını konfokal mikroskobunda incelendiğimizde hücre yüzeyinde benekler şeklinde gözlenmiştir (Şekil 5.6.3.). Gruplar birbirleriyle kıyaslandığında İV-MKH'lerinde diğerlerine göre daha iyi ifade edildiği belirlenmiştir. Farklılaşmanın ikinci haftasından sonra osteonektin, osteokalsin, BSP2'nin (Bone sialoprotein–2) gözlenmeye başlamasıyla farklılaşmanın son aşamasına gelinir. Osteonektin (Şekil 5.6.4.) ve BSP2'nin (Şekil 5.6.5.) farklılaşma başarısı sırasıyla PV-MKH, SA-MKH, İV-MKH, GKA-H olarak belirlenmiştir. Osteokalsin ise hücreler boyunca düzensiz odaklar şeklinde izlenmiştir. Gruplar birbiriyle kıyaslandığında SA-MKH'lerin diğerlerine göre daha başarılı bir boyanma paterni olduğu gözlenir (Şekil 5.6.6.). İGK bölgelerinden elde edilen hücreler içinde osteojenik farklılaşmayı gösteren belirteçlerin ifadesinin PV ve SA-MKH'lerinde öne çıktığı gözlenmiştir. Bu sonuca göre osteojenik yönde yapılacak indüksiyonlarda PV ve SA-MKH'lerinin kullanılması başarı şansını arttıracaktır.

Kondrojenik indüksiyonda hücre pelletleri oluşturularak uygun kültür ortamı içinde üç boyutlu hücre kürelerinin oluşumu sağlanır. Bu oluşturulan hücre kürelerinin kollajen lif içerdiği ve GAG biriktirerek kondrojenik farklılaşmayı gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Hücre kürelerinin özellikle perifer alanında tip 1 ve 2 kollajen mevcuttur (28, 68, 111). Üç hafta süreyle kondrojenik olarak farklılaştığımız İGK bölgelerindeki hücrelerin bir araya gelerek toplandığı, 1-2 mm çapında küre şeklini aldığı ve kürelerin etrafının parlak olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.6.7.). Kürelerin büyüklüklerinin ve düzenli şekillerinin birbirlerine benzer olduğu gözlenmiştir. Kürelerin kriyo kesitlerinin toluidine mavisiyle boyanmasıyla, ince küreler içinde heterojen metakromatik matris içerisine gömülü düzensiz hücrelerin bulunduğunu belirlenmiştir (Şekil 5.6.7.).

6.6. Sonuç

Yapılan değerlendirmeler sonucunda İGK bölgeleri arasında en fazla hücreyi İV, SA bölgeleri barındırmaktadır. Doku, hücre miktarı ve hücreler arası matris bileşenlerine bağlı olarak eksplant kültüre en iyi yanıtı İV, SA bölgeleri vermektedir. Hücrelerin konfluensiye ulaşma süreleri, doku miktarı ve kültür kabına yapışma potansiyelleriyle koreledir. Bölgeler içinde bulunan hücrelerin yoğunlukları karşılaştırıldığında, birim alanda en fazla hücre sırasıyla PV, GKA, SA, İV bölgelerinden elde edilmektedir. Başlangıçta elde edilen doku miktarı az olsa da, PV-MKH'lerinin kendini yenileme süresindeki kısalık ve birim alanda daha çok hücre barındırması kümülatif hücre miktarında diğer grupları yakalamasını sağlamıştır.

İzolasyon tekniği İGK-MKH'lerinin fenotipi üzerine değişime neden olmaktadır. Enzimatik yöntemde kullanıldığında heterojen bir popülasyona rastlanırken, eksplant yöntemiyle daha saf bir hücre popülasyonu elde edilebilmektedir. Hücre heterojenitesi bölgelerden kaynaklanmamaktadır. İV-MKH'leri diğer bölgelerdeki hücrelere göre daha heterojen bir yapı sergilemektedir. GKA-H'lerinin onarımsal tıp alanında kullanılabilecek önemli bir saf düz kas hücre kaynağı olduğu ortaya konmuştur .

İV, PV, SA, GKA hücreleri birbirlerinden ayrılarak kültüre edildiğinde MKH özelliklerini kaybetmemektedirler. Buna rağmen Kordon dokusundaki hücrelerin birbirinden ayrılması sadece MKH belirleği olan CD73 ifadesinde düşüşe neden olmaktadır. PV-MKH'leri dokudan ayrıştırılarak kültüre edildiğinde MKH belirteçlerini diğer bölgelere daha az ifade etmektedir.

In situ ortamdan *in vitro* ortama geçen İV, PV, SA, GKA-H'lerinde yapısal proteinler incelendiğinde, vimentinin ifadesinin tüm gruplarda korunuyor olması mezenkimal özelliklerin korunduğunu gösteren önemli bir kanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Sitokeratin ifadesi dokudan ayrılarak kültür ortamına geçen PV-MKH'lerinde değişim

göstermektedir. İlk pasajlarda bir grup sitokeratin pozitive hücre bulunurken, kültür koşullarının etkisiyle bu ifadesini pasajlar ilerledikçe arttırmaktadır. *In situ* ortamda İV dışındaki tüm gruptaki hücreler miyojenik karaktere sahipken, hücrelerin dokudan ayrılarak kültüre edilmesi miyojenik özelliklerinin yitirilmesine neden olmaktadır. İV dışında tüm doku bölgelerinde α -SMA ifade eden miyofibroblast karakterinde hücreler vardır, bu hücreler kültüre edildiğinde sadece sitoplazması geniş hücrelerde α -SMA ifadesi korunur diğerlerinde miyofibroblastik özellik kaybedilmektedir.

İGK'nun İV, PV, SA, GKA bölgelerine ayrılarak hücrelerin kültüre edilmeleri sahip oldukları pluripotent özelliklerini kaybetmelerine neden olmaktadır. Bu sonuca göre doku içerisinde bulunan farklı aşamalardaki hücreler parakrin etkiyle birbirlerine destek görevi göstererek pluripotensi seviyesinin korunması sağlanmaktadır. PV-MKH'leri her ne kadar CD73 ifadesini daha az gösterse de vimentin ifadesindeki yükseklik mezenkimal karaktere sahip olduğunu göstermektedir. PV bölgesindeki hücelere oranla daha immatür olduğu söylenen SA ve İV bölgesindeki hücrelerin kültür ortamına alınması, sahip oldukları zayıf miyofibroblastik karakterin yok olmasına neden olmaktadır. GKA ve İV-MKH'leri kardiyak hasarın rejenerasyonu yönünde yapılacak çalışmalarda kullanılabilir önemli bir hücre kaynağıdır. PV-MKH'lerinin diğer bölgelere göre nestini daha fazla ifade etmeleri onların nöron yönünde yapılacak çalışmalarda daha başarılı farklılaşabileceğini göstermektedir. Dokudan ayrılarak kültür ortamına alınan hücrelerin kasılma işlevleri kalmaması sebebiyle miyojenik özelliklerini kaybettikleri görülmektedir. İV, PV, SA, GKA hücrelerinin hedefleme yeteneklerinin bir belirteci olan SEMA-3C ifade etmeleri, bu hücre gruplarının anti-kanser çalışmalarında kullanılabilir önemli bir kaynak olduklarını ortaya koymaktadır.

Hücreler farklılaşma ortamlarına maruz bırakıldıklarında PV hücreleri adipojenik farklılaşmada daha başarılıyken, SA ve İV hücreleri osteojenik farklılaşmada daha iyidir. İlginç olarak bölgeler içinde en fazla farklılaşmış olan GKA hücreleri birçok duruma İGK-MKH'leri gibi yanıt vermektedir. GKA-H'lerinin kültür ortamına alınması onların geriye farklılaşmasına neden olmuş olabileceğini düşündürmüştür. Sonuç olarak, İGK içindeki doku bölgeleri değişen köklülük özelliği gösteren hücreleri içerisinde barındırmaktadır.

Kordon bölgelerinden elde edilen hücreler klinik çalışmalar için önemli bir kaynaktır. Fakat kordon dokusunun tümünden elde edilen İGK-MKH'leri kordon bölgelerine göre daha pluripotent hücrelerdir. Bu çalışmada, klinikte tedavi amaçlı kullanılacak İGK bölgelerindeki hücre gruplarının birbirlerinden farklarının ortaya konması literatüre önemli bir katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- 1 McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem Soc Trans.* 1991 Feb;**19**(1):29S.
- 2 Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology.* 2008 Mar;**134**(3):833-48.
- 3 Cheng H, Qiu L, Ma J, et al. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Mol Biol Rep.* 2010 Dec 29.
- 4 Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 Oct;**2**(7):394-9.
- 5 Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev.* 2006;**2**(2):155-62.
- 6 Karahuseyinoglu S, Kocafe C, Balci D, Erdemli E, Can A. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells.* 2008 Mar;**26**(3):682-91.
- 7 Huang P, Lin LM, Wu XY, et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2010 Mar 1;**109**(4):747-54.
- 8 Medicetty S, Bledsoe AR, Fahrenholtz CB, Troyer D, Weiss ML. Transplantation of pig stem cells into rat brain: proliferation during the first 8 weeks. *Exp Neurol.* 2004 Nov;**190**(1):32-41.
- 9 Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, et al. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol.* 2003 Aug;**182**(2):288-99.
- 10 Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells.* 2008 Nov;**26**(11):2865-74.
- 11 Lu LL, Song YP, Wei XD, Fang BJ, Zhang YL, Li YF. [Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue and bone marrow]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2008 Feb;**16**(1):140-6.
- 12 Hamada H, Kobune M, Nakamura K, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci.* 2005 Mar;**96**(3):149-56.
- 13 Rachakatla RS, Marini F, Weiss ML, Tamura M, Troyer D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. *Cancer Gene Ther.* 2007 Jun 29.
- 14 Conconi MT, Di Liddo R, Tommasini M, Calore C, Parnigotto PP. Phenotype and differentiation potential of stromal populations obtained from various zones of human umbilical cord: An overview. *The Open Tissue Eng Regen Med J.* 2011;**4**:6-20.
- 15 Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells.* 2007 Nov;**25**(11):2886-95.

- 16 Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*. 2001;**17**:435-62.
- 17 Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology*. 2001;**17**:387-403.
- 18 CAN A. Kök Hücre Biyolojisi, Turleri ve Kullanımları. Ankara: Akademisyen Tıp Kitapevi; 2014.
- 19 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;**292**(5819):154-6.
- 20 Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984 May 17-23;**309**(5965):255-6.
- 21 Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews*. 2005 Apr;**85**(2):635-78.
- 22 Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010 Nov 12;**143**(4):508-25.
- 23 Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001 Oct;**19**(10):971-4.
- 24 Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*. 2008;**25**(2):57-9.
- 25 Can A. Kök Hücre Tanımları. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu. Ankara: Türkiye Bilimler Akademisi; 2009. p. 15-22.
- 26 Barcena A, Muench MO, Kapidzic M, Gormley M, Goldfien GA, Fisher SJ. Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for transplantation. *Transfusion*. 2011 Nov;**51 Suppl 4**:94S-105S.
- 27 De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan;**25**(1):100-6.
- 28 Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007 Feb;**25**(2):319-31.
- 29 Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an update. *Current opinion in genetics & development*. 2006 Oct;**16**(5):518-24.
- 30 Gardner RL. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1982 Apr;**68**:175-98.
- 31 Gardner RL, Rossant J. Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1979 Aug;**52**:141-52.
- 32 Rossant J. Lineage development and polar asymmetries in the peri-implantation mouse blastocyst. *Seminars in cell & developmental biology*. 2004 Oct;**15**(5):573-81.
- 33 Guo G, Huss M, Tong GQ, et al. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Developmental cell*. 2010 Apr 20;**18**(4):675-85.
- 34 Cauffman G, De Rycke M, Sermon K, Liebaers I, Van de Velde H. Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2009 Jan;**24**(1):63-70.

- 35 De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem cell reviews*. 2010 Dec;**6**(4):633-49.
- 36 De Miguel MP, Arnalich Montiel F, Lopez Iglesias P, Blazquez Martinez A, Nistal M. Epiblast-derived stem cells in embryonic and adult tissues. *The International journal of developmental biology*. 2009;**53**(8-10):1529-40.
- 37 Fainsod A, Steinbeisser H, De Robertis EM. On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *The EMBO journal*. 1994 Nov 1;**13**(21):5015-25.
- 38 Almeida KL, Abreu J, Yan CYI. Neural Induction. In: Ulrich H, editor. *Perspectives of Stem Cells*. Heidelberg: Springer; 2010. p. 1-10.
- 39 Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 10th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- 40 Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier; 2009.
- 41 Carlson B. *Human Embryology and Developmental Biology*. 3 ed. Philadelphia: CV Mosby; 2004.
- 42 Sobolewski K, Bankowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate*. 1997;**71**(1):11-21.
- 43 Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;**698**:51-62.
- 44 Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*. 1997 Jan;**18**(1):53-64.
- 45 Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin. *Early Hum Dev*. 1998 Jul 10;**51**(3):223-33.
- 46 Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005 Feb;**23**(2):220-9.
- 47 Takechi K, Kuwabara Y, Mizuno M. Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*. 1993 Mar-Apr;**14**(2):235-45.
- 48 Kreis T, Vale R. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. 2 ed. Oxford: Oxford University Press; 1999.
- 49 Kasper M, Stosiek P, Karsten U. Coexpression of cytokeratins and vimentin in hyaluronic acid-rich tissues. *Acta Histochem*. 1988;**84**(1):107-8.
- 50 Kohnen G, Kertschanska S, Demir R, Kaufmann P. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol*. 1996 Jun;**105**(6):415-29.
- 51 Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008 Mar;**26**(3):591-9.
- 52 Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2009;**2009**:789526.
- 53 Parry EW, Abramovich DR. The ultrastructure of human umbilical vessel endothelium from early pregnancy to full term. *J Anat*. 1972 Jan;**111**(Pt 1):29-42.

- 54 Eyden BP, Ponting J, Davies H, Bartley C, Torgersen E. Defining the myofibroblast: normal tissues, with special reference to the stromal cells of Wharton's jelly in human umbilical cord. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1994 Jul;**26**(3):347-55.
- 55 Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science*. 1971 Aug 6;**173**(996):548-50.
- 56 Fawcett D, editor. *An Atlas of Fine Structure*. London: Saunders Company; 1966.
- 57 Chou YH, Skalli O, Goldman RD. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Feb;**9**(1):49-53.
- 58 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;**8**(4):315-7.
- 59 Alaminos M, Perez-Kohler B, Garzon I, et al. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2010 Jun;**223**(3):640-7.
- 60 Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006 Mar;**24**(3):781-92.
- 61 La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*. 2009 Feb;**131**(2):267-82.
- 62 Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006 Feb 6;**4**(1):8.
- 63 Jo CH, Kim OS, Park EY, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion. *Cell Tissue Res*. 2008 Dec;**334**(3):423-33.
- 64 Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's Jelly Stem Cells Have Unique Transcriptome Profiles Compared to Human Embryonic Stem Cells and Other Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev*. 2010 Jul 3.
- 65 Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Sep;**36**(9):1179-83.
- 66 Pruszk J, Ludwig W, Blak A, Alavian K, Isacson O. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells. *Stem Cells*. 2009 Dec;**27**(12):2928-40.
- 67 Fong CY, Subramanian A, Biswas A, et al. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online*. 2010 Sep;**21**(3):391-401.
- 68 Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;**22**(7):1330-7.
- 69 Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;**21**(1):50-60.
- 70 Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006 Jan;**24**(1):115-24.

- 71 Lund RD, Wang S, Lu B, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*. 2007 Mar;**25**(3):602-11.
- 72 Ding DC, Shyu WC, Chiang MF, et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. *Neurobiol Dis*. 2007 Sep;**27**(3):339-53.
- 73 Liao W, Zhong J, Yu J, et al. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiol Biochem*. 2009;**24**(3-4):307-16.
- 74 Yang CC, Shih YH, Ko MH, Hsu SY, Cheng H, Fu YS. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*. 2008;**3**(10):e3336.
- 75 Yan Y, Xu W, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver Int*. 2009 Mar;**29**(3):356-65.
- 76 Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*. 2006 Aug;**91**(8):1017-26.
- 77 Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*. 2008;**3**(1):e1451.
- 78 Zhang YN, Lie PC, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*. 2009;**11**(5):548-58.
- 79 Kocaepe C, Balci D, Hayta BB, Can A. Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev*. 2010 Dec;**6**(4):512-22.
- 80 Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem cell reviews*. 2011 Mar;**7**(1):195-207.
- 81 Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007 Jun;**25**(6):1384-92.
- 82 Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005 Aug 15;**106**(4):1232-9.
- 83 Raio L, Cromi A, Ghezzi F, et al. Hyaluronan content of Wharton's jelly in healthy and Down syndrome fetuses. *Matrix Biol*. 2005 Apr;**24**(2):166-74.
- 84 Schneider RK, Puellen A, Kramann R, et al. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials*. 2010 Jan;**31**(3):467-80.
- 85 Wang L, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009 Feb 27.
- 86 Bongso A, Fong CY, Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *J Cell Biochem*. 2008 Dec 15;**105**(6):1352-60.

- 87 Bankowski E, Sobolewski K, Palka J, Jaworski S. Decreased expression of the insulin-like growth factor-I-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoform in pre-eclamptic Wharton's jelly and its role in the regulation of collagen biosynthesis. *Clin Chem Lab Med*. 2004 Feb;**42**(2):175-81.
- 88 Suva D, Garavaglia G, Menetrey J, et al. Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2004 Jan;**198**(1):110-8.
- 89 Gauthaman K, Venugopal JR, Yee FC, Biswas A, Ramakrishna S, Bongso A. Osteogenic Differentiation of Human Wharton's Jelly Stem Cells on Nanofibrous Substrates In Vitro. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep 9.
- 90 Kadam SS, Bhonde RR. Islet neogenesis from the constitutively nestin expressing human umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. *Islets*. 2010 Mar-Apr;**2**(2):112-20.
- 91 Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Dec;**13**(12):1477-86.
- 92 Ayuzawa R, Doi C, Rachakatla RS, et al. Naïve human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*. 2009;**280**(1):31-7.
- 93 Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord. *Stem Cell Rev*. 2010 Jul 2.
- 94 Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol*. 2009 Sep;**90**(2):261-9.
- 95 Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal*. 2009;**7**:6.
- 96 Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006 Dec;**18**(6):1089-96.
- 97 Ren H, Zhao Q, Cheng T, et al. No contribution of umbilical cord mesenchymal stromal cells to capillarization and venularization of hepatic sinusoids accompanied by hepatic differentiation in carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis. *Cytotherapy*. 2010 May;**12**(3):371-83.
- 98 Bozhok Iu M, Bannikov GA, Tavokina LV, Svitkina TM, Troianovskii SM. [Local expression of cytokeratins 8, 17 and 18 in the mesenchyme and smooth muscles in the early stages of human organogenesis]. *Ontogenez*. 1989 May-Jun;**20**(3):250-7.
- 99 Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation*. 1993 Jun;**53**(2):75-93.
- 100 Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*. 1990 Jul;**63**(1):21-9.

- 101 Kadner A, Zund G, Maurus C, et al. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Apr;**25**(4):635-41.
- 102 Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*. 2008 Sep 11;**3**(3):301-13.
- 103 Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol*. 2008 Aug;**36**(8):1035-46.
- 104 Struys T, Moreels M, Martens W, Donders R, Wolfs E, Lambrichts I. Ultrastructural and Immunocytochemical Analysis of Multilineage Differentiated Human Dental Pulp- and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2010 Dec 1.
- 105 Tong CK, Vellasamy S, Tan BC, et al. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using combination of enzymatic and mechanical disassociation method. *Cell Biol Int*. 2010 Oct 15.
- 106 Song D, Liu X, Liu R, Yang L, Zuo J, Liu W. Connexin 43 hemichannel regulates H9c2 cell proliferation by modulating intracellular ATP and [Ca²⁺]. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2010 Jul;**42**(7):472-82.
- 107 Making a difference. *The World Health Report. Health Millions*. 1999(25):3-5.
- 108 Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*. 2006 Dec 15;**127**(6):1137-50.
- 109 La Rocca G, Anzalone R, Farina F. The expression of CD68 in human umbilical cord mesenchymal stem cells: new evidences of presence in non-myeloid cell types. *Scandinavian journal of immunology*. 2009 Aug;**70**(2):161-2.
- 110 Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One*. 2009;**4**(8):e6498.
- 111 Bailey MM, Wang L, Bode CJ, Mitchell KE, Detamore MS. A Comparison of Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells and Temporomandibular Joint Condylar Chondrocytes for Tissue Engineering Temporomandibular Joint Condylar Cartilage. *Tissue Eng*. 2007 May 14.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Deniz BALCI

Doğum Yeri: Adana

Doğum Tarihi: 29/10/1983

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce (ileri), İspanyolca (başlangıç)

Eğitim Durumu

Lise: Özel Bilimkent Lisesi, Adana (2000)

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara (2000-2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara (2006-2009)

İş Tecrübesi

Kurum	Görevi	Yılları
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü	Araştırmacı	7/2006 – 12/2008
Ankara Üniversitesi Histoloji Embriyoloji ABD	Araştırmacı	12/2008 –
Korpus Biyoteknoloji Araştırma Ve Ürün Geliştirme, Eğitim, Danışmanlık Ve Sağlık Hizmetleri Tic. Ltd. Şti.	AR-GE Sorumlusu	5/2010 – 05/2012
12B3330010 no'lu Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi	Proje destek uzmanı	11/2012 –

Patentler

İnsan göbek kordonu stromasının dondurulması. (Kordon dondurma işlemi, taşıma ve dondurma çözümleri) Başvuru no: 2010/05578. Patentlenme işlemi devam etmekte.

Ödüller

- X. Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, *THED Bilimsel Araştırma Üçüncülük Ödülü*. Balcı D, Can A. "The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking" 17-20 Mayıs, Çeşme.
- 17th International Symposium on Biomedical Science and Technology BIOMED. *Poster Ödülü*. Karadağ A, Balcı D, Çubukçuoğlu G, Durdu S, Özdağ H, Sunguroğlu A, Akar R, Can A. "In Vitro Fusion of Murine Cardiomyocytes (HL-1) and Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells", 23-25 Kasım 2011, Ankara.
- Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, *Deneysel Sözel Bildiri Ödülü*. Durdu S, Karadağ A, Çubukçuoğlu G, Balcı D, Davidson M, Ferit Avcu, Uğur M, Can A, Akar R. "İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kardiyomiyojenik Farklılaşması (Ex vivo deneysel çalışma)" 8 – 11 Kasım 2012, Antalya.

Yayımlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

- 1) S. Karahuseyinoglu, C. Kocaefe, D. Balci, E .Erdemli, A. Can. "Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells." Stem Cells. 2008 Mar;26(3):682-91.
- 2) C. Kocaefe, D. Balci, B. Balci Hayta, A. Can."Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair." Stem Cell Rev. 2010 Dec;6(4):512-22.
- 3) P. Oktar, S. Yildirim, D. Balci, A. Can. "Continual Expression Throughout the Cell Cycle and Downregulation upon Adipogenic Differentiation Makes Nucleostemin a Vital Human MSC Proliferation Marker." Stem Cell Reviews and Reports. 2011 Jun;7(2):413-24.
- 4) Alp Can, Deniz Balcı. Isolation, Culture and Characterization of Human Umbilical Cord Stroma-derived Stem Cells. Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications,

Methods in Molecular Biology. Mohan C. Vemuri, Mahendra S. Rao & Lucas G. Chase, Humana Press; 2011; 698:51-62. (kitap bölümü)

5) S. Durdu, GC. Deniz, D. Balci, C. Zaim, A. Dogan, A. Can, KC. Akcali, AR. Akar. “Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection” Cardiovascular therapeutics. 2012 Dec;30(6):308-16.

6) D. Balci, A.Can. “The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking.” Curr Stem Cell Res Ther. 2012 Dec 24.

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

S. Yıldırım, D Balci, P. Akpınar, A. Can. “Differentiation potentials of two stroma-resident tissue-specific stem cells.” Niche. 2012 1: 1-7.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1) Kocaefe Ç, Balcı D, Hayta B, Can A. “Reprogramming Of Human Umbilical Cord Stromal Stem Cells For Muscle Regeneration” EMBO 2009, 29 Ağustos-1 Eylül, Amsterdam, Hollanda.

2) Balcı D, Can A. “The Assessment of Cryopreservation Conditions for Human Umbilical Cord Stromal Stem Cells Towards A Potential Use For Stem Cell Banking” The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs (CRYO)”, 27-30 Mayıs 2011, Valencia, İspanya.

3) Balcı D, Can A. “The Assessment Of Controlled Cryopreservation Conditions Of Human Umbilical Cord Stromal Tissue For The Potential Usage Of MSCs For Stem Cell Transplantations And Banking” ISSCR 9th Annual Meeting, 15-18 Haziran 2011, Toronto, Kanada.

4) Balcı D, Can A. “Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells From Four Different Tissue Subcompartments Having Distinct Stemness Properties Retain Their Characteristics When Isolated Using Explant Cultures” ISSCR 11th Annual Meeting, 12-15 Haziran 2013, Boston, USA.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- 1) S. Karahuseyinoglu, C. Kocaefe, D. Balci, E. Erdemli, A. Can. "Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells" IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 20-23 Mayıs, Adana.
- 2) Balci D, Kocaefe Ç, Kara F, Can A. "Göbek kordonu stroması kök hücrelerinin kontrollü yavaş dondurma parametrelerinin optimizasyonu" TÜBA IV. Kök Hücre Sempozyumu, 26-27 Haziran, Ankara. (Sözlü Bildiri)
- 3) Balci D, Can A. "İnsan göbek kordonu stroması kök hücrelerinin kök hücre bankacılığı için kriyoprezervasyon koşullarının belirlenmesi" X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 17-20 Mayıs 2010, Çeşme. (Sözlü Bildiri)
- 4) Topal F, Erdemli E, Özkavukçu S, Balci D, Çınar Ö, Kılıçoğlu S. "Vitrifiye edilmiş ve yavaş dondurma ile saklanmış fare ovaryum dokusunun karşılaştırılması" X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 17-20 Mayıs 2010, İzmir.
- 5) Durdu S, Çubukçuoğlu G, Zaim Ç, Doğan A, Balci D, Can A, Akçalı C, Akar R "Involvement of Bcl-2 Family of Proteins in Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis in Patients with Ascending Aortic Aneurysm and Dissection" International Symposium On New Approaches In Cardiovascular Disorders, 04-08 Mayıs 2011, Ankara.
- 6) Karadağ A, Balci D, Çubukçuoğlu G, Durdu S, Özdağ H, Sunguroğlu A, Akar R, Can A "Spontaneous Fusion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Murine Cardiomyocytes (HL-1) in vitro" International Symposium On New Approaches In Cardiovascular Disorders, 04-08 Mayıs 2011, Ankara.
- 7) Topal F, Erdemli E, Özkavukçu S, Balci D, Kılıçoğlu S. "Vitrifiye edilmiş ve yavaş dondurma ile saklanmış fare ovaryum dokusunun ince yapı düzeyinde incelenerek karşılaştırılması" 20. Ulusal Elektron Mikroskopisi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Kemer-Antalya.
- 8) Durdu S, Karadağ A, Çubukçuoğlu G, Balci D, Davidson M, Ferit Avcu, Uğur M, Can A, Akar R. "İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kardiyomyojenik Farklılaşması (Ex vivo deneysel çalışma)" Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8 – 11 Kasım 2012, Antalya.
- 9) Karadağ A, Balci D, Çubukçuoğlu G, Durdu S, Özdağ H, Sunguroğlu A, Akar R, Can A. "In vitro Fusion of Murine Cardiomyocytes (HL-1) and Human Umbilical Cord

Mesenchymal Stem Cells” 17th International Symposium on Biomedical Science and Technology BIOMED, 23-25 Kasım 2011, Ankara.

10) Karadağ A, Balcı D, Çubukçuoğlu G, Durdu S, Özdağ H, Sunguroğlu A, Akar R, Can A. “Spontaneous Fusion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Murine Cardiomyocytes (HL-1) in vitro” International Symposium on New Approaches in Cardiovascular disorders: NACD, 4-8 Mayıs 2011, Ankara.

11) Dastouri M, Karadağ A, Balcı D, Çubukçuoğlu G, Durdu S, Doğan A, Can A, Akar R. “Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin (Upkh) Flk1+ Öncül Hücelere Farklılaştırılması Aşamasında Optimum Zamanlama” Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8 – 11 Kasım 2012, Antalya.

12) Dastouri M, Karadağ A, Balcı D, Çubukçuoğlu G, Durdu S, Doğan A, Akar R, Can A. “Uyarılmış Pluripotent Kök (iPS) Hücrelerinin Flk1+ Öncü Hücelere Farklılaştırılması ve Tanımlanması” 3. Kök Hücre Sempozyumu 30 Kasım – 1 Aralık, 2012, İstanbul. (Sözlü Bildiri)