

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN GÖBEK KORDONU STROMASI KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
İN VİTRO KOŞULLARDA GERÇEKLEŞTİRDİĞİ HÜCRESEL DÖNÜŞÜMÜN
EPİTEL-MEZENKİM GEÇİŞİ ÇERÇEVESİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Hakan Coşkun

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alp Can

Temmuz

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.

Hakan Coşkun

İmzası

Prof. Dr. Alp Can danışmanlığında, Hakan Coşkun tarafından hazırlanan bu çalışma 18/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Petek Korkusuz İmza:

Üye : Prof. Dr. Hilâl Özdağ İmza:

Üye : Prof. Dr. Alp Can İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İnsan Göbek Kordonu Stroması Kaynaklı Kök Hücrelerin
in vitro Koşullarda Gerçekleştirdiği Hücresel Dönüşümün
Epitel Mezenkim Geçişi Çerçevesinde Değerlendirilmesi

Hakan Coşkun

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Alp Can

Laboratuvar koşullarında kültürü yapılan insan göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücreleri (iGKS-MKH) iki farklı fenotip ile karşımıza çıkmaktadır. Tip 1 ve Tip 2 olarak adlandırılan bu hücreler kültür ortamında heterojen bir yapıda olup, ilk pasajlardaki kültür ortamı Tip 1 hücrelerce zengin iken ilerleyen pasajlarda yerini Tip 2 hücrelere bırakmaktadır. Tip 1 hücreler geniş sitoplazmalı, son derece yassı ve stres liflerince zengin bir fenotip sergilerken; Tip 2 hücreler fibroblastoid olup uzun sitoplazmik uzantılara sahiptir. Bu bulgular ve deneyimler doğrultusunda göbek kordonu stromasından izole edilen hücreler arasında *in vitro* koşullarda bir geçişin olduğunu ön görmekteyiz. Bu olay EMG süreci ile ilişkilendirildiğinde Tip 1 hücrelerin ilerleyen pasajlarda yerini Tip 2 hücrelere bıraktığı düşünülebilir. Bu geçişin epitel mezenkim geçişinden ziyade bir miyofibroblast fibroblast geçişi olabileceğini düşündük ve bu tez çalışması ile bunu kanıtlamayı planladık.

Epitel mezenkim geçişi (EMG) bazal membran üzerinde polarize olmuş epitel hücrelerinin bir dizi hücresel değişim sonucunda mezenkim hücresi karakteri kazanmasıdır. Bu geçiş, biçimsel (fenotipik) ve hücre-hücre yapışma moleküllerinde meydana gelen bir dizi değişimle başlar ve bazal membranın tamamen yıkılmasıyla sona erer. EMG süreci ile hücrenin göç ve invazyon kapasitesi artar. Bu süreç içerisinde birçok moleküler değişim gerçekleşmektedir.

Doğum sonrasında alınan göbek kordonu steril ve uygun taşıma koşulları içerisinde laboratuvara getirilerek gerekli mekanik ve enzimatik izolasyon teknikleri kullanılarak hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından 7. pasaj kadar kültürleri yapılan bu hücreler çalışmanın amacına göre farklı denemelere tabi tutulmuştur.

Araştırmada temel olarak immünohistokimyasal ve immüno-sitokimyasal incelemeler ile belirli hücre iskeleti ve hücre yüzey proteinlerinin hücredeki varlığı, dağılımı ve yarı sayısal yöntemle miktarı belirlenmiştir. Yapılan *in situ* ve *in vitro* çalışmalarda hücrelerin E-kaderin ifade etmedikleri fakat N-kaderin ifade ettikleri belirlenmiştir. Bunun yanında hücrelerin farklı düzeylerde pansitokeratin, sitokeratin 18, sitokeratin 19 ile α -SMA (alfa-düz kas aktini) ve vimentin ifade ettikleri gözlenmiştir.

Bu çalışmada *in vitro* ortamda Tip 1 ve Tip 2 olarak adlandırılan farklı fenotipe sahip iki hücre tipi ile yapılacak olan moleküler düzeydeki deneylerden elde edilen veriler doğrultusunda miyofibroblast fibroblast geçiş sürecini ve bu iki hücrenin deneysel olarak birbirine geçişini kontrol eden mekanizmaların gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu moleküler mekanizmalar temelinde iGKS-MKH'lerinin moleküler ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi kök hücre tedavisinde başarı oranına ve hücre biyolojisi alanına önemli katkı sağlayacaktır.

2013, 83 sayfa

Anahtar kelimeler: Epitel mezenkim geçişi, Göbek kordonu, Mezenkimal kök hücre

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

The Assessment of Cellular Transformation in view of Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Umbilical Cord-Derived Stromal Stem Cells Upon *in vitro* Culture Conditions

Hakan Coşkun

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Alp Can

Human umbilical cord-derived stromal stem cells (HUCSCs) in culture revealed two distinct cell populations, designated as type-1 and type-2 cells. Type-1 cells dominate in the early passages, whereas later passages become rich in type 2 cells. Type-1 cells exhibit flat, wide cytoplasmic phenotype like myofibroblastic cells. In contrast, type 2-cells appear to have fibroblast-like cell phenotype. We hypothesized that an *in vitro* transition is concerned between those cell types, type-1 cells are replaced by type-2 cells in late passages. It appears that this phenomenon is a myofibroblast fibroblast transition rather than an epithelial-mesenchymal transition. In this thesis, our aim was to prove this hypothesis.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a biologic process that allows a polarized epithelial cell, which normally interacts with basement membrane via its basal surface, to undergo multiple biochemical changes enabling it to assume a mesenchymal cell phenotype. EMT starts to undergo a series of multiple biochemical changes by which and greatly an increased production of extra cellular matrix (ECM) components exist. The completion of EMT is signaled by the degradation of underlying basement membrane and the formation of a mesenchymal cell, which includes enhanced migratory capacity, invasiveness.

Briefly, umbilical cords from newborn babies were immersed in sterile transfer solution and immediately transferred to the laboratory. Stromal cells were isolated using

mechanical and enzymatic cell isolation techniques and then primary cultures were carried out until 7 passages.

We used immunohistochemical and immunocytochemical methods to observe the changes and semi-quantitative amount in specific cell-surface and cytoskeletal proteins. When *in situ* and *in vitro* surveys were observed that E-cadherin was not expressed but N-cadherin was expressed by the cells. Furthermore, it was determined that the cells were expressing pancytokeratin, cytokeratin 18, cytokeratin 19 and vimentin, α -SMA (alpha-smooth muscle actin).

In this study, we aimed to assess the cellular transformation of Type-1 and Type-2 cells in view of EMT *in vitro* culture conditions. The ultimate goal was to achieve the molecular and phenotypic characterization of the HUCSCs, which will importantly contribute to the stem cell therapies and biology of the cell.

2013, 83 pages

Keywords: Epithelial mesenchymal transition, Mesenchymal stem cell, Umbilical cord

ÖNSÖZ

Vücut içinde karmaşık doku ortamlarında bulunan hücreler vücut dışına çıkarıldıklarında bugüne kadar bilinen kültür yöntemlerinden birisi kullanılarak vücut dışındaki yapay ortamda çoğaltılmaktadır. Hücre kültürü olarak adlandırılan bu yaklaşım birçok hücrenin davranışında ve fenotipinde farklı düzeylerde değişimlere neden olmaktadır. Bu alanda yürütülen çalışmaların en önde gelen amaçlarından birisi kültür ortamında canlılığını sürdüren hücrelerin *in vivo* koşullardaki fizyolojik süreçlerini taklit etmektir. Ancak yürütülen sayısız çalışmaya rağmen, sınırlı sayıda hücresel özelliğin *in vitro* ortamdaki hücrelerde korunabildiği görülmektedir. Kök hücreler söz konusu olduğunda bu durum daha da fazla önem kazanmaktadır. Çünkü kök hücreler sınırlı sayıya sahip hücreler olarak organizmanın çok özgün mikroçevrelerinde, yani kendilerine özgü niş ortamlarında varlıklarını sürdürmektedir. Günümüzde kök hücre çalışmaları ve tedavilerinde yaygın kullanıldığı üzere hücreler belli anatomik bölgelerden çıkarılmakta, kültür ortamlarında çoğaltılmakta ve gerekirse farklılaştırılmaktadır. Bu bağlamda hücrelerin özgün karakterlerinin belirlenmesi ve kültür koşullarında bu özelliklerinin korunması hedeflenen çalışmalarda büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* koşullar altında sergilediği heterojen hücre fenotipinin hücresel dönüşüm modeli çerçevesinde değerlendirerek sergilemiş oldukları heterojen görünümün moleküler ve fenotipik olarak tanımlanması amaçlanmıştır.

Çalışmamın başlangıcından bitimine kadar, benden yardımını esirgemeyen pek çok kişiye teşekkür borçluyum.

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoş görü ve sabırdan dolayı değerli hocam, Prof. Dr. Alp Can'a,

Eğitimim boyunca üzerimde emeği geçen sayın hocalarıma; birlikte çalışmaktan zevk aldığım sevgili asistan arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Epitel Mezenkim Geçişi	4
2.1.1. Epitel Mezenkim Geçişinin Nedenleri	5
2.1.2. Epitel Mezenkim Geçişinin Sınıflandırılması	6
2.1.2.1. Tip 1 EMG: İmplantasyon, Embriyogenez, Organ Gelişimi	8
2.1.2.2. Tip 2 EMG: Doku yenilenmesi ve organ fibrozisi	10
2.1.2.3. Tip 3 EMG: Kanser ve Metastaz	12
2.2. İnsan Göbek Kordonunun Yapısı ve İşlevi	16
2.2.1. iGK Hücreleri ve Hücreler Arası Matriks Bileşenleri	17
2.2.2. İnsan Göbek Kordonu Stroma Hücreleri ve Organizasyonu	19
2.2.3. İnsan Göbek Kordonu Hücreler Arası Matriks Bileşenleri	20
2.2.4. İnsan Göbek Kordonu Stromal Hücrelerin <i>İn vitro</i> Farklılaşma Potansiyelleri	21
3. GEREKÇE VE AMAÇ	24
4. GEREÇ VE YÖNTEM	27
4.1. Gereç	27
4.1.1. İnsan Göbek Kordonu Örneklerinin Laboratuvara Taşınması	27
4.1.2. iGKS-MKH'lerinin İzolasyonu	27
4.1.3. iGKS-MKH'lerinin Primer ve Pasajlama Kültürleri	28
4.1.4. iGKS-MKH'lerinin Dondurularak Saklanması ve Çözülmesi	28
4.1.5. iGKS-MKH'lerinin İmmünohistokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	29
4.2. Yöntem	31
4.2.1. İnsan Göbek Kordonu Örneklerinin Laboratuvara Taşınması	31
4.2.2. iGKS-MKH'lerinin İzolasyonu	31
4.2.3. iGKS-MKH'lerin Primer ve Pasajlama Kültürleri	32
4.2.4. iGKS-MKH'lerinin Dondurulması ve Çözülmesi	33
4.2.5. iGK'ndan Frozen Kesitlerin Alınması	34
4.2.6. iGK Frozen Kesitlerin İmmünohistokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	34
4.2.7. iGKS-MKH'lerin İmmünohistokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	35
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
5.1. iGKS-MKH'in Büyüme ve Çoğalma Sürecinin Değerlendirilmesi	37
5.2. iGKS-MKH'in <i>İn vitro</i> Koşullar Altında Fenotiplerinin Değerlendirilmesi	37

5.3. iGK Histolojik Kesitlerinin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	39
5.4. iGKS-MKH'lerinin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	44
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
6.1. iGKS-MKH'lerinin İzolasyon, Büyüme ve Çoğalma Sürecinin Fenotipik Olarak Değerlendirilmesi.....	62
6.2. iGKS ve iGKS-MKH'lerin Moleküler Olarak Değerlendirilmesi	64
6.3. Sonuç.....	70
KAYNAKLAR	72
EKLER	81
EK1:Etik Kurul Kararı.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1 Epitel Mezenkim Geçişi	4
Şekil 2.1.2.1 Epitel Mezenkim Geçiş Tipleri	7
Şekil 2.1.2.1.1 Omurgalılarda embriyonik tabakaların oluşumu.....	10
Şekil 2.1.2.1.2 Epitel Mezenkim Geçişi ve Fibrozis	12
Şekil 2.1.2.1.3 Epitel-Mezenkim Geçişi ve kanserin ilerlemesi.....	13
Şekil 2.1.2.1.1 Omurgalılarda embriyonik tabakaların oluşumu.....	10
Şekil 2.1.2.1.2 Epitel Mezenkim Geçişi ve Fibrozis	12
Şekil 2.1.2.1.3 Epitel-Mezenkim Geçişi ve kanserin ilerlemesi.....	13
Şekil 2.1.2.1.1 Omurgalılarda embriyonik tabakaların oluşumu.....	10
Şekil 2.1.2.1.2 Epitel Mezenkim Geçişi ve Fibrozis	12
Şekil 2.1.2.1.3 Epitel-Mezenkim Geçişi ve kanserin ilerlemesi.....	13
Şekil 2.1.1.1 İnsan göbük kordonu ve bölgeleri	18
Şekil 3.1 Hipotez: Miyofibroblast (Tip 1 hücre) – Fibroblast (Tip 2 hücre) geçişi	25
Şekil 5.2. 1 Mekanik olarak izole edilmiş iGK-MKH'leri.....	38
Şekil 5.2.2 Enzimatik olarak izole edilmiş iGK-MKH'leri.....	39
Şekil 5.3.1 iGK stromasında E-kaderin ve N-kaderin ifadesi	40
Şekil 5.3.2 iGK stromasında pansitokeratin, sitokeratin 18 ve sitokeratin 19 ifadesi.....	41
Şekil 5.3.3 iGK stromasında vimentin ve α -SMA ifadesi	43
Şekil 5.4.1 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında E-kaderin ifadesi.....	45
Şekil 5.4.2 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında N-kaderin ifadesi	45
Şekil 5.4.3 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında E-kaderin ifadesi.....	46

Şekil 5.4.4 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında N-kaderin ifadesi.....	47
Şekil 5.4.5 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde uzun süreli kültür sonrasında E-kaderin ifadesi.....	48
Şekil 5.4.6 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde uzun süreli kültür sonrasında N-kaderin ifadesi	49
Şekil 5.4.7 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde pansitokeratin ifadesi.....	50
Şekil 5.4.8 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde pansitokeratin ifadesi.....	51
Şekil 5.4.9 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde sitokeratin 18 ifadesi	52
Şekil 5.4.10 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde sitokeratin18 ifadesi.....	53
Şekil 5.4. 11 iGK-MKH'lerinde sitokeratin 19 ifadesi	54
Şekil 5.4. 12 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde sitokeratin19 ifadesi.....	55
Şekil 5.4. 13 Enzimatik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde α -SMA ifadesi	56
Şekil 5.4.14 Mekanik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde α -SMA ifadesi	57
Şekil 5.4.15 Enzimatik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde vimentin ifadesi	58
Şekil 5.4.16 Mekanik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde vimentin ifadesi	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.2.5. 1 İnsan göbek kordonu stroması MKH'nin taşıdığı belirteçler.....	23
Çizelge 4.1.5. 1 Kullanılan kimyasalların marka ve katalog numaraları	30
Çizelge 5.3.1 iGK stroma bölgelerinde sitokeratin ifade şiddetinin değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 5.3.2 iGK stroma bölgelerinde vimentin ve α -SMA ifade şiddetinin değerlendirilmesi	43
Çizelge 5.4.1 iGK MKH'lerinde moleküllerin ifade şiddetinin değerlendirilmesi	60

1. GİRİŞ

Vücut içinde karmaşık doku ortamlarında bulunan hücreler vücut dışına çıkarıldıklarında bugüne kadar bilinen kültür yöntemlerinden birisi kullanılarak vücut dışındaki yapay ortamda çoğaltılırlar. Hücre kültürü olarak adlandırılan bu yaklaşım birçok hücrenin davranışında ve fenotipinde farklı düzeylerde değişimlere neden olmaktadır. Bu alanda yürütülen çalışmaların en önde gelen amaçlarından birisi kültür ortamında canlılığını sürdüren hücrelerin *in vivo* koşullardaki fizyolojik süreçlerini taklit etmektir. Ancak yürütülen sayısız çalışmaya rağmen, sınırlı sayıda hücresel özelliğin *in vitro* ortamdaki hücrelerde korunabildiği görülmektedir. Kök hücreler söz konusu olduğunda bu durum daha da fazla önem kazanmaktadır. Çünkü kök hücreler sınırlı sayıya sahip hücreler olarak organizmanın çok özgün mikroçevrelerinde, yani kendilerine özgü niş ortamlarında varlıklarını sürdürmektedir. Günümüzde kök hücre çalışmaları ve tedavilerinde yaygın kullanıldığı üzere hücreler belli anatomik bölgelerden çıkarılmakta, kültür ortamlarında çoğaltılmakta ve gerekirse farklılaştırılmaktadır. Bu bağlamda hücrelerin özgün karakterlerini bir bölümünü geçici veya kalıcı olarak yitirmeleri son derece doğaldır.

İnsan göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücreleri (iGKS-MKH) üzerinde yürütmekte olan analizler bu hücrelerin de kaynak aldıkları dokudan çıkarılmaları ve sonrasında kültüre edilmeleri sırasında benzer değişim sürecinden geçtiğini göstermiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde laboratuvar koşullarında kültürü yapılan iGKS-MKH iki farklı fenotip göstermektedir. İlk kez Can ve ark. tarafından Tip 1 ve Tip 2 olarak adlandırılan bu hücreler kültür ortamında heterojen bir yapıda olup, ilk pasajlardaki kültür ortamı Tip 1 hücrelerce zengin iken ilerleyen pasajlarda yerini Tip 2 hücrelere bırakmaktadır (1). Tip 1 hücreler geniş sitoplazmalı, son derece yassı ve stres liflerince zengin bir fenotip sergilerken; Tip 2 hücreler fibroblastoid olup uzun sitoplazmik uzantılara sahiptir. İki hücre tipi de farklı vimentin ve sitokeratin profiline sahiptir. Alfa-düz kas aktin (α -SMA) ve desmin filamentlerinin ise dokuda varlıkları tespit edilmiş, fakat kültür ortamında ilerleyen pasajlarda ifadelerinin azaldıkları belirlenmiştir (2). Bununla birlikte Tip 1 ve Tip 2 hücrelerin kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşmaları arasında bir fark belirlenmemiştir. Oysa nöronal hücre hatlarında tercihli bir farklılaşma saptanmıştır. Hücreler ilk olarak mezenkimal ve ekto/endodermal

belirteç olan vimentin ve pansitokeratin antikorlarıyla boyandığında vimentinin tüm hücre tiplerinde ifade olduğu gözlenirken; pansitokeratinin ifadesinin Tip 1 hücrelerle sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak ilerleyen pasajlarda (P5-P9) pansitokeratin ifadesinin azaldığı görülmüştür. Desmin ve α -SMA ifadelerine bakıldığında ise kültürdeki hücrelerde desmin tespit edilmezken, erken pasajlarda (P1-P3) α -SMA ifadesi belirlenmiş, ilerleyen pasajlardaki (P5-P9) hücrelerin α -SMA'dan yoksun olduğu belirlenmiştir. Dokuda yapılan analizlerde ise perivasküler, intervasküler ve subamniyotik bölgelerdeki hücrelerin güçlü bir şekilde vimentin ve desmin ifade ettiği belirlenmiştir. Bu bölgelerde pansitokeratin ve α -SMA ifadesinde ise perivasküler ve subamniyotik alanda güçlü bir ifade gözlenirken; intervasküler alanda ifadenin zayıf olduğu belirlenmiştir (2).

Tüm bu bulgular ve deneyimler değerlendirildiğinde göbek kordonu stromasından izole edilen hücreler arasında *in vitro* koşullarda bir geçişin olduğunu hatırlatmaktadır. Bu olay kısmen yeni bir kavram olan epitel mezankim geçişi (EMG)'ne benzer bir nitelik taşıdığını düşünmekteyiz. Bir başka deyişle, Tip 1 hücrelerin ilerleyen pasajlarda yerini Tip 2 hücrelere bırakması söz konusu olabilir.

EMG sürecinde de birçok hücrel proteinde sentez ve dağılım değişikliği gerçekleşir. Kaderin grubu proteinler ve hücre iskeleti filamanları bu süreçte belirgin değişik gösterir. iGKS-MKH'leri üzerinde yaptığımız çalışmalarda bu iki molekül grubu arasında bir değişim saptamış bulunmaktayız. Yeni tanımlanan EMG değişim süreci bu nedenle bizim karşılaştığımız hücrel değişimi açıklamaya yardımcı olabilir. Özellikle, hücre yüzey proteinleri olan E-kaderin ifadesinde azalma gerçekleşirken; N-kaderin sentezi artmaktadır. E-kaderin ve N-kaderinin her ikisi de hücre-hücre ilişkilerinde rol oynamaktadır. Hücre iskeleti elemanlarına bakıldığında α -SMA, vimentin ve F-aktin ifadesi artarken; sitokeratinin ifadesi azalmaktadır.

In vitro koşullar altındaki iGKS-MKH'leri EMG çerçevesinde değerlendirildiğinde bir miyofibroblast fibroblast geçişinin söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmayı yaparken EMG sürecinden esinlenebilecek çok sayıda bilimsel veri ve bulgu elde ettik. Araştırmada temel olarak immünohistokimyasal incelemeler ile hücre yüzey molekülleri

olan E-kaderin, N-kaderin; hücre iskeleti proteinleri olan vimentin, α -SMA, pansitokeratin (Tip1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 ve19), sitokeratin 18, sitokeratin 19 ifadeleri gözlemlendi. Bu tez çalışmasının amacı da bu değişimin söz konusu olup olmadığını araştırmak ve eğer varsa bunun tanımlamaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Epitel Mezenkim Geçişi

Epitel mezenkim geçişi (EMG) polarize olmuş epitel hücrelerin, birçok biyokimyasal değişim sonucunda göç edebilme yeteneğine sahip, yayılcı özellik sergileyen ve apoptoza dirençli mezenkimal hücre fenotipini oluşturan biyolojik bir süreçtir (3). Bu süreç içerisinde hücreler arası matriks elemanlarının üretimi büyük bir artış göstermektedir. EMG süreci, bazal membran yapısının bozulması ve epitel hücrelerinin göç edebilme yetisine sahip mezenkimal hücrelerin oluşması ile tamamlanmaktadır. EMG birçok moleküler değişim süreci sonunda gerçekleşir. Bunlar; transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, hücre yüzey proteinlerin ifadesi, hücre iskelet proteinlerinin yeniden düzenlenmesi ve ifadesindeki değişiklikler, hücreler arası matriksi parçalayan enzimlerin üretilmesi ve miRNA ifadesindeki değişiklikler olarak sıralanabilir (Şekil 2.1.1). Birçok durumda bu faktörler EMG süreci içerisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1.1 Epitel Mezenkim Geçişi

EMG, polarize olmuş epitel hücrelerinin, birçok biyokimyasal değişimler sonucunda göç etme yetisine sahip, yayılcı özellik sergileyen ve mezenkimal hücre fenotipini oluşturan biyolojik bir süreçtir. Bu süreç içerisinde hücreler epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanırlar. ZO-1, zona occludens; MUC1, musin 1; miR200, mikroRNA 200; FOXC2, forkhead box C2. (Kalluri and Weinberg 2009'dan değiştirilerek alınmıştır)

İlk olarak E. Hay'ın tavuk embriyosunda ilkel çizginin oluşum modelini kullanarak yaptığı öncü çalışmalar "Epitel Mezenkim Dönüşümü" olarak adlandırılmıştır (4). Aradan geçen süre içinde, bu sürecin neoplastik dönüşümden farklı olması ve daha doğru yansıttığı için "dönüşüm" teriminin yerini "geçiş" terimi almıştır (3). Bunun yanında, EMG süreci ile gerçekleşen fenotipik esnekliğin tersine, mezenkimal hücrelerin epitel türevlerine dönüşümünü içeren "Mezenkim Epitel Geçiş" süreci ortaya konmuştur (5).

2.1.1. Epitel Mezenkim Geçişinin Nedenleri

Yaklaşık 150 yıl önce, hücrelerin daha fazla hücre oluşturmak ve buna bağlı olarak doku hacmini artırmak için bölündükleri düşüncesi ortaya konmuştur. Her hücrenin bir diğer hücreden kaynaklandığı ve bunun temelinde de tek bir hücrenin (zigot) olması bu düşüncenin merkezini oluşturmaktadır. Gelişim boyunca hücrelerin farklılaşma süreci içerisindeki çeşitli fenotipik durumları ise bir diğer karmaşık bölümdür. Son zamanlarda gelişim sürecindeki epitel hücrelerinin fenotipik esnekliğe sahip olduğu ve EMG ile MEG süreçleri içerisinde ileri ve geriye dönüşüm yapabildikleri bilinmektedir (6).

Epitel dokularının gelişimine bakıldığında, mezenkim hücreleri doku oluşumunu destekleme rolünü üstlenmişken; epitel hücreler dokuya özgü bir işlev sergiler. Burada bazı özelleşmiş işlevleri gerçekleştirmek için terminal bir farklılaşmanın gerekli olduğu ve gelişim tamamladıktan sonra da hücrelerin bu durumu korunduğu görülmüştür. Bu durum gelişim ve yetişkinlik dönemi boyunca, terminal farklılaşma geçirmiş epitel hücreleri içeren hücre popülasyonunun EMG süreci ile farklılaşma geçirerek mezenkimal fenotipe dönüşmesi olarak açıklanmıştır. Bu programlar doku tamiri, patolojik stresler sonucunda çeşitli yangı oluşumları ve ileri seviyedeki karsinoma tipleri ile bağlantılı olarak aktif hâle gelebilir. Buna göre EMG, embriyodaki hücre dağılımı, hasarlı dokulardaki mezenkimal hücre şekillenmeleri, epitel kökenli kanser tiplerinin invazyonu ve metastazındaki mekanizmaları oluşturmaktadır.

2.1.2. Epitel Mezenkim Geçişinin Sınıflandırılması

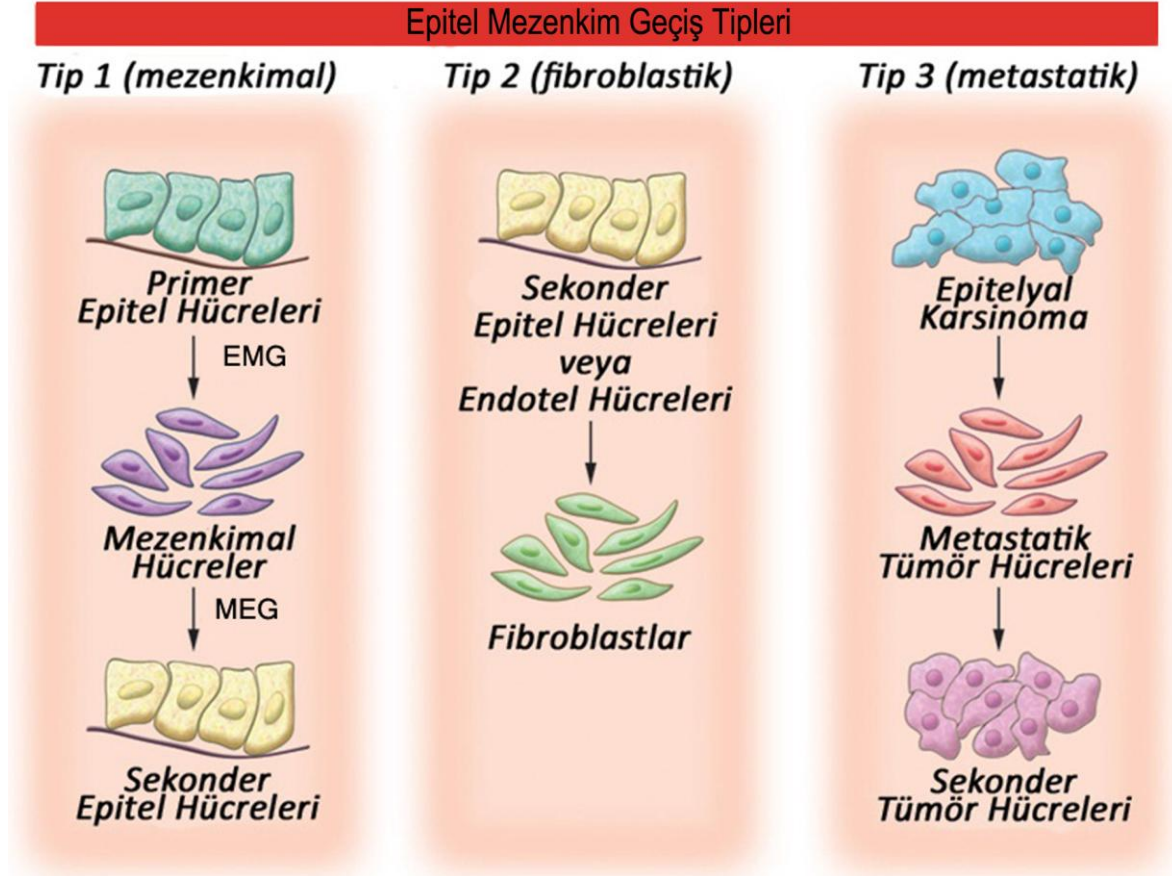
EMG süreci içerisinde birbirinden farklı işlevsel sonuçları olan üç ayrı biyolojik olayla karşılaşılır. Bu olaylara ait özel sinyaller henüz yeterince netlik kazanmamış olmasına rağmen bu programların birbirinden farklı olduğu kabul edilmiştir. EMG programının üç farklı biyolojik alt tipinin sınıflandırılmasına yönelik öneriler 2007’de Polanya ve 2008’in Mart ayında Cold Spring Harbor Laboratuvarları’nda yapılan EMG konulu toplantılarda ele alınmış ve kabul edilmiştir (7).

İmplantasyon, embriyo oluşumu ve organ gelişimi ile bağlantılı EMG süreci, ortak mezenkim fenotipine sahip farklı hücre tipleri oluşturmak üzere organize olmuşlardır. Tip 1 EMG olarak adlandırılan bu süreçte, ilk oluşan epitel hücrelerin ikincil epiteli oluşturmak üzere MEG sürecine girme potansiyeline sahip mezenkimal hücrelere (birincil mezenkim) dönüşümü söz konusudur (Şekil 2.1.2.1).

EMG’ye bağımlı yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve organ fibrozisi EMG’nin ikinci tipini oluşturur. Tip 2 EMG’de oluşan ikincil epitel ya da endotel hücrelerin fibroblastlara dönüşümü söz konusudur (Şekil 2.1.2.1). Fibroblast oluşumu ve fibrozis, immünolojik olgunlaşmayı ve doku oluşumunu işaret eder. Ancak Tip 1 EMG’nin tersine Tip 2 EMG yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi boyunca görülen inflamasyon ile bağlantı gösterir.

Tip 3 EMG, genetik ve epigenetik değişimler sonucunda tümör gelişimine neden olabilen neoplastik hücrelerde görülür. Bu değişimler sadece onkogen ve tümör baskılayıcı genleri etkilemez, bunun yanında EMG sürecini kontrol eden ve diğer iki tip EMG’den farklı olarak yeni bir oluşuma neden olan kontrol mekanizmalarını da etkiler. Tip 3 EMG sürecine girmiş karsinoma hücreleri, invazyon ve metastaz yapabilir ve bu olay kanser ile sonuçlanmaktadır. Epitel kanser hücreleri, EMG boyunca farklılaşma gösterir ve mezenkim fenotipine dönüşerek metastatik bir işlev kazanır. Metastaz sonrasında yerleştikleri niş ortamında epitel fenotiplerini geri kazanarak ikincil tümör yapısını şekillendirirler (Şekil 2.1.2.1).

Bu üç tip EMG farklı biyolojik süreçleri temsil ediyorken temelde benzer genetik ve biyokimyasal değişimlerin gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 2.1.2.1 Epitel Mezenkim Geçiş Tipleri

Tip 1 EMG’de, ilk oluşan epitel hücrelerin mezenkim hücrelerine dönüşü söz konusudur. Bu durum, embriyogenezin gastrulasyon ve nöral krest oluşum evrelerinde gözlenir. Daha sonra, oluşan mezenkimal hücreler, ikincil epitel hücreleri oluşturmak üzere farklılaşırlar (MEG). Tip 2 EMG’de, oluşan ikincil epitel ya da endotel hücrelerinin fibroblastlara dönüşmesi söz konusudur. Tip 3 EMG, metastatik sürecin bir parçasıdır. Epitelyal tümör hücreleri, birincil tümör nodülü olarak davranır ve bulunduğu ortamdan koparak yeni dokulara göç eder, bunun sonucunda ikincil tümör nodülünü oluşturur. (Can A. 2014’ten değiştirilerek alınmıştır)

2.1.2.1. Tip 1 EMG: İmplantasyon, Embriyogenez, Organ Gelişimi

Embriyogenezin erken safhaları boyunca embriyonun implantasyonu ve plasenta yapısının oluşması EMG süreci ile bağlantılı olarak gerçekleşir (8). Özellikle sitotrofoblast öncüleri olan trofoektoderm hücreleri, endometriyuma yayılmayı kolaylaştırmak ve plasentanın doğru bir şekilde tutunabilmesini sağlamak için EMG programını kullanarak bazı düzenlemelerde bulunmaktadır (9).

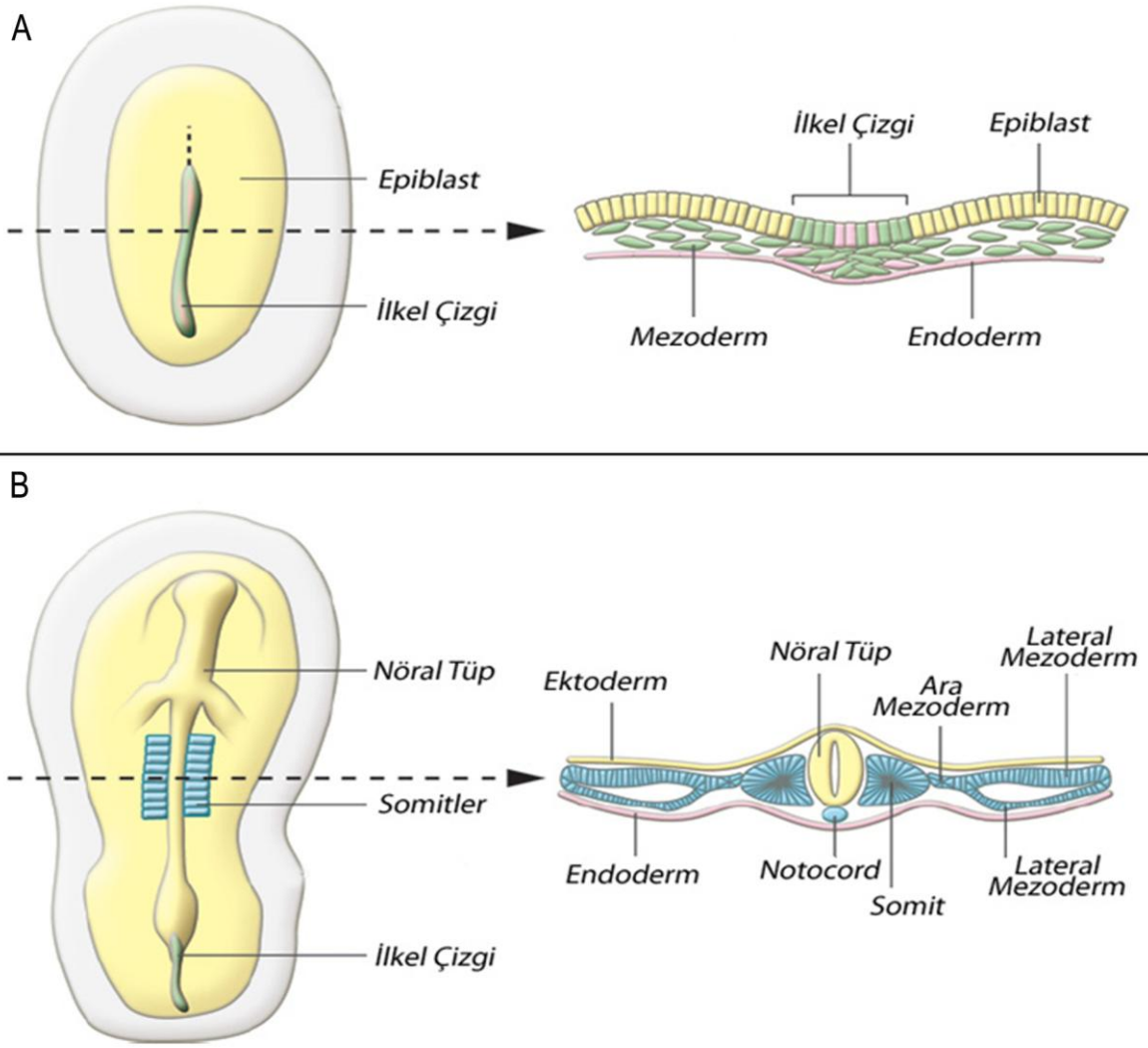
Embriyo, üç germ tabakasını oluşturmak üzere gastrülasyon aşamasına girer ve ilk olarak epiblast tabakasında ilkel çizgi oluşur (10). Buradaki epitel hücreler E-kaderin ifade eder ve apikal-bazal kutuplaşması oluşturur. İlkel çizginin içe doğru göçmesi ile mezoderm ve endoderm tabakalarına ayrılacak olan, mezoderm tabakasını oluşturur (9). Bu süreç EMG ile gerçekleşmektedir (4). Epiblast ile hipoblast arasında oluşan embriyonik mezoderm aksial, paraksial, orta ve yan mezodermal tabakalarla bağlantılı olarak göç edebilme yetileri yüksek olan birincil mezenkimleri oluşturur (11).

Biyokimyasal açıdan bakıldığında EMG bağımlı gastrülasyon Wnt sinyaline bağımlı olarak düzenlenir. *Wnt3* hasarlı embriyolar EMG bağımlı gastrülasyon aşamasına geçemezler (12, 13). Birincil çizgi oluşumu *Wnt8c* ifadesi ile bağlantılıdır ve *Wnt8c*'nin aşırı ifadesi birçok birincil çizgi oluşumuna yol açar. TGF- β üst ailesi proteinleri, özellikle de *Nodal* ve *Vg1*, *Wnt*'nin çalışmasına aracılık etmektedir ve hasar gördüklerinde EMG kaybından dolayı mezodermal bozukluklar ortaya çıkmaktadır (14-18). Bununla birlikte *Wnt*'ler FGF reseptörleri ile birlikte çalışarak EMG bağlantılı gastrülasyon sürecinin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (19-21). Snail, Eomes ve Mesps gibi transkripsiyon faktörleri EMG bağımlı gastrülasyonu yönetmektedir. Örneğin; Snail 1, E-kaderin ifadesini azaltmaktadır.

Embriyonik gelişim boyunca EMG, nöroektodermi oluşturan nöral krista hücrelerinin göçüne doğrudan katılmaktadır (22). Göçe henüz başlamış hücreler ilk başta *Sox*, *Snail1*, *Slug* ve *FoxD3* (Forkhead box D3) gibi genleri ifade etmektedir ve sonrasında bu hücreler EMG programına girmektedir (23, 24). Bunun sonucunda bu hücreler nöral katlantılardan

ayrılır, hareketli hâle gelir ve diğer hücre tiplerini dönüşmek üzere embriyonun farklı bölgelerine göç eder.

Nöral krista içerisindeki EMG de gastrülasyon aşamasındakilere benzer sinyaller ile uyarılır. Bu sinyal yollarını *Wnt*, *FGF* (Fibroblast Büyüme Faktörü), *BMP* (Kemik Morfogenetik Protein), *c-Myb* ve *msh homeobox 1* genlerinin ürünleri oluşturur. Bunların içerisinde *BMP* nöral krista hücrelerinin uyarılmasında en belirgin olanıdır. Sadece *BMP*'nin engellenmesi ile EMG sürecinin geriye çevrilmesi gerçekleştirilebilir (25-27). Bununla birlikte nöral krista yapısında (Bkz. Şekil 2.1.2.1.1) EMG'nin gerçekleşebilmesi için E-kaderin gibi hücre-hücre tutunma moleküllerinin de baskılanması gerekmektedir (28).



Şekil 2.1.2.1.1 Omurgalılarda embriyonik tabakaların oluşumu

Tip 1 EMG (A) Gastrülasyon evresinde embriyonik tabakaların oluşması. EMG süreci ile epitel hücreleri (sarı), ilkel çizgiden içeriye doğru göç eden mezodermal (yeşil) ve endodermal (pembe) hücrelere dönüşmektedir. (B) Mezodermal hücreler (mavi), orta-yan eksenler boyunca çeşitli yapıları oluşturmak üzere yoğunlaşmaktadırlar. MEG süreci ile lateral mezoderm tabakasından notokord yapısı oluşurken; paraksial mezoderm tabakasından somitler oluşmaktadır. (Nieto *et al.* 2009'dan değiştirilerek alınmıştır)

2.1.2.2. Tip 2 EMG: Doku yenilenmesi ve organ fibrozisi

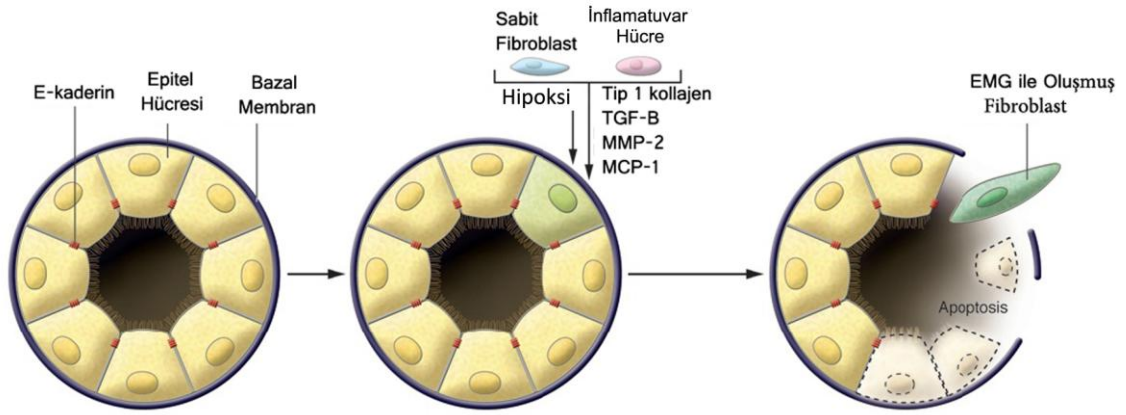
Epitel dokuda gerçekleşen organ fibrozisi, çeşitli inflamatuvar sinyaller sonrasında inflamatuvar hücre ve fibroblastlar ile kollajen, laminin, elastin ve tenaksin gibi hücreler arası matriks bileşenleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Bkz. Şekil 2.1.2.1.2). EMG süreci

ile ilişkili fibrozis özellikle böbrek, karaciğer, akciğer ve bağırsakta görülmektedir (29-31). Çeşitli organlarda fibrozis gelişimi boyunca görülen vimentin, α -SMA, desmin gibi hücre iskeleti proteinleri ve hücreler arası makriks bileşeni olan kollajen 1 EMG süreciyle oluşmuş mezenkimal hücrelerin tanımlanmasında güvenilir belirteçler olarak kullanılabilir. Bu süreçte E-kaderin/ β -katenin sinyalleri anahtar bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte TGF- β 'nın tersine çalışan BMP-7 de EMG sürecinde önemli bir transkripsiyon faktörüdür. BMP-7, TGF- β ile uyarılmış EMG'ye karşı endojen baskılayıcı olarak işlev gösterir (32, 33). Bir diğer etkisini ise TGF- β 'nın etkisiyle kaybolan E-kaderin ifadesini tersine çevirerek gösterir (32).

EMG sürecinde epitel belirteçlerin ifadesi devam ederken EMG'nin ara formundaki hücreler mezenkimal hücre belirteçleri sentezlenmeye başlar. İnflamatuvar stres altındaki epitel hücreleri EMG sürecinin başlarında mezenkim özelliklerinin yanında epitel özelliklerini de kısmen korurlar, bu da "kısmi EMG" kavramını oluşturmaktadır. Sonuçta bu hücreler tamamen mezenkim özellik kazanarak epitel tabakasını terk eder ve dokunun interstiyumunda birikir (34).

Farenin böbreğinde meydana getirilen inflamatuvar hasar sonrasında TGF- β , PDGF, EGF ve FGF-2 gibi EMG sürecini tetikleyen büyüme faktörlerinin salgılandığı görülmüştür. Bu salınım, makrofajların ve istirahat halindeki fibroblastların aktifleşerek hasar bölgesinde birikmesi ile başlar. Buna ek olarak, bu hücreler kemokinler ve MMP (Matriks Metalloproteinaz)'lerin (özellikle de MMP-2, MMP-3 ve MMP-9) salgılanmasını sağlar. Epitel hücreler bu sinyal moleküllerinden etkilenir ve Tip 4 kollajen ve lamininin parçalanması ve bozulması sonucunda inflamatuvar hücreleri ile birlikte hareket ederler. Laminin yapısı bozulmuş olan hücreler mezenkim fenotipi kazanır ve ilgili büyüme faktörleri ve bazı kemoatraktan maddeler ile buldukları bölgeden diğer epitel tabakalarına doğru hareket ederler (35). Epitel hücrelerinin EMG süreci içerisindeki bu oluşum, doku plazminojen uyarıcısının (tPA) bozulması ve MMP-9'un ifadesinin baskılanması ile durdurulur. Bu sırada TGF- β 'nın düzenlenmesine bağlı olarak E-kaderin seviyesi düşer ve aktif MMP-9'un seviyesi azalır (36). Tübüler epitel hücrelerde gerçekleşen TGF- β bağımlı EMG sürecinde, β -integrin ve integrin bağımlı kinazlar (ILK) arabulucu olarak davranırlar (37). Bu sinyal yolağı içerisinde TGF- β , Smad2/3 bağımlı yolak ve MAPK bağımlı yolaklar üzerinden EMG'yi uyarmaktadır (38, 39).

Kader belirleme ve kemik iliği nakli çalışmalarında farelerdeki böbrek oluşumu boyunca fibroblastların % 12'sinin kemik iliği kaynaklı % 30'unun ise EMG aracılığı ile böbrek tübüler epitelı kaynaklı olduğu gösterilmiştir (40). İnsan dokularında gerçekleşen fibrozisde de EMG süreci rol almaktadır (41). 133 hastada yapılan böbrek fibrozisi çalışmasında tübüler epitel hücreleri etiketlemek için sikokeratin, vimentin, α -SMA kullanılarak yapılan çalışmalarda örneklerin önemli bir çoğunluğunda EMG süreci tespit edilmiştir (42).

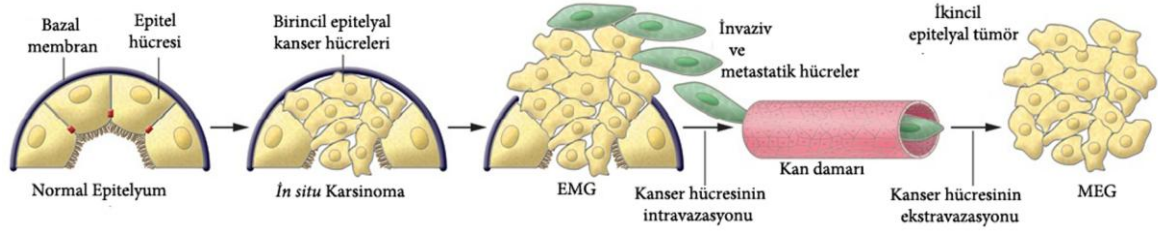


Şekil 2.1.2.1.2 Epitel Mezenkim Geçişi ve Fibrozis

İnflamasyona bağlı EMG sürecinin uyarılması ile fibrozis gerçekleşmektedir. Bu süreçte inflamatuvar ve fibroblast hücreleri tarafından birçok molekül sentezlenir. Bu moleküller bazal membranın yıkılmasını ve Epitel hücrelerin polaritesini kaybederek ya apoptozise uğrarlar ya da EMG süreci ile fibroblast özellikleri kazanırlar. (Kalluri and Weinberg 2009'dan değiştirilerek alınmıştır)

2.1.2.3. Tip 3 EMG: Kanser ve Metastaz

Epitel hücrelerin aşırı bölünmesi ve damar oluşumu birincil epitel kanserlerin başlangıcı olarak kabul edilir (43). Sonrasında membranın alt tarafına doğru yayılmanın gerçekleşmesi metastazın başlangıcıdır. Genetik kontrol ve biyokimyasal süreçlerin kontrolü ile yayılmacı fenotipin oluşması ve sonrasında kanser hücrelerinin metastazı günümüzde en çok araştırılan konuların başında gelmektedir. Bu çalışmaların birçoğunda epitel kanser hücreleri tarafından kanser hücre fenotipinin oluşmasında EMG programının kritik bir mekanizma olduğu söylenmektedir (Bkz. Şekil 2.1.2.1.3) (44).



Şekil 2.1.2.1.3 Epitel-Mezenkim Geçişi ve kanserin ilerlemesi

Kanserin invaziv hale dönüşme evresi epitel hücrelerin polaritesini kaybetmesi ve bazal membran yapısının bozulması ile başlamaktadır. Bunun yanında hücreler arası matriks yapısındaki değişimler ve ilgili sinyal yollarının uyarılması ile devam etmektedir. Sonraki süreçte hareketli hale gelen karsinoma hücre damar içine geçerek dolaşım sistemine geçer ve mikro veya makro metastaz gerçekleştirmek üzere damar dışına çıkarak kendine bir niş ortamı yaratır ve orada MEG süreci ile ikincil epitelyal tümörü oluşturur. (Kalluri and Weinberg 2009'dan değiştirilerek alınmıştır)

Fareler üzerinde yapılan çalışmalar ve hücre kültürü deneyimleri epitel karsinoma hücrelerinin EMG programı ile mezenkim fenotipi kazandığını ve α -SMA, vimentin ve desmin gibi mezenkimal belirteçleri ifade ettiğini göstermiştir (45). Bu hücreler tipik bir şekilde birincil tümörlerin başlangıcında yayılmacı olarak görülmektedir, sonrasında bu hücreler invazyon-metastaz yolağına girmektedir. Bu süreç hücrenin damar içine göçü, periferik kanda taşınması, damar dışına taşınması, mikrometastaz oluşumu ve en sonunda kolonizasyon (makroskopik metastazların içinde küçük kolonilerin oluşumu) olarak özetlenebilir (44, 46, 47).

Göç edebilen kanser hücreleri EMG süreci ile bulunduğu bölgeden ayrılarak uzak bölgelerde ikincil kolonileri oluşturur. Bu durum histopatolojik olarak incelendiğinde, birincil tümörden oluşan ve metastatik karsinoma hücrelerini temsil eden mezenkim fenotipler metastaz sonrasında yerini epitel fenotipe bırakır. Metastatik yayılma sürecinde rol oynadığı belirtilen EMG sürecinin yanı sıra metastatik kanser hücreleri ikincil tümörün oluşumu boyunca MEG süreci ile kendi mezenkim fenotipini yansıtır (48). Yayılmış kanser hücrelerinin MEG sürecine girme eğilimi yerel mikroçevreye yansır. EMG sürecinin uyarılması, metastatik evrenin oluşumu için karsinoma devamlılığının merkezinde bulunan önemli bir mekanizmadır ve bir sonraki kolonizasyon süreci boyunca

MEG'yi etkisi altına almaktadır (44, 49, 50). Ancak, bu mekanik modelin birçok basamağının açıklanması direk olarak deneysel onaylar gerektirmektedir. Dahası, bu olay ve moleküler mekanizmanın ilişkisi ve epitel olmayan kanser hücrelerinin metastatik yayılması henüz yeterince netlik kazanmamıştır.

Kanser hücrelerinin oluşumunda EMG sürecine katkıda bulunan sinyal moleküllerinin tamamı henüz açığa kavuşmamıştır. Fakat genetik ve epigenetik değişimler sonucunda tümör stromasından kaynaklanan heterotipik sinyaller ile EMG süreci uyarılmaktadır. Bu süreçte onkogenler aktif rol oynamaktadır (51-53). Protein düzeyinde bakıldığında ise HGF (Hepatosit Büyüme Faktörü), EGF (Epitel Büyüme Faktörü), PDGF (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü) ve TGF- β (Tümör Büyüme Faktörü) gibi büyüme faktörleri bu süreci kontrol etmektedir. Bunun yanında Snail1, Slug, zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), Twist, Goosecoid ve FOXC2 gibi transkripsiyon faktörleri de EMG sürecini uyarılmaktadır (54-57). Aktif hale gelen her bir transkripsiyon faktörü EMG sürecini başlatmak üzere pleiotropik olarak hareket eder. Bu durum diğer transkripsiyon faktörlerinden bağımsız olarak gerçekleşir. EMG programına bağımlı olarak hücreler tarafından gerçekleşen bu durum ERK, MAPK, PI3K, Akt, Smads, RhoB, β -katenin, LEF (Limfoid Artırıcı Bağlanma Faktörü), Ras, ve c-Fos gibi birçok hücre içi sinyal yolağını içermektedir. Bununla birlikte β 4 integrinler, α 5 β 1 integrin ve α V β 6 gibi hücre yüzey proteinleri de bu sürece katılmaktadır (58).

TGF- β , epitel hücre çoğalmasının önemli bir baskılayıcısıdır, buna bağlı olarak da birincil tümör oluşumunu baskılar. Ancak tümör oluşumu ve metastazın pozitif yönde düzenlenmesinde de görev almaktadır (59-61). Bu bağlamda, *in vitro* çalışmalarda TGF- β 'nın kanser hücre tiplerini içeren EMG'yi uyardığı gösterilmiştir (62). TGF- β ile uyarılmış EMG sürecinde muhtemel iki sinyal yolağı tespit edilmiştir. Birincisi Smad proteinleridir. Bu proteinler, TGF- β aracılığı ile ALK-5 reseptörlerini kullanarak EMG programlarını uyarır (62-65). Smad proteinlerinin engellenmesi uygun transkripsiyon faktörleri ve sitoplazmik kinazların etkileri ve TGF- β 'nın otokrin üretimi ile gerçekleşir. β -katenin ve LEF aracılığı ile sinyal yolağı da Smad ile birlikte çalışarak EMG uyarılmasını sağlar (38, 66, 67). TGF- β ile uyarılmış ikinci EMG yolağının p38 MAPK ve

RhoA aracılığı ile kontrol edilmektedir. Bu süreç integrin $\beta 1$ aracılıklı sinyal ve $\alpha V\beta 6$ tarafından TGF- β 'nin aktivasyonuna ile gerçekleşir (68).

EMG'nin önemli belirtilerinden biri de süreç içerisinde E-kaderin ifadesinin azalmasıdır (69, 70). Örneğin; c-Fos onkogeninin normal fare meme epitel hücrelerindeki uyarılması EMG'yi tetiklemektedir. Bu durum E-kaderin ifadesindeki azalma ile doğrudan bağlantılıdır (62). Metastaz sonrasında epitel hücre yapışma molekülleri yeniden organize olur ve E-kaderinin sitoplazmik kısmı ya da tamamı ektopik olarak hücrelerde ifade olur (66, 71). E-kaderin ifadesine bağlı olarak β -katenin'in sitoplazmada biriktirilmesi kanser hücrelerinin epitelyal geleceklerinin korunması için önemlidir ve mezenkimal fenotipin kazanılması β -kateninin Tcf/LEF kompleksinin çekirdeğe taşınması ile bağlantılıdır (67, 72). E-kaderin ifadesinin kaybı ile sonuçlanan çekirdekdeki β -katenin birikimi EMG sürecinin başlaması ve yayılcı fenotipin oluşması ile bağlantılıdır. Buna göre, yüzeyindeki E-kaderinleri kaybetmiş olan hücreler birçok büyüme faktörünün etkisi ile EMG sürecini uyarılması yönünde daha duyarlı hale gelir (38, 44). E-kaderin ve β -katenin/LEF aktivitesinin epigenetik kontrolü kanser hücrelerinin metastatik potansiyellerinin saptanmasında önemlidir. E-kaderin eksikliği gösteren hücre hatları bağışıklık sistemi baskılanmış farelere verildiğinde tümör oluşumu ve metastazın arttığı gözlenmiştir (73-77).

E-kaderin ifadesi Snail 1 ve Slug transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Bunun yanı sıra çinko parmak protein tipini içeren temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörleri, motor nöron proteini etkileşim proteini (SIP1)'nin sürekliliği ve E12 (E47-E2A olarak da bilinen)'de bu süreçte rol alır (78). Bu transkripsiyon faktörleri TGF- β ile uyarılmaktadır ve bir kere ifade olduğunda E-kaderin ifadesini baskılar. Snail 1 de invaziv fenotipi yönlendirir. E-kaderinin kaybı Wnt sinyalini teşvik eder ve bu durum çekirdekdeki Snail 1'in yüksek seviyedeki ifadesi ile bağlantılıdır. SIP1 de Snail 1 ile birlikte E-kaderin ifadesini baskılar (19). Metastatik ve metastatik olmayan fare meme kanser hücre hatlarındaki gen ifadelerini karşılaştırmak için kullanılan gen ifade analizlerinde Twist ve Goosecoid'in EMG'yi yönlendirmede ve metastazı uyarmada önemli genler olduğu gösterilmiştir (79, 80). MMP-3 gibi bazı matriks parçalayıcı enzimlerin de Rac1b ve ROS aracılığı ile genomik kararsızlığı uyarak EMG sürecini yönlendirmektedir (81).

EMG programını düzenleyen bir diğerk molekül miRNA'lardır. miR200 ve miR205 E-kaderin, ZEB1 ve ZEB2 reseptörlerini engeller ve böylece epitel fenotipinin oluşumuna yardım eder (82-86). Meme karsinoması da miR200 tipi ile vimentin ifadesinin artışı ve kanser hücrelerindeki E-kaderin seviyesinin azalışı ile bağlantılıdır (82-84). miR21 miktarının artması ile birçok kanser ve TGF-β ile uyarılmış EMG süreci baskılanır. Bununla birlikte CD44^{yüksek}/CD20^{düşük} hücreler, EMG özelliklerini sergileyen kötü huylu meme kanseri dokularından izole edilip sağlıklı hücreler ile kültür edildiklerinde metastatik potansiyeli artan bir profil sergileyerek EMG sürecini uyardıkları gözlenmiştir (87). Bu durum EMG sürecinin kök hücre benzeri özelliği ile yüksek derecede invaziv hücrelerin oluşmasında rol oynayabildiği ve kendinin aynısını oluşturabilme potansiyeline sahip olan sonraki fenotip, yaygınlaşan kanser hücreleri tarafından ikincil tümör oluşumunu yönlendirebildiği düşünülmektedir.

2.2. İnsan Göbek Kordonunun Yapısı ve İşlevi

Göbek kordonu (GK) hamilelik boyunca anne ile fetus arasındaki bağlantıyı temsil etmektedir. Dokunun histolojik yapısına baktığımızda en dışta dokuyu saran amniyotik epitel bölgesi, içte ikisi arter biri ven olmak üzere üç damar ve damarlar ile amniyon zarı arasında ise Wharton Jeli (WJ) olarak adlandırılan bölge bulunmaktadır. Mukoz bir yapıya sahip olan WJ, doku içerisindeki temel görevi sıkışma, basınç, bükülme gibi mekanik etkilere karşı damar yapısını korumaktır.

GK, doğum sonrası atılan bir materyal olduğu için 1970-1980'lerde bilim camiasının yeterince dikkatini çekmemiştir. 1990'larda bilim insanları tarafından Wharton Jeli stroma hücreleri (WJSH) ve hücreler arası matriksin kompozisyonu yeniden gözden geçirilmiş ve bunun sonunda iki temel düşünce ortaya atılmıştır. Birincisi, gebelik zehirlenmesi vakalarının muhtemel nedenlerinin GK ile ilişkisinin olduğu ihtimalidir. Buna bağlı olarak gebelik zehirlenmesi geçirmiş hastalarda, GK'nun erken yaşlanması ile ilişkili bir seri değişik matriks fenotipi karşılaşılmıştır (88, 89). İkicisi ise GK stromal hücrelerinin mezenkimal fibroblastlar olarak tanımlanması olmuştur (90-92). Bu hücreler üzerine yapılan ileri yapısal çalışmalar ile bu hücrelerin düz kas hücresi iler benzerlik taşıdıkları için miyofibroblastlar olarak kabul edilmiştir (1).

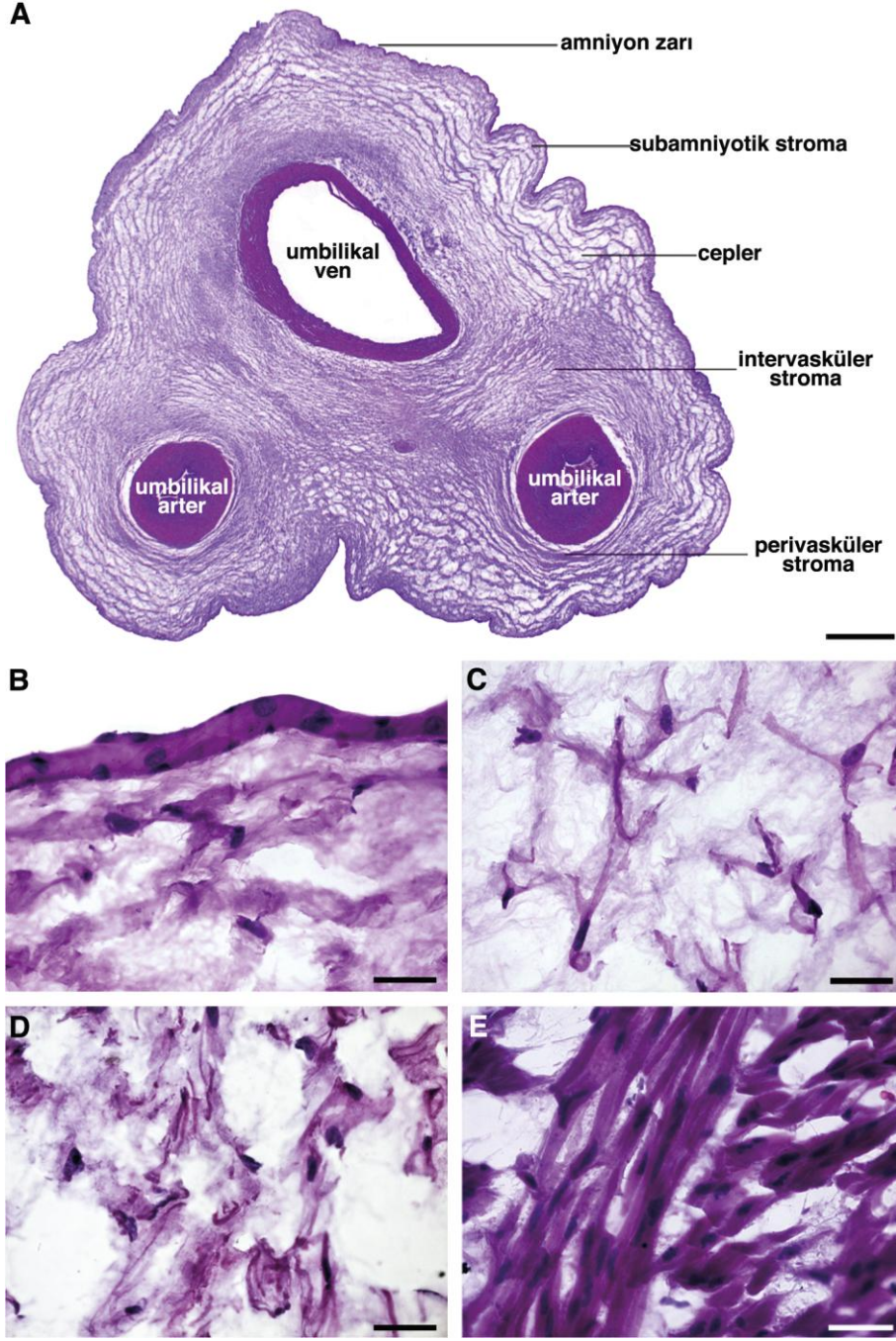
Son yıllarda farklı kaynaklardan elde edilen kök hücre çalışmalara paralel olarak fetal hücre deposu olarak görülen GK'nu da multipotent kök hücre kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır. 2003 yılını takiben bu miyofibroblastik hücrelerin kök hücre potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar ivme kazanmıştır (1).

2.2.1. iGK Hücreleri ve Hücreler Arası Matriks Bileşenleri

İnsan göbek kordonu (iGK) yaklaşık 40 gr ağırlığında, 60-65 cm uzunluğunda ve ortalama 1,5 cm çapındadır (93, 94). Doku, dıştan tekli/çoklu amniyotik kübik epitel hücreler tarafından oluşturulmuş tabaka(lar) ile sarıdır (95, 96). Bu epitel hücrelerin keratinosit (97) özelliği sergilemelerinin yanında bir miktar kök hücre özellikleri de bulunmaktadır (98).

Dokunun iç yapısına bakıldığında ise sola doğru spiral oluşturmuş şekilde organize olmuş iki arter ve bir ven bulunmaktadır. Göbek kordonu yapısında kılcal damar ve lenf düğümü bulunmamaktadır (99, 100). Bu damar yapılarını saran bağlayıcı muköz yapının içerisinde fibroblast benzeri hücreler ile zengin proteoglikan ve hiyaluronik asit yapıları içerisine gömülü halde mast hücreleri bulunmaktadır.

iGK damarlarında damar duvarı bulunmamaktadır. WJ bu yapı içerisinde damarlara bağlanıp çevreleyerek adeta bir damar duvarı gibi görev yapmaktadır. Bunun yanında WJ'nin iGK içerisinde kan akışını düzenlemek üzere bir görevi olduğu da düşünülmektedir (101, 102). iGK histolojisi incelendiğinde kendi içerisinde yapı ve fonksiyonlarına göre altıya ayrılmıştır. Dıştan içe doğru; yüzey epiteli (amniyon zarı), cepler, subamniyotik stroma, intervasküler stroma (Wharton Jeli), perivasküler stroma ve damarlar şeklindedir. Yapısal, immünohistokimyasal (2, 103) ve *in vitro* fonksiyon analizleri (2, 104) yapıldığında subamniyotik, intervasküler ve perivasküler bölgelerdeki hücrelerin sayısı ve doğalarında önemli farklılıklar olduğu belirtilmiştir (Bkz. Şekil 2.1.1.1) Örneğin; intervasküler stroma kaynaklı miyofibroblastik hücrelerin vasküler düz kas hücresinden ya da önceden var olan fibroblastlardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.1.1.1 İnsan göbek kordonu ve bölgeleri

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 (Can A., 2014'ten alınmıştır.)

2.2.2. İnsan Göbek Kordonu Stroma Hücreleri ve Organizasyonu

iGK stroması ile yapılan çalışmalarda, stromal hücreler ilk önce fibroblastlara benzetilmiştir (105). Bu hücreler glikojen sentezi, yağ damlacıkları ve kollajen salgılayan granülleri ile gelişmiş endoplasmik retikulum, mitokondri ve golgi bileşenleri ile aktif bir şekilde protein sentezi ve salınımı gerçekleştirmektedir (92, 106). Hücrelerin etrafı laminin, tip 4 kollajen (90-92) ve heperan sülfattan (91) oluşan eksternal lamina ile kaplıdır. Hücreler, düz kas hücresinde olduğu gibi membran altında ve hücre içinde yoğun plak yapılarına sahiptir (103, 106). Mebranöz kaveol (91) ve pinositik veziküller plazma membranının (92) altında yer alır ve periferik membran içerisinde 10 nm kalınlığındaki filamentler ile birlikte çok sayıda yoğun yapılar bulunmaktadır (90, 91). Düz kas hücresine özgü olarak görülen bu yapılar, stromal hücrelerin fibroblasttan ziyade miyofibroblast olabileceğini işaret etmektedir. Bu terim ilk kez Manjo ve ark. tarafından fibroblast ve düz kas hücresi üzerine yaptığı yapısal çalışmalar ile ortaya konmuştur (107). Aktin, miyozin, desmin ve α -düz kas aktin proteinleri miyofibroblastta özgü belirteçlerdir (108). İnsan göbek kordonu stroma hücreleri (iGKSH) de miyozin hariç diğer proteinleri ifade etmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bu hücrelerin fibril sentezinde özel olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu görüşü destekleyen kanıtlardan biri de bu hücrelerin vimentin ifade etmesidir (2, 109). Vimentin düz kas hücrelerinde ifade edilmemektedir. iGKSH'nin vimentin ve desmin ifade etmeleri bu hücrelerin miyofibroblast olduğu hipotezini desteklemektedir. Stromal hücreler tarafından ifade edilen bir diğer hücre iskeleti proteini ise normalde endoderm ve ektoderm orijinli epitel hücrelerde görülen sitokeratindir (2, 109). Karahuseyinoglu ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda perivasküler bölgeden izole edilen hücrelerin güçlü bir şekilde sitokratini ifade ettikleri gösterilmiştir (2).

Vasküler düz kas hücreleri ile komşu olan miyofibroblastlar, gevşek düz kas hücresi ile olan morfolojik benzerlik göstermektedir. Hamilelik dönemi boyunca hücrelerin iGK stroması içerisindeki morfolojik ve işlevsel özellikleri de belirtilmiştir (90, 91). Örneğin, hamileliğin ilerleyen dönemlerinde α -düz kas aktinin ifadesi artmaktadır. Buna göre subaminyotik, intervasküler ve perivasküler bölgelerde hücre yoğunluğu bakımından farklılık göstermektedir. Subaminyotik bölgede hücre yoğunluğu oldukça düşük iken;

perivasküler alanda oldukça yüksektir (90, 92, 110). iGKSH'lerin iskelet elemanlarının karmaşıklığı doku dışından damarlara doğru yaklaşıldıkça artmaktadır (90, 92). Buna paralel olarak farklılaşma durumları ve çoğalma kapasitelerinde de bir artış olduğu belirtilmiştir (91).

2.2.3. İnsan Göbek Kordonu Hücreler Arası Matriks Bileşenleri

Hamilelik döneminde anne ile fetüs arasındaki tek bağlantıyı sağlayan GK'nun mekanik özellikleri oldukça önemlidir. Göbek kordonu içindeki damarların dış etkilerden korunması, içerisinde bağlayıcı fiberler ve çözünebilir proteinler barındıran hücreler arası matriks ile sağlanmaktadır. Hücreler arası matriks hakkındaki ilk gözlemler 1950-60'larda rapor edilmiştir, daha sonra yapılan çalışmalarda amorf görünüşünün kollajen yapısı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (105, 111, 112). Stroma, dalgalı kollajen demetleri ile zengin fibriler bir yapıya sahip olmasına rağmen elastik fibriller bulunmamaktadır (111). Tip 4 kollajen minör bir kollajen formu olmasına rağmen GK'nu epitelinde ve kültüre edilmiş stromal hücrelerde baskın olarak ifade edildiği yapılan PCR ve immünohistokimyasal analizler ile belirlenmiştir (113). Kollajen, stroma içinde glikozaminoglikan ve proteoglikanlar ile gerçekleştirdiği iyonik bağlar ile GK yapısına oldukça güçlü bir sağlamlık katmaktadır (114). Kollajen yapısının içinde bulunan cep olarak adlandırılan boşlukların dokuya bir tutarlılık kazandırmaktadır (115). Stroma içerisinde tip 1, 3, 4 kollajen olmak üzere dört tip kollejen bulunur. Tip 4 kollajen GK epitel tabakasının bazal membranında ve subamniyotik bölgede gösterilmiştir (91). Tip 1 ve tip 3 kollajen ise hücreler arası matriks ve damara yakın bölgelerde tespit edilmiştir. Stromada bulunan kollajen miktarı arter duvarına yakın bölgeden dört kat daha fazladır (114).

GK stromasını ikinci önemli bileşeni ise glikozaminoglikan (GAG)'lardır. GAG'lar damarın yakınında bulunan mast hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Stromadaki toplam GAG yapısının %70'ini hiyaluranik asit (HA) oluşturur (114, 116). Keratin, heperan, dermatin, kondroitin-4 sülfat ve konfroitin-6 sülfat gibi sülfatlanmış GAG yapılarının miktarı ise oldukça düşüktür (114). GK, insana ait dokular içerisinde yapısında en çok HA barındıran yapılardan bir tanesidir (117). Bunun yanında GK'nda HA'in normal seviyenin

üzerinde ifade edilmesi ile patolojik vakalar ile sonuçlanmaktadır. HA'in stroma içerisindeki hareketliliği kollajen ağı ve proteoglikan(lar) ve/veya mikrofibriller ile sağlanır. Fiziksel gereksinimler sonucunda HA'in hareketliliğinin artırılması GK'nun yeniden şekil kazanmasında önemli rol oynamaktadır (118).

2.2.4. İnsan Göbek Kordonu Stromal Hücrelerin *İn vitro* Farklılaşma Potansiyelleri

İnsan göbek kordonu kaynaklı stroma hücreleri, mezenkimal kök hücreler (MKH) ve birçok embriyonik ve yetişkin kök hücre serileri ile benzer özellikler sergilerler. iGKSH'leri ekstraembriyonik mezoderm tabakasından köken almaktadır. Bu hücreler ile en fazla adipojenik, kondrojenik, osteojenik, kardiyojenik ve miyojenik farklılaşma potansiyelleri üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile kıyaslandığında iGKSH'lerinin adipojenik farklılaşma kapasitelerinin daha yüksek olduğu Karahuseyinoglu ve ark. yaptığı çalışma ile gösterilmiştir (2). Adipojenik farklılaşma yönünde uyarılan hücrelerin adiposite özel genleri, lipoprotein lipaz ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1'i ifade ettikleri gözlenmiştir (119).

Kondrojenik farklılaşma 3-boyutlu kürecikler şeklinde pellet haline getirilmiş hücrelerin uyarılması veya kollojen fibriller, GAG'lar içeren poliglukolik iskele üzerine ekilmiş hücrelerin özel kültür ortamları içerisinde kültürü yapılarak gerçekleştirilmektedir (2, 120, 121). 1-2 mm çapındaki hücre kürecikleri üç hafta içerisinde mukopolisakkaridlerce zengin stroması ile kıkırdak özelliği göstermeye başlamaktadır (2). Uyarılmış kürecikler immünohistokimyasal ve hidroksipropilen yöntemi ile analiz edildiğinde büyük oranda tip 2 kollejen ifade ettikleri bunun yanında küreciklerin dışına yakın bölgelerinde ve kapsül yapılarında tip 1 kollejen fibrilleri belirlenmiştir (2, 120).

iGKSH'lerinin osteojenik farklılaşma potansiyelleri ilk olarak 2004 yılında Wang ve ark. tarafından gösterilmiştir (121). Uyarılma sonrasında alkalın fosfat pozitif kümeler

görülmüş ve osteospesifik matrijel proteini olan osteoponin ifadesi von Kossa boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Sonrasında ise Karahuseyinoglu ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda uyarılmadan dört hafta sonra hücrelerde kalsiyumun depolandığı ve ikinci, üçüncü ve dördüncü haftalarda sialoprotein-2, osteonetin ve osteokalsin ifade ettikleri görülmüştür (2).

iGKSH'lerin kardiyomiyosit ve iskelet kasına farklılaşma potansiyelleri diğer çalışmalara göre daha az ele alınmıştır. Sitozin nükleotidinin kimyasal bir analogu olan 5-azasitidin, miyojenik farklılaşmada anahtar kimyasal ajan olarak kullanılmaktadır (121). Bunun yanında Kocafe ve ark. 2010 yılında yayınladıkları çalışmada bu hücrelerin MyoD transkripsiyon faktörü ile yeniden programlanması sonucunda miyojenik farklılaşmayı sağladıklarını rapor etmişlerdir (122).

1990'ların sonuna doğru yapılan MKH ve MKH benzeri hücrelerin nöronal hücre hatlarına farklılaştırılması çalışmaları bilim dünyasında büyük bir heyecan yaratmıştır. Domuz göbek kordonu stromal hücreleri ile yapılan çalışma bu konudaki ilk bulgular bilim camiasına sunulmuştur (123, 124). Farklılaşan hücrelerin tuj-1 (β -3 tübülün), nörofilament (NF), nörona özgü enolaz, tirozin hidroksilaz (TH) ve büyüme proteini-43 ifade etmektedir. Mitchell ve ark. da glial hücrelere farklılaşmakta olan bazı hücrelerin glial fibriler protein (GFAP) ve CNPaz ifadesi gösterdiğini rapor etmiştir (125). Benzer bir şekilde iGKSH'lerinin de nöronal farklılaşma sürecinde NeuN, NF ve GFAP ifade ettiği belirlenmiştir (126).

2.2.5. İnsan Göbek Kordonu Stromal Hücrelerin Tıp Alanında Kullanımı

Kök hücreler tamir edici ve yenileyici tıp alanında kullanılma potansiyeli oldukça yüksek olmasından dolayı bu alanda yapılan çalışmalar son on yılda büyük bir ivme kazanmıştır. Son yıllarda birçok klinik çalışmada da kullanılmaya başlanmıştır. iGKSH'leri özel kültür koşullarında osteoblast, adiposit, kondrosit ve miyoblasta dönüşebilme potansiyeline sahip ve HLA-DR⁻ olmaları nedeni ile doku uyumluluğu problemlerini tekrarlayan uygulamalarda bile yaşanmadığı bir hücre kaynağı olarak son yıllarda oldukça ümit vaat

eden hücreler haline gelmiştir (Çizelge 2.2.5. 1). Bunun yanında doğum sonrasında atılan bir materyal olması sebebi ile oluşabilecek etik problemler en az düzeye inmiş durumdadır. Son yıllarda göbek kordonu stromasının allojeneik doku nakilleri için bankacılığının yapıldığını izlemekteyiz. Özellikle kemik ve kıkırdak onarımında ümit vaat eden hücreler olmaları önümüzdeki yıllarda insan uygulamalarının gerçekleşeceğini göstermektedir. Bu bağlamda Çin başta olmak üzere dünyanın farklı ülkelerinde dondurularak saklanmak suretiyle insan göbek kordonu bankaları kurulmuştur. Uzak Doğu ve Avrupa ülkelerinin bazılarında kordon stroması bankacılığında 6000'in üzerinde örnek toplanmış ve 4 adet klinik çalışmada¹ hasta kabullerine başlamıştır.

Mezenkimak kök hücre belirteçleri

CD10, CD13, CD29, CD44, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD51, CD54, CD68, CD73, CD80, CD90, CD105, CD106, CD117, CD146

İmmün düzenleyici hücre belirteçleri

HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G, CD80, CD58, CD106, CD166, IL-1a, IL-6, HGF, PGE2, TGFβ1

Hücre iskeleti proteinleri

Vimentin, sitokeratin (tip 8, 18, 19), caldesmon, α-düz kas aktini

Diğer belirteçler

Bmi-1, GD2, Nucleostemin, ZFX, connexin-43, GATA-4, GATA-5, GATA-6

Negatif belirteçler

HLA-DR, CD34, CD31, CD45, desmin

Çizelge 2.2.5. 1 İnsan göbek kordonu stroması MKH'nin taşıdığı belirteçler
(Karahuseyinoglu *et al.* 2007'den değiştirilerek alınmıştır.)

¹ www.clinicaltrials.gov

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Son yıllarda insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iGKS-MKH) biyolojisi oldukça yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. iGKS-MKH'leri özel kültür koşullarında osteoblast, adiposit, kondrosit ve miyoblasta dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Bunun yanında allojenik MKH nakillerinde etik endişenin en az olduğu ve HLA-DR⁻ olması nedeni ile doku uyumluluğu problemlerini tekrarlayan uygulamalarda bile yaşanmadığı bir hücre kaynağı olarak son yıllarda oldukça ümit vaat eden hücreler haline gelmiştir. Bunun yanında doğum sonrasında atılan bir materyal olması sebebi ile oluşabilecek etik problemler azamiye inmiş durumdadır.

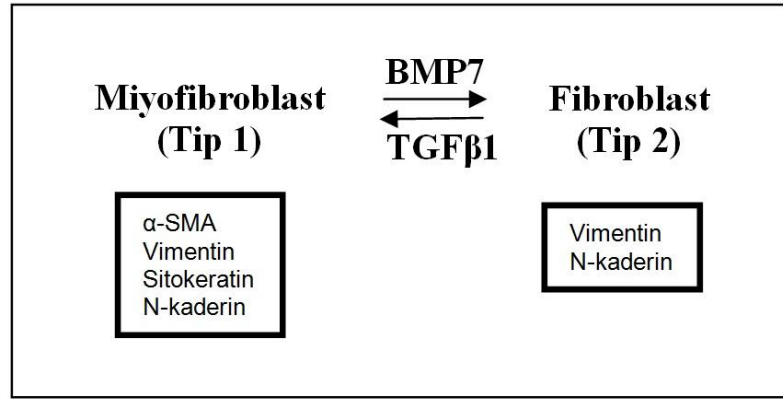
Karahuseyinoglu ve ark. (2007) tarafından yapılan insan göbek kordonu kaynaklı kök hücre izolasyonu çalışmaları sonucunda kültür ortamında iki farklı hücre tipi görülmüştür. Tip 1 ve Tip 2 olarak adlandırdıkları hücre tipleri farklı hücre iskeleti proteini profiline sahiptir. Ayrıca bu hücreler kültür koşullarında heterojen bir görünüm sergilemektedir. Erken pasajlarda Tip 1 hücrelerce zengin kültür ortamı ile karşılaşılırken geç pasajlarda Tip 2 hücrelerden zengin bir kültür ortamı görülmektedir (2). Yapılan literatür taramasında insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde gözlemiş olduğumuz bu değişikliği ele alan bir çalışma bulunamamıştır. Benzeri gözlemler kemik iliği kaynaklı MKH'lerde de saptanmıştır. Dolayısıyla bu heterojen görünümün dokuya özgü olabileceğinin yanı sıra kullanılan izolasyon ve kültür koşullarından da kaynaklanabileceği olasılığı güçlenmektedir.

Bu deneyimler doğrultusunda göbek kordonu stromasından izole edilen hücreler arasında *in vitro* koşullarda bir geçişin olduğunu ön görülerek çalışma planlanmıştır. Bu olayı EMG sürecine benzer biçimde ele aldığımızda Tip 1 hücrelerin ilerleyen pasajlarda yerini Tip 2 hücrelere bıraktığını ve bu geçişin epitel mezenkim geçişinden ziyade bir miyofibroblast fibroblast geçişi olabileceğini düşündük. Bu bağlamda laboratuvarımızda insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücreler hakkında 2006 yılından beri sürdürülen çalışmaların sonuçlarına dayanarak *in vitro* koşullarda gözlemlediğimiz

heterojen hücre fenotipini hücresel dönüşüm modeli çerçevesinde değerlendirerek moleküler ve fenotipik olarak tanımlamayı amaçladık.

Bu tez çalışmasının temel amacı *in vitro* ortamda Tip 1 ve Tip 2 olarak adlandırılan farklı fenotipe sahip iki hücre tipi ile yapılacak olan moleküler düzeydeki deneylerden elde edilen veriler doğrultusunda miyofibroblast/fibroblast olarak değerlendirilen hücrelerin kullandığımız kültür ortamları tarafından öne çıkarılıp çıkarılmadığını ve çıkarılıyor ise bu dönüşüm temellerini sınamaktır.

Geçmişte elde edilen deney sonuçları incelendiğinde Tip 1 olarak adlandırılan hücreler miyofibroblast benzeri bir karakteri sergilerken Tip 2 olarak adlandırılan hücreler fibroblast benzeri bir hücre karakteri sergilemektedir. Bu süreci bir Tip 2 EMG sürecine benzetmek gerekirse aşağıdaki gibi bir hipotezi öne sürmek mümkün olmaktadır (Şekil 3.1);



Şekil 3.1 Hipotez: Miyofibroblast (Tip 1 hücre) – Fibroblast (Tip 2 hücre) geçişi

Bu hipoteze göre; miyofibroblast karaktere sahip Tip 1 hücreler α-SMA, vimentin, sitokeratin, N-kaderin ifade etmelidir. Diğer yanda fibroblastik karaktere sahip Tip 2 hücreler ise vimentin, N-kaderin ifade etmelidir.

Bu hipotez bu güne kadar bilim literatüründe ilk kez ele alınmaktadır ve doğruluğu ispatlanırsa *in vitro* koşullarda bir miyofibroblast-fibroblast ve/veya fibroblast-miyofibroblast geçişinin var olduğu gösterilecektir. Hipotezin ispatlanmasının yanı sıra yaygın bir şekilde kök hücre kaynağı olarak kullanılan insan göbek kordonu stroması kök hücreleri daha doğru bir şekilde tanımlanmış olup, *in vitro* koşullar altında gösterdiği heterojen fenotip anlamlandırılabilir.

Daha önce bu heterojen profilin çeşitli araştırma grupları tarafından da gözlemlendiği halde henüz böyle bir bakış açısı ile ele alınmamış olması bu çalışmanın özgün değerini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, iGKS-MKH kullanılarak klinik deneylerin başlatıldığı bir dönemde, bu hücrelerin *in vitro* özelliklerini ortaya koyacak her türlü çalışman doğrudan kök hücre tedavilerine yansıtılabilir potansiyeline sahiptir. Bu bilgiler yalnızca kök hücre dünyasına değil hücre biyolojisi alanına önemli bir katkı sağlayacaktır.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

Bu tez çalışması için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 12 Kasım 2012 tarihli 18-578-12 karar numarası ile etik kurul kararı alınmıştır (Bkz. EK1:Etik Kurul Kararı)

4.1.1. İnsan Göbek Kordonu Örneklerinin Laboratuvara Taşınması

1. Bu aşamada kullanılan bütün cam ve metal malzeme önceden steril edilmiştir.
2. Çalışmaya 18 yaş üzerinde normal doğum gerçekleştiren (komplikasyon gebeliklerden) toplam 10 anne dahil edilmiştir. Gözle görünür herhangi bir anemalisi olmayan 6 adet göbek kordonu ile çalışılmıştır.
3. Göbek kordonu, doğum sonrasında, plasentaya yakın bölgeden 15 cm uzunluğunda kesilerek kanın fazlası el yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra örnek, taşıma ortamının içine alınmıştır.
4. Örnek, 4°C'lik ortamda mümkün olduğunca hızlı bir süre içerisinde laboratuvara getirilmiş ve hücre kültürü işlemlerine başlanmıştır.

4.1.2. iGKS-MKH'lerinin İzolasyonu

1. Enzimatik Parçalama Vasatı: % 1 penisilin/streptomisin (Sigma) ve 2,5 µg/mL amfoterisin B (Sigma) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12 (1:1) (Sigma) ortama % 0.1 (g/L) kollajenaz tip 1 (Sigma) eklenerek enzimatik parçalama vasatı hazırlanmıştır.
2. 0.6 mM kalsiyum klorür (CaCl) ve 0.5 mM magnezyum klorür içeren (MgCl) Dulbecco's fosfat tamponlu tuz (D-PBS) (Sigma).
3. 50 mL ve 15 mL'lik konik polipropilen santrifüj tüpü (Biochrom, Berlin, Almanya).
4. Cam petri kabı (100 mm çapında)

5. Otomatik hücre sayım cihazı (Vi-CELL, Automated Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter, Fullerton, CA).
6. Çalkalamalı su banyosu (37 °C'ye ayarlı) (Mettler, Schwabach).
7. Soğutmalı santrifüj (Hettich, Tuttlingen).
8. Doğrama tablası (5-8 mm kalınlığında teflon tabla)
9. Paslanmaz çelik parçalama makası (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA).
10. Cerrahi bıçak sapı ve bıçak (no: 20, 21) (Electron Microscopy Sciences).
11. 1x2 dişli paslanmaz çelik pens (Electron Microscopy Sciences).
12. Serolojik pipet (5 mL, 10 mL, 25 mL) ve pipet tutucu (Biochrom).

4.1.3. iGKS-MKH'lerinin Primer ve Pasajlama Kültürleri

1. Kültür Ortamı: % 10 heat-inactivated FBS (Fötal Bovin Serum) (Sigma), % 1 (g/mL) penisilin/streptomisin (Sigma) ve 2,5 µg/mL amfoterisin B (Sigma) içeren DMEM/Ham's Nutrient Mixture F12 (1:1) (Sigma).
2. Tripsin (% 0,25) (g/L) (Biochrom) ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (1 mM) çözeltisi (İnvitrogen).
3. 0,6 mM kalsiyum klorür ve 0,5 mM magnezyum klorür içeren fosfat tamponlu tuz (PBS) (Sigma).
4. Polistiren steril doku kültür kapları (T25, T75, 24-kuyucuklu) (Corning).
5. 15 ve 50 mL'lik polipropilen steril konik tüp (Biochorom).
6. Yuvarlak cam lamel (12 mm çapında) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).
7. CO₂'li İnkübatör (Sanyo)

4.1.4. iGKS-MKH'lerinin Dondurularak Saklanması ve Çözülmesi

1. Dondurma ortamı: % 10 FBS (Sigma) içeren DMEM/Ham's Nutrient Mixture F12 (1:1) (Sigma).
2. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma).
3. Polikarbonat dondurma kabı (Mr. Frosty®, Nalgene Labware, Rochester, NY).
4. 2 mL'lik polipropilen kapaklı dondurma şişesi (Corning)

4.1.5. iGKS-MKH'lerinin İmmüsitokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

1. Paraformaldehit (% 4) (% 10'luk stok çözeltiden taze olarak hazırlanmış) (Merck, San Diego, CA)
2. PBS (Sigma)
3. 25 mg/mL sodyum azid (NaN₃) (% 2) içeren PBS çözeltisi (Merck).
4. Hücre iskeleti proteinlerine karşı bağlanma özelliği olan antikolar;
 - I. Monoclonal Anti-Vimentin antibody produced in mouse (Sigma). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
 - II. Monoclonal Anti-Cytokeratin, pan (Mixture) antibody produced in mouse (Tip1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 ve19) (Sigma). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
 - III. Monoclonal Anti-Cytokeratin Peptide 18 antibody produced in Mouse (Sigma). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
 - IV. Monoclonal Anti-Cytokeratin Peptide 19 antibody produced in mouse (Sigma). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
 - V. Monoclonal Anti-Actin, α -Smooth Muscle antibody produced in mouse (Sigma). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
5. Hücre yüzey proteinlerine karşı bağlanma özelliği olan antikolar;
 - I. Monoclonal Anti-N-Cadherin antibody produced in mouse (Sigma). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
 - II. Monoclonal Anti-E-Cadherin antibody produced in mouse (İnvirtogen). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
6. Floresan boya bağlı ikincil antikolar;
 - I. FITC-Goat Anti-Mouse IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
 - II. Cy-3-Goat Anti-Mouse IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.

- III. Cy-5-Goat Anti-Mouse IgG (Zymed). Azidli PBS içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş olarak kullanılmıştır.
- IV. 7- Aminoaktinomisin D (7AAD) (Sigma). Azidli PBS içerisinde 10 µg/mL oranında seyreltilerek kullanılmıştır.
- V. Hoechst 33242. Preparat kapama ortamı içerisinde 1 mg/mL oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Materyal	Marka	Katalog Numarası
Leibovitz L-15	Sigma	L4386
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's Nutrient Mixture F12	Sigma	D0547
Penisilin/Streptomisin	Sigma	P0781
Amfoterisin B	Sigma	A2942
Kollajenaz tip 1	Sigma	C0130
Fötal Bovin Serum (FBS)	Sigma	F9665
Tripsin	Biochrom	L2123
Fosfat tamponlu tuz (PBS)	Sigma	P4417
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma	D4540
Anti-Vimentin	Sigma	V6630
Anti-PanCytokeratin	Sigma	C2562
Anti-Cytokeratin 18	Sigma	C1399
Anti-Cytokeratin 19	Sigma	C6930
Anti-N-cadherin	Sigma	C3865
Anti- α -smooth muscle actin (α -SMA)	Sigma	A5228
Anti-E-cadherin	Invitrogen	33-4000
FITC- Goat Anti-Mouse IgG	Jackson	115-095-166
Cy-3-Goat Anti-Mouse IgG	Jackson	115-165-208
Cy-5-Goat Anti-Mouse IgG	Zymed	81-6516
7-Aminoaktinomisin D (7AAD)	Sigma	A9400
Hoechst 33242	Sigma	H6024

Çizelge 4.1.5. 1 Kullanılan kimyasalların marka ve katalog numaraları

4.2. Yöntem

4.2.1. İnsan Göbek Kordonu Örneklerinin Laboratuvara Taşınması

1. Bu aşamada kullanılan bütün cam ve metal malzemeler önceden steril edilmiştir.
2. Çalışmaya 18 yaş üzerinde normal doğum gerçekleştiren (komplikasyon gebeliklerden) toplam 10 anne dahil edilmiştir. Gözle görülür anomalisi olmayan 6 adet göbek kordonu ile çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda anne ve bebeklerin kişisel özellikleri değerlendirilmemiştir.
3. Göbek kordonu, doğum sonrasında, plasentaya yakın bölgeden 15 cm uzunluğunda kesilerek kanın fazlası el yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra örnek, taşıma ortamının içine alınmıştır.
4. Örnek, 4°C'lik ortamda mümkün olduğunca hızlı bir süre içerisinde laboratuvara getirilmiş ve hücre kültürü işlemlerine başlanmıştır.

4.2.2. iGKS-MKH'lerinin İzolasyonu

Aşağıdaki aşamalar sınıf II laminar hava akımlı kabin (Holten) içerisinde yapılmıştır.

1. Laboratuvara getirilen kordon parçası uzun bir pens yardımı ile şişeden çıkarılmış ve bir diğer pens yarımı ile sıkılarak damarlar içerisinde kalan kan mümkün olduğunca uzaklaştırılmıştır.
2. Sonrasında kordon parçası, içerisinde L15 taşıma kültür ortamı bulunan cam petri kabının içerisine alınmıştır.
3. Teflon tabla üzerine alınan kordon parçası, bistüri yardımı ile 5 cm'lik bir parça kesilmiş, kordon parçasının kalanı tekrar L15 taşıma kültür ortamı bulunan cam petri kabının içerisine alınmıştır.
4. Kordon parçasına dişli pens yardımı ile boyuna bir yarık açılmış ve yine dişli pens yardımı ile kordon matriksi dikkatli bir şekilde açılarak damarlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Aynı işlemler dokunun diğer parçalarına da uygulanmıştır. Arterler beyaz renkli ve sert bir yapıya sahipken; ven açık sarı renkli ve oldukça

kırılgan bir yapıya sahiptir. Bu yüzden damarların uzaklaştırılması sırasında doku matriksi iyice açılmasına dikkat edilmiştir. Bunun yanında işlem sırasında dokunun kurumaması için arada bir doku taşıma oramı ile ıslatılmıştır.

5. Damarları uzaklaştırılmış kordon parçaları 50 mL'lik santrifüj tüpleri içerisine alınarak makas yardımı ile parçalanmış ve 2-3 mm'lik parçalar elde edilmiştir.
6. Doku parçalarının üzerine 20 mL kültür ortamı eklenmiş ve 4°C'de 250g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve ikinci kez aynı yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminden sonra çöken parçalar enzimatik ve mekanik kültür ortamlarında kullanılmak üzere ikiye ayrılmıştır.
7. Mekanik parçalanma sonrasında elde edilen parçaların yarısı 10 mL kültür ortamı ile seyreltilerek iki adet T75 flaska aktarılmış ve flask yüzeyine homojen dağılımı sağlamıştır.
8. Pelletin diğer yarısı, 25 mL enzimatik parçalama ortamı ile seyreltikten sonra parçalanmak üzere 37°C'de 3 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda doku parçacıklarının parçalanarak viskoz bir yapı oluşturduğu görülmüştür.
9. Tüp içerisine 25 mL içeren kültür ortamı konulmuş ve pipet yardımı ile karıştırılmıştır.
10. 50 mL'lik süspanse ortam dört adet T75 flaska aktarılmıştır.

4.2.3. iGKS-MKH'lerin Primer Kültürleri

1. T75'lik flaklara 10 mL kültür ortamı içerisinde yaklaşık 2×10^5 hücre ekilmiştir.
2. 37°C ve % 5'lik CO₂ altında enzimatik olarak izole edilen hücreler üç günlük inkübasyonun sonunda flask zemininde başlanmıştır. Sadece mekanik parçalama yöntemi kullanılan yöntemde ise ikinci haftanın sonunda tutunan doku parçacıklarından da hücrelerin dışa doğru göç ettiği gözlemlenmiştir.
3. Enzimatik yöntemle elde edilen kültür ortamında flask içerisinde hâlâ küçük parçacıklar hâlinde bulunan dokuların flaska tutunduğu ve yaklaşık bir hafta sonra bu parçacıklardan da hücrelerin dışa doğru göç ettiği gözlemlenmiştir.
4. Primer kültürün onuncu gününde yapışmayan hücre ve diğer parçacıkları ortamdaki uzaklaştırmak için flask, ısıtılmış D-PBS ile yıkanmış ve üzerine hücre ve eksplantları kaldırmayacak şekilde 10 mL kültür ortamı konulmuştur.

5. Kùltür ortamı her üç günde bir değiştirilmiştir.
6. % 80-90 üzerinde bir hücre yoğunluğuna gelindiğinde, hücreler ısıtılmış tripsin-EDTA çözeltisi (her flask için 4 mL) ile 37°C’de 5 dk. muamele edilip kaldırılmış ve kalkmayan hücreler el ile mekanik kuvvet uygulanmak sureti ile kaldırılmıştır.
7. Tripsin reaksiyonunu durdurmak üzere ortama 4 mL kùltür ortamı konulmuştur.
8. Süspansiyon, 15 mL’lik konik santrifüj tüpüne alınmış ve 200g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve pellet 15 mL kùltür ortamı ile süspanse hâle getirilmiş ve 5’er mL iki T75 flasklara ekilmiş, diğer 5 mL’lik hücre süspansiyonu ise toplam hacim 24 mL olacak şekilde seyreltilmiş ve 24 gözlü kaplar içerisinde bulunan poli-L-lizin kaplı yuvarlak lameller üzerine ekilmiştir.
9. Kùltür ortamı her üç günde bir değiştirilmiş hücrelerin davranışları faz-kontrast mikroskop (Leica Wetzlar) ile izlenmiştir.
10. Tüm bu süreç 7. Pasaja (P₇) kadar sürdürülmüştür.

4.2.4. iGKS-MKH’lerinin Dondurulması ve Çözülmesi

1. Tripsin-EDTA ile muamele edilmiş hücreler 200g’de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp hücre pelleti dondurma ortamı ile süspanse hâle getirilmiştir. 1,5 mL dondurma ortamının içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde bir sonraki aşamaya geçilmiştir.
2. P₀ ve P₇ aşamasında olan hücreler dondurularak saklanmıştır. Bunun için 1350 µL hücre süspansiyonu 4°C’lik soğutma kabı içerisinde bulunan 2 mL kriyotübe aktarılmış ve üzerine 150 µL DMSO damla damla eklenmiştir.
3. 4°C’lik soğutma kabı içerisinde bulunan kritüpler Mr. Frosty® içerisinde yerleştirilerek -80°C’lik derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Bir gece sonra bu ortamdan alınan kriyotüpler uzun süre saklamak amacı ile sıvı nitrojen tankına (-196°C) yerleştirilmiştir.
4. Hücreleri çözmek için sıvı nitrojen tankından alınan kriyotüpler direk 37°C sıcaklıktaki su banyona alınmıştır. 3 dakika beklendikten sonra dondurma ortamının çözüldüğü görülmüş ve sonrasında hücre süspansiyonu 150g’de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti kùltür ortamı ile süspanse edilip flaska ekilmiştir.

4.2.5. iGK'ndan Frozen Kesitlerin Alınması

1. Doğum sonrasında laboratuvara getirilen dokudan, hücre izolasyonuna başlamadan önce, 1 cm uzunluğunda doku parçası kesilmiş ve % 4'lük PFA içerisine alınmıştır.
2. 24 saat % 4'lük PFA içerisinde kalan doku 1.2 M süktroz çözeltisine alınmış ve doku dibe çökene kadar 4 °C'de beklenmiştir (Bu süre genellikle bir gece sürmekle beraber dokunun büyüklüğüne göre değişmektedir).
3. Süktroz içerisinden alınan doku akarsudan geçirildikten sonra kurutma kâğıdı yardımı ile kurutulup kriyoprotektan (Thermo Shandon) içerisine gömülmüş ve -60 °C'de donması beklenmiştir.
4. Donmuş doku kalıplarından kriyostat (Shandon) ile 10 µm kalınlığında kesitler poli-L- lizin kaplı lamlar üzerine alınmış ve kesitler -20 °C'de saklanmıştır.

4.2.6. iGK Frozen Kesitlerin İmmunhistokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

1. Doku kesitlerinin immünhistokimyasal işaretlenmesi için lamlar nemli ortam oluşturulmuş kaplara alınmış ve iki defa PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 15 µL birincil antikor eklenerek 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonrasında kesitler iki defa PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 15 µL ikincil antikor eklenmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
3. Kesitler iki defa PBS ile yıkanmıştır.
4. F-aktin moleküllerini işaretlemek için Cy-5 falloidin kullanılmıştır. Lam üzerine Cy-5 falloidin çözeltisinden 15 µL eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
5. Kesitler iki defa PBS ile yıkanmıştır.
6. Çekirdeği işaretlemek üzere 7-AAD çözeltisinden 15 µL eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
7. Kesitler iki defa PBS ile yıkanmıştır.
8. Son olarak içerisinde Hoechst 33242 bulunduran preparat kapatma ortamından lam üzerine 5 µL damlatılarak lamel ile kapatılmıştır.
9. Kapatma sonrasında lamellerin etrafı oje ile kaplanmış ve gözlem yapılana kadar -20°C'de depolanmıştır.

10. İmmühistokimyasal boyamalar lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeiss, LSM510) ile analiz edilmiştir.

4.2.7. iGKS-MKH'lerin İmmüsitokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

1. Hücrelerin pasajlar boyunca morfolojik görünümleri faz-kontrast mikroskobu (Leica Wetzlar) ile yapılan gözlemler ile belirlenmiştir.
2. İmmüsitokimyasal incelemeler için önceden 24-kuyucuklu kaplar içerisindeki poli-L-lizin kaplı yuvarlak cam lamellere ekilmiş olan örnekler kullanılmıştır.
3. Kültür ortamındaki hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında % 3,5'lük PFA (her bir kuyucuk için 250-300 µL PFA yeterlidir) ile 20 dk. oda sıcaklığında (25°C) kuyucuk içinde fikse edilmiştir.
4. Fiksasyon süresinin sonunda fiksatif ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 1 mL azidli PBS eklenerek 4°C'de saklanmıştır.
5. Hücrelerin immüsitokimyasal işaretlenmesi için yuvarlak lameller kuyucuklardan nemli ortam oluşturulmuş kaplara alınmış ve iki defa PBS ile yıkandıktan üzerlerine 15 µL birincil antikor eklenerek 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
6. Yuvarlak lameller iki defa PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 15 µL ikincil antikor eklenmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
7. Yuvarlak lameller iki defa PBS ile yıkanmıştır.
8. F-aktin moleküllerini işaretlemek için Cy-5 falloidin kullanılmıştır. Lamel üzerine Cy-5 falloidin çözeltisinden 15 µL eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
9. Yuvarlak lameller iki defa PBS ile yıkanmıştır.
10. Çekirdeği işaretlemek üzere 7-AAD çözeltisinden 15 µL eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
11. Yuvarlak lameller iki defa PBS ile yıkanmıştır.
12. Son olarak içerisinde Hoechst 33242 bulunduran preparat kapatma ortamından lam üzerine 3-4 µL damlatılarak, hücreler alta gelecek şekilde, yuvarlak lameller kapatılmıştır.
13. Kapatma sonrasında lamellerin etrafı oje ile kaplanmış ve gözlem yapılmasına kadar -20°C'de depolanmıştır.

14. İmmüisitokimyasal boyamalar lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeis, LSM510) ile analiz edilmiştir. Sinyal dağılımı her mikroskop alanı için + ile +++++ arasında kalitatif bir değer verilerek değerlendirilmiştir (Bkz. Çizelge 5.3.1).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. iGKS-MKH'in Büyüme ve Çoğalma Sürecinin Değerlendirilmesi

Doğum sonrasında alınan insan göbek kordonu laboratuvara getirildikten sonra iki eşit parçaya bölünmüştür. Bu parçalardan bir tanesi makas yardımı ile yaklaşık 1mm'lik parçalara ayrıldıktan sonra eksplant kültürleri yapılmıştır. Diğer parça ise mekanik parçalanma sonrasında enzim uygulanmış ve daha sonrasında santrifüj yardımı ile ayrılan hücrelerin kültürleri yapılmıştır.

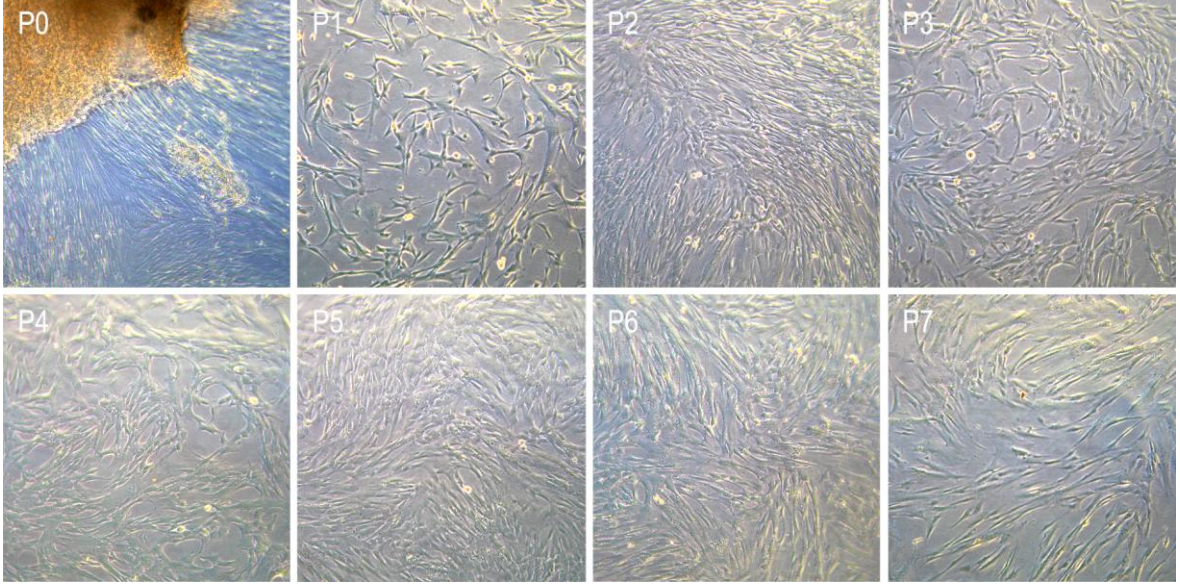
Eksplant kültürler değerlendirildiğinde; primer kültür ortamında 15. günün sonunda tutunmuş olan doku parçacıklarından hücrelerin ayrılmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bu hücreler 25. günün sonunda flaskın yüzeyini % 100 oranında kaplamıştır. Sonrasında hücrelerin her 3 günde bir pasajları yapılmıştır. Enzimatik ayrıştırılmış hücrelerin serisinde ise flaskın yüzeyini % 100 oranında kaplayan hücrelerin pasajları 10 günde bir yapılmıştır. Hücre pasajları 7. pasaja kadar sürdürülmüştür.

Enzimatik kültürler değerlendirildiğinde; primer kültür ortamında kültürün 4. gününde hücrelerin flask yüzeyine tutundukları ve 10. günde flaskın tamamını kapladıkları gözlemlenmiştir. Primer kültürleri yapılan bu hücrelerin her 3 günde bir pasajları yapılmıştır. Bir diğer kültür serisinde ise yine primer kültür sonucunda flaskın yüzeyini % 100 oranında kaplayan hücrelerin pasajları 10 günde bir yapılmıştır, yoğunluklarından ziyade zaman göz önünde tutulmuştur. Hücre pasajları 7. pasaja kadar sürdürülmüştür.

5.2. iGKS-MKH'in *In vitro* Koşullar Altında Fenotiplerinin Değerlendirilmesi

Hücrelerin, mekanik izolasyonu sonrasında 15. günün sonunda dokudan ayrılmaya başladıkları gözlemlenmiştir ve 25. günün sonunda flaskın tamamını kaplamışlardır. Dokudan ayrılan hücrelerin fibroblastoid yapıda uzun sitoplazmik uzantılara sahip oldukları

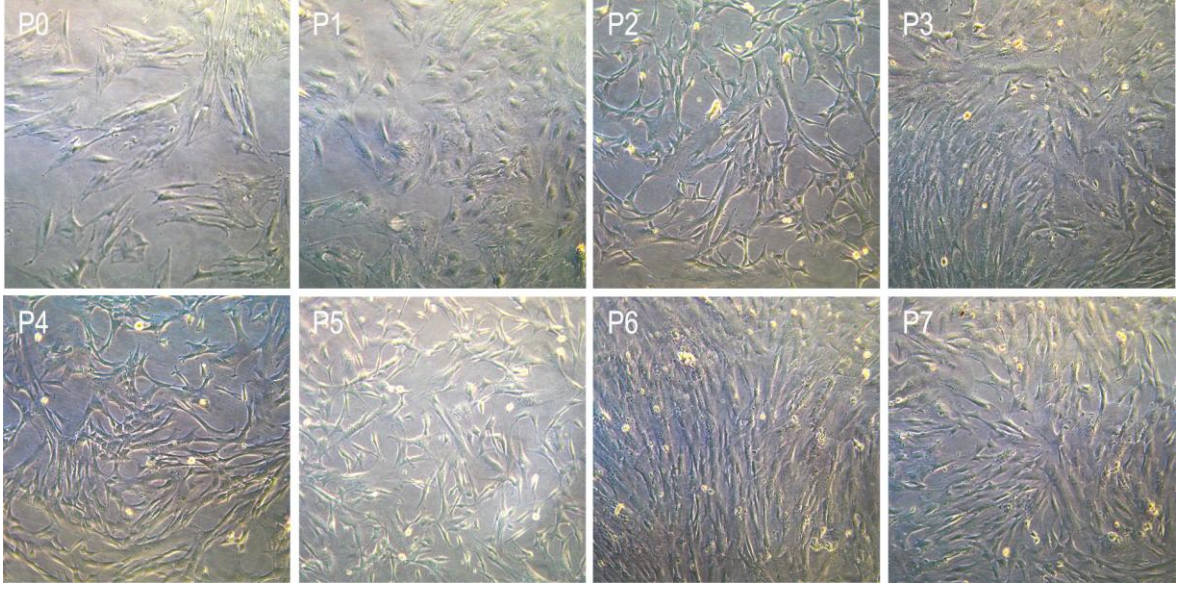
gözlenmiştir. İlerleyen pasajlarda kültür ortamının yine bu fenotipe sahip hücrelerden zengin olduğu görülmüştür (Şekil 5.2.1).



Şekil 5.2.1 Mekanik olarak izole edilmiş iGK-MKH'leri

Mekanik izolasyon sonrasında dokudan ayrılmaya başlayan hücreler fibroblastoid yapıda uzun sitoplazmik uzantılara sahiptir (P0). Sonraki pasajlarda da hücreler aynı fenotipi sergilemiştir (P1-P7). Büyütme ölçeği 15X

Enzimatik izolasyon sonrasında ise geniş sitoplazmalı, son derece yassı ve stres liflerince zengin bir fenotip sergileyen hücrelerin kültür ortamında çoğunluğu temsil ettiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında fibroblastoid görünümlü, uzun sitoplazmik uzantılara sahip hücrelerin de varlığı saptanmıştır. Buna göre ilk üç pasajda kültür ortamı geniş sitoplazmalı hücrelerce zengin durumda iken 4, 5, 6 ve 7. pasajlarda fibroblastoid hücre fenotipinin arttığı görülmüştür (Şekil 5.2.2).



Şekil 5.2.2 Enzimatik olarak izole edilmiş iGK-MKH'leri

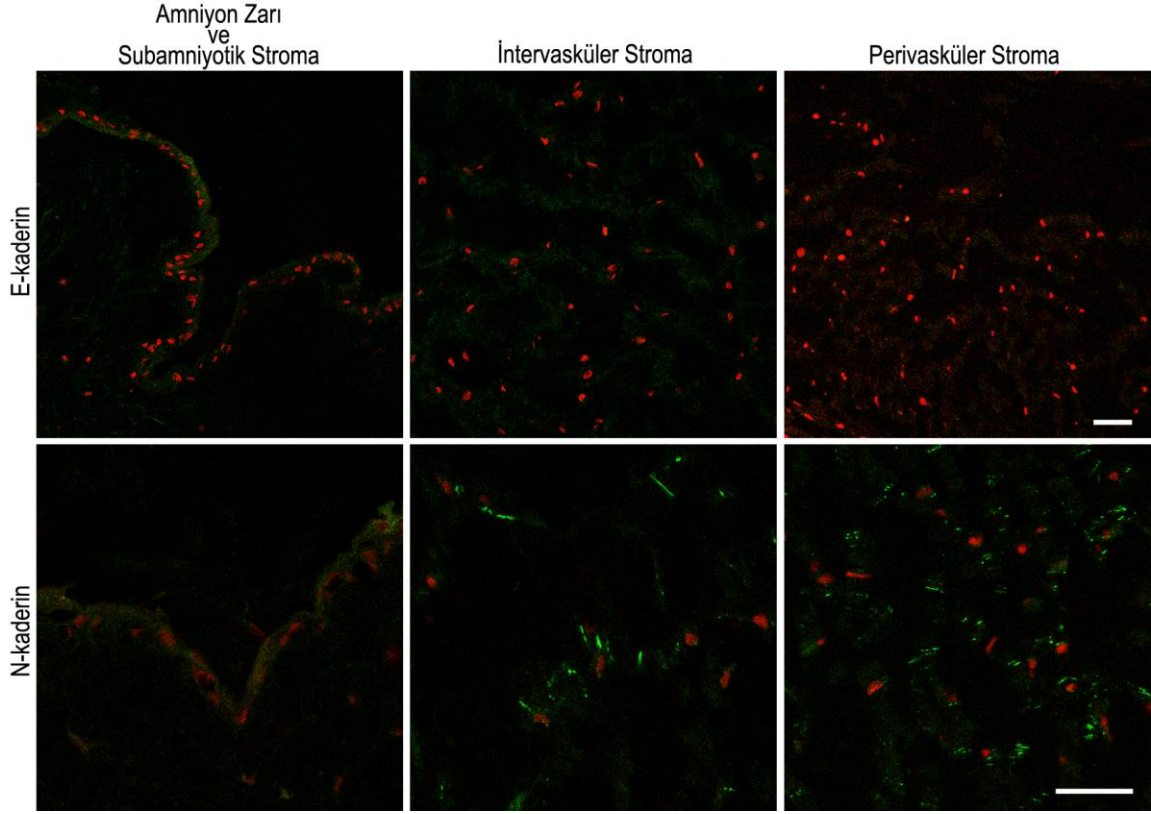
Enzimatik izolasyon sonrasında ilk 3 pasajda geniş sitoplazmalı, yassı ve stres liflerine zengin bir fenotip sergileyen hücrelerin kültür ortamında çoğunluğu temsil ettiği gözlemlenmiştir (P0-P3). İlerleyen pasajlarda fibroblastoid hücre fenotipinin arttığı görülmüştür (P4-P7). Büyütme ölçeği 15X

5.3. iGK Histolojik Kesitlerinin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Doğum sonrasında labotaruvara getirilen göbek kordonundan 1 cm kalınlığında bir kesit alındıktan sonra %3,5'lük PFA içerisine alınmıştır. Fiksasyon aşamasından sonra (bkz. Yöntem) kriyotektan içerisine gömülmüş olan dokudan kriyostat yardımı ile 10 µm kalınlığında kesitler poli-L lizin kaplı lamlar üzerine alınmış ve immünohistokimya boyama yöntemi kullanılarak lazer taramalı konfokal mikroskobu ile immünflüoresan analizleri yapılmıştır.

Kordon kesitlerine E-kaderin, N-kaderin, pansitokeratin (Tip 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19) (PanSk), sitokeratin 18 (sk 18), sitokeratin 19 (sk19), α -SMA ve vimentin antikoları ile işaretlenme yapılmıştır. Protein ifadelerinin değerlendirilmesi kordonun üç farklı bölgesi (amniyon zarı ve subamniyotik stroma, intervasküler stroma ve perivasküler stroma) ayrı ayrı ele alınarak yapılmıştır.

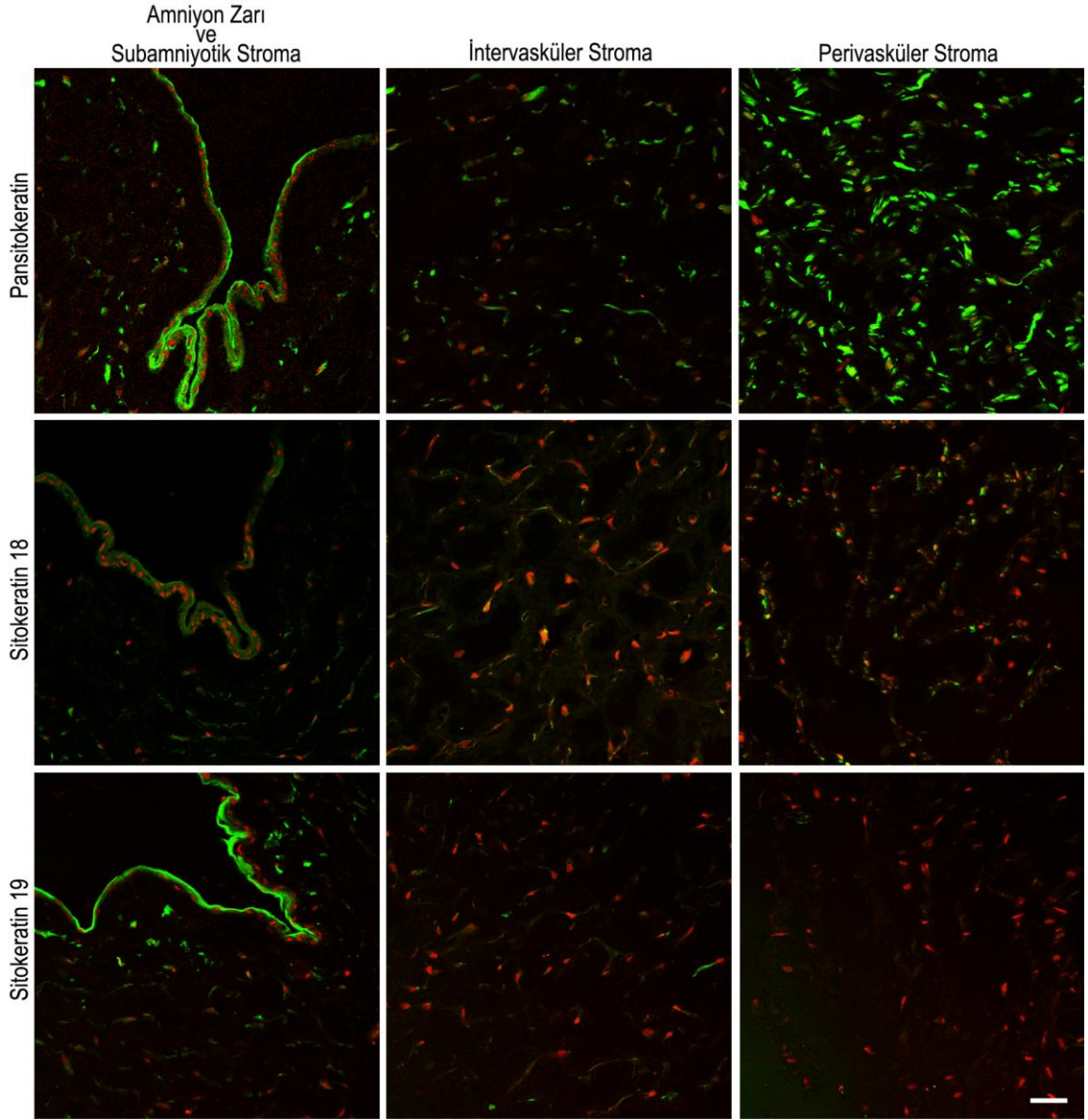
Lazer taramalı konfokal mikroskop ile yapılan analizler sonucunda kordonun hiçbir bölgesinde E-kaderin ifadesi gözlenmemiş; intervasküler ve perivasküler stromada bulunan hücrelerin N- kaderin ifade etikleri tespit edilmiştir (Şekil 5.3.1).



Şekil 5.3.1 iGK stromasında E-kaderin ve N-kaderin ifadesi

iGK stromasının hiçbir bölgesinde E-kaderin ifadesi gözlenmemiştir. İntervasküler ve perivasküler stromada bulunan hücreler N-kaderin ifade etmektedir. Ölçek boyu 50 µm.

Sitokeratin ifadelerine bakıldığında ise amnion zarında bulunan epitel hücreleri ve subamniyotik bölgedeki hücrelerin panSk ve sk 19'u güçlü bir şekilde ifade ederken sk 18'i oldukça zayıf ifade ettikleri gözlenmiştir. İntervasküler stromada panSk ifadesi gözlenirken sk 18 ve sk 19'un birkaç hücre tarafından ifade edildiği gözlenmiştir. Perivasküler stromada ise panSk güçlü bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir. Bunun yanında sk 18 birkaç hücre tarafından zayıf bir şekilde ifade edilirken; sk 19'un hiç ifade olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.3.2) (Çizelge 5.3.1).



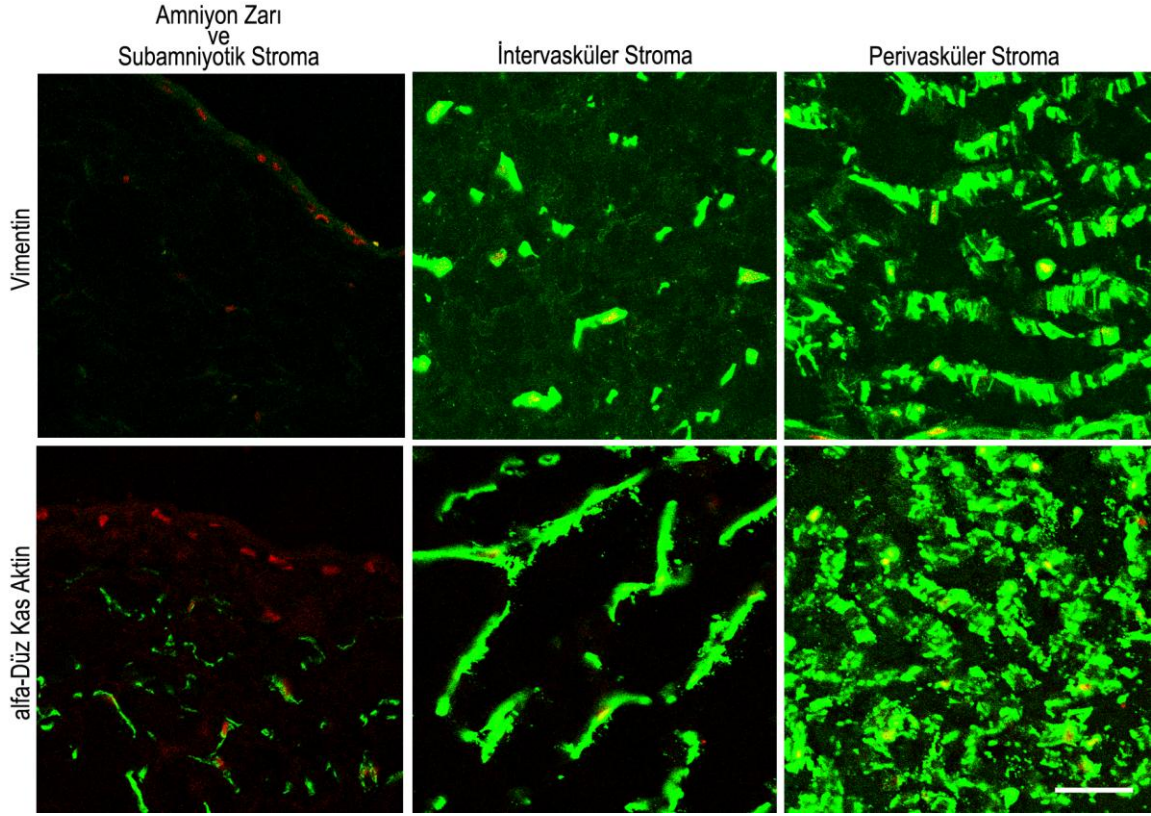
Şekil 5.3.2 iGK stomasında pansitokeratin, sitokeratin 18 ve sitokeratin 19 ifadesi

Amnion zarında bulunan epitel hücreleri ve subamniyotik bölgedeki hücrelerin pansitokeratin ve sitokeratin 19 ifade etmektedir. Sitokeratin 18 ise zayıf ifade ettikleri gözlenmiştir. İntervasküler stromada pansitokeratin ifadesi gözlenirken sitokeratin 18 ve sitokeratin 19'un birkaç hücre tarafından ifade edildiği gözlenmiştir. Perivasküler stromada pansitokeratinin güçlü bir şekilde ifade edildiği; sitokeratin 18 birkaç hücre tarafından zayıf bir şekilde ifade edilirken; sitokeratin 19'un hiç ifade olmadığı gözlenmiştir. Ölçek boyu 50 µm.

Bölge Antikor	Amniyon Zarı	Subamniyotik Bölge	İntervasküler Alan	Perivasküler Alan
Pansitokeratin	++++	+++	++	+++++
Sitokeratin 18	+	+	-	+
Sitokeratin 19	+++++	+++	-	-

Çizelge 5.3.1 iGK stroma bölgelerinde sitokeratin ifade şiddetinin değerlendirilmesi

Vimentin ve α -SMA ifadelerine bakıldığında ise; amniyon zarında vimentin ve α -SMA ifadesi gözlenmemiştir. Subamniyotik stromaya bakıldığında ise vimentin ifadesi gözlenmez iken hücrelerin güçlü bir şekilde α -SMA ifade ettikleri tespit edilmiştir. İntervasküler ve perivasküler stromada ise hem vimentinin hem de α -SMA'in oldukça güçlü bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir (Şekil 5.3.3) (Çizelge 5.3.2).



Şekil 5.3.3 iGK stromasında vimentin ve α -SMA ifadesi

Amnion zarında vimentin ve α -SMA ifadesi gözlenmemiştir. Subamniyotik stromada vimentin ifadesi gözlenmez iken hücrelerin α -SMA ifade ettikleri tespit edilmiştir. İntervasküler ve perivasküler stromada ise hem vimentinin hem de α -SMA'ın oldukça güçlü bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir. Ölçek boyu 50 μ m

Bölge \ Antikor	Amnion Zarı	Subamniyotik Bölge	İntervasküler Alan	Perivasküler Alan
Vimentin	+	-	++++	+++++
α -SMA	-	+++	++++	+++++

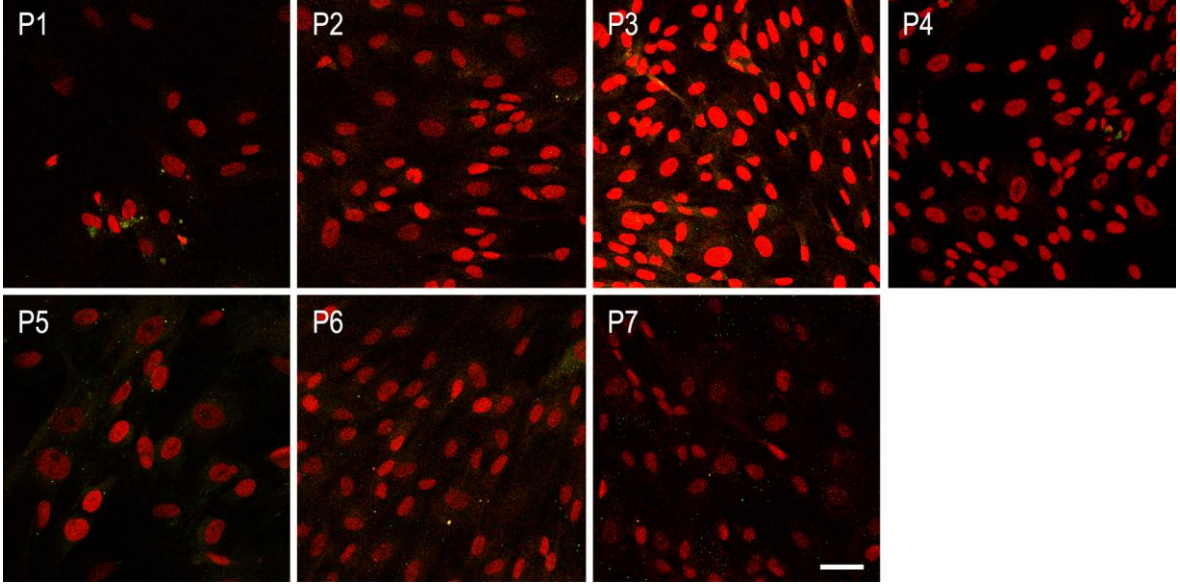
Çizelge 5.3.2 iGK stroma bölgelerinde vimentin ve α -SMA ifade şiddetinin değerlendirilmesi

5.4. iGKS-MKH'lerinin İmmüsitokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

İnsan göbek kordonundan izole edilen hücreler *in vitro* koşullar altında 1.pasajdan 7. pasaja kadar kültürleri yapılmış ve her aşamada 24 kuyucuklu kültür kapları içerisinde poli-L lizin kaplı yuvarlak lameller üzerinde fikse edilerek immüsitokimyasal boyama yöntemi kullanılarak lazer taramalı konfokal mikroskobu ile immünflüoresan analizleri yapılmıştır. Kültürü yapılan hücrelere hücre yüzeyi molekülleri olan N-kaderin, E-kaderin ile hücre iskeleti proteinleri olan α -düz kas aktini (α -SMA), vimentin, panSk (Tip 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19), sk 18 ve sk 19 antikoları ile işaretlenme yapılmıştır.

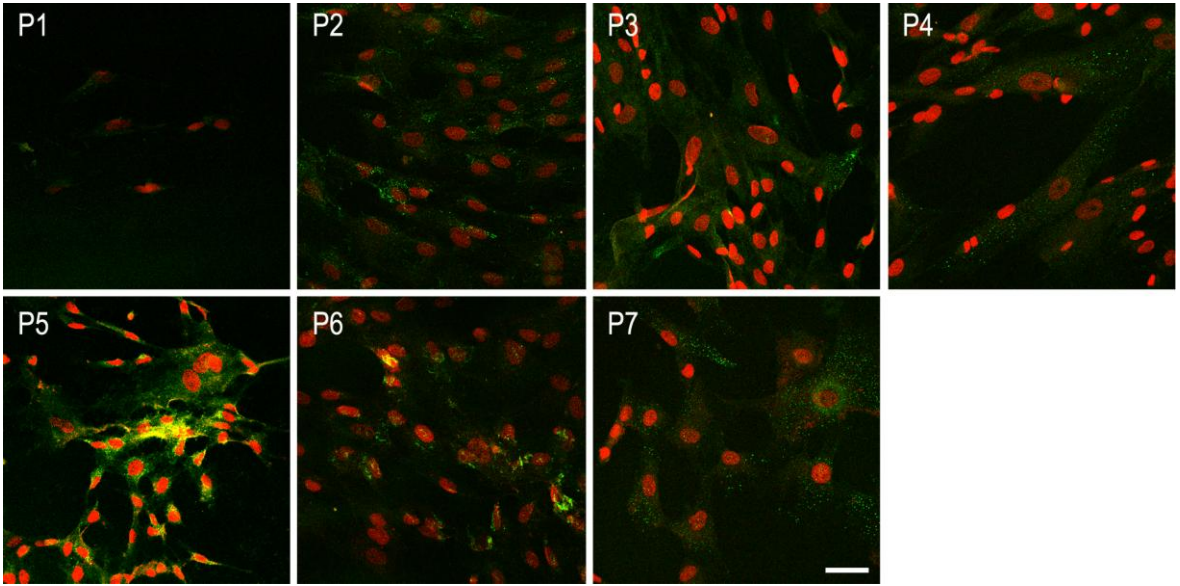
Hücre kültür koşulları temel de izolasyon tipi (enzimatik, mekanik) ve pasaj süreleri (72 saat gün ve 10 gün) olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır. Her bir inceleme bu başlıklar altında ayrı ayrı analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda kaderin ailesi moleküllerinin ifadesinde kısa süreli pasajlar ile uzun süreli pasajlar arasında ifade farklılığı gözlenmiştir. Hücre izolasyon yöntemleri ele alındığında enzimatik ve mekanik kültürler arasında kaderin molekülleri arasında herhangi bir fark gözlenmez iken ve hücre içi iskelet elemanı proteinlerinin ifadesinde farklılıklar gözlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda kültürleri yapılan iGK-MKH'lerinde E-kaderin ifadesi belirlenmemiştir (Şekil 5.4.1 ve Şekil 5.4.3). Bunun yanında kısa süreli kültürlerde N-kaderinin bütün pasajlarda sitoplazma içerisinde noktasal şekilde ifade edildiği görülmüştür (Şekil 5.4.2 ve Şekil 5.4.4). Kaderin hücre içindeki sentez dinamiği göz önüne alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda hücrelerin pasajlanma süreleri 10 güne çıkartıldığında kısa süreli kültürlerde olduğu gibi uzun süreli kültürlerde de E-kaderin ifadesine rastlanmamıştır (Şekil 5.4.5). Fakat iGK-MKH'lerinin yüzeylerinde N-kaderin ifadesi tipik bir şekilde çizgisel olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.4.6) (Çizelge 5.4.1).



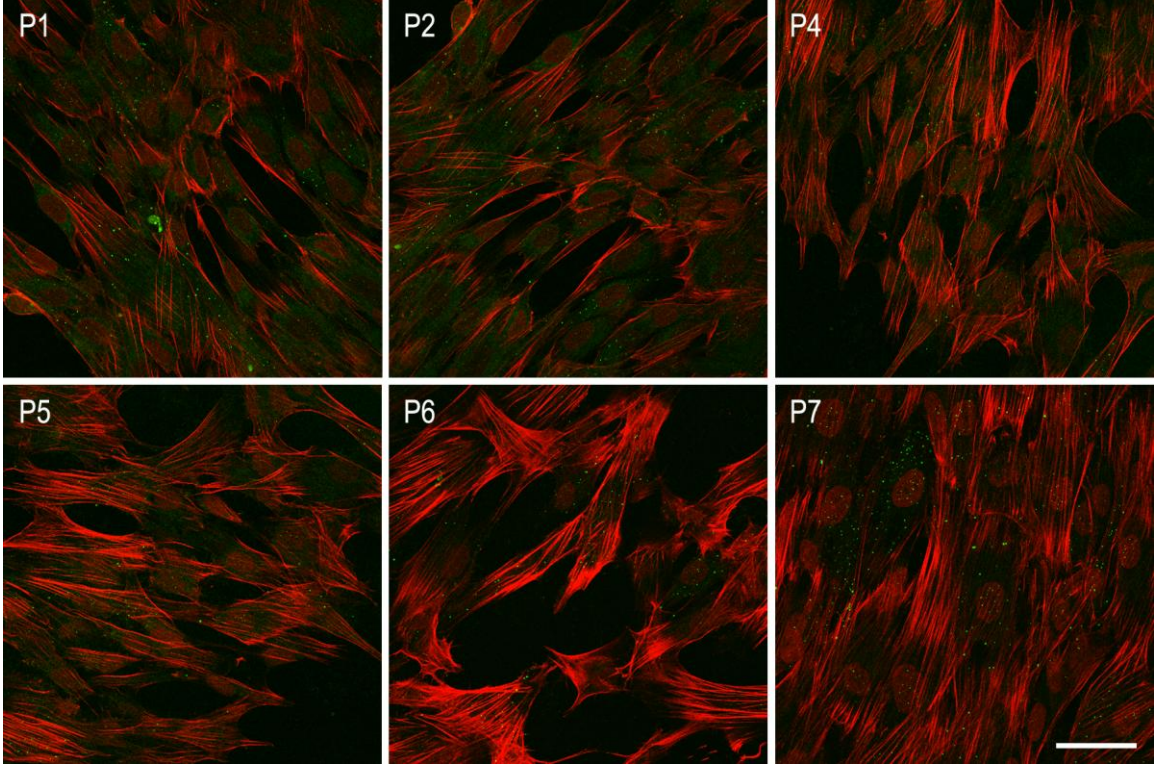
Şekil 5.4.1 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında E-kaderin ifadesi

Hücrelerin E-kaderin ifade etmedikleri tespit edilmiştir. Ölçek boyu 50µm.



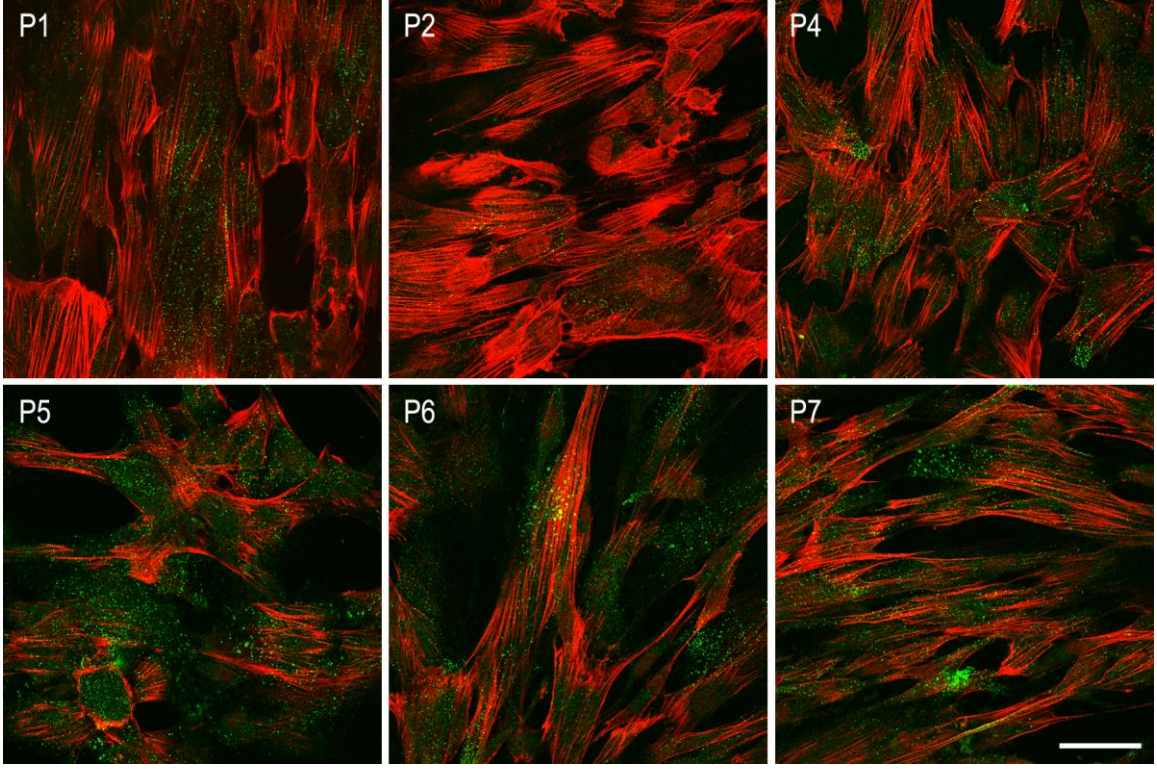
Şekil 5.4.2 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında N-kaderin ifadesi

Hücrelerin sitoplazma içinde noktasal bir şekilde N-kaderin ifade ettikleri tespit edilmiştir. Ölçek boyu 50µm.



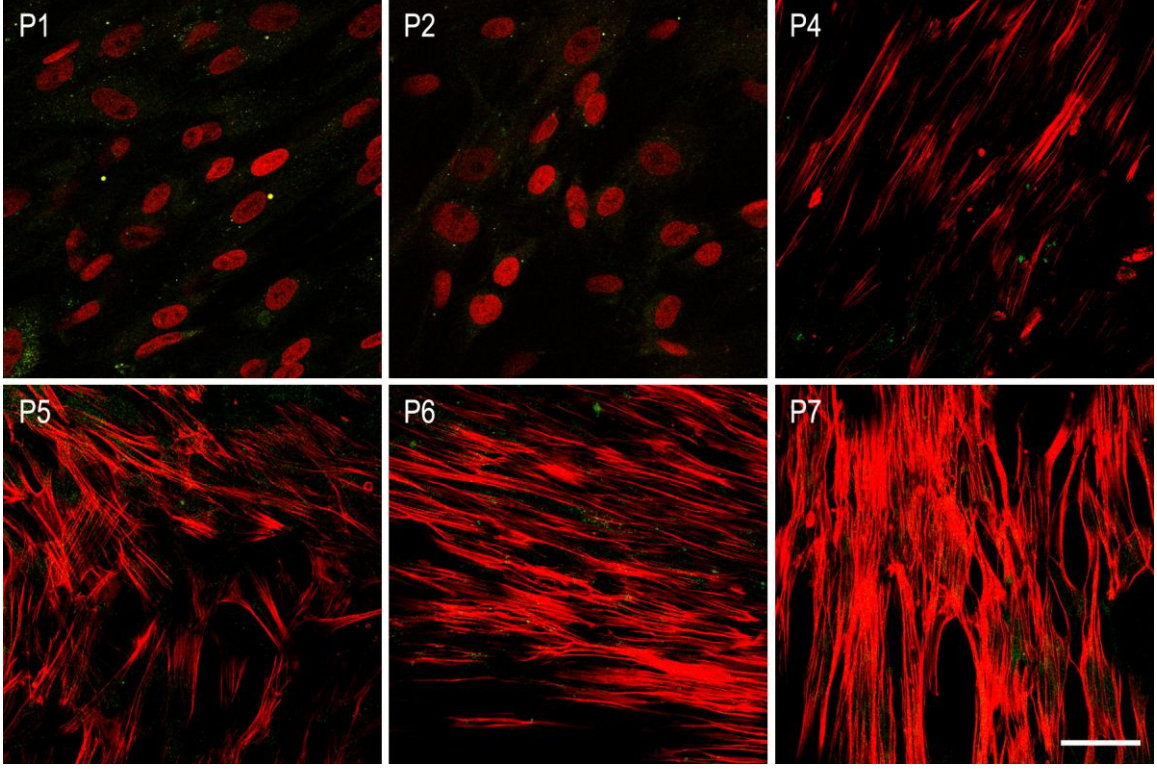
Şekil 5.4.3 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında E-kaderin ifadesi

Hücrelerin E-kaderin ifade etmedikleri tespit edilmiştir. Ölçek boyu 50µm



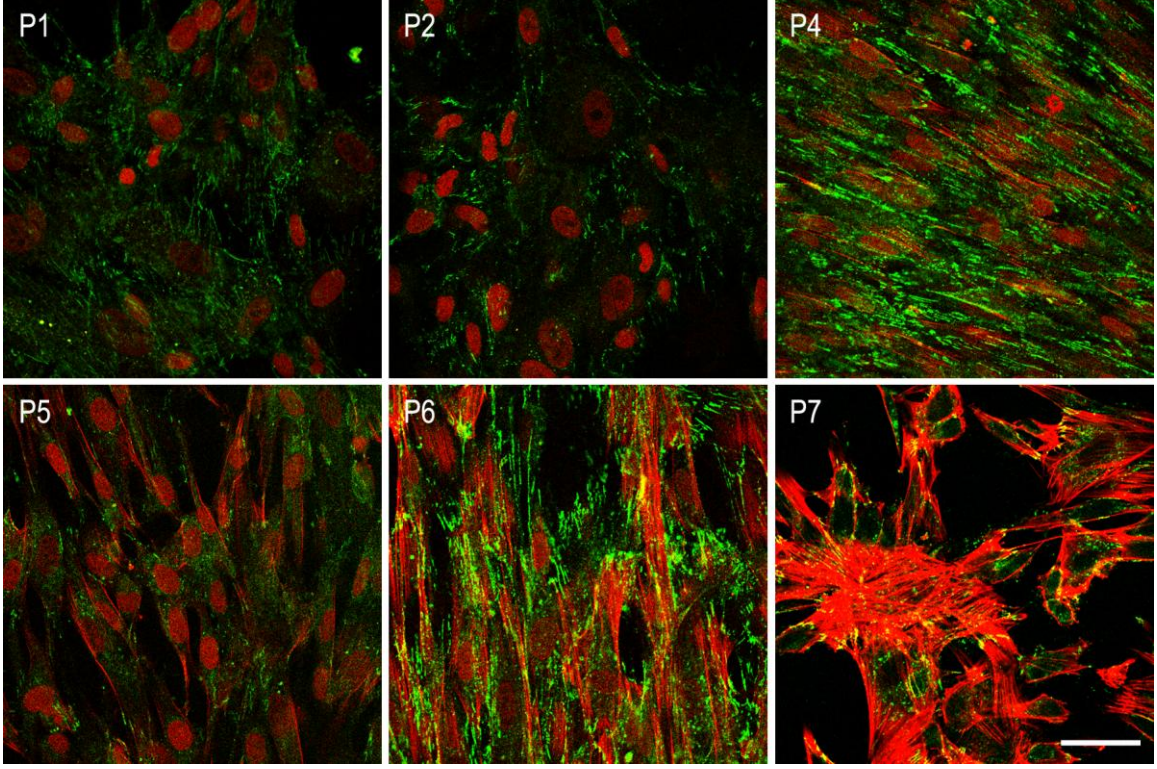
Şekil 5.4.4 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde kısa süreli kültür sonrasında N-kaderin ifadesi

Hücrelerin sitoplazma içinde noktasal bir şekilde N-kaderin ifade ettikleri tespit edilmiştir. Ölçek boyu 50µm



Şekil 5.4.5 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde uzun süreli kültür sonrasında E-kaderin ifadesi

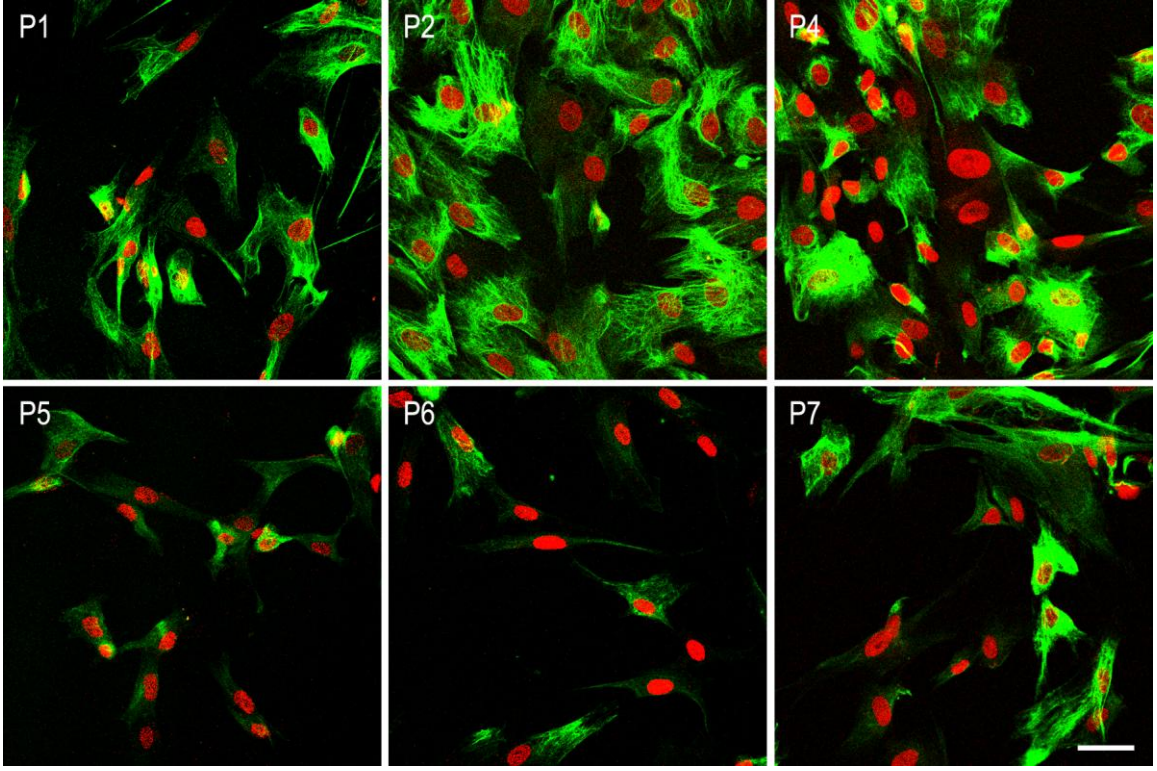
Hücrelerin E-kaderin ifade etmedikleri tespit edilmiştir. Ölçek boyu 50µm



Şekil 5.4.6 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde uzun süreli kültür sonrasında N-kaderin ifadesi

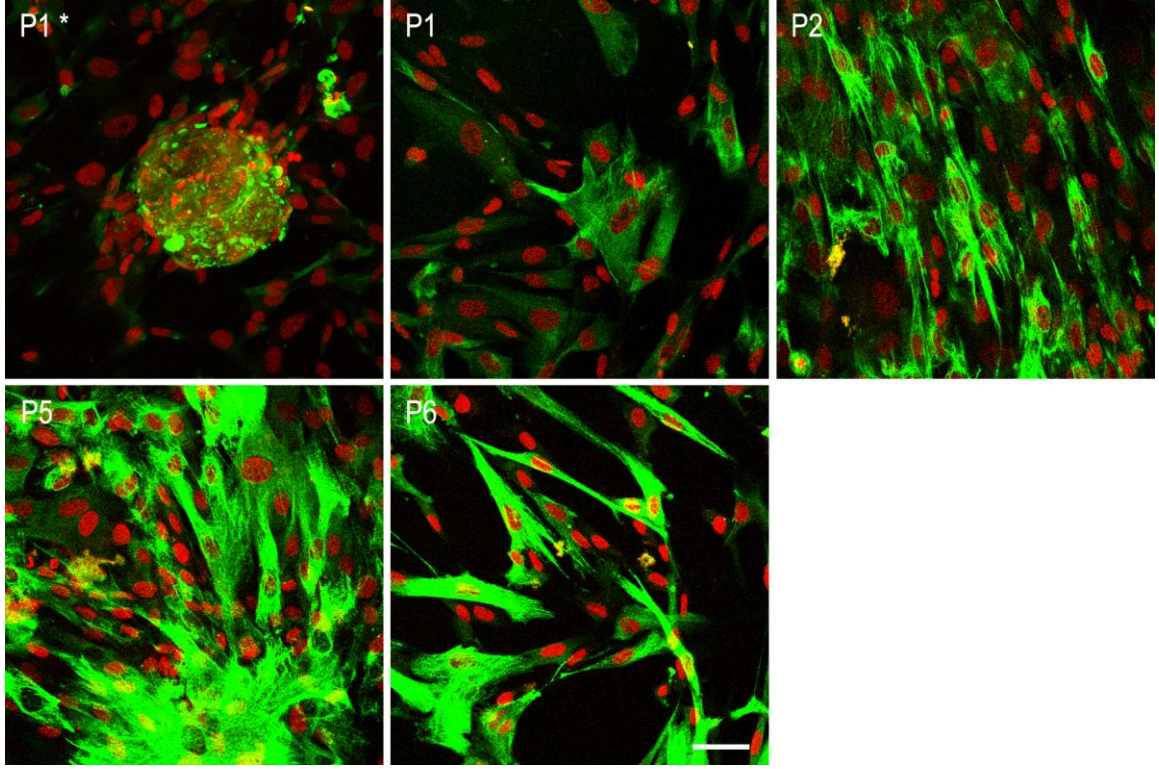
Hücrelerin yüzeylerinde çizgisel bir şekilde N-kaderin ifade ettikleri tespit edilmiştir. Ölçek boyu 50µm

Pansitokeratin ifadelerine bakıldığında enzimatik kültürün bütün pasajlarında Tip 1 büyük sitoplazmalı hücrelerde fazla miktarda ifade olurken Tip 2 hücrelerde düşük seviyelerde ifade olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında ilk 3 pasajdan sonra ifadenin azaldığı fakat 7. pasajda görülen büyük sitoplazmalı hücrelerde yüksek seviyede pansitokeratin ifade edildiği tespit edilmiştir (Şekil 5.4.7) (Çizelge 5.4.1). Mekanik olarak izole edilen hücrelerde pansitokeratin ifadesine bakıldığında ise P1'de kültür ortamında bulunun eksplant doku parçacıklarında heterojen bir görünümde ifade tespit edilirken etrafından flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa pansitokeratin ifade ettikleri görülmüştür. İlerleyen pasajlarda (P2, P5, P6) pansitokeratin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Fakat genel ifade profiline bakıldığında belli hücrelerin pansitokeratin ifade etmedikleri tespit edilmiştir. Bu hücreler morfolojik olarak değerlendirildiklerinde Tip 1 ve Tip 2 olarak net bir ayırım yapılamamıştır (Şekil 5.4.8) (Çizelge 5.4.1).



Şekil 5.4.7 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde pansitokeratin ifadesi

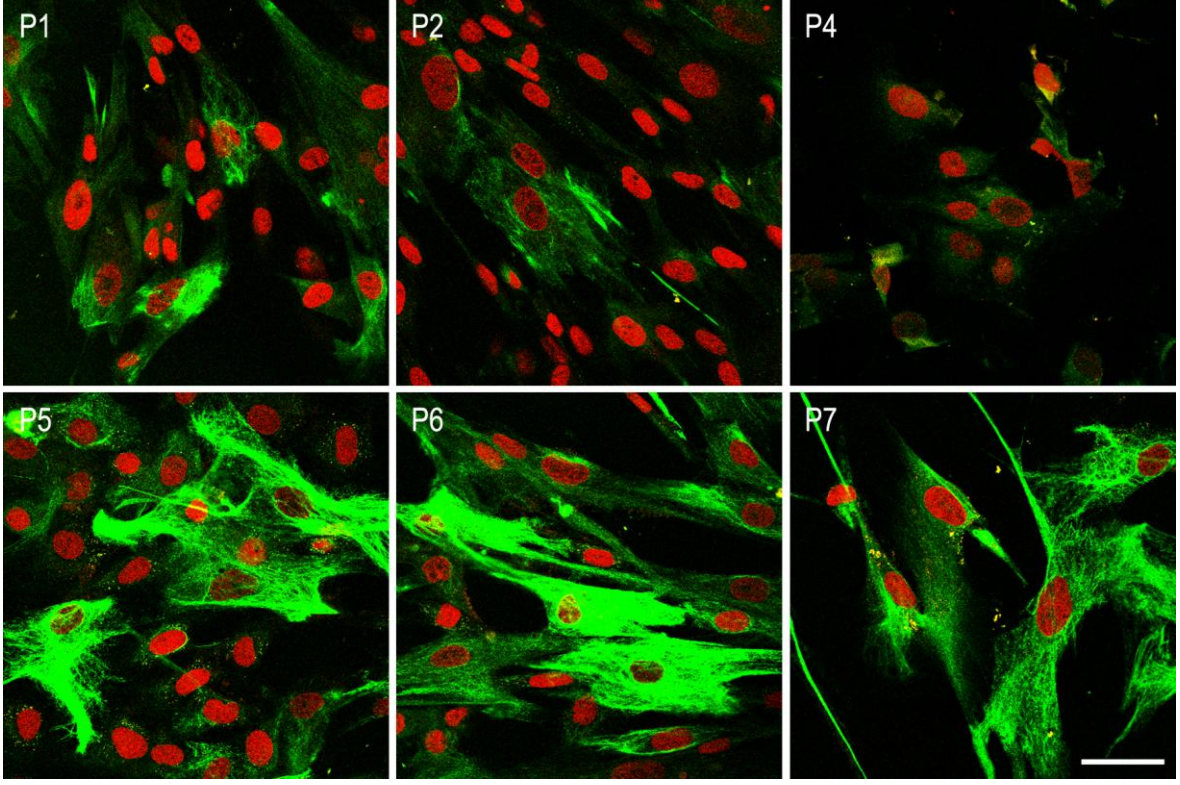
Büyük sitoplazmaya sahip hücrelerde fazla miktarda ifade edilirken küçük sitoplazmalı hücrelerde az miktarda ifade edilmiştir. İlk pasajlarda genel ifade seviyesi yüksekiken 5. ve 6. Pasajda azalmış ve 7. pasajda tekrar artmıştır. Ölçek boyu 50 μm



Şekil 5.4.8 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde pansitokeratin ifadesi

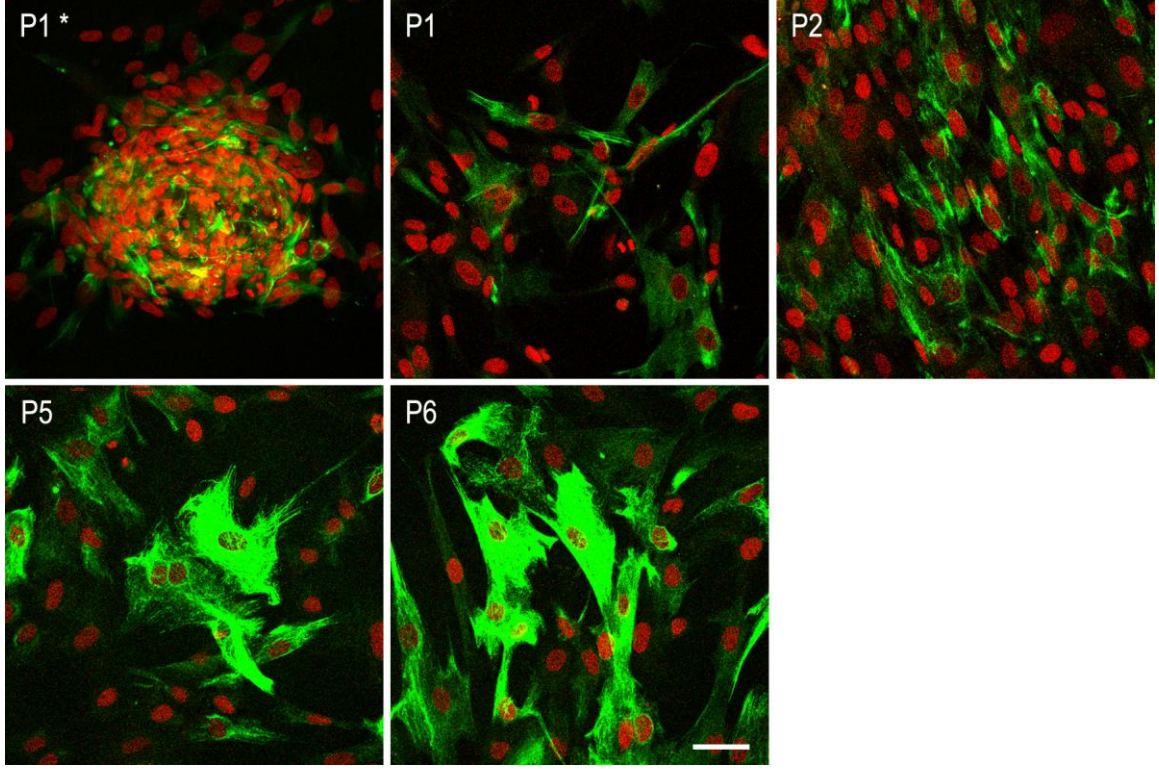
P1'de kültür ortamında bulunan eksplant* doku parçacıklarında heterojen bir görünümde pansitokeratin ifadesi tespit edilirken etrafından flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmemektedir. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa pansitokeratin ifade etmektedir. İlerleyen pasajlarda (P2, P5, P6) pansitokeratin ifadesi artmaktadır. Ölçek boyu 50µm

Enzimatik kültürlerde SK 18 de pansitokeratin ifadesinde olduğu gibi büyük sitoplazmaya sahip hücrelerde daha fazla miktarda ifade edildiği gözlenmiştir. İlk iki pasajda ifade edilen SK 18'in 4. pasajda azaldığı sonraki 3 pasajda ise ifadenin arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.4.9) (Çizelge 5.4.1). Mekanik olarak izole edilen hücrelerde SK 18 ifadesine bakıldığında ise P1'de kültür ortamında bulunan eksplant doku parçacıklarında heterojen bir görünümde ifade tespit edilirken etrafından flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa SK 18 ifade ettikleri görülmüştür. İlerleyen pasajlarda (P2, P5, P6) SK 18 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Fakat genel ifade profiline bakıldığında bazı hücrelerin az miktarda, bazı hücrelerin ise fazla miktarda SK 18 ifade ettikleri tespit edilmiştir. Bu hücreler morfolojik olarak değerlendirildiklerinde Tip 1 ve Tip 2 olarak net bir ayırım yapılamamıştır (Şekil 5.4.10) (Çizelge 5.4.1).



Şekil 5.4.9 Enzimatik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde sitokeratin 18 ifadesi

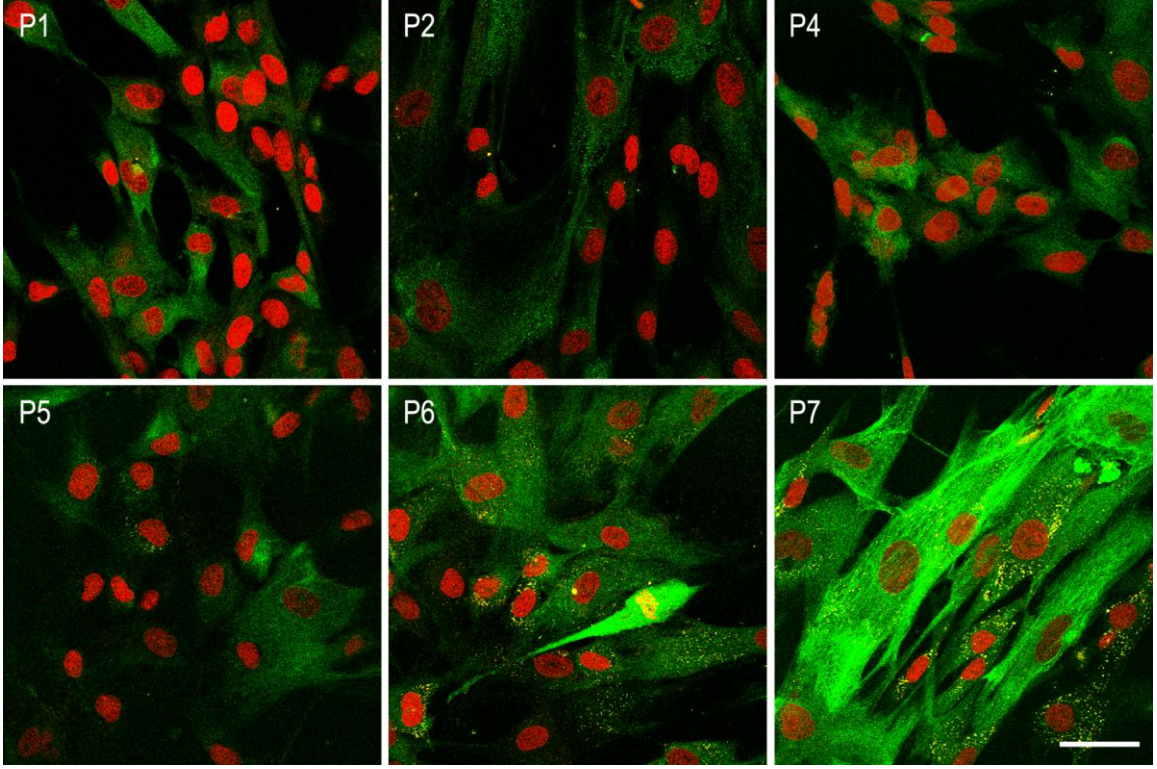
Büyük sitoplazmaya sahip hücrelerde fazla miktarda ifade edilirken küçük sitoplazmalı hücrelerde az miktarda ifade edilmiştir. İlk iki pasajda ifade edilen sitokeratin 18'in 4. pasajda azaldığı sonraki 3. pasajda ise ifadenin arttığı gözlenmiştir. Ölçek boyu 50 μm



Şekil 5.4.10 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde sitokeratin18 ifadesi

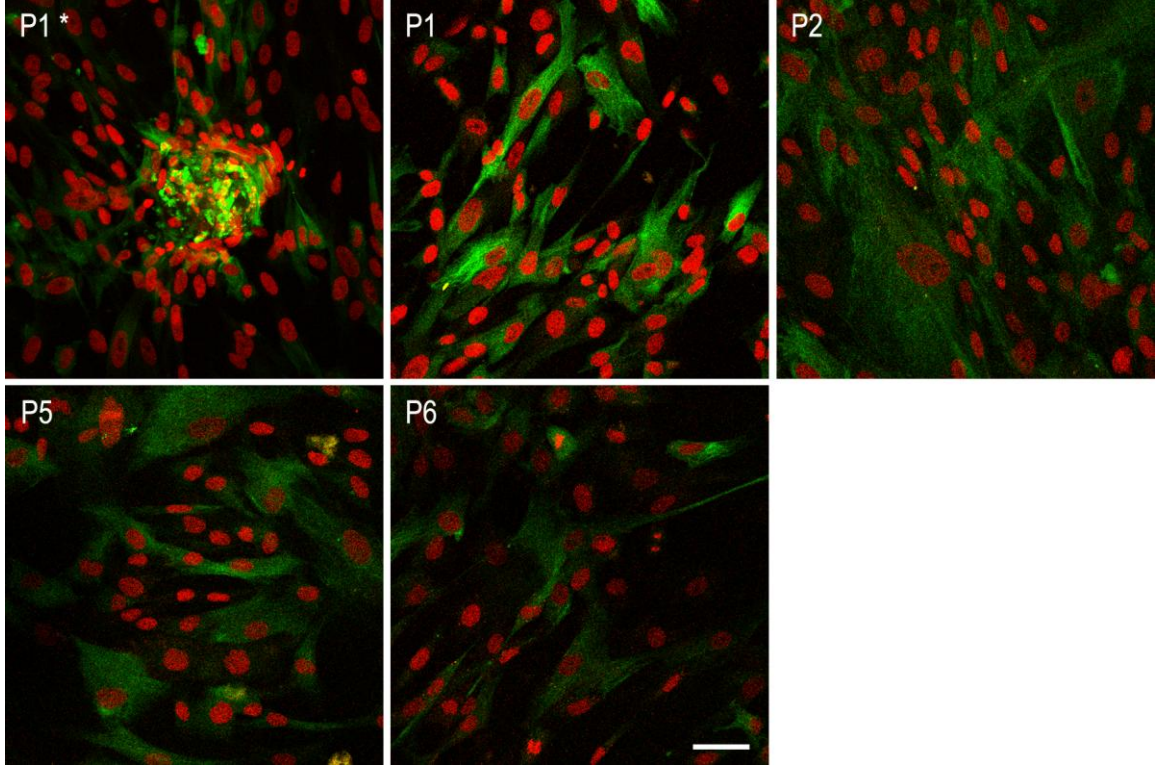
P1'de kültür ortamında bulunan eksplant* doku parçacıklarında heterojen bir görünümde sitokeratin 18 ifadesi tespit edilirken etrafından flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmemektedir. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa sitokeratin 18 ifade etmektedir. İlerleyen pasajlarda (P2, P5, P6) sitokeratin 18 ifadesi artmıştır. Genel ifade profiline bakıldığında ise bazı hücreler az miktarda bazı hücreler ise fazla miktarda sitokeratin 18 ifade etmektedir. Ölçek boyu 50µm

SK 19 ifadesine bakıldığında ise enzimatik kültürlerde ilk 6 pasajda bütün hücrelerde az da olsa ifade edildiği; 7. pasajda ise ifadenin arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.4. 11) (Çizelge 5.4.1). Mekanik olarak izole edilen hücrelerde SK 19 ifadesine bakıldığında P1'de kültür ortamında bulunan eksplant doku parçacıklarında heterojen bir görünümde ifade tespit edilirken etrafından flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa SK 19 ifade ettikleri görülmüştür. İlerleyen pasajlarda (P2, P5, P6) SK 19 ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında bazı hücrelerin ise hiç SK 19 ifade etmedikleri görülmüştür. Bu hücreler morfolojik olarak değerlendirildiklerinde Tip 1 ve Tip 2 olarak net bir ayırım yapılamamıştır (Şekil 5.4. 12) (Çizelge 5.4.1).



Şekil 5.4. 11 iGK-MKH'lerinde sitokeratin 19 ifadesi

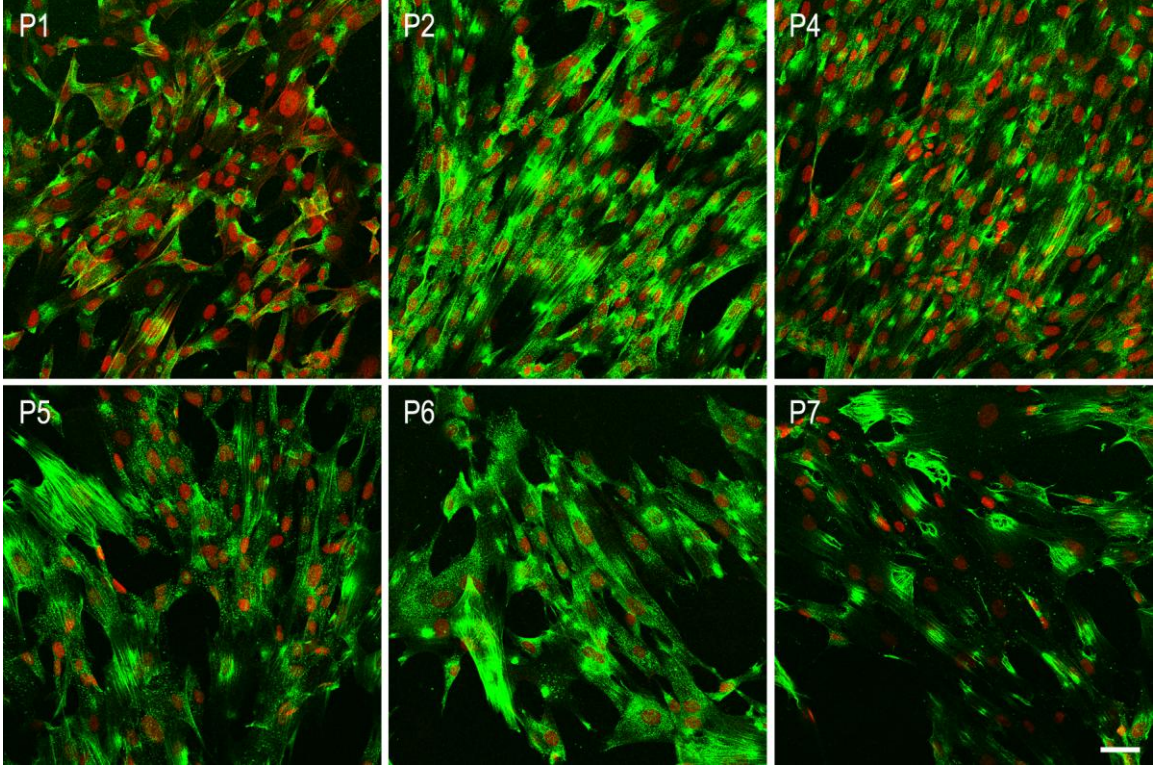
Bütün hücrelerde az da olsa ifade edildiği; 7. pasajda ise ifadenin arttığı gözlenmiştir.
Ölçek boyu 50 μ m



Şekil 5.4. 12 Mekanik olarak izole edilen iGK-MKH'lerinde sitokeratin19 ifadesi

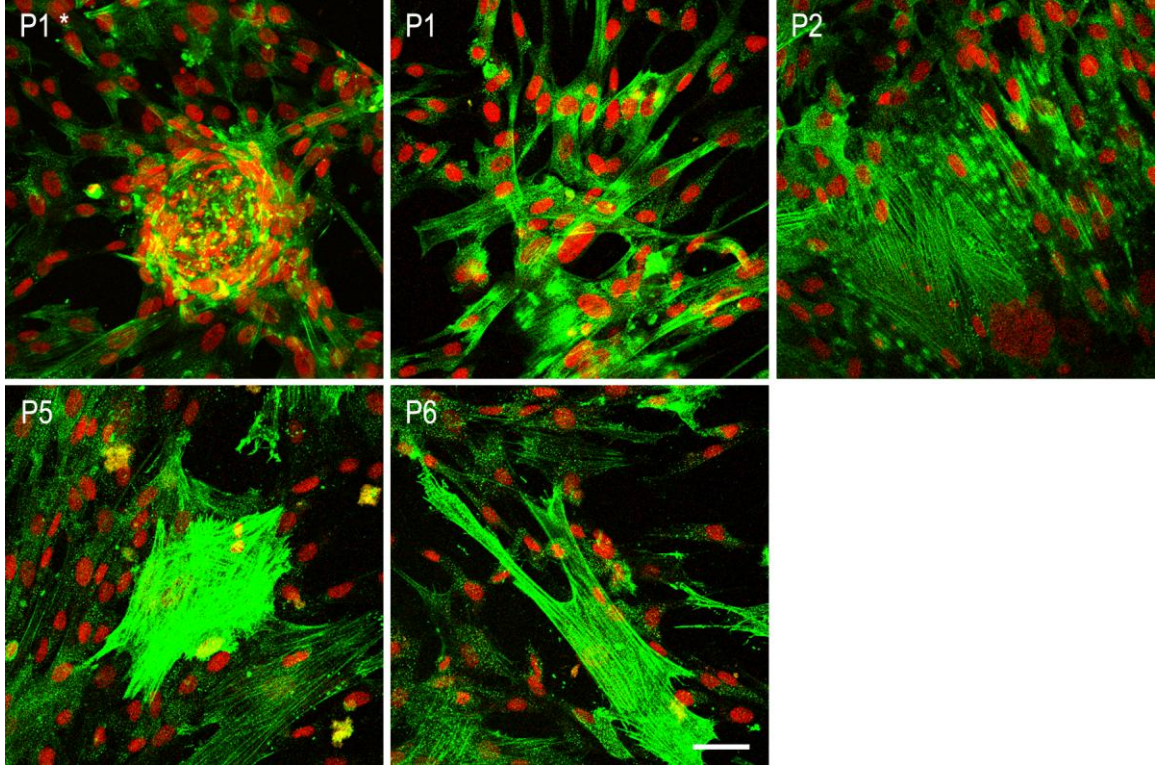
P1'de kültür ortamında bulunan eksplant* doku parçacıklarında heterojen bir görünümde sitokeratin 19 ifadesi tespit edilirken etrafından flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmemektedir. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmı sitokeratin 19 ifade etmektedir. İlerleyen pasajlarda (P2, P5, P6) sitokeratin 19 ifadesi azalmıştır. Bunun yanında bazı hücreler sitokeratin 19 ifade etmemektedir. Ölçek boyu 50 μm

Enzimatik izolasyon sonrasında α -SMA ifadesine bakıldığında ise ilk 3 pasajda hücre içerisinde çizgisel hâlde ifade edildiği gözlenirken ilerleyen pasajlarda hücrelerin bir kısmında noktasal, bir kısmında ise çizgisel hâlde ifade şekli gözlenmiştir. 1. pasajda ifade seviyesi düşük iken ilerleyen pasajlarda artmış ve 7. pasajda ifade azalmıştır (Şekil 5.4. 13) (Çizelge 5.4.1). Mekanik izolasyon sonrası kültürlere bakıldığında ise 1. pasajdaki eksplant doku parçacıklarında homojen bir şekilde ifade edildiği, ilerleyen pasajlarda da homojen ifade tipinin devam ettiği görülmüştür. 5. ve 6. Pasajda bazı hücrelerin diğer hücrelerden farklı olarak α -SMA'ni daha güçlü ifade ettikleri gözlenmiştir (Şekil 5.4.14) (Çizelge 5.4.1).



Şekil 5.4. 13 Enzimatik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde α -SMA ifadesi

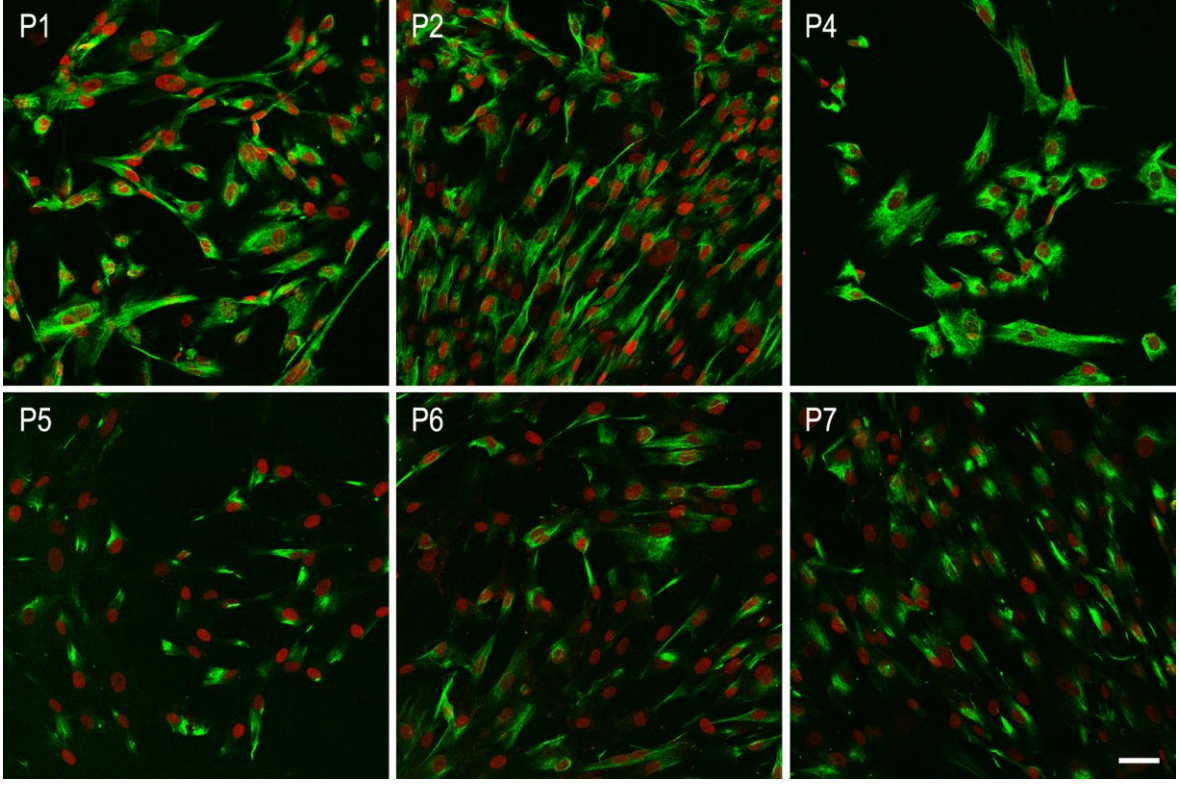
İlk 3 pasajda hücre içerisinde çizgisel halde ifade edildiği gözlenirken ilerleyen pasajlarda hücrelerin bir kısmında noktasal bir kısmında ise çizgisel halde ifade şekli gözlenmiştir. 1. Pasajda ifade seviyesi düşük iken ilerleyen pasajlarda artmış ve 7. pasajda ifade azalmıştır. Ölçek boyu 50 μ m



Şekil 5.4.14 Mekanik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde α -SMA ifadesi

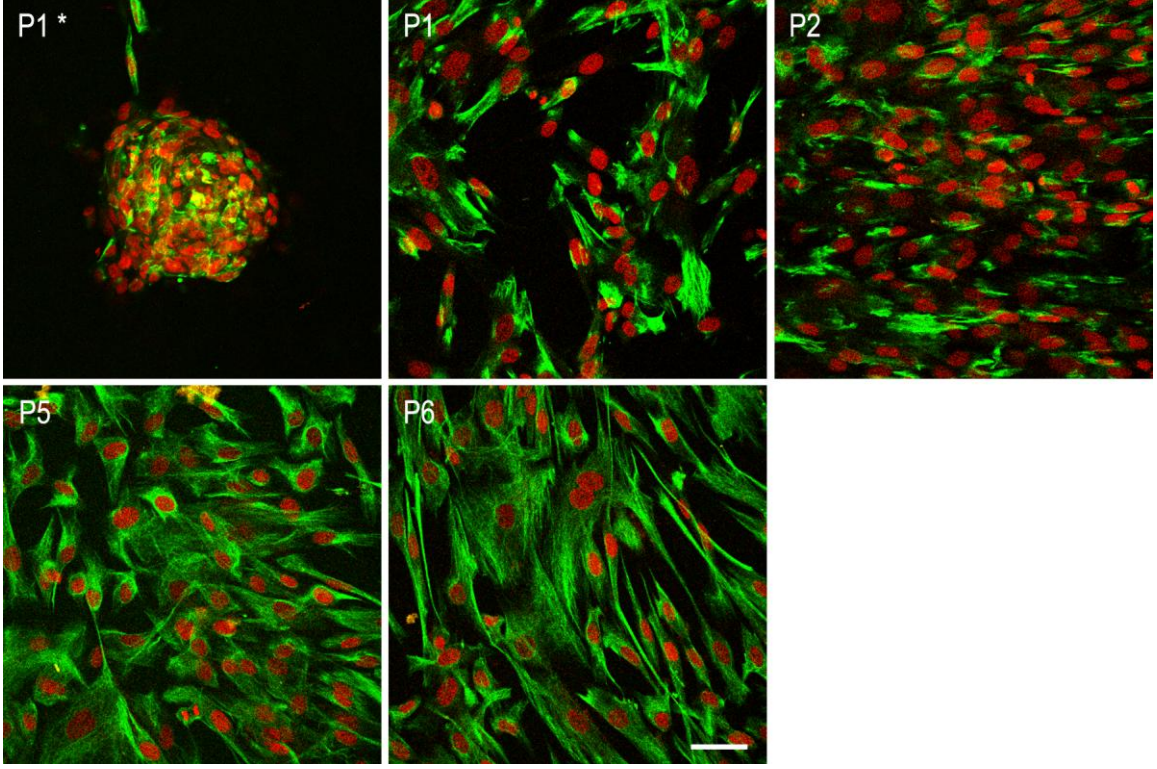
α -SMA, pasaj 1'deki eksplant doku parçacıklarında homojen bir şekilde ifade edilmektedir. İlerleyen pasajlarda da homojen ifade tipinin devam etmektedir. 5. ve 6. pasajda bazı hücreler diğer hücrelerden farklı olarak daha güçlü bir şekilde α -SMA ifade etmektedir. Ölçek boyu 50 μ m

Bunun yanında bir diğer hücre iskelet proteini olan vimentin, enzimatik olarak izole edilmiş olan hücre kültürlerinin ilk 4 pasajında bütün hücrelerde sitoplazma içinde homojen bir görünümde ifade edilirken ilerleyen pasajlarda ifade seviyesi düşmüş ve hücrelerin tek bir bölgesinde yoğunlaşmış hâlde ifade edildiği gözlenmiştir (Şekil 5.4.15) (Çizelge 5.4.1). Mekanik izolasyon sonrasında ise 1. pasajdaki eksplant doku parçacığında homojen bir şekilde vimentin ifadesi gözlenmiştir. Yine 1. pasajda farklı bir alan incelendiğinde dokudan ayrılan hücrelerin çoğunluğunun vimentin ifade ettikleri, bazılarının ise ifade etmedikleri gözlenmiştir. 2. pasajda vimentin ifadesi çekirdek etrafına dağılmış bir şekilde hücre sitoplazmasının küçük bir kısmında ifade edildiği görülmüştür. 5. ve 6. pasajda ise alanda bulunan bütün hücrelerin tipik bir şekilde vimentin ifade ettikleri belirlenmiştir (Şekil 5.4.16) (Çizelge 5.4.1).



Şekil 5.4.15 Enzimatik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde vimentin ifadesi

İlk 4 pasajda bütün hücrelerde sitoplazma içinde homojen bir görünümde ifade edilirken ilerleyen pasajlarda ifade seviyesi düşmüş ve hücrelerin tek bir bölgesinde yoğunlaşmış halde ifade edildiği gözlenmiştir. Ölçek boyu 50 μ m



Şekil 5.4.16 Mekanik olarak izole edilmiş iGK-MKH'lerinde vimentin ifadesi

Eksplant doku parçacığı (P1^{*}) homojen bir şekilde vimentin ifadesi etmektedir. 1. pasajda farklı bir alanda dokudan ayrılan hücrelerin büyük bir çoğunluğu vimentin ifade etmektedir. Bunun yanında bazı hücreler vimentin ifade etmemektedir. 2. pasajda vimentin ifadesi çekirdek etrafına dağılmış bir şekilde hücre sitoplazmasının küçük bir kısmında ifade edilmektedir. 5. ve 6. pasajda ise alanda bulunan bütün hücreler tipik bir şekilde vimentin ifade etmektedirler. Ölçek boyu 50 µm

Pasaj Antikor	1. Pasaj	2. Pasaj	4. Pasaj	5. Pasaj	6. Pasaj	7. Pasaj
E-kaderin	-	-	-	-	-	-
N-kaderin (Kısa kültür)	++	+	+++	++++	++++	++++
N-kaderin (Uzun kültür)	+++	+++	++++	+++	++++	++++
α -SMA (Enzimatik)	+++	++++	+++	++++	++++	+++
α -SMA (Mekanik)	++++	++++	Gözlem yapılmamıştır	++++	++++	Gözlem yapılmamıştır
Vimentin (Enzimatik)	++++	++++	++++	+++	+++	+++
Vimentin (Mekanik)	++++	++++	Gözlem yapılmamıştır	+++++	+++++	Gözlem yapılmamıştır
Pansitokeratin (Enzimatik)	+++	++++	++++	++	++	+++
Pansitokeratin (Mekanik)	++	+++	Gözlem yapılmamıştır	++++	++++	Gözlem yapılmamıştır
Sitokeratin 18 (Enzimatik)	+++	+++	++	++++	++++	++++
Sitokeratin 18 (Mekanik)	++	++	Gözlem yapılmamıştır	+++	++++	Gözlem yapılmamıştır
Sitokeratin 19 (Enzimatik)	++	++	++	++	++	++++
Sitokeratin 19 (Mekanik)	++	++	Gözlem yapılmamıştır	+	+	Gözlem yapılmamıştır

Çizelge 5.4.1 iGK MKH'lerinde moleküllerin ifade şiddetinin değerlendirilmesi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde birçok dokudan hücre izolasyonu yapılmaktadır. Vücut içinde karmaşık doku ortamlarında bulunan bu hücreler vücut dışına çıkarıldıklarında bugüne kadar bilinen kültür yöntemlerinden birisi kullanılarak vücut dışındaki yapay ortamda çoğaltılmaktadır. Hücre kültürü olarak adlandırılan bu yaklaşım birçok hücrenin davranışında ve fenotipinde farklı düzeylerde değişimlere neden olmaktadır. Bu alanda yürütülen çalışmaların en önde gelen amaçlarından birisi kültür ortamında canlılığını sürdüren hücrelerin *in vivo* koşullardaki fizyolojik süreçlerini taklit etmektir. Ancak yürütülen sayısız çalışmaya rağmen, sınırlı sayıda hücre özelliğinin *in vitro* ortamdaki hücrelerde korunabildiği görülmektedir. Kök hücreler söz konusu olduğunda bu durum daha da fazla önem kazanmaktadır. Çünkü kök hücreler sınırlı sayıya sahip hücreler olarak organizmanın çok özgün mikroçevrelerinde, yani kendilerine özgü niş ortamlarında varlıklarını sürdürmektedir. Günümüzde kök hücre çalışmaları ve tedavilerinde yaygın kullanıldığı üzere hücreler belli anatomik bölgelerden çıkarılmakta, kültür ortamlarında çoğaltılmakta ve gerekirse farklılaştırılmaktadır. Bu bağlamda hücrelerin özgün karakterlerinin belirlenmesi ve kültür koşullarında bu özelliklerinin korunması hedeflenen çalışmalarda büyük önem arz etmektedir. Bu durumda bu hücrelerin hem araştırmacılar hem de klinisyenler tarafından yaygın olarak kolay bir şekilde kullanılabilmesi amacıyla atılması gereken adımların başında bu hücrelerin kültür koşullarında sergiledikleri özelliklerin iyi anlaşılması gerekmektedir.

Literatüre yaptığı önemli katkılarıyla araştırma grubumuz İGKS-MKH'lerinin izolasyon yöntemi, tanımlanması ve farklılaşma özelliklerinin yanı sıra, bu hücrelerin elde edildiği kaynağın işleneceği merkeze ulaşıncaya kadar korunmasının sağlanması için gerekli koşullar ile izole edilen hücrelerin dondurulması ardından etkin bir şekilde kök hücre özelliklerini sergilemesine ilişkin pek çok veriye sahip bulunmaktadır (1, 2, 122, 127-130). Bunun yanında kordon stromasından elde edilen bu hücrelerin kültür koşulları altında sergilemiş oldukları heterojen görünümün morfolojik ve moleküler düzeyde tanımlanması ve yorumlanması ilk defa grubumuz tarafından gerçekleştirilmiştir (2).

Bu tez çalışmasında ise bu durum literatüre çok yeni kazandırılmış olan Epitel-Mezenkim Geçişi olarak tanımlanan hücresel dönüşüm süreci çerçevesinde değerlendirilerek hücrelerin moleküler ve fenotipik olarak tanımlanması amaçlanmıştır. iGKS-MKH'lerinin sergilemiş olduğu bu durumu EMG çerçevesinde değerlendiren bir çalışma henüz yayınlanmamıştır.

6.1. iGKS-MKH'lerinin İzolasyon, Büyüme ve Çoğalma Sürecinin Fenotipik Olarak Değerlendirilmesi

Yetişkin kök hücreler ile ilgili yapılan çalışmalarda hücrelerin izolasyon teknikleri ve sonrasındaki büyüme ve çoğalma süreci önemli mesele olarak karşımıza çıkmaktadır. Kullanılan izolasyon tekniği hücre fizyolojisini etkilemektedir. Bunun yanı sıra kültür ortamında kullanılan büyüme faktörleri ve serum oranı da hücrelerin *in vitro* koşullar altında farklılaşmadan büyüme ve çoğalmaları etkinliğini belirlemektedir.

İGKS dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücre miktarının kordon kanı ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile kıyaslandığında daha fazla olduğu ve İGKS hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin 7. pasaj sonunda 300 kata ulaşarak bu hücrelerin çoğalma kapasitelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (2). Bu araştırma kapsamında iGKS-MKH'leri iki farklı teknik ile izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında elde edilen hücrelerin aynı koşulları altında kültürleri yapılmıştır.

Mekanik olarak izolasyon yönteminde kültür kabına tutunan dokulardan 15. günün sonunda adeta bir halı gibi kültür kabının yüzeyini kaplarcasına hücrelerin ayrılmaya başladıkları görülmüştür. Dokudan ayrılan hücrelerin Karahuseyinoglu ve ark.'nın Tip 2 olarak tanımladıkları (2007) fusiform yapıda oldukları gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.2.1 P0). 20. günün sonunda hücrelerin flaskın tamamını kapladığı gözlenmiş, ileri pasajları yapılmış ve kültür 7. pasaja kadar sürdürülmüştür. İlerleyen pasajlarda hücrelerin iki katına çıkma süreleri 72 saat olarak belirlenmiş ve 3 günde bir pasajları yapılmıştır. Hücre morfolojileri incelendiğinde ise ilerleyen pasajlarda da hücrelerin Tip 2 hücreye benzeyen uzun, ince fibroblastoid yapılarını korudukları gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.2.1 P1-P7).

Enzimatik izolasyon yönteminde ise hücrelerin kültürün 4. gününde flask yüzeyine tutundukları izlenmiştir. Hücre morfolojilerine bakıldığında ise Karahuseyinoglu ve ark.'nın Tip 1 olarak tanımladıkları (2007) geniş sitoplazmalı, son derece yassı ve stres liflerince zengin bir fenotip sergileyen hücrelerin çoğunlukta olduğu, bunun yanında fibroblastoid olup uzun sitoplazma uzantılara sahip Tip 2 hücre fenotipinin de var olduğu gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.2.2 P0). 10. günün sonunda hücrelerin flaskın tamamını kapladığı gözlenmiş, üst kültürü yapılmış ve kültür 7. pasajı kadar sürdürülmüştür. İlerleyen pasajlarda hücrelerin iki katına çıkma süreleri 3 gün olarak belirlenmiş ve 3. günde bir pasajları yapılmıştır. İlk üç pasajda Tip 1 hücre fenotipinin çoğunluğu temsil ettiği gözlenirken, 4. pasajdan sonra Tip 2 hücre fenotipine sahip hücrelerin kültür ortamında daha fazla olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 5.2.2 P1-P7).

Tüm bu sonuçlara göre hücrelerin dokudan izole edilirken kullanılan tekniğin ne kadar önemli olduğunu görmüş bulunmaktayız. Bu sonuçlara göre enzimatik izolasyon esnasında kullanılan kollajenaz tip 1 enzimi yalnızca hücreler arası makriksi parçalamakla kalmayıp matriks içerisine gömülü halde bulunan hücreleri de etkilemektedir. Bu etki kültür koşullarına fenotipik olarak yansımaktadır. Tip 1 hücre ve Tip 2 hücre fenotipinin kök hücre özellikleri göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda diğer hücrelere farklılaşma potansiyelleri arasında bir fark bulunmamaktadır. Buna rağmen mekanik izolasyon tekniğinin hücre özelliklerinin kısmen korunması ile ilişkili olarak kök hücre çalışmalarında daha etkili olabileceğini düşünüyoruz. Fakat enzimatik ve eksplant kültürlerin süreleri göz önüne alındığında enzimatik olarak izole edilen hücreler aynı anda yaşlanırlarken, eksplant kültürlerde hücreler arasında bir yaşlanma farkı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu farkın kök hücre özellikleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde izolasyon tekniğinin öneminin daha da öne çıkacağını düşünmekteyiz. Bununla birlikte eksplant kültür tekniği ile *in vitro* koşullar altında karşılaşılan heterojenitenin de azamiye inmesi kayda değer bir gelişme olacağına inanmaktayız.

6.2. iGKS ve iGKS-MKH'lerin Moleküler Olarak Değerlendirilmesi

Epitel-Mezenkim Geçişi çerçevesinde bakıldığında *in vivo* ve *in vitro* ortamdaki farklılıklar hücre yüzeyinde bulunan moleküller ile hücre içinde bulunan ara filamanların farklı şekillerde ifade olması ile değerlendirilmektedir (7, 131). Hücre yüzey moleküllerine bakıldığında kaderin ailesinin bu süreçte başrol oynadığını görmekteyiz. Kaderinler, tip 1 transmembran proteini olup hücreler arasında bağlantı yapıları oluşturarak hücre-hücre tutunmasından önemli bir role sahiptir. Klasik kaderin ailesi olarak tanımlanan E-kaderin, N-kaderin, VE-kaderin ve P-kaderin Ca^{2+} bağımlı olup, Ca^{2+} varlığında işlev kazanmaktadır. E-kaderin, epitel hücrelerinde bulunurken; N-kaderin nöron ve mezenkimal hücrelerde ifade edilmektedir. Bunun yanında VE-kaderin endotel hücrelerinde işlev görürken; P-kaderin özellikle salgı kanalını oluşturan epitel hücrelerde bulunmaktadır (132-134). EMG sürecinde bu kaderin ailesi grubundan E-kaderin ve N-kaderin önemli bir rol üstlenmişlerdir. Şöyle ki; epitel hücreler tarafından E-kaderin ifade edilirken sürecin başlaması ile E-kaderin ifadesi azalmakta ve mezenkimal özelliklerin oluşumuna paralel olarak N-kaderin ifadesi artmaktadır (3, 7, 67, 76, 81, 131, 133).

Bu bilgiler doğrultusunda E-kaderin ve N-kaderin ifadelerinin kültür koşullarında karşılaştığımız heterojen hücre fenotipi ile bağdaşp bağdaşmadığını test etmek istedik. Literatüre bakıldığında göbek kordonu stromasında bulunan hücrelerin miyofibroblast karaktere sahip olduğu söylenmektedir. Yine yapılan çalışmalarda *in situ* ve *in vitro* koşullar altında bu hücrelerin tipik miyofibroblast biyobelirteçlerini ifade ettiği belirtilmiştir. Bizim de deneyimlerimiz bu yönde olmuştur. Fakat yapılan literatür taraması sonucunda iGKS-MKH'lerinde kaderin ailesine henüz bakılmadığı tespit edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda kültür koşullarındaki Tip1 hücre – Tip 2 hücre heterojenitesinin bir miyofibroblast-fibroblast geçişi olabileceğini düşünmemize sevk etmiştir. Bu hipoteze göre hücreler N-kaderin ifade etmelidir, fakat E-kaderin ifade etmemelidir.

Bu bağlamda insan göbek kordonunda hem *in situ* hem de *in vitro* olarak E-kaderin ve N-kaderin ifadesi değerlendirilmiştir. *In situ* çalışmalarda göbek kordonu kesitlerinin amniyon zarı ve subamniyotik stroma, intervasküler stroma ve perivasküler stroma olmak üzere üç bölge ayrı ayrı olarak analiz edilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda hiçbir

bölgede E-kaderin ifadesine rastlanmamıştır. Bunun yanında intervasküler ve perivasküler stromadaki hücrelerin N-kaderin ifade ettikleri gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.3.1). Bunun yanında *in vitro* sonuçlar izolasyon tipi ve kültür süresi olmak üzere iki farklı parametre altında değerlendirilmiştir. Buna göre enzimatik ve mekanik olarak izole edilen kültürler ayrı ayrı değerlendirildiğinde hücrelerin E-kaderin ifade etmedikleri görülmüştür (Bkz.Şekil 5.4.1 ve Şekil 5.4.3). Fakat N-kaderin ifade ettikleri tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 5.4.2 , Şekil 5.4.4 ve Şekil 5.4.6). N-kaderin ifadesinde enzimatik ile eksplant kültürler arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. İlk yaptığımız kaderin analizlerinde E-kaderin ifadesi gözlenmez iken, N-kaderin ifadesinin sitoplazma içerisinde noktasal bir şekilde ifade olduğunu tespit edilmiştir. Oysaki N-kaderin, yapı ve görevi gereği hücre yüzeyinde ifade olmalıdır. Bu durum karşısında kaderin dinamiği ile hücrelerin kültür süreleri kıyaslandığında üç günlük bir sürenin N-kaderin hücre yüzeyinde ifade olabilmesi için yeterli olmadığı kanaatine varılmış ve kültür süresini 10 güne uzatılmıştır. Kültür süresi uzatıldığında hücrelerin tipik bir şekilde yüzeylerinde çizgisel formda N-kaderin ifade ettiklerini tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 5.4.6). Yine uzun süreli kültürlerde de E-kaderin ifadesine rastlanmamıştır (Bkz. Şekil 5.4.5). Yapılan *in situ* ve *in vitro* analizler sonucunda iGKS-MKH'lerinin E-kaderin ifade etmediği, Tip 1 hücre ve Tip 2 hücre ayırdımı olmaksızın bütün hücrelerin N-kaderin ifade ettiği literatürde ilk kez gösterilmiştir. Bunun yanında hipotezimizde belirttiğimiz dönüşüm dâhilinde her iki hücre tipinin de N-kaderin ifade etmelidir savı doğruluk kazanmıştır.

Hücre içi ara filamanlara bakıldığında ise sitokeratin ve α -SMA ile hücrenin yapısal proteini olan vimentin değerlendirilmiştir.

Sitokeratinler 55-69 kDa molekül ağırlığındaki hücre içi ara filaman proteinlerdir ve ekto-/endodermal kökenli epitel hücrelerinde gözlenirler. Temelde asidik tipler ve bazik tipler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Bazik sitokeratinler, sitokeratin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 tiplerini içerirken, asidik sitokeratinler, sitokeratin 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ve 20 tiplerini temsil etmektedir. Bu sitokeratin tiplerinin ifade profili genellikle doku veya organa özel olarak gerçekleşir (135-137). Örneğin sitokeratin 7 üriner sistemdeki duktal epitel hücrelerinde ifade olurken SK 20 genellikle gastrointestinal sistem organlarında görülmektedir. SK 18 tek tabakalı Epitel tabakalarında ifade olurken SK 19 epitelyal meme kanseri kaynaklı metastaz tiplerinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.

Sitokeratin ifadesi EMG sürecinde de önemli bir belirteç olarak rol almaktadır. Buna göre sitokeratin ifade eden epitel hücresi EMG süreci ile sitokeratin ifadesini azaltmaktadır. Bunun yanında sitokeratin 8, 17, 19 gibi bazı sitokeratin izoformları miyofibroblastik hücrelerde de ifade edilmektedir (138). İGKS-MKH'lerinde de benzer şekilde sitokeratinin ifadesiyle hücrelerin yapısının karakterizasyonu sağlanabilmektedir (139). Pansitokeratinin (Tip 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 ve 19) göbek kordonu dokusunun damar duvarının etrafındaki hücrelerde, yani perivasküler alanda ifadelendiği ve kültür ortamında Tip 1 olarak adlandırılan hücrelerde varlığı ortaya konmuştur (2, 91). Tüm bu bilgiler doğrultusunda oluşturduğumuz hipotezde, miyofibroblast-fibroblast geçiş sürecinde, miyofibroblastik karaktere sahip olan Tip 1 hücrelerde sitokeratin ifadesinin ilerleyen pasajlarda azalması ve fibroblastik karaktere sahip Tip 2 hücrelerde sitokeratin ifadesinin olmaması veya düşük seviyede olması beklenmektedir. Bu bağlamda insan göbek kordonunda *in situ* ve *in vitro* olarak pansitokeratin (Tip 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 ve 19), sitokeratin 18 ve sitokeratin 19 ifadeleri değerlendirilmiştir.

Göbek kordonu kesitlerinin amniyon zarı ve subamniyotik stroma, intervasküler stroma ve perivasküler stroma olmak üzere üç bölge ayrı ayrı olarak analiz edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda amniyon zarında bulunan epitel hücreleri ve subamniyotik bölgedeki hücrelerin pansitokeratin ve sitokeratin 19'u güçlü bir şekilde ifade ederken sitokeratin 18'i zayıf ifade ettikleri gözlenmiştir. İntervasküler stromada ise pansitokeratin ifadesi gözlenirken sitokeratin 18 ve sitokeratin 19'un birkaç hücre tarafından ifade edildiği gözlenmiştir. Perivasküler stromada pansitokeratinin güçlü bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir. Bunun yanında sitokeratin 18 birkaç hücre tarafından zayıf bir şekilde ifade edilirken; sitokeratin 19'un hiç ifade olmadığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.3.2).

In vitro sonuçlara bakıldığında ise enzimatik olarak izole edilen hücrelerde pansitokeratin ifadesinin bütün pasajlarda Tip 1 hücrelerde fazla miktarda ifade olurken Tip 2 hücrelerde düşük seviyelerde ifade olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında ilk 3 pasajdan sonra ifadenin azaldığı fakat 7. Pasajda görülen büyük sitoplazmalı hücrelerde yüksek seviyede pansitokaretin ifade edildiği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 5.4.7). Mekanik olarak izole edilen hücrelerde PanSK ifadesine bakıldığında ise P1'de bulunan eksplant doku parçacıklarının heterojen bir görünümde olduğu tespit edilirken flaska yayılmış olan hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde

hücrelerin belli bir kısmının az da olsa pansitokeratin ifade ettiği görülmüştür. İlerleyen pasajlarda (P5, P6) PanSK ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Fakat genel ifade profiline bakıldığında belli hücrelerin PanSK ifade etmediği tespit edilmiştir. Bu hücreler morfolojik olarak değerlendirildiklerinde Tip 1 ve Tip 2 olarak net bir ayırım yapılamamıştır (Bkz. Şekil 5.4.8)

SK 18'in ifade profiline bakıldığında enzimatik kültürlerdeki PanSK ifadesinde olduğu gibi Tip 1 hücrelerde daha fazla miktarda ifade edildiği gözlenmiştir. İlk iki pasajda ifade edilen SK 18'in 4. pasajda azaldığı sonraki pasajlarda ise ifadenin arttığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4.9). Mekanik olarak izole edilen hücrelerde ise P1'de eksplant doku parçacıklarında heterojen ifade tespit edilirken flaska yayılmış olan hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa SK 18 ifade ettiği görülmüştür. İlerleyen pasajlarda (P5, P6) SK 18 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Fakat genel ifade profiline bakıldığında bazı hücrelerin az, bazı hücrelerin ise fazla miktarda SK 18 ifade ettikleri tespit edilmiştir. Bu hücreler morfolojik olarak değerlendirildiklerinde Tip 1 ve Tip 2 olarak net bir ayırım yapılamamıştır (Bkz. Şekil 5.4.10).

Sk 19'un enzimatik kültürlerİN ilk 6 pasajdaKİ bütün hücrelerde az da olsa ifade edildiği; 7. pasajda ise ifadenin arttığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4. 11). Mekanik olarak izole edilen hücrelerde ise P1'de kültür ortamında bulunun eksplant doku parçacıklarında heterojen bir görünümde ifade tespit edilirken etraftan flaska doğru yayılmış olan hücrelerde ifade edilmediği görülmüştür. Yine P1'de farklı bir alan incelendiğinde hücrelerin belli bir kısmının az da olsa SK 19 ifade ettiĞİ görülmüştür. İlerleyen pasajlarda (P5, P6) SK 19 ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında bazı hücrelerin ise hiç SK 19 ifade etmedikleri görülmüştür. Bu hücreler morfolojik olarak değerlendirildiklerinde Tip 1 ve Tip 2 olarak net bir ayırım yapılamamıştır (Bkz. Şekil 5.4. 12)

İn situ ve *in vitro* sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde hücrelerin doku içerisinde iken ifade ettikleri sitokeratin profili ile kültür koşulları altında sergiledikleri sitokeratin profili farklılık göstermektedir. PanSK ifadeleri kıyaslandığında bir biri ile tutarlı sonuçlar sergilerken, doku içerisinde SK 18 neredeyse hiç görülmez iken kültür koşulları altında

hücreler tarafından ifade edilmesi oldukça ilginçtir. Bununla yanında doku içerisinde özellikle amniyon zarında güçlü bir şekilde ifade edilen SK 19'un kültür ortamında hücreler tarafından ifade edilmemesi normal karşılanırken 7. pasajda ifadenin artması bir diğer şaşırtıcı sonuçtur. Bununla birlikte 6. pasajda görülen bir mitoz örneğinde SK 19 ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4. 11 P6). Elde edilen sonuçlara bakıldığında sitokeratin ifade profilinde farklılıklar olduğu aşikârdır, fakat sadece pansitokeratin ifadesine bakılarak hücreler arasında bir ayırım yapabilmek söz konusu değildir. Sonuçlara bakıldığında Tip 1 olarak tanımlanabilecek hücrelerde de yer yer sitokeratin ifadesinin olmadığını görmekteyiz. Bununla birlikte ilerleyen pasajlarda Tip 2 morfolojisine sahip hücrelerde de sitokeratin ifadesi mevcuttur. Buna göre hücreler buldukları ortama göre sitokeratin ifade profilini değiştirmektedir. Hipotez ile verileri kıyasladığımızda ise her iki hücre tipinde de sitokeratin ifadesinin görülmesi hipotezi desteklememektedir. Fakat pansitokeratin kokteylinin içerisindeki sitokeratin tiplerinin ayrı ayrı değerlendirilmesinin karşımıza daha net bir resim çizeceğini düşünmekteyiz.

Alfa-düz kas aktini miyofibroblastlara özgü bir proteindir. İGKS dokusunda ve kültüre edilen hücrelerinde erken pasajlarda kuvvetli pozitif bulunmuş pasajlar ilerledikçe ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (2, 104, 125). Bu veriler doğrultusunda miyofibroblastik hücrelerin ilerleyen pasajlarda yerini fibroblastik hücelere bıraktığını düşünerek miyofibroblas-fibroblast hipotezimizde ilk pasajlarda görülen α -SMA ifadesinin ilerleyen azalması gerektiğini öngördük. Bu bağlamda insan göbek kordonunda *in situ* ve *in vitro* olarak α -SMA ifadesini analiz ettik.

In situ sonuçlara bakıldığında α -SMA'nın amniyon zarında ifade olmadığı, subamniyotik, intervasküler ve perivasküler stromada bölgedeki hücre sayısına paralel olarak oldukça güçlü bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.3.3).

In vivo sonuçlara bakıldığında ise enzimatik kültürlerde ilk 3 pasajda bütün hücrelerde sitozlazma içerisinde çizgisel şekilde ifade edildiği gözlenirken ilerleyen pasajlarda hücrelerin bir kısmında noktasal bir kısmında ise çizgisel halde ifade şekli gözlenmiştir. 1. pasajda ifade seviyesi düşük iken ilerleyen pasajlarda artmış ve 7. pasajda ifade azalmıştır (Bkz. Şekil 5.4. 13). Mekanik izolasyon sonrası kültürlerle bakıldığında ise pasaj 1'deki

eksplant doku parçacıklarında homojen bir şekilde ifade edildiği, ilerleyen pasajlarda da homojen ifade tipinin devam ettiği görülmüştür. 5. ve 6. pasajda bazı hücrelerin diğer hücrelerden farklı olarak α -SMA'ni daha güçlü ifade ettikleri gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4.14). Diğer hücrelerde ise α -SMA ifadesi düşmektedir. Bu da hipotezi desteklemektedir.

In situ ve *in vitro* sonuçlar değerlendirildiğinde α -SMA'nın tipik bir miyofibroblast belirteci olduğunu göz önüne aldığımızda göbek kordonu stromasının miyofibroblastlarca zengin olduğunu söyleyebiliriz. Kültür koşullarına alındıklarında da bütün hücrelerin α -SMA ifade etmeleri bu hücrelerin hala miyofibroblast özelliklerini koruduklarını ve spontan farklılaşmadıklarını göstermektedir.

Hücre içi yapısal proteini olan vimentin 50 kDa'luk bir protein olup mezodermal kökenli hücrelerde bulunmaktadır (2). İGKS dokusunda vimentinin hem perivasküler hem de intervasküler alanda kuvvetle ifade edildiği ve dokudaki hücrelerin izolasyonu sonucunda kültür ortamına alınan hücrelerin, her iki fenotipteki hücrede de ifadelendiği Karahuseyinoglu ve ark. (2) tarafından gösterilmiştir. Vimentin ifadesinin kültür ortamında da sürdürülüyor olması hücre tarafından mezenkimal özelliklerinin korunduğunu gösteren önemli bir kanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda insan göbek kordonunda *in situ* ve *in vitro* olarak vimentin ifadesini analiz ederek sonuçlarımızı tekrar etmek istedik.

In situ sonuçlara bakıldığında amniyon zarında ve subamniyotik stromada vimentin ifadesi gözlenmemiştir. İntervaslüler ve perivasküler stromada ise vimentinin güçlü bir şekilde ifade edildiği gözlenmiştir (Bkz. Şekil 5.3.3).

In vitro sonuçlara bakıldığında ise vimentin ilk 4 pasajda bütün hücrelerde sitoplazma içinde homojen bir görünümde ifade edilirken ilerleyen pasajlarda ifade seviyesi düşmüş ve hücrelerin tek bir bölgesinde yoğunlaşmış halde ifade edildiği gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4.15). Mekanik izolasyon sonrasında ise 1.pasajdaki eksplant doku parçacığında homojen bir şekilde vimentin ifadesi gözlenmiştir. Yine 1. pasajda farklı bir alan incelendiğinde dokudan ayrılan hücrelerin büyük çoğunluğunun vimentin ifade ettiği, bazılarının ise ifade etmedikleri gözlenmiştir. 2. pasajda vimentin ifadesi çekirdek etrafına dağılmış bir şekilde

hücre sitoplazmasının küçük bir kısmında ifade edildiği görülmüştür. 5. ve 6. pasajda ise alanda bulunan bütün hücrelerin tipik bir şekilde vimentin ifade ettikleri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4.16)

Buna göre doğal niş ortamında vimentin ifade eden hücrelerin kültür koşullarında vimentin ifadelerinde miktar olarak bir dalgalanma söz konusudur. Enzimatik ve mekanik kültürler arasındaki ifade farklılığının ise tamamen izolasyon tekniğine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bunun yanında ilerleyen pasajlarda da hücrelerin vimentin ifadelerini sürdürüyor olmaları bu hücrelerin doğal niş ortamındaki miyo/fibroblastoid özelliklerini koruduklarını göstermektedir.

6.3. Sonuç

Yapılan değerlendirmeler sonucunda iGKS-MKH'lerinin *in vitro* koşullar altında heterojen bir fenotip sergilediği açık bir şekilde görülmüştür. Bunun yanında kullanılan hücre izolasyon tekniğinin heterojen hücre fenotipin kazanılması üzerine olan etkileri net bir şekilde belirlenmiştir. Buna göre daha önceden rapor edilmiş olan Tip1 ve Tip 2 hücre fenotipinin kazanılmasında kullanılan enzimatik hücre izolasyon tekniğinin neden olduğu düşünülmektedir. Zira mekanik izolasyon sonrasındaki eksplant kültür ortamında Tip 1 ve Tip 2 hücrelerin bulunduğu bir heterojen yapı ile karşılaşılması. Bunun yanında yapılan ileri analiz yöntemlerinde ilerleyen pasajlarda hücrelerin heterojen fenotiplerini hâlâ korudukları gözlenmiştir. Yapılan gözlemlerde miktar olarak bir oran saptanamamıştır. Yapılan analizlerde hücre sitoplazmalarının boyutları arasında belirgin bir heterojenitenin var olduğu görülmüştür; fakat Tip 1 ve Tip 2 olarak iki ayrı hücre fenotipini net bir şekilde ortaya koymak mümkün görünmemektedir.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda gerek dokuda gerekse kültür ortamındaki hücrelerde E-kaderin ifadesinin olmayışı, buna karşın hem doku içerisindeki hücrelerde hem de kültür ortamındaki hücrelerin yüksek miktarda N-kaderin ifade ettikleri gözlenmiştir. Bunun yanında bütün hücre tiplerinin farklı tip ve seviyelerde sitokeratin ifade etmeleri bu durumun tipik bir EMG süreci olmadığını göstermektedir. Bunun yanında hücrelerin bütün

pasajlarda α -SMA ve vimentin ifade etmeleri hücrelerin her ikisinin de mezenkimal karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Fakat miyofibroblast ve/veya fibroblast olarak tanımlanamamıştır. Bunun yanında hücrelerin güçlü bir şekilde α -SMA ifade etmeleri miyofibroblastik özelliklerini ortaya çıkarır iken yine aynı seviyede vimentin ifade etmeleri fibroblastik özelliklerini ön plana çıkarmaktadır. Bu bağlamda kültür ortamında görülen farklılığın bir miyofibroblast-fibroblast geçişi olmadığını öne sürebiliriz. Ancak bu durumun bu güne kadar tanımlanmamış, iGKS-MKH'lere özgü bir biyolojik sürecin söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1 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.
- 2 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.
- 3 Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Dec;**112**(12):1776-84.
- 4 Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*. 1995;**154**(1):8-20.
- 5 Lipschutz JH. Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1998 Mar;**31**(3):383-97.
- 6 Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*. 2006 Mar 27;**172**(7):973-81.
- 7 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun;**119**(6):1429-37.
- 8 Vicovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta anatomica*. 1996;**156**(3):202-16.
- 9 Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun;**119**(6):1438-49.
- 10 Hay ED. Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists*. 1990 Dec 2;**32**(3):367-75.
- 11 Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2005 Jul;**233**(3):706-20.
- 12 Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature genetics*. 1999 Aug;**22**(4):361-5.
- 13 Skromne I, Stern CD. Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo. *Development*. 2001 Aug;**128**(15):2915-27.
- 14 Chea HK, Wright CV, Swalla BJ. Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2005 Oct;**234**(2):269-78.
- 15 Skromne I, Stern CD. A hierarchy of gene expression accompanying induction of the primitive streak by Vg1 in the chick embryo. *Mechanisms of development*. 2002 Jun;**114**(1-2):115-8.
- 16 Collignon J, Varlet I, Robertson EJ. Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature*. 1996 May 9;**381**(6578):155-8.

- 17 Shah SB, Skromne I, Hume CR, et al. Misexpression of chick Vg1 in the marginal zone induces primitive streak formation. *Development*. 1997 Dec;**124**(24):5127-38.
- 18 Varlet I, Collignon J, Robertson EJ. nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development*. 1997 Mar;**124**(5):1033-44.
- 19 Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002 Mar;**3**(3):155-66.
- 20 Lindsley RC, Gill JG, Murphy TL, et al. Mesp1 coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell stem cell*. 2008 Jul 3;**3**(1):55-68.
- 21 Arnold SJ, Hofmann UK, Bikoff EK, Robertson EJ. Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. *Development*. 2008 Feb;**135**(3):501-11.
- 22 Duband JL, Thiery JP. Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Developmental biology*. 1982 Dec;**94**(2):337-50.
- 23 Knecht AK, Bronner-Fraser M. Induction of the neural crest: a multigene process. *Nature reviews Genetics*. 2002 Jun;**3**(6):453-61.
- 24 Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Jul;**9**(7):557-68.
- 25 Liem KF, Jr., Jessell TM, Briscoe J. Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development*. 2000 Nov;**127**(22):4855-66.
- 26 Karafiat V, Dvorakova M, Pajer P, Cermak V, Dvorak M. Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007 Nov;**64**(22):2975-84.
- 27 Villanueva S, Glavic A, Ruiz P, Mayor R. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Developmental biology*. 2002 Jan 15;**241**(2):289-301.
- 28 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology*. 2003 Dec;**15**(6):740-6.
- 29 Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Aug 29;**103**(35):13180-5.
- 30 Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British journal of cancer*. 2008 Nov 4;**99**(9):1375-9.
- 31 Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine*. 2007 Aug;**13**(8):952-61.
- 32 Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *American journal of physiology Renal physiology*. 2003 Dec;**285**(6):F1060-7.

- 33 Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature medicine*. 2003 Jul;**9**(7):964-8.
- 34 Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contributions to nephrology*. 1996;**118**:147-54.
- 35 Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney international*. 2002 May;**61**(5):1714-28.
- 36 Yang J, Shultz RW, Mars WM, et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Nov;**110**(10):1525-38.
- 37 Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Aug;**112**(4):503-16.
- 38 Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell biology international*. 2002;**26**(5):463-76.
- 39 Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells, tissues, organs*. 2005;**179**(1-2):11-23.
- 40 Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005 Aug 29;**24**(37):5764-74.
- 41 Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney international*. 2002 Jul;**62**(1):137-46.
- 42 Bataille F, Rohrmeier C, Bates R, et al. Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2008 Nov;**14**(11):1514-27.
- 43 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;**100**(1):57-70.
- 44 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2002 Jun;**2**(6):442-54.
- 45 Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*. 2008 Jun;**14**(6):818-29.
- 46 Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. *The lancet oncology*. 2008 Aug;**9**(8):808.
- 47 Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Aug 28;**98**(18):10356-61.
- 48 Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Mar 4;**280**(9):8094-100.
- 49 Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation; research in biological diversity*. 2002 Dec;**70**(9-10):537-46.

- 50 Jechlinger M, Grunert S, Beug H. Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2002 Oct;**7**(4):415-32.
- 51 Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer cell*. 2008 Jul 8;**14**(1):79-89.
- 52 Smit MA, Peeper DS. Deregulating EMT and senescence: double impact by a single twist. *Cancer cell*. 2008 Jul 8;**14**(1):5-7.
- 53 Weinberg RA. Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nature cell biology*. 2008 Sep;**10**(9):1021-3.
- 54 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;**113**(6):685-700.
- 55 Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of cell science*. 2008 Oct 15;**121**(Pt 20):3317-24.
- 56 Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Molecular biology of the cell*. 2008 Nov;**19**(11):4875-87.
- 57 Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *The Journal of cell biology*. 2008 Jul 28;**182**(2):315-25.
- 58 Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *Journal of cellular biochemistry*. 2007 Jul 1;**101**(4):816-29.
- 59 Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006 Jul;**6**(7):506-20.
- 60 Hata A, Shi Y, Massague J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Molecular medicine today*. 1998 Jun;**4**(6):257-62.
- 61 Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Current biology : CB*. 1998 Nov 19;**8**(23):1243-52.
- 62 Song J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell research*. 2007 Apr;**17**(4):289-90.
- 63 Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*. 2001 Oct;**29**(2):117-29.
- 64 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997 Dec 4;**390**(6659):465-71.
- 65 Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Advances in immunology*. 2000;**75**:115-57.
- 66 Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H, Foisner R. Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *The Journal of cell biology*. 2000 Jan 10;**148**(1):173-88.

- 67 Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of cell biology*. 2001 Sep 17;**154**(6):1185-96.
- 68 Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL. Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Dec 14;**276**(50):46707-13.
- 69 Edelman GM, Gallin WJ, Delouvee A, Cunningham BA, Thiery JP. Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983 Jul;**80**(14):4384-8.
- 70 Thiery JP, Huang R. Linking epithelial-mesenchymal transition to the well-known polarity protein Par6. *Developmental cell*. 2005 Apr;**8**(4):456-8.
- 71 Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, et al. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes & development*. 2000 Oct 15;**14**(20):2610-22.
- 72 Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *The Journal of cell biology*. 2001 May 28;**153**(5):1049-60.
- 73 Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et biophysica acta*. 1994 May 27;**1198**(1):11-26.
- 74 Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002 May 9;**21**(20):3241-6.
- 75 Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *The American journal of pathology*. 1998 Aug;**153**(2):333-9.
- 76 Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S. E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1996 Aug;**87**(8):843-8.
- 77 Saito A, Kanai Y, Maesawa C, Ochiai A, Torii A, Hirohashi S. Disruption of E-cadherin-mediated cell adhesion systems in gastric cancers in young patients. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1999 Sep;**90**(9):993-9.
- 78 Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Molecular biology of the cell*. 2008 Nov;**19**(11):4875-87.
- 79 Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA. The Spemann organizer gene, Gooseoid, promotes tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Dec 12;**103**(50):18969-74.
- 80 Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004 Jun 25;**117**(7):927-39.
- 81 Radisky DC, LaBarge MA. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell stem cell*. 2008 Jun 5;**2**(6):511-2.

- 82 Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*. 2008 May;**10**(5):593-601.
- 83 Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2008 Oct;**7**(20):3112-8.
- 84 Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of biological chemistry*. 2008 May 30;**283**(22):14910-4.
- 85 Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development*. 2008 Apr 1;**22**(7):894-907.
- 86 Paterson EL, Kolesnikoff N, Gregory PA, Bert AG, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The microRNA-200 family regulates epithelial to mesenchymal transition. *TheScientificWorldJournal*. 2008;**8**:901-4.
- 87 Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008 May 16;**133**(4):704-15.
- 88 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.
- 89 Bankowski E, Sobolewski K, Romanowicz L, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996 Jun;**66**(2):109-17.
- 90 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.
- 91 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.
- 92 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.
- 93 Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Jun;**96**(2):150-7.
- 94 Rao CV, Li X, Toth P, Lei ZM. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and their common receptor genes in human umbilical cords. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Mar;**80**(3):1012-20.
- 95 Copland IB, Adamson SL, Post M, Lye SJ, Caniggia I. TGF-beta 3 expression during umbilical cord development and its alteration in pre-eclampsia. *Placenta*. 2002 Apr;**23**(4):311-21.
- 96 Mizoguchi M, Suga Y, Sanmano B, Ikeda S, Ogawa H. Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. *J Dermatol Sci*. 2004 Sep;**35**(3):199-206.

- 97 Sanmano B, Mizoguchi M, Suga Y, Ikeda S, Ogawa H. Engraftment of umbilical cord epithelial cells in athymic mice: in an attempt to improve reconstructed skin equivalents used as epithelial composite. *J Dermatol Sci*. 2005 Jan;**37**(1):29-39.
- 98 Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem cells*. 2005 Nov-Dec;**23**(10):1549-59.
- 99 Peng HQ, Levitin-Smith M, Rochelson B, Kahn E. Umbilical cord stricture and overcoiling are common causes of fetal demise. *Pediatr Dev Pathol*. 2006 Jan-Feb;**9**(1):14-9.
- 100 Trevisanuto D, Doglioni N, Zanardo V, Chiarelli S. Overcoiling of the umbilical cord. *J Pediatr*. 2007 Jan;**150**(1):112.
- 101 Bruch JF, Sibony O, Benali K, Challier JC, Blot P, Nessmann C. Computerized microscope morphometry of umbilical vessels from pregnancies with intrauterine growth retardation and abnormal umbilical artery Doppler. *Hum Pathol*. 1997 Oct;**28**(10):1139-45.
- 102 Weissman A, Jakobi P, Bronshtein M, Goldstein I. Sonographic measurements of the umbilical cord and vessels during normal pregnancies. *J Ultrasound Med*. 1994 Jan;**13**(1):11-4.
- 103 Akerman F, Lei ZM, Rao CV. Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol*. 2002 Aug;**16**(4):299-306.
- 104 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.
- 105 Parry EW. Some electron microscope observations on the mesenchymal structures of full-term umbilical cord. *J Anat*. 1970 Nov;**107**(Pt 3):505-18.
- 106 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.
- 107 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.
- 108 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.
- 109 Kasper M, Stosiek P, Karsten U. Coexpression of cytokeratins and vimentin in hyaluronic acid-rich tissues. *Acta Histochem*. 1988;**84**(1):107-8.
- 110 Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, et al. Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999 Apr;**83**(2):131-5.
- 111 Meyer FA, Laver-Rudich Z, Tanenbaum R. Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Feb 22;**755**(3):376-87.
- 112 Schoenberg MD, Moore RD. Studies on connective tissue. III. Enzymatic studies on the formation and nature of the carbohydrate intermediate of the connective tissue polysaccharides in the human umbilical cord. *AMA Arch Pathol*. 1958 Feb;**65**(2):115-24.

- 113 Ryyanen J, Tan EM, Hoffren J, Woodley DT, Sollberg S. Type VII collagen gene expression in human umbilical tissue and cells. *Lab Invest.* 1993 Sep;**69**(3):300-4.
- 114 Sobolewski K, Bankowski E, Chyczewski L, Jaworski S. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly. *Biol Neonate.* 1997;**71**(1):11-21.
- 115 Vizza E, Correr S, Goranova V, et al. The collagen skeleton of the human umbilical cord at term. A scanning electron microscopy study after 2N-NaOH maceration. *Reprod Fertil Dev.* 1996;**8**(5):885-94.
- 116 Engberg Damsgaard TM, Windelborg Nielsen B, Sorensen FB, Henriques U, Schiotz PO. Estimation of the total number of mast cells in the human umbilical cord. A methodological study. *Apmis.* 1992 Sep;**100**(9):845-50.
- 117 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.
- 118 Klein J, Meyer FA. Tissue structure and macromolecular diffusion in umbilical cord. Immobilization of endogenous hyaluronic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1983 Feb 22;**755**(3):400-11.
- 119 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.
- 120 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.
- 121 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.
- 122 Kocafe C, Balci D, Hayta BB, Can A. Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem cell reviews.* 2010 Dec;**6**(4):512-22.
- 123 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;**284**(5411):143-7.
- 124 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000 Aug 15;**61**(4):364-70.
- 125 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.
- 126 Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci.* 2004 Sep-Oct;**11**(5):652-60.
- 127 Balci D, Can A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Current stem cell research & therapy.* 2013 Jan;**8**(1):60-72.
- 128 Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;**698**:51-62.
- 129 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.

- 130 Uckan D, Kilic E, Sharafi P, et al. Adipocyte differentiation defect in mesenchymal stromal cells of patients with malignant infantile osteopetrosis. *Cytotherapy*. 2009;**11**(4):392-402.
- 131 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun;**119**(6):1420-8.
- 132 Leckband D, Prakasam A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annual review of biomedical engineering*. 2006;**8**:259-87.
- 133 Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000 Nov;**1**(2):91-100.
- 134 Pokutta S, Weis WI. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;**23**:237-61.
- 135 Walid MS, Osborne TJ, Robinson JS. Primary brain sarcoma or metastatic carcinoma? *Indian journal of cancer*. 2009 Apr-Jun;**46**(2):174-5.
- 136 Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of cell biology*. 2006 Jul 17;**174**(2):169-74.
- 137 Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1979 Jun;**81**(3):570-80.
- 138 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.
- 139 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; research in biological diversity*. 1993 Jun;**53**(2):75-93.
- 140 Can A, Kök Hücre, Biyolojisi, Tipleri ve Klinik Kullanımları. *Akademisyen Yayınevi*. 2014

EKLER

EK1:Etik Kurul Kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan göbek kordonu stroması kaynaklı kök hücrelerin in vitro koşullarda gerçekleştirildiği hücresel dönüşümün epitel-mezenkim geçişi çerçevesinde değerlendirilmesi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Alp Can			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	FAZ 2	<input type="checkbox"/>
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	FAZ 4	<input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARAS <input type="checkbox"/>	



DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:18-578-12	Tarih: 12 Kasım 2012				
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Yurtdışın da
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Ahmet DEMİRKAZIK	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Derste
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Serap SIVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Yrd.Doç.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[İmza]</i>

* :Toplantıda Bulunma

Hasan ÖZKAYA
A.Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Birim Sorumlusu
14 Kasım 2012
ASLI GIBI

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hakan COŞKUN

Doğum Yeri: Kurşunlu/Çankırı

Doğum Tarihi: 04.07.1988

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Kurşunlu Anadolu Lisesi

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yayımlar

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. **Coskun, H.**, Izzetoglu, S., Sahar, U., Deveci, R., Karacali, S., Determination of Sialic Acid Types in Stem Cells and Differentiated Cells of *Paracentrotus lividus* By Fluorescence Microscopy and CapLC-ESI-MS/MS System, 1st Annual Congress on Stem Cell Research with International Participation, 2011, Sapanca, Turkey (Poster Sunumu)
2. **Coskun, H.**, Induced Pluripotent Stem Cells, 4th International Molecular Biology and Genetic Research and Application Platform, 2010, Izmir, Turkey (Poster Sunumu)
3. **Coskun, H.**, Importance of the N- glycosylation on Differentiated Embryonic Stem Cells, Original Resource and Project Market Competition, 2009, Izmir, Turkey (Poster Sunumu)
4. **Coskun, H.**, Role of Mitochondria in Apoptosis, 3rd International Molecular Biology and Genetic Research and Application Platform, 2009, Izmir, Turkey (Poster Sunumu)

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. **Coskun, H.**, Izzetoglu, S., Sahar, U., Deveci, R., Karacali, S., Sialik Asitler Yeni Bir Kök Hücre Belirteci Olabilir mi?, 2. Uluslararası Katılımlı Glikobiyoloji Kongresi, 2013, Çeşme, İzmir (Sözlü Sunum)
2. **Coskun, H.**, Hücrelerin Moleküler Organizasyonu: Epitel-Mezenkim Geçışı, 11. Gamet Biyolojisi Makale Kulübü Toplantısı, 2012, Gölbaşı, Ankara (Sözlü Sunum)