

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN GÖBEK KORDONU STROMA DOKUSUNUN KÖK HÜCRESİ
TRANSPLANTASYONLARI AMACIYLA KULLANILMAK ÜZERE
KONTROLLÜ DONDURULMASI KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

DENİZ BALCI

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Alp CAN

ANKARA

2009

İnsan Göbek Kordonu Stroma Dokusunun Kök Hücresi Transplantasyonları Amacıyla Kullanılmak Üzere Kontrollü Dondurulması Koşullarının Belirlenmesi

Son yıllarda mezankimal kök hücre kaynağı olarak gösterilen göbek kordonu stroması içinde yer alan hücreler, mezankimal seri hücreleri olan adiposit, kondrosit, osteosit ve myosite olan farklılaşmalarıyla onarımsal tıp uygulamalarında dikkati çekecek kadar ümit verici biçimde ortaya konmuştur. Bazı araştırmalarda işlevsel sinir hücrelerine dek varan farklılaşma gerçekleştirilmiştir. Bunun da ötesinde bu hücrelerin ksenotransplantasyonlarında bile alıcıda immün yanıt oluşmaması ve doku reddi ile karşılaşılmasıdır.

Bu çalışmada, daha önce kök hücre özelliklerini ayrıntılarıyla gösterdiğimiz bu hücrelerin kaynağı olan dokunun kontrollü bir biçimde dondurulması, ardından çözülerek kök hücrelerin izole edilmesi ve dondurma öncesinde ve sonrasında hücrelerin yapısal ve işlevsel açıdan incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bilgisayar kontrollü yavaş dondurma sistemi kullanılarak uygun dondurma ortamı ve soğutma oranı optimize edilmeye çalışılmıştır. Dakikada 1°C ve 0,3°C olacak şekilde ısı düşürülerek iki farklı soğutma oranı karşılaştırılmıştır. Dondurulan dokulardan ve taze dokudan daha sonra hücre izolasyonu yapılarak hücre morfolojisi, proliferasyon düzeyleri ve sağkalımı değerlendirilmiştir.

Dondurma sonrası hücre sağkalımı % 80'in üzerinde bulunmuştur. Dakikada 0,3°C soğutma oranı 1°C'ye göre hücre sağkalımını arttırdığı saptanmıştır. Dondurma öncesi ve sonrası hücre morfolojisinde ve mezankimal hücre belirteci olan CD90 (Thy1), vimentin, BMP-4 (bone morphogenetic protein-4), embriyonik kök hücre belirteci olan ve bu hücrelerde ifade olduğu bilinen Nanog oranlarında, kontraktıl proteinler olan aktin, desmin ve α -düz kas aktini, bir diğer ara filaman olan sitokeratin seviyesinde ve yerleşiminde herhangi bir farklılık saptanmamıştır.

Bu çalışma sonucunda önemli bir mezankimal kök hücre kaynağı olarak gösterilen göbek kordonu dokusunun dakikada 0,3°C ısının düşürülmesiyle bilgisayar kontrollü yavaş dondurulması yönteminin güvenilir, etkin bir yöntem olduğu, bu dokunun doğumdan hemen sonra bu yöntem kullanılarak yıllarca saklanabileceği ve gerektiğinde çözülerek kök hücrelerin izole edilebileceği ortaya konmuştur (Bu çalışma Sanayi Bakanlığı STZ 00139.2007/2 nolu projeye desteklenmiştir).

Anahtar Sözcükler

İnsan göbek kordonu stroması, mezankimal kök hücreler, kriyoprezervasyon, doku bankası

The assessment of the controlled cryopreservation conditions of human umbilical cord stroma with a potential usage for stem cell transplantations

In recent years, Umbilical cord stromal cells as a new source of stem cells, are successfully differentiated into mesenchymal cells; adipocytes, chondrocytes, osteocytes and myocytes, thus they are considered as remarkable and promising stem cell source in cellular therapies. In addition to the mesenchymal lineages they were also differentiated into functional neuron-like cells. Furthermore, no immune response or graft rejection has been reported in the recipient organism. Even in the xenotransplantation studies.

In the present study, controlled cryopreservation of the umbilical cord tissue pieces as a source of stromal stem cells has been tested. The success rate has been determined by constitutional, functional examination and assessment of these cells before and after the cryopreservation.

The computer controlled slow freezing system was used for optimizing the proper freezing environment and proper freezing proportion. The freezing rate was decreased to 1°C or 0,3°C per minute during which two different conditions were compared regarding the tested parameters. The survival rate was found over 80 % after controlled freezing. The 0,3°C per minute freezing ratio was found higher the survival rate compared to the 1°C per minute freezing ratio. No significant difference was noted before and after the cryopreservation in terms of cell morphology and the levels of mesenchymal cell indicator CD90 (Thy1), vimentin, BMP-4 (bone morphogenetic protein), the embryonic stem cell indicator; Nanog, and the in situ expression of the contractile proteins; actin, desmin, α - smooth muscle actin and cytokeratin.

In conclusion, the computer controlled slow freezing technique applied for the freezing of the umbilical cord tissue strips turned out to be an valuable tool in preserving the mesenchymal stem cell source, by decreasing the freezing rate to 0,3°C per minute. Using this reliable and effective cryopreservation method might save the umbilical cord tissues for years right after the birth. When necessary they can be successfully thawed and stem cells could be isolated. (This study was supported by The Ministry of Industry STZ 00139.2007/2 project)

Keywords

Human umbilical cord stroma, mesenchymal stem cells, cryopreservation, tissue bank

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü olanağı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi, önerileriyle bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Alp CAN'a; yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Çetin KOCAEFE, Uzm. Dr. Sinan ÖZKAVUKCU, Uzm. Dr. Özgür ÇINAR ve Uzm. Dr. Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU'na; tez çalışmam sırasında katkılarından dolayı tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi ve yardımcılarına, Dr. Fadıl Kara ve Uzm. Bio. Ayşe Yüzbaşıoğlu'na; ayrıca benim bugünlere gelmem de her türlü destek ve teşvikini esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Aliye BALCI ve babam Tuncay BALCI'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma T.C. Sanayi Bakanlığı Santez Projeleri kapsamında 2007-2009 yılları arasında 00139.STZ.2007/2 proje numarasıyla desteklenmiştir. Bu vesileyle Sanayi Bakanlığı Projeleri Birimine, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve projeyi destekleyen Sacem Hayat Teknolojileri Ltd. Şti. firmasına teşekkür ederim.

Deniz BALCI

Ankara, Mayıs 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Termal profil	3
2.2. Donmanın Doku ve Hücreler Üzerine Olan Etkileri	5
2.3. Kriyopreservasyon İşleminde Kullanılan Kimyasal Maddeler (Kriyokoruyucular) ve Etki Mekanizmaları	7
2.4. Kriyokoruyucu Maddeleri Taşıyan Çözelti	10
2.5. Soğutma Oranı	10
2.5.1. Geleneksel yavaş dondurma	12
2.5.2. Hızlı dondurma	13
2.5.3. Vitrifikasyon	13
2.6. Bilgisayar Kontrollü Yavaş Dondurma Sistemi	15
2.7. Dokunun Çözülmesi ve Kriyokoruyucuların Uzaklaştırılması	17
2.8. Eş Zamanlı PCR	18
2.8.1. <i>Housekeeping</i> genlerin kantitatif RT-PCR çalışmalarındaki önemi	21
2.9. İnsan Göbek Kordonu Stroması Hücrelerinin Yapısal ve İşlevsel Özellikleri	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	26
3.1. İnsandan Göbek Kordonunun Elde Edilmesi, Laboratuvara Transferi ve Ön İşlem Aşamaları	26
3.2. Dondurma Öncesi Göbek Kordonu Stroma Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültüre Edilmeleri	26
3.3. Göbek Kordonunun Uygun Şartlarda Dondurulması	27
3.4. Dondurma Sonrası Göbek Kordonu Dokusunun Çözülmesi ve Stroma Hücrelerinin İzolasyonu	30
3.5. Dondurma Öncesi ve Sonrası Kök Hücrelerin Yapısının ve Potansiyelinin Ölçümü	30
3.5.1. Hücre proliferasyon ölçümleri	30
3.5.2. Dondurma öncesi ve sonrası hücrelerin immün histokimyasal işaretlenmesi	30
3.5.3. RNA izolasyonu	33
3.5.4. RNA'ların kalite kontrolü	33
3.5.5. cDNA sentezi	34
3.5.6. Eş zamanlı PCR	35
3.5.7. Verilerin analizi	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Hücre Morfolojisi	38
4.2. Hücre Sağkalım Oranları	40
4.3. Hücrelerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	43
4.4. Hücrelerde Yapısal Gen İfadelerinin İncelenmesi	49
4.4.1. β -aktin gen ifadesi bulguları	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1.	Örneğin termal profili	4
Şekil 2.3.1.	Kriyokoruyucu madde ve hücre hacmi ilişkisi	8
Şekil 2.3.2.	Kriyokoruyucu maddenin hücre üzerindeki etkisi	9
Şekil 2.5.1.	Dört farklı hücre için soğutma hızının hücre sağkalımı üzerine olan etkisi	11
Şekil 2.5.2.	Kriyokoruyucu maddenin donma hızı üzerine etkisi	12
Şekil 2.6.1.	Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan test eğrisi	16
Şekil 2.6.2.	Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan program eğrisi	17
Şekil 2.8.1.	SYBR Green tekniği	19
Şekil 2.8.2.	Erime eğrisi analizi	20
Şekil 2.8.3.	PCR amplifikasyon eğrisi (A) ve standart eğri (B).	21
Şekil 2.9.1.	İnsan göbek kordonu dokusunun kompartmanları	23
Şekil 3.3.1.	Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan test eğrisi	28
Şekil 3.3.2.	Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan program eğrisi	29
Şekil 4.1.1.	Dondurma öncesi (A ve B) ve sonrası (C ve D) göbek kordonu stromas kök hücreleri.	39
Şekil 4.2.1.	Dondurulmamış İGKS, 0,3°C/dk ve 1°C/dk hızla dondurulan İGKS dokusundan kök hücresi izolasyonu sonucu elde edilen hücrelerin sağkalım değerleri.	41
Şekil 4.2.2.	Hücrelerin izolasyondan hemen sonraki 11 günlük kültüründe (P ₀) çoğalma eğrisi.	41
Şekil 4.2.3.	Hücrelerin pasajları süresinde kültür ortamındaki çoğalma eğrisi.	42
Şekil 4.2.4.	Hücrelerin pasajları süresinde kültür ortamındaki kendini eşleme eğrisi.	42
Şekil 4.3.1.	İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki CD105 değerlendirilmesi.	44
Şekil 4.3.2.	İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki vimentin filamanlarının değerlendirilmesi.	45
Şekil 4.3.3.	İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki sitokeratinin değerlendirilmesi.	46
Şekil 4.3.4.	İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki α -düz kas aktini değerlendirilmesi.	47
Şekil 4.3.5.	Dondurma sonrası dokudan izole edilen hücrelerin mitotik aşamaları	48
Şekil 4.4.1.	İGKS hücrelerinde ifade olduğu bilinen yapısal genler	49
Şekil 4.4.2.	β -aktin geni RT-PCR analizi sonuçları	51
		52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.9.1.	İGKS hücrelerinde varlığı bilinen hücre yüzey belirteçleri	25
Çizelge 3.5.4.1.	Agaroz-formaldehid jel elektroforezi (RNA elektroforezi)	34
Çizelge 3.5.5.1.	cDNA sentezi	34
Çizelge 3.5.5.2.	Revers transkripsiyon karışımı	34
Çizelge 3.5.6.1.	Eş zamanlı PCR	35
Çizelge 3.5.6.2.	Eş zamanlı PCR koşulları	36
Çizelge 3.5.6.3.	Agaroz jel elektroforezi	36
Çizelge 3.5.6.4.	Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri ve uzunlukları	36

SİMGELER DİZİNİ

AFP	Antifriz protein
ASMA	Alfa düz kas aktini
BMP-4	Kemik morfojenetik proteini-4
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik döngü değeri
DECP	Diethylpyrocarbonate
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Dezoksiribonükleik asit
dNTP	Dezoksiribonükleotittrifosfat
FBS	Föetal dana serumu
FITC	Flüoresan izotiyosiyanat
L15	Leibovitz's 15
M	Molarite
MOPS	3-(N-morpholino) propanesülfonik asit
mRNA	Mesajcı RNA
P	Pasaj
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA	Paraformaldehid
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirrolidon
Rad	Rad
RNA	Ribonükleik asit
Tm	Erime sıcaklığı
A	Alfa
µg	Mikrogram
ml	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Celcius
7AAD	7-Aminoactinomycine D

Kısaltmalar

EKH	Embriyonik kök hücre
İGKS	İnsan göbek kordonu stroması
KKM	Kriyokoruyucu madde
MKH	Mezankimal kök hücre

1. GİRİŞ

Son yıllarda kök hücresi ile yapılacak hücre tedavileri daha önce doku yamalarıyla başarılmaya çalışılan onarımların yerini almaya adaydır. Oldukça karmaşık olan doku homeostazını sağlamada kişinin kendinden alınan doku bir dereceye kadar işlevini yerine getirirse de özellikle bireyler arasındaki doku nakilleri bir dizi problemlere neden olmaktadır. O nedenle, kök hücreler *in vivo* farklılaşma özelliklerini ve dolayısıyla doku homeostazını daha dengeli kurma konusundaki yetenekleri nedeniyle doku nakillerinin yerine kullanılma noktasına gelmiştir. Yanı sıra bazı kök hücrelerin alıcıda immün yanıt ve dolayısıyla redde neden olmaması kök hücrelerin allograft doku nakillerinin yerine kullanılması olasılığını artırmaktadır.

Erişkin kök hücrelerin bir grubu da, göbek kordonu içinde yer alan stroma hücreleridir. İlk kez 2003 yılında Mitchell ve ark. (Mitchell ve Weiss et al. 2003) tarafından kök hücresi potansiyelleri ortaya konmuştur. Daha sonra Karahüseyinoğlu ve ark. tarafından (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007) mezankimal seri hücreleri olan adiposit, kondrosit, osteosit ve myosite olan farklılaşmalar dikkati çekecek kadar ümit vaat edici biçimde ortaya konmuştur. Bazı araştırmalarda işlevsel sinir hücrelerine dek varan farklılaşma gerçekleştirilmiştir (Fu ve Cheng et al. 2006, Weiss ve Medicetty et al. 2006). Bunun da ötesinde bu hücrelerin ksenotransplantasyonlarında bile (insandan fareye veya domuzdan sıçana) alıcıda immün yanıt oluşmamış ve doku reddi ile karşılaşılmamıştır (Weiss ve Mitchell et al. 2003, Medicetty ve Bledsoe et al. 2004).

Doku bankası uygulamaları son 30 yıldır gündemdedir. Özellikle doku onarımının gerektiği durumlarda (yanık, büyük yaralanmalar, rezeksiyonlar vb) yerine benzer dokunun yerleştirilmesi ve çevre dokularla uyumunun sağlanması onarımsal tıbbın önemli konuları olmuştur. Bu nedenle potansiyeli ortaya konan insan göbek kordonu stroma (İGKS) kök hücrelerini içeren bu dokunun saklanması doku bankacılığı açısından büyük öneme sahiptir.

İzole edilmiş İGKS hücrelerinin dondurma koşulları, çözüldükten sonraki hücre sağkalım oranları birkaç grup tarafından değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda dondurma ortamı olarak kültür ortamına ilaveten 7%-10% dimethyl sulfoxide (Weiss ve Medicetty et al. 2006, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007), veya gliserol (Weiss ve Medicetty et al. 2006)

kullanılarak hücreler kademeli olarak dondurulmuş ve -135°C ile -195°C arasında saklanmıştır (Sarugaser ve Lickorish et al. 2005, Weiss ve Medicetty et al. 2006, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Hücrelerin 37°C de hızla çözümleriyle sağkalım ve çoğalma oranları %50'nin üzerinde bulunmuştur (Sarugaser ve Lickorish et al. 2005).

Bu çalışmada, daha önce kök hücre özellikleri gösterilen bu hücrelerin kaynağı olan **dokunun** kontrollü bir biçimde dondurulması veya vitrifikasyonu, ardından çözülerek kök hücrelerin izole edilmesi ve dondurma öncesinde ve sonrasında hücrelerin yapısal ve işlevsel açıdan incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Kontrollü dondurma, doku ve hücrelerin süper kritik ısı basamaklarının hızı ve sıcaklığı kontrol altında tutulduğu bir yöntem olup bilgisayar donanımlı ve sıvı azot buharıyla doku/hücrelerin tüpler içinde azotla temas etmeden -150°C ile -180°C'ye kadar kontrollü soğutulması, daha sonra -196°C'deki azot buharıyla donmuş olarak yıllarca saklanması prensibine dayanır (Brockbank KGM 2001). Böylece şeritler halinde dilimlenmiş doku parçacıkları yaklaşık 50 yıl süresince saklanabilmektedir (Sumida 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

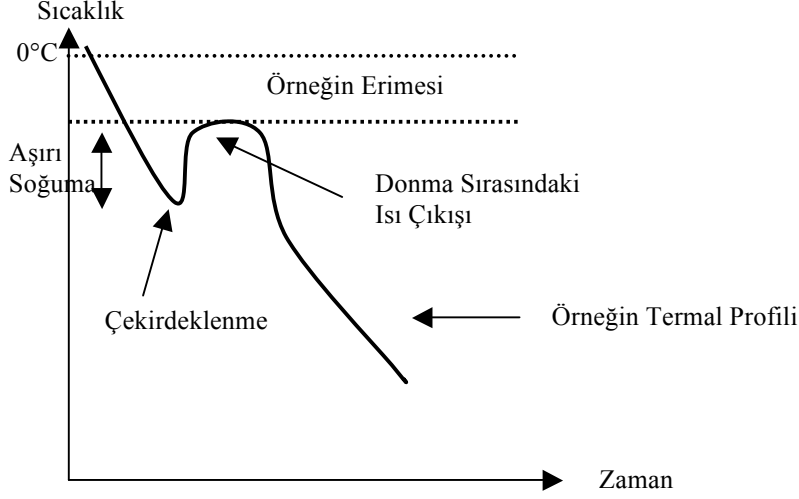
Soğukta saklama düşük sıcaklıklar kullanılarak canlı hücre veya dokuların yapısal olarak bozulmamış bir şekilde korunmasını sağlar. Dondurma işlemiyle durağan bir ortam oluşturularak yaşam korunur. Isı düştükçe organizmanın metabolik aktivitesi yavaşlar ve donma sonucunda durur. Günümüzde tek hücreler ve küçük doku parçaları soğukta korunabilmektedir. Tek bir hücrenin kriyobiyolojik olarak dondurulması en basit yöntem olarak değerlendirilmektedir. Zira bu durumda söz konusu hücrenin biyokimyasal özellikleri göz önüne alınarak donmaya karşı vereceği tepkiler önceden tahmin edilebilir. Ancak doku parçaları çok sayıda ve türde hücre barındırdığından donma koşullarının optimizasyonu daha güçtür. İleride insanlığı bekleyen olası dönüm noktası tüm vücudun soğukta korunması şeklinde olacaktır, ancak şuan teknoloji bu amaca ulaşmaktan çok uzaktır.

Sıcaklığın düşmesiyle hücreler birçok faktörün etkisi altında kalır. Birincil etki, sıcaklığın donma noktasına ulaşmasıyla hücrelerin termal şok ile karşı karşıya kalmasıdır. Bunu, hücre içinde ve dışında buz kristallerinin oluşumuyla buz kristallerinin hücreye verdiği mekanik hasar izler. Üçüncü etki olarak suyun donmasıyla hücre dışındaki sıvı faz bileşimindeki tuz derişiminin artışı ve hücresel dehidratasyondur. Bu etkilerin göreceli etkisi hücre ve doku tipine, soğuma ve ısınma oranına bağlı olarak değişir.

Donma sonucu ortaya çıkan hasarı azaltmak için uygun kriyokoruyucu maddeler ve taşıma çözeltilisinin bileşimi, uygun dondurma sistemleri, uygun depolama sıcaklığı ve çözme ısısı göz önüne alınmalıdır.

2.1. Termal Profil

Donma ve çözülme esnasındaki ısı düşüşünün hızı, doku ve hücrelerin sağ kalımında önemli rol oynar. Isının düşüş hızının nicel olarak ölçülmesi bu nedenle önemlidir, bu değeri gösteren eğri **termal profil** olarak adlandırılır. Örneğin termal profilinde ilk olarak aşırı soğuma (*supercooling*), donma ve gizli ısı çıkışı gözlenir (Şekil 2.1.1.). Oda ısısından çözeltilinin donma noktasının 1 veya 2 derece altına kadar olan ısı düşüşünün oranı hücrenin sağkalımı üzerinde çok etkilidir. Bu nedenle soğuma derecesi +4°C ile -40°C arasında kontrol edilmelidir.



Şekil 2.1.1. Örneğin termal profili

Aşırı soğuma; bir sıvının sıvı fazdan katı faza geçmeden, normal donma noktasının altındaki bir sıcaklığa soğumasıdır. Bu durumda yarı kararlı haldeki sıvı molekülleri enerjilerini kaybeder ancak katı faza geçemez. Bu faz birçok değişkene bağlıdır.

- Soğuma hızı
- Örneğin büyüklüğü
- Çözeltideki yabancı parçacıklar

Çevremizde bulunan maddeler katı, sıvı ya da gaz halinde bulunurlar, bunlara yeterli ısı verildiğinde ya da alındığında, bir halden diğer bir hale geçiş yaptıkları gözlemlenir. Maddelerin sıvı halden katı hale geçmelerine **donma** denir. Bir madde sıvı halden katı hale geçerken çevresine ısı verir ve enerjisini kaybeder. Bu nedenle donma ekzotermik (dışarıya ısı veren) bir tepkimedir. Maddenin faz değişimi sırasında aldığı ya da saldıdığı ısıya **gizli ısı** denir. Donmanın başlamasıyla ortamda enerji değişimi olur ve termal profilde ısı çıkışı olarak bilinen **gizli ısı çıkışı** (*latent heat of fusion*) gözlenir ve daha sonra madde donma noktasına geri döner (Şekil 2.1.1.). Gizli ısı çıkışı hücrenin sağkalımını üzerine etkilidir. Burada oluşan ısının baskılanması sağkalım oranlarını artırır.

Su ve sulu çözeltilerde **çekirdeklenme** sıvı fazın katı faza (buz kristaline) dönüşümü olarak tanımlanır. Suyun erime noktası 0°C olmasına karşın, suyun sıcaklığı buz oluşumu gerçekleşmeden belirgin şekilde 0°C'nin altına düşürülebilir. Dikkatli şekilde kontrol edilen koşullar altında su, buz çekirdeklenmesi oluşmadan yaklaşık -40°C 'ye kadar soğutulabilir (Morris 2007).

Buz oluşumu esnasında, donan hücrenin korunması gerekir. Örneğin çekirdeklenme derecesinden -40°C ye kadar soğuması dikkatle kontrol edilmelidir. Örneğin ısısının -90°C 'ye kadar kontrol edilmesi, azot tankına taşınması esnasında olabilecek ısınma riskini azaltır (Brockbank KGM 2001).

Çekirdeklenmenin dışarıdan bir etken yardımıyla uyarılmasına ise **filizlenme** (*seeding*) denir. Bu sırada eğer sıvıya küçük bir soğuk cisim ile filizlenme yapılırsa kristalleşme oluşacak ve sıcaklık donma noktasına geri dönecektir. Filizlenme ortamdaki toz tanecikleri, mekanik titreşim ya da sert yüzeylerle de indüklenebilir. Bu uyarıcı etkenler; çekirdeklenme gerçekleşene kadar soğuk metal bir objeyle dokunmak, mekanik vibrasyon ve hızlı sıcaklık düşüşüdür (Özkavukcu ve Erdemli et al. 2008).

Yapılan çalışmalar birçok memeli hücresinde en uygun soğuma oranının dakikada $0,3^{\circ}\text{C}$ ile 10°C arasında olduğunu göstermiştir. Bu aralık her hücre tipi için değişiklik gösterir (Brockbank KGM 2001).

2.2. Donmanın Doku ve Hücreler Üzerine Olan Etkileri

Isının hızlı düşüşü hücreler üzerinde olumsuz etkilidir. Hücrelerin canlı kalmayı başarmaları, sanılanın tersine aşırı düşük sıcaklıklara dayanma becerilerinden çok donma ve ısınmada iki kez geçmek zorunda oldukları ölümcül olarak kabul edilen ara bölge sıcaklığındaki ($+15^{\circ}\text{C}$ ile -60°C) sağ kalımlarına bağlıdır. Hücrenin donma noktasının altında ve üstünde karşılaştığı bu olumsuz durum **termal şok** olarak adlandırılır. Hücreler hızlı soğumaya zorlandıkları zaman, buz kristalizasyonu olmasa bile termal şokun oluşturduğu hasarların etkisi altında kalır. Hücreler için kritik olan termal şok aralığı $+15^{\circ}\text{C}$ ve 0°C arasındadır ve etkisi -80°C ye kadar gözlenebilir. Termal şok hasarı hücre zarında başlar ve bunun sonucunda zarsı yapılarda büzüşme, hücrede mekanik kırılma ve parçalanma meydana gelir. Termal şokun verdiği hasarın üstesinden gelmek için **kriyokoruyucular**, belirli **fosfolipitler** (fosfotidilserin) ve **yavaş soğutma sistemleri** kullanılmalıdır.

Bir diğer etki de hücrenin fiziksel çevresindeki değişimdir. Hücre sağ kalımında, donmanın meydana gelmediği hücre dışı sıvı önemlidir. Hücreler genelde donmamış bölümlerde depolanma eğilimindedir. Hücrelerin tek bir bölgede toplanma eğilimleri fiziksel hasara

neden olur ve hücrelerde biçim bozukluğu gözlenir. Yoğun olarak paketlenmiş hücreler mekaniksel stresten dolayı zarar görürler. Ayrıca, hücre dışı sıvıdaki katyon oranından çok, anyon miktarı hasarda önemli rol oynar.

Soğuma sürdükçe buz kristali oluşumu gerçekleşir. Buz kristalleri ilk önce hücre dışı ortamda oluşmaya başlar. Suyun donması sonucu hücre dışı çözeltinin tuz derişimi artar, bu artış belirli bir düzeyin üzerine çıktığında ise **özetik nokta** olarak adlandırılır. Bu şekildeki bir elektrolit derişimi artışını hücrenel dehidratasyon izler ve hücre içinden dışına su çıkışı gözlenir. Hücreden hücreye değışen ve her hücrenin tolere edebileceğı bir dehidratasyon eşik değıeri vardır (Mazur 1988). Bu değıer aşıldığında hücrede geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelebilir. Hücreler dehidratasyona ne kadar dirençliyse düşük sıcaklıklara da o kadar dirençli olur. Hücrenin su kaybetmesiyle hücre içi iyon derişiminde artış gözlenir. Hücre içindeki bileşiklerin, tuzların derişimindeki artış, toksik etkilere neden olur. Bu artış proteinlerin çökmesine ve zardaki lipoprotein yapısının bozulmasına yol açar. Dolayısıyla hücre içi ve hücre dışı iyon dengesinin sağlanması hücre sağ kalımı açısından çok önemlidir. Tampon tuzlarının kristalize olmasıyla hücre içi pH'da ciddi değıişimler gözlenir, bunun sonucunda da proteinlerde hasar meydana gelir. Bazı biyolojik sistemler göreceli olarak eriyik madde etkisine daha dirençlidir. Örneğın sekiz hücreli embriyonların, donma esnasında oluşan yüksek tuz derişiminden etkilenmediğı gösterilmiştir (Schneider ve Mazur 1987).

Düşük ısıda korumada sıklıkla kullanılan sıvı azotun -196°C 'lik sıcaklığı ısıya bağımlı olan hiç bir tepkimenin çalışmasına izin vermez. Bu sıcaklıklarda sıvı su halinde var olamaz. Var olabilen tek fiziksel hal camsı ve kristalli parçacıklardır. Bu iki durumda da akışkanlık, difüzyonun oluşamayacağı kadar yüksektir. -196°C 'deki donmuş sulu çözeltilerde oluşabilecek tek tepkime iyonize radyasyon ve kozmik ışınların doğrudan etkisiyle meydana gelen serbest radikallerin ortaya çıkışı ve makro moleküllerde kırık oluşumu gibi foto-fiziksel olaylardır. Bu kadar düşük sıcaklıklarda enzimatik tamir mekanizmaları da çalışamayacağından uzun süre içinde bu iyonlaşmalar zararlı ve geri dönüşümsüz DNA kırıklarına yol açabilir. Kültürdeki memeli hücrelerinin %63'ünün ölümüne yol açan iyonize radyasyon dozu 200–400 rad'dır. Dünyadan yayılan radyasyon dozunun yılda 0,1 rad olduğu göz önüne alındığında -196°C 'de korunan tipik memeli hücre popülasyonunun bu oranda bir hasara uğraması için 2000 ila 4000 yıl geçmesi

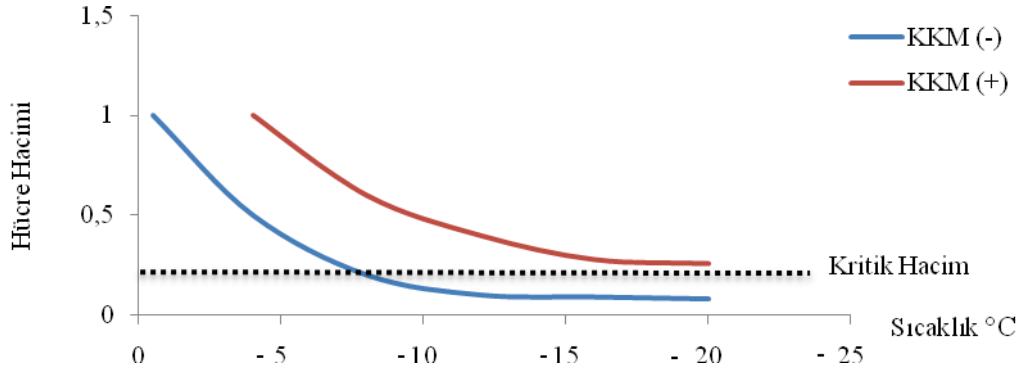
gerekmektedir. Bu oransal hesaplamaların ötesinde -196°C 'de hücre saklama yöntemlerinde kromozomal veya genetik değişikliklerin ortaya çıktığını gösteren bir kanıt yoktur.

2.3. Kriyopreservasyon İşleminde Kullanılan Kimyasal Maddeler (Kriyokoruyucular) ve Etki Mekanizmaları

Soğukta saklamada amaç; donma ve çözünme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin ve yüksek tuz derişiminin oluşumunu engelleyerek vereceği zararı önlemektir. Bunun için hücre içi sıvının hücre zarından geçen ve hücre için olabildiğince zararsız olan kriyokoruyucu madde ile yer değiştirmesi, hücreyi soğğun olumsuz etkilerinden korumada kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir.

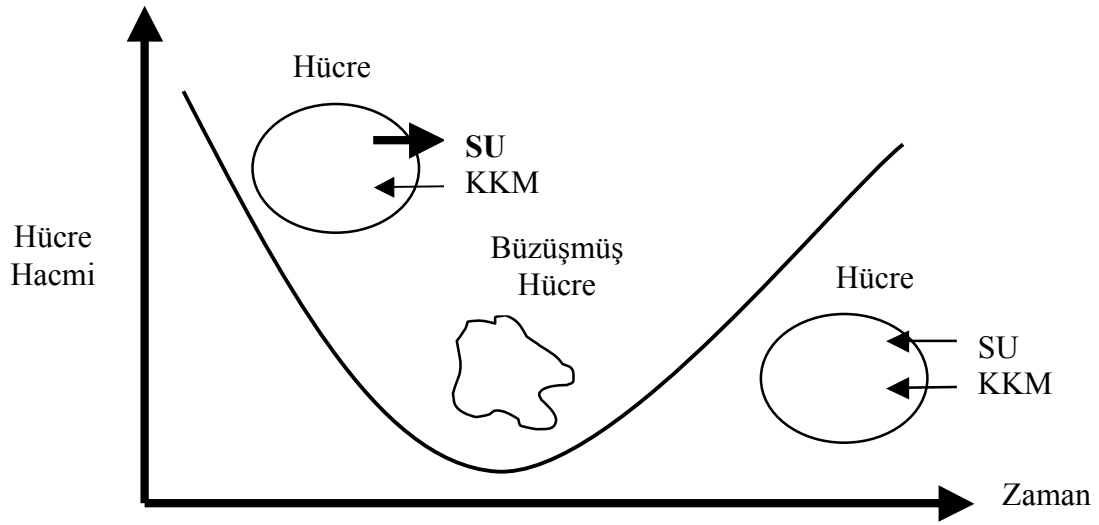
Kriyokoruyucular dondurma ve çözme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır(Palasz ve Mapletoft 1996). Kriyokoruyucular, içinde buldukları sıvının donma noktasını düşürürler. Hücre dışı ortamdaki sıvının donma noktasındaki düşüş, hücre içindeki suyun hücre dışına çıkışını önler böylece hücrenin büzüşmesini kritik hacmin üzerinde tutar (Şekil 2.3.1.). Kriyokoruyucular hücre içi yüksek derişimin seyrelmesini sağlar ve proteinlerin çökmesini önler; etkilerini sistemdeki toplam eriyik derişimini arttırarak ve böylece oluşacak buz miktarının azalmasını sağlayarak gösterirler. Fakat kriyokoruyucuların biyolojik olarak kabul edilebilir, hücre içine girebilir nitelikte ve toksik etkisinin az olması istenir. Hücre zarından geçip geçemediklerine göre iki ayrı grupta incelenir.

- 1- Hücre zarından geçebilen, yani hücre içerisine girebilen kriyokoruyucu maddeler.
 - Dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol, 1,2 propanediol, 2,3 bütanediol.
- 2- Hücre zarından geçemeyen, yani hücre içerisine giremeyen kriyokoruyucu maddeler.
 - Düşük molekül ağırlıklı (glikoz, sükroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz)
 - Yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP)



Şekil 2.3.1. Kriyokoruyucu madde ve hücre hacmi ilişkisi. Kriyokoruyucu madde (KKM)'nin varlığı hücre hacmini kritik noktanın üzerinde tutar.

Hücre içine girebilen kriyokoruyucular düşük molekül ağırlığına sahiptir ve dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol, 1,2 propanediol, 2,3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkolleri kapsamaktadır (Agca 1994, Palasz ve Mapletoft 1996). Donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı, hücre içerisindeki sıvı kriyokoruyucu maddelerle yer değiştirir ve böylece hem hücre hacmindeki değişiklikler hem de hücre içindeki buz kristallerinin oluşumu azaltılarak donma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmesi minimum düzeye indirilir (Şekil 2.3.2.). Hücre içerisine girebilen kriyokoruyucular, suya bağlanabilme özellikleriyle ve diğer bileşenlerin yüksek derişimlerinden kaynaklanan toksik etkilerini azaltarak koruyucu etki gösterirler. Hücre içinde ve dışında belirli bir miktar suyun kristalize olmadan sıvı fazda kalmasını sağlayarak elektrolitleri çözeltide tutarlar. Bu gruptaki kriyokoruyucuların çoğu yüksek oranda suda çözünebilme yeteneğine ve ısı etkisine sahiptir; su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilmektedirler. Bu sayede suyun hidrojen bağlarını kopararak, suyun yapısını değiştirirler. Örneğin; gliserol kendi hidroksil grubu ile su molekülündeki oksijen arasında hidrojen bağı oluşturur. DMSO'nun oksijeni ise, suyun protonları ile birleşmekte ve bunun sonucunda da ısı açığa çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, hücreler yüksek tuz derişimi ile çevrildiğinde kriyokoruyucular hücreleri yoğun su kaybından korumaktadır (Brockbank KGM 2001).



Şekil 2.3.2. Kriyokoruyucu maddenin hücre üzerindeki etkisi. Kriyokoruyucu madde (KKM) ortama verildiğinde hücredeki su kaybı KKM'nin hücre içine girmesinden daha hızlıdır. Böylece hücre hacim kaybeder. Daha sonra hücre içindeki KKM, suyun hücre içine girmesine neden olur ve hücre hacmi artar.

Hücre içine giremeyen kriyokoruyucular ise, kendi aralarında iki ayrı gruba ayrılır. Bunlar; hücre içine giremeyen düşük molekül ağırlıklı (glukoz, sükröz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) ve yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP ve diğer bazı polimerler) kriyokoruyuculardır (Agca 1994, Palasz ve Mapletoft 1996, Bagis ve Odaman et al. 2002). Hücre içine giremeyen düşük molekül ağırlıklı kriyokoruyucular donma işlemi süresince şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini hücreleri önce dehidrate ederek gösterirler. Hücre içine giremeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyokoruyucular ise, hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini gösterirler (Palasz ve Mapletoft 1996). Bunlardan başka, albümin (Pugh ve Aankaersmith et al. 1998), fikor (Begin ve Bhatia et al. 2003) ve antifriz protein (AFP) (Wang 2000) gibi bazı proteinler de hücre içerisine giremeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyokoruyucular içerisinde yer almaktadırlar. Günümüzde serumdan kaynaklanabilecek kontaminasyonlar nedeniyle, genellikle polivinil piroldon (PVP) ya da polivinil alkol (PVA) gibi bazı maddeler serum yerine kullanılmaktadır (Palasz ve Mapletoft 1996, Pugh ve Aankaersmith et al. 1998, Dinnyes ve Dai et al. 2000).

2.4. Kriyokoruyucu Maddeleri Taşıyan Çözelti

Başarılı bir soğukta saklama işlemi için dondurma öncesi faz büyük öneme sahiptir. Dondurma öncesi faz hücrelerin fizyolojik çevreden dondurma çözeltisine taşınması sürecini kapsar. Taşıma çözeltisi içindeki tamponlar, bileşikler ve kriyokoruyucu maddeler düşük sıcaklıklarda hücrenin alacağı hasarı engellemeyi amaçlar. Dondurma öncesi faz soğuma fazıyla başlar (*hipotermik faz*) ve iki amaca hizmet eder. Birincisi, metabolizmayı yavaşlatarak iskemik ve hipoksik değişimleri minimize etmek; ikincisi de, kriyokoruyucu maddenin kimyasal toksisitesini azaltmaktır (Taylor ve Hunt 1985).

Soğukta saklama sırasında hücre sağ kalımını birçok faktör etkiler ve genelde taşıma çözeltisinin rolü göz ardı edilir. Genelde taşıyıcı çözelti olarak geleneksel kültür ortamı kullanılır fakat bu ortam hücreleri fizyolojik sıcaklıklarda desteklemek üzere tasarlanmıştır. Oysaki sıcaklığın düşüşüyle hücrelerin metabolizmasındaki yavaşlama sonucu metabolik destekleyiciden çok fiziksel destek ön plana çıkar. Düşük sıcaklıklarda kimyasal reaksiyonların azalmasıyla oksijen ve diğer substratlara olan gereksinim azalır. Bu nedenle hipotermi sırasında hücrede oluşan su ve iyon değişimlerini destekleyen özel olarak düzenlenmiş çözeltiler kullanılmalıdır (Taylor ve Hunt 1985, Taylor ve Campbell et al. 2001). Bu çözeltiler donma anına kadar hücre metabolizmasını desteklemeli, hücre içi ve dışı iyon ve su dengesini sağlamalıdır. Düşük sıcaklıklarda hücre zarı pompaları inaktive olur ve metabolizma çalışmaz, su ve iyon dengesinin sağlanması hücre dışı ortamın kontrol altında tutulmasıyla sağlanır. Bu nedenle hipotermik sıcaklıklarda hücreyi koruyacak olan taşıma çözeltisi hücre içi tipte olmalıdır. Özellikle monovalan katyonlarla iyonik dengenin sağlanması ve hücre içine giremeyen eriyik madde kullanılmasıyla ozmolalite artırılır.

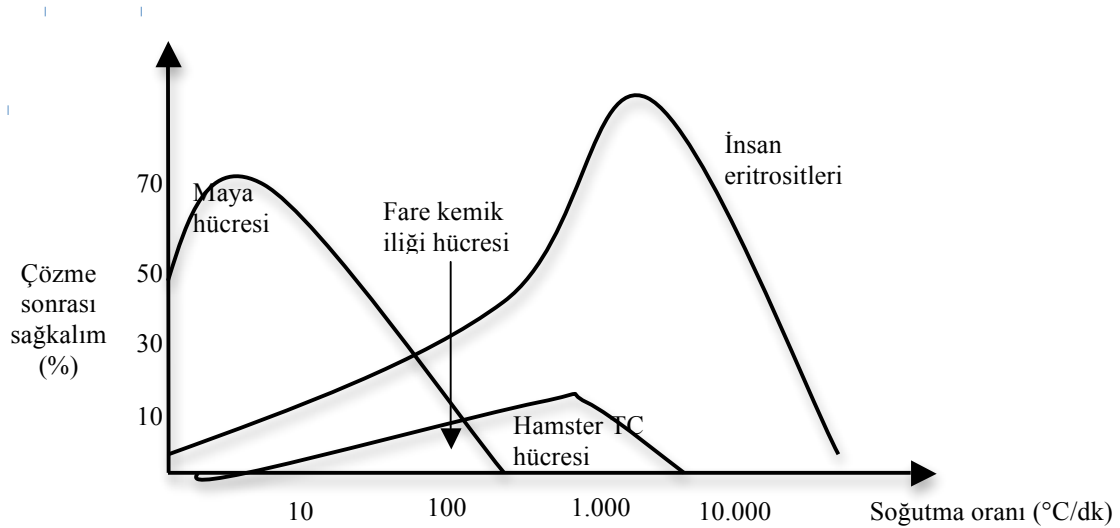
2.5. Soğutma Oranı

Hücrelerin soğuma oranının sağkalım üzerine etkili olduğu 1963 yılında Mazur tarafından gösterilmiştir (Mazur 1963). Bu oran hücreleri oda ısısından başlayıp donma noktasının 1-2°C altına kadar geçen sürede çok etkiler. Bu nedenle 4°C den -40°C ye kadar soğuma oranının kontrolü sağkalım üzerine doğrudan etkilidir. Suyun hücre zarı boyunca hareketi ve bununla bağlantılı olarak hücre içi buz oluşumu soğuma hızıyla ilişkilidir. Hücre içi buz oluşumu genelde ölümcüldür. Bu hasarın azaltılması soğuma oranına bağlıdır. Soğuma

oranı kontrol edilerek suyun hareketi de kontrol edilir ve bu nedenle buza dönüşecek olan su miktarı da buna bağlı olarak değişim gösterir. Hücre içinde buz oluşturmayacak en hızlı soğutma, **optimum soğutma hızı** olarak değerlendirilir. Çeşitli hücre tipleri için farklı optimum soğutma hızları tanımlanmıştır (Şekil 2.5.1.).

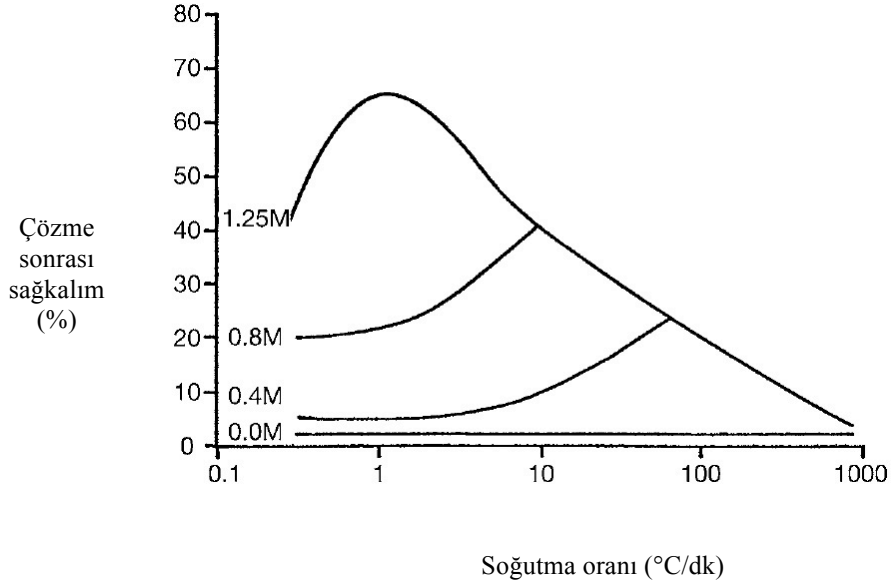
Donma sırasında hücrelerin hipertonik durumlara karşı gösterdiği tepki birçok etkene bağlıdır. Bunların en önemlileri şunlardır:

1. Hücrenin hacmi ve yüzey alanı
2. Hücrenin suya geçirgenlik katsayısı
3. Arrhenius aktivasyon enerjisi
4. Ortama eklenen soğukta koruyucu maddenin tipi ve derişimi
5. Soğutma hızı



Şekil 2.5.1. Dört farklı hücre için soğutma hızının hücre sağkalımı üzerine olan etkisi.

Bunun yanı sıra optimum sağkalım için kriyokoruyucu derişimi ile soğutma oranı arasında bir ilişki vardır, kriyokoruyucu derişimi arttıkça optimum soğutma oranı azalır. En yüksek hücre sağkalımı için bu ilişki hücreden hücreye incelenmelidir (Şekil 2.5.2.).



Şekil 2.5.2. Kriyokoruyucu maddenin donma hızı üzerine etkisi. Farklı derişimlerdeki gliserol içinde dondurulan fare hematopoetik kök hücrelerinin donma hızıyla olan etkileşimi

Dondurmada kullanılan yöntemleri geleneksel **yavaş dondurma**, **hızlı dondurma** ve **vitrikasyon** olmak üzere başlıca 3 grupta inceleyebiliriz.

2.5.1. Geleneksel yavaş dondurma

Dondurma işlemi yavaş gerçekleştiğinde (0,2 – 10°C/dk) ilk olarak hücre dışı ortamda buz oluşmaya başlar. Buzun oluşması hücre dışı ortamın hipertonic olmasına neden olur ve bunun sonucu olarak hücre içinden hücre dışına ozmoz ile su geçişi meydana gelir. Dondurma işlemi yavaş ise hücrenin su kaybı giderek artar. Hücre için ölümcül olan hücre içi buz kristali oluşumu, bu şekilde ozmoz ile su kaybı sonucu engellenmiş olur. Fakat hücrenin su kaybı ötetik noktanın ötesine geçerse, hücre içi tuz ve bileşiklerin derişimindeki artış hücre için ölümcül sonuçlar doğurur. Bu nedenle hücrenin sağkalım oranını arttırmak için hücre içinde buz kristali oluşmayacak kadar su kaybetmesini sağlayacak süre tanınmalı fakat yüksek derişimden etkilenmeyecek kadarda hızlı soğutulması amaçlanır. Bu yöntemde hücrenin dondurulmasında ardışık aşamalar şu şekilde özetlenebilir;

1. Dokunun ve hücre kümesinin gliserol, etilen glikol, DMSO ya da propilen glikol gibi hücre içine girebilen kriyokoruyuculardan birisinin giderek artan derişimdeki çözeltide,

ozmotik denge sağlanana kadar bekletilir.

2. Kontrollü dondurma aygıtı aracılığıyla -30°C ile -70°C 'ler arasındaki bir sıcaklığa ulaşıncaya kadar kademeli yavaş soğutma yapılır ($0,2-3,0^{\circ}\text{C}/\text{dk}$).
3. İstenilen sıcaklığa ulaşıldığında, sıvı azotun (-196°C) içerisine daldırılarak saklanır.
4. Kontrollü çözme yaklaşık $250^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ olacak hızda (37°C 'lik su banyosunda) yapılır.

2.5.2. Hızlı dondurma

Hızlı dondurma, çok hızlı donma ($1200-1250^{\circ}\text{C}/\text{dk}$) uygulanmasından önce hücrelerin kısmen suyunu kaybettiği dondurma işlemini tanımlamak için kullanılır. Bu yöntemle başarılı bir sonuç almak için gliserol, propandiol, DMSO ya da etilen glikol gibi hücre içine girebilen kriyokoruyuculardan birisi (2-4,5 molar) sükroz, trehaloz, laktoz ya da galaktoz gibi hücre içine giremeyen kriyokoruyuculardan biri (0,25-0,5 molar)'lık karışımlarından oluşan dondurma çözeltilerinin kullanılması gerekir (Cseh ve Corselli et al. 1997, Park ve Kim et al. 2000). Kısa bir dengeleme (*ekilibrasyon*) işleminden sonra hücre suyunun bir bölümünü kaybeder ve bu aşamada hücreler sıvı azot buharında çok kısa bir süre tutulup sıvı azot içerisine daldırılır. Aşağıda açıklanan vitrifikasyon yönteminden farklı olarak, hızlı dondurmada hücre dışı sıvı donar ve dondurma çözeltilisinin ozmolaritesinde artış meydana gelir. Bunun sonucu olarak hücrelerin suyunu tamamen kaybetmesi beklenir ancak hücrelere yeteri kadar su kaybetme süresi tanınmadığı için hücre içinde kalan suyun donma esnasında kristalizasyona uğramasıyla hücre hasar görebilir. Çözme işleminde uygun olmayan çözme hızları uygulanırsa, hücre içi küçük buz kristalleri birleşip büyük kristalleri şekillenebileceğinden hücre zarar görebilir (Palasz ve Mapletoft 1996).

2.5.3. Vitrifikasyon

Vitrifikasyon hücrelerin, dokuların ve organların düşük sıcaklıklarda hücre içerisinde tamamıyla camsı (vitröz) bir durumun yaratılmasıyla dondurulmasını ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde buz kristalleri hiç şekillenmemektedir. Vitrifikasyon işlemi başarıyla ilk kez fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir (Rall ve Fahy 1985). Vitrifikasyon yönteminin basitliği, düşük maliyeti ve uygulanan işlemin kısa zamanda gerçekleştirilebilmesi gibi avantajlarına karşın, gamet ve embriyonlar dışındaki kullanımı genellikle deneysel düzeyde kalmıştır. Başarılı bir vitrifikasyon için, viskozitede çok

yoğun bir artış gerekmektedir. Bunun için de ya yüksek soğutma oranları ya da düşük sıcaklık derecelerinde viskoziteyi artıran ve buz kristallerinin biçimlenişini baskılayan kriyokoruyucu çözeltilerin kullanımı gerekmektedir (Vajta 2000). Kriyokoruyucuların yaklaşık 5-7 molar gibi yüksek derişimlerde kullanılması ile vitrifikasyonun sağlanabileceği gösterilmiştir. Bu oran geleneksel yavaş dondurmadaki derişimlerin (genellikle 1-2 molar) yaklaşık 2-3 katıdır (Shaw ve Kuleshova et al. 1997). Vitrifikasyonda kriyokoruyucuların dondurma işleminde buz oluşumunu baskılamaları en önemli unsurdur ve sıcaklık düştükçe çözelti tümüyle visköz bir hal alarak sonunda camsı faza geçmektedir. Farklı kriyokoruyucuların suyla oluşturulan çözeltilerinin camsı fazı oluşturabilme özelliklerinin değişken olduğu gösterilmiştir. Bunun da nedeninin, her bir kriyokoruyucunun vitrifikasyonun gelişmesine yardımcı olması ya da donmaya olan eğilimi azaltması; yanı sıra su molekülleri ile olan etkileşimlerindeki farklılığından kaynaklandığı bildirilmiştir. Pratik soğutma hızlarında vitrifikasyonun sağlanması için kriyokoruyucuların yüksek derişimlerinin (>%30) kullanılması gerektiğinden ilgili kriyokoruyucuların toksisiteleri vitrifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Arakawa 1990). Yüksek derişimlerdeki kriyokoruyucuların toksik etkilerini en aza düşürmek için dengeleme zamanının kısaltılması, iki aşamalı dengeleme ve toksisiteyi azaltan sükroz, trehaloz, formamid ve rafinoz gibi bazı maddelerin kullanılması önerilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996). Öldürücü buz kristallerinin oluşumunun donma aşamasındakine kıyasla çözünme aşamasında daha hızlı şekillendiği gösterilmiştir (Palasz ve Alkemade et al. 1993). Bu nedenle hücrelerin vitrifikasyondan sonra canlılıklarını sürdürebilmeleri, aynı zamanda, devitrifikasyon sırasında meydana gelebilecek zararların da önlenmesine bağlıdır. Sulu çözeltilerinin dondurma ve çözündürme işlemleri boyunca camsı fazı şekillendiren polietilen glikol ve 2.3 bütanediol gibi maddeler aynı zamanda gliserolle karşılaştırıldığında, hücrelere çok daha hızlı penetre olduğundan, vitrifikasyon çözeltilerinde kullanılan ideal kriyokoruyucu maddeler olarak bildirilmiştir (Palasz ve Mapletoft 1996). Fikol, antifriz proteinler ve sodyum hyaluronat gibi yüksek molekül ağırlıklı maddeler kriyokoruyucu çözeltilerin vitrifiye olabilme özelliklerini artırır ve çözündürme sürecinde devitrifikasyonu önlerler. Ancak, in vitro geliştirilmiş sığır blastosistleri etilen glikol-sükroz çözeltisiyle herhangi bir vitrifikasyon özelliğini artırıcı madde kullanılmadan başarıyla vitrifikasyon yöntemiyle dondurulmuştur. Bu tür moleküllerin vitrifikasyon çözeltilerinde bulunmaması çözündürme esnasında net bir devitrifikasyonla sonuçlanmıştır ki; bu da buz kristallerinin dondurma aşamasına göre çözündürme aşamasında daha kolay şekillendiğini doğrulamaktadır. Ancak, çözündürme

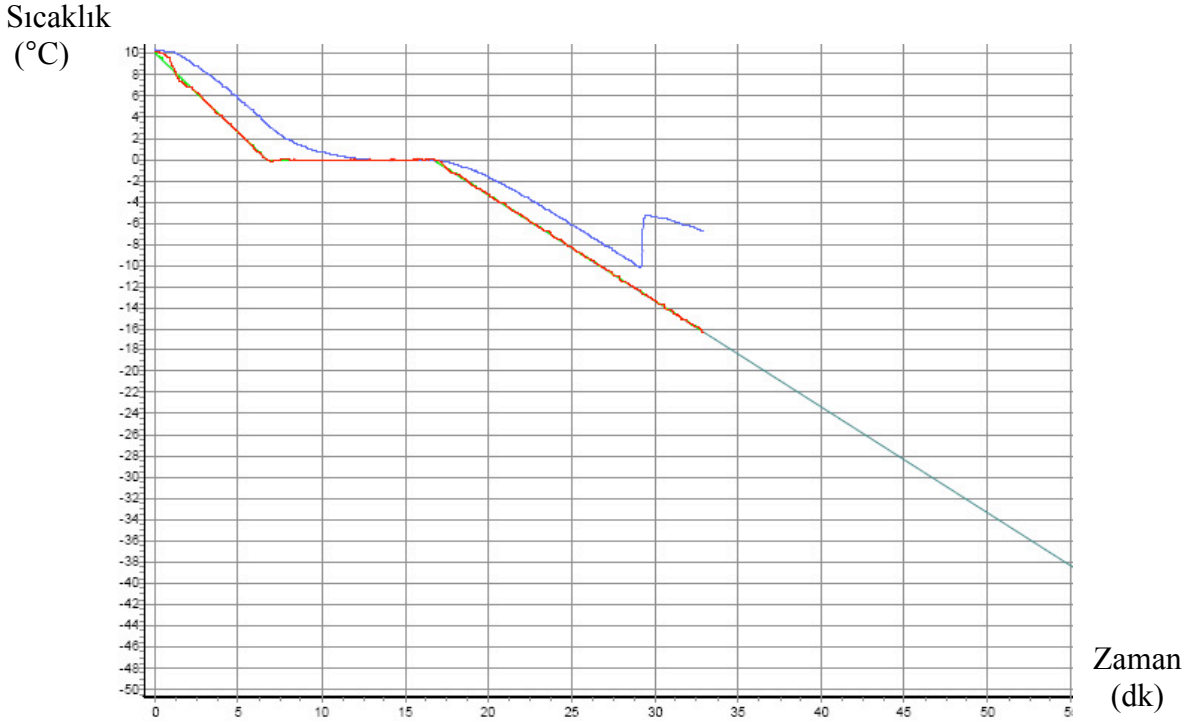
sürecinde şekillenen devitrifikasyon olgusunun çözündürme sonrası hücrelerin canlılıklarını korumada olumsuz etki göstermediği bildirilmiştir(Palasz ve Alkemade et al. 1993). Farelerde yapılan başka bir çalışmada, dondurma aşamasında vitrifikasyon çözeltisinde şekillenen kristalizasyonun embriyolara zarar vermediği bildirilmiştir(Leibo ve Oda 1993). Bu nedenle, dondurma aşamasındaki gözlenebilir kristalizasyon ve çözündürme aşamasındaki yeniden şekillenen kristalizasyonun hücelere zararsız olması, buz kristallerinin hücre dışında şekillendiğinin ve hücrelerin içerisinde herhangi bir kristalleşmenin ya da değişikliğin olmadığını göstergesi olarak kabul edilmektedir(Palasz ve Mapletoft 1996). Tartışmalı da olsa, başarı ile gerçekleştirilen dondurma yöntemlerinin hemen tümünde vitrifikasyonun bir dereceye kadar embriyon ya da ovositlerin içinde ve etrafındaki çözeltilerin derişimine bağlı olarak aşamalı şekilde gerçekleşen buz oluşumu sonucunda oluştuğu bildirilmiştir (Rall ve Reid et al. 1984).

2.6. Bilgisayar Kontrollü Yavaş Dondurma Sistemi

Kontrollü yavaş dondurma sisteminin kullanılmasının amacı hücre içindeki suyun kontrollü şekilde çıkışını ve donma anındaki ölümcül olan ısı çıkışının kontrol edilmesini sağlamaktır. Örneğin bulunduğu ortamın ısısının kontrollü bir şekilde çekirdeklenme gerçekleşmeden hemen önce hızla düşürülmesiyle ısı çıkışı kontrol altına alınır ve aşırı soğuma gerçekleşmeden çekirdeklenme oluşumu sağlanır. Donma noktasından önce kontrollü bir şekilde çekirdeklenmenin gerçekleştirilmesiyle, her örnek için aynı doğrusal termal profil oluşumu sağlanır. Bu şekilde kriyopreservasyon sonrası hücre sağkalım oranı arttırılır. Uygun dondurma programının oluşturulması için, her yeni örnek ve dondurma çözeltisine özel test programı kullanılarak çekirdeklenme noktasının belirlenmesi gerekir (Şekil 2.6.1.). Bu test programından elde edilen veriler sonucunda çözeltilerin termal profili elde edilerek asıl dondurma programının oluşturulması sağlanır. Test program basamakları sırasıyla;

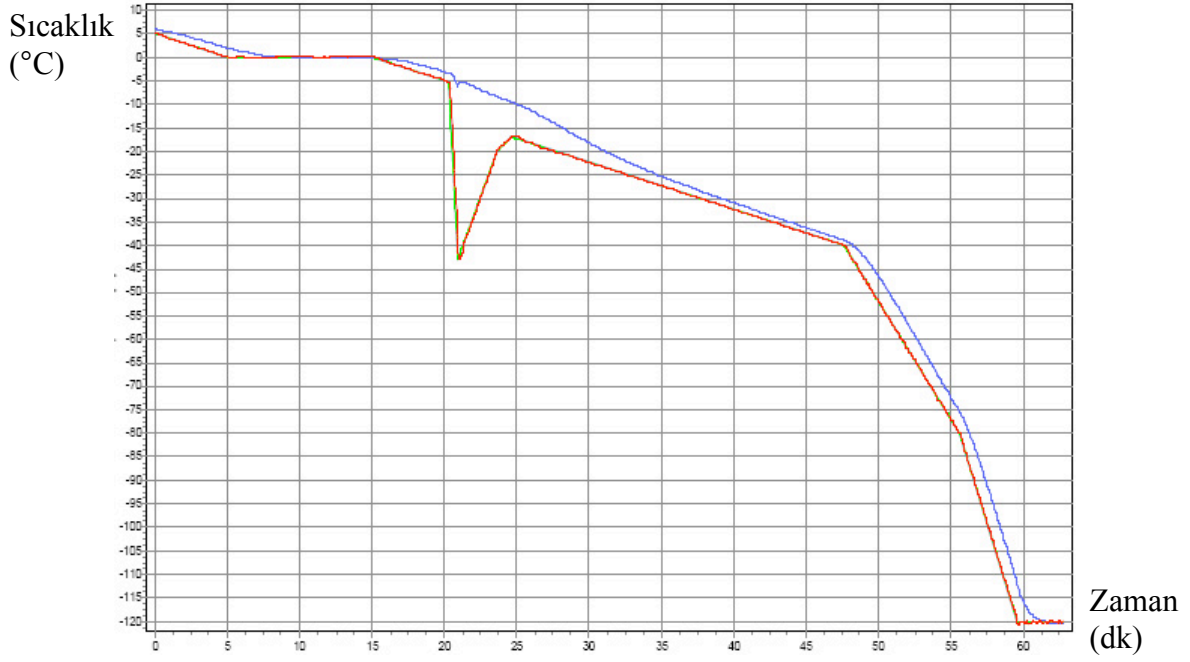
1. Kriyokoruyucuya bağlı olarak +10°C’de program başlatılır.
2. Dokunun ve içinde bulunduğu kriyo çözeltisi +10°C den 0°C ye 2°C/dk hızla soğutulur. Bu aşamada örneğin 0°C olması programın derecesiyle dengeye ulaşması için örneğe zaman tanımak gerekir ve 0°C de 5 dakika beklenir.
3. Çekirdeklenmenin hangi ısıda gerçekleştiğini gözlemleyebilmek için örneğin ısısı -40°C’ye 1°C/dk hızda olacak şekilde indirilir.

Bu aşamada ekranda üç eğri izlenir; istenen program, örnek ve odacığın ısısı gözlenir. Çekirdeklenmenin olduğu aşamada örneğin ısısında hızlı bir yükselme gözlenecektir, bu andaki odacığın ve örneğin ısısı belirlenir. Burada oluşan ısı gizli ısıdır ve baskılanması gerekir. Bu nedenle oluşan eğri incelenip, ısı çıkışının baskılanacağı bir asıl program oluşturulur, böylece programın ve örneğin termal profil eğrisinin olabildiğince birbirine paralel olması sağlanır.



Şekil 2.6.1. Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan test eğrisi. İstenen program (yeşil), örnek (mavi) ve odacığın ısısı (kırmızı). Çekirdeklenme -10°C 'de gerçekleşir.

Test programında çekirdeklenmenin gerçekleştiği ısı derecesi -10°C olarak belirlendikten sonra, gizli ısı oluşmadan az önce odacığın ısısının -40°C ye $-60^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ düşürülmesi sağlanır. Bu şekilde çekirdeklenme gerçekleşmeden az önce örneğin bulunduğu odacığın ısısı -6°C 'de düşürülerek gizli ısı çıkışının baskılanması amaçlanır, bu ısının -40°C ve -50°C 'ye düşürülmesi birçok çalışmada uygun bulunmuştur. Örneğin bu ısıya ulaşabilmesi için -40°C de 0,5 dk. beklenir. Sıcaklık tekrar -25°C 'ye $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla çıkarılır. -17°C 'ye $3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ olacak şekilde indirilir. -30°C 'ye $1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ olacak şekilde indirilir. Bu noktada örnek tam olarak donmuş olmalıdır. -30°C 'den -40°C 'ye $5^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla indirilir. -120°C ye $-8^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla indirilip program sonlandırılır (Şekil 2.6.2.). Bu şekilde örneğin termal profilinin doğrusal olarak düşmesi sağlanır.



Şekil 2.6.2. Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan asıl program

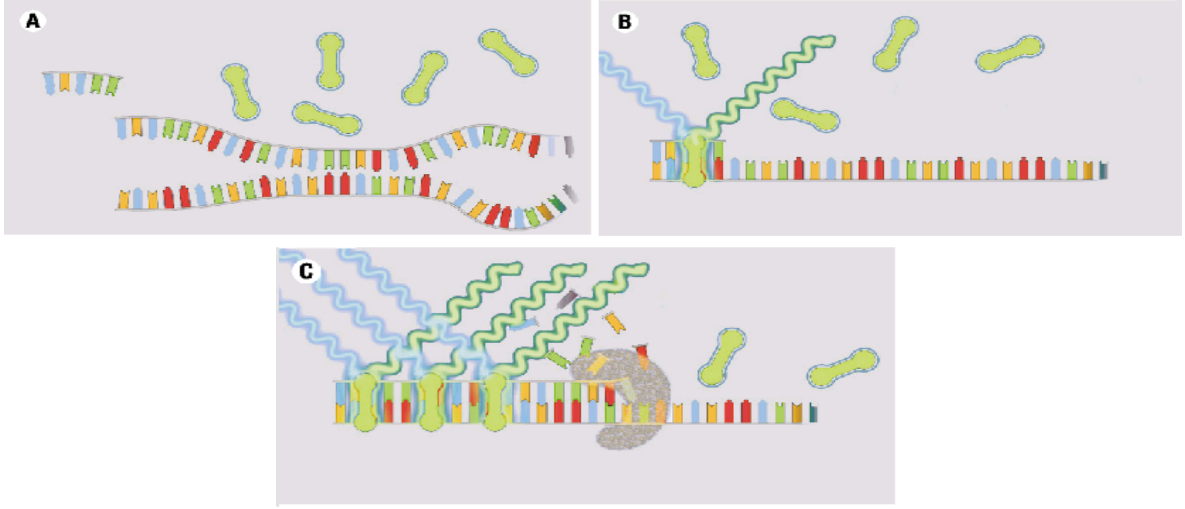
2.7. Dokunun Çözülmesi ve Kriyokoruyucuların Uzaklaştırılması

Çözme işleminin hızı hücre sağ kalımı üzerine etkilidir. Birçok uygulamada hızlı çözmenin daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Donma esnasında oluşan küçük kristaller çözme sırasında birleşme eğiliminde olup bu birleşme hücreye zarar verir. Çözme işlemi hızlı gerçekleştiğinde kristaller birleşmek için yeterli zaman bulamadığından bu sorunun üstesinden gelinir (Farrant ve Lee et al. 1977, Farrant ve Walter et al. 1977). Çözme işlemi dokuyu içerisinde bulunduran tüplerin veya diğer taşıyıcıların sıvı azottan çıkarıldıktan sonra, hemen 37°C'deki su banyosu içerisine 2-3 dk. süreyle daldırılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Kriyokoruyucu maddelerin zararlı etkilerini (ozmotik şok vs.) önlemek için hızla bu maddelerin dokudan uzaklaştırılması gerekmektedir. Kriyokoruyucuların uzaklaştırılması için sükroz (Cseh ve Horlacher et al. 1999, Nowshari ve Brem 2000), trehaloz (Bagis ve Odaman et al. 2002) veya galaktoz (Kaidi ve Donnay et al. 2000) gibi hücre içine giremeyen şekerler kullanılmaktadır. Bu maddelerin ortamda bulunması sonucu kriyokoruyucu madde yoğunluk farkından dolayı hücre dışına çıkar. Bu işlem ya tek ya da üç aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. Çözme işleminde, sükrozun 0,5 ile 1 molar derişimi yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Nowshari ve Brem 1998, Cseh ve Horlacher et al. 1999, Nowshari ve Brem 2000). Sırasıyla doku 1M, 0,5M, 0,25M ve 0M çözeltilerde 5'er dk. tutularak çözme işlemi gerçekleştirilir.

2.8. Eş Zamanlı PCR

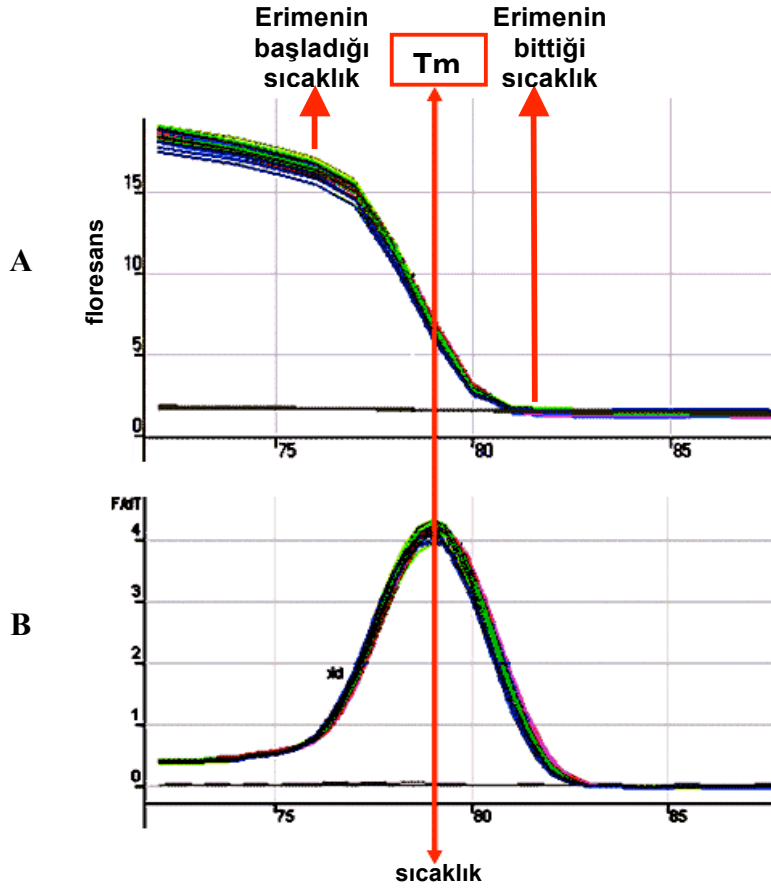
Eş Zamanlı (*Real Time*) PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir polimeraz zincir tepkimesi (PCR) teknolojisidir. DNA sarmalına bağlanarak flüoresan ışığa yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile amplifikasyon miktarının saptanmasını sağlamaktadır. Her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar (Nolan ve Hands et al. 2006).

SYBR Green I, gen ifadesinin ölçümünde sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA'ya bağlanarak flüoresan özellik kazanan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PCR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak flüoresanışığın açığa çıkmasını sağlar (Şekil 2.8.1.). SYBR Green tekniği ile gen ifadesinin kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gereklidir. RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu da SYBR Green tekniğinin başarısını gölgeleyen bir diğer unsurdur. Özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için, cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, ampikon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz) ve primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi dikkat edilmesi gereken noktalar. SYBR Green I, primer dimerleri ve özgül olmayan PCR ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir (Bustin ve Catez et al. 2005). Bu nedenle flüoresan artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermez. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile incelenir. Bununla birlikte eş zamanlı PCR cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin saptanması için **erime eğrisi** (*melting curve*) analizi yapılabilmektedir (Şekil 2.8.2A.). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir **erime ısı** (*melting temperature, T_m*) (Çift zincirli DNA'nın %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile flüoresan miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca bağlı olan boya serbest kaldığı için ölçülen flüoresan miktarı azalmaya başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenebilir. T_m değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilebilir. Bu türev analiz, sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Şekil 2.8.2B.).



Şekil 2.8.1. SYBR Green tekniği.A. Başlangıç aşaması: Tepkimenin başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için flüoresan sinyal yoktur. B. Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda flüoresan sinyal açığa çıkar. C. Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak flüoresan sinyal artar.

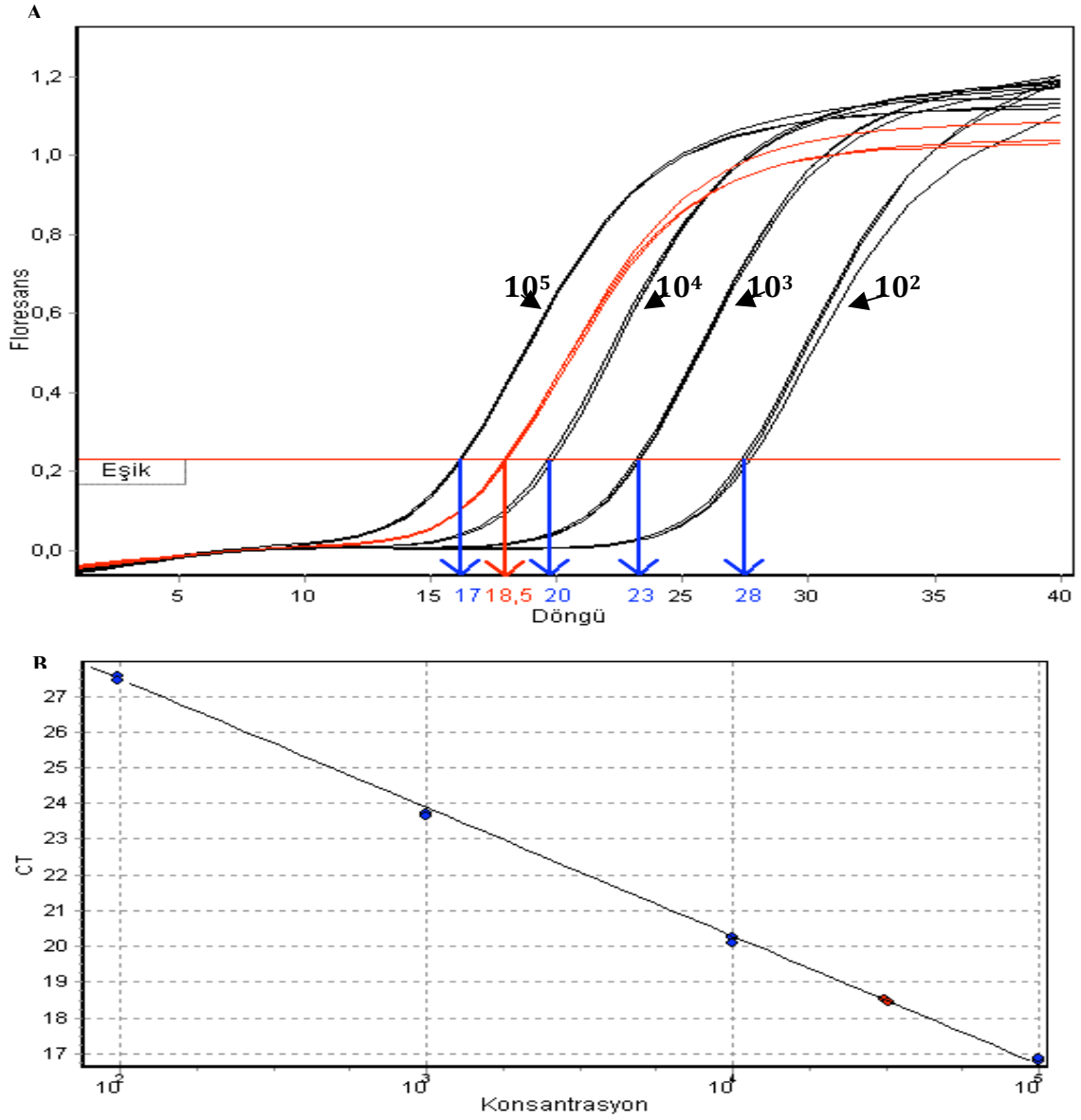
Eşik döngü değeri (*threshold cycle = Ct*) eş zamanlı PCR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında saptanan flüoresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PCR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir(Wong ve Medrano 2005). Flüorimetrik PCR yöntemi ile yapılan kantitatif çalışmalarda, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara **mutlak kantitasyon** adı verilir.



Şekil 2.8.2. Erime eğrisi analizi

Bir örneğin içinde yer alan kalıp miktarının diğer bir örnekle karşılaştırıldığı durumlarda mutlak kantitasyona gerek yoktur. Bu durumda, standart örneğin içinde bulunan kalıp DNA miktarının bilinmesi önemli değildir. İyi ifadelenen bir örneğin seri dilüsyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara **bağlı kantasyon** (*relative quantitation*) adı verilir. Bir standart örnekten seri dilüsyonlar hazırlanır. Standart dilüsyonlara varsayılan bir derişim miktarı atfedilir ve genellikle bu miktar **varsayılan birim** (*arbitrary unit*) olarak ifade edilir. Bu standartlar kullanılarak, atfedilen derişim değerlerine karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek kantasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Kantasyon aşamasında, örneklerin Ct değerlerinin regresyon eğrisi üzerinde hangi atfedilen değeri temsil ettiklerine bakılarak göreceli bir miktar belirlenir. Bu şekilde kantitatif PCR verilerinin analizinde; mutlak ve bağlı kantasyon kullanılır. bağlı kantasyon için, şekil 2.8.3.'te 3'er kez tekrar edilmiş standart örnek seri dülüsyonlarının (10^5 ile 10^2 arası

derişim değerleri atfedilmiştir) Ct değerleri ile amplifikasyon eğrileri ve bu eğriler kullanılarak çizilen standart eğri bir örnek olarak verilmiştir.



şekil 2.8.3. PCR amplifikasyon eğrisi (A) ve standart eğri (B). A. Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri (mavi oklar) gösterilmiştir. Bir adet bilinmeyen örnek ve Ct değeri kırmızıyla gösterilmiştir. B. Standart rneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir. Bilinmeyen rnek kırmızı ile ifade edilmiştir.

2.8.1. Housekeeping genlerin kantitatif RT-PCR çalışmalarındaki nemi

Kantitatif RT-PCR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifade düzeyi değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (Bustin 2002). Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle

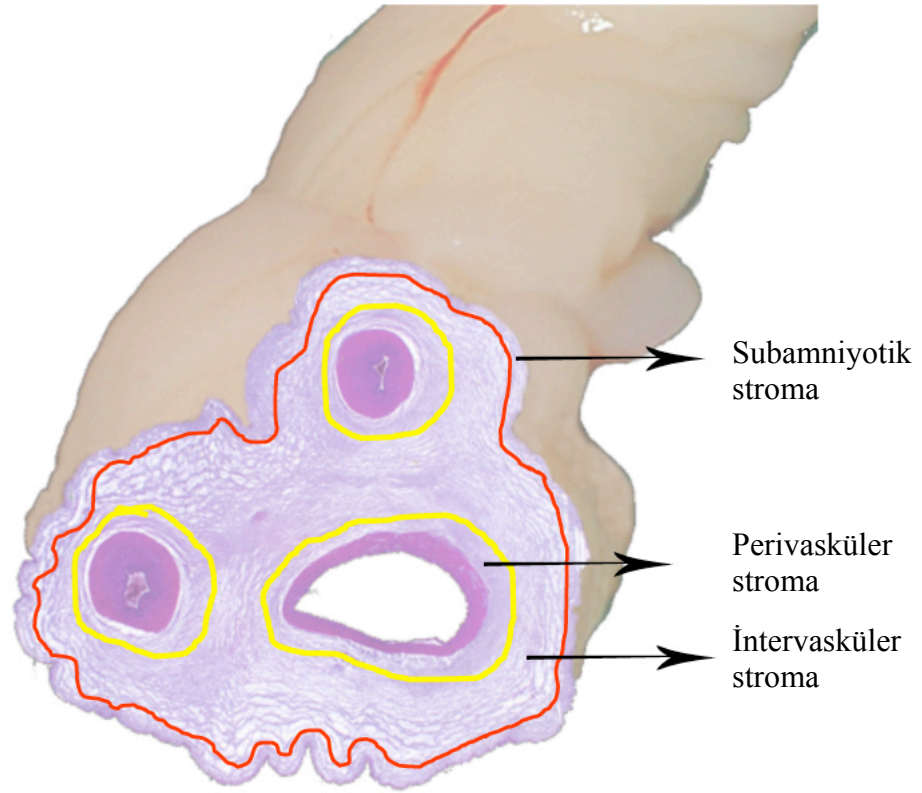
yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir.

2.9. İnsan Göbek Kordonu Stroması Hücrelerinin Yapısal ve İşlevsel Özellikleri

İGKS hücreleri adipojenik(Karahuseyinoglu ve Kocaefe et al. 2008), kondrojenik, osteojenik, kardiyomiyojenik ve işlevsel sinir hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip kök hücreler barındırırlar (Takechi ve Kuwabara et al. 1993, Bankowski ve Sobolewski et al. 2004, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Ksenotransplantasyonlarında bile alıcıda immün yanıt oluşturmamış ve doku reddi ile karşılaşılmamıştır (Fu ve Cheng et al. 2006, Weiss ve Medicetty et al. 2006). Kemik iliği kökenli MKH kıyasla daha etkin bir kök hücre kaynağıdır (Suva ve Garavaglia et al. 2004). Gen terapisinde kullanılabilir özelliği olması (Hamada ve Kobune et al. 2005, Rachakatla ve Marini et al. 2007),emriyonik kök hücrelerin (EKH) aksine, tümör oluşturmamaları (Conconi ve Burra et al. 2006), bireylerden acısız, hızlıca alınabilir ve daha az etik probleme neden olmaları, düşük maliyetle doğumda toplanabilir, kriyojenik olarak depolanıp, çözülüp, tedavi edici amaçlı çoğaltılabilir potansiyele sahip olmalarıyla önem taşımaktadırlar (Can ve Karahuseyinoglu 2007).

İGKS hücrelerinin gebelik süresince belirli farklılaşma aşamalarından geçtiği gösterilmiştir (Takechi ve Kuwabara et al. 1993). İlk trimesterde α -düz kas aktini filamanı izlenmezken ikinci ve üçüncü trimesterlerde α -düz kas aktini'nin varlığı ortaya konmuş ve bu da Wharton peltasindeki hücrelerde postnatal farklılaşmaların olabileceği konusunu gündeme getirmiştir (Takechi ve Kuwabara et al. 1993). Temporal farklılığın yanı sıra hücre dışı matriks elemanları ve hücre iskeleti filamanlarının ekspresyonunun göbek kordonunda bulunan subamniyotik, intervasküler ve perivasküler hücrelerde (Şekil 2.9.1.) bölgesel farklılık gösterdiği saptanmıştır. Termde göbek kordonunda perivasküler ve intervasküler hücrelerde devimentin, desmin, α -düz kas aktini, γ -düz aktini, düz kas miyozini eksprese eden iyi farklılaşmış hücrelerken subamniyotik bölgedeki hücrelerin genellikle düz kas miyozini ve γ -düz aktini eksprese etmeyen daha az farklılaşmış hücreler olduğu

gösterilmiştir (Nanaev ve Kohnen et al. 1997). İGKS dokusundaki hücrelerin vimentin ve desmin açısından varlığı ve yerleşimi incelendiğinde hem perivasküler hemde intervasküler alanda ifade bulur. Endodermal ve ektodermal epitel hücrelerinde ifade olduğu bilinen (Kreis ve Vale 1999) bir diğer ara filaman olan sitokeratin stroma hücrelerinde pozitifdir (Kasper ve Stosiek et al. 1988, Nanaev ve Kohnen et al. 1997, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). İGKS dokusundaki hücreler sitokeratin ve α -düz kas aktini açısından değerlendirildiğindeyse perivasküler alanda dominant olarak izlenirken ayrıca α -düz kas aktinin subamniotik bölgede ifade bulur (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007).



Şekil 2.9.1. İnsan göbek kordonu dokusunun kompartmanları

İGKS hücreleri *in situ* miyofibroblastlara benzer özellik gösterirler (Parry ve Abramovich 1972). Hücre içi glikojen ve yağ damlacıkları, prokollajen salgı granülleri, iyi gelişmiş endoplazmaretikulumları, çok sayıda mitokondriyon ve Golgi kompleksine sahiptirler (Takechi ve Kuwabara et al. 1993, Eyden ve Ponting et al. 1994, Nanaev ve Kohnen et al. 1997). Hücre yüzeyi kısmen heparan sülfatlı proteoglikanlardan oluşmuştur (Nanaev ve Kohnen et al. 1997). Miyojenik hücrelere benzer şekilde, 10nm kalınlığında çok sayıda hücre içi filamanları vardır. Hücre sitoplazmasındaki bu filamanların immün flüoresan

boyamalarla desmin ve α -düz kas aktini gibi miyojenik hücelere özgü filamanlar olduğunun görülmesi, bu hücrelerin hem düz kas hem de fibroblast özelliklerini taşıdığına işaretler (Majno ve Gabbiani et al. 1971, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Düz kas ve fibroblast ince yapısını birlikte gösteren hücreler miyofibroblast olarak tanımlanmışlardır (Fawcett 1966, Takechi ve Kuwabara et al. 1993, Nanaev ve Kohnen et al. 1997). Kontraktıl proteinler olan aktin, desmin ve α -düz kas aktini miyofibroblastlara özgüdür (Chou ve Skalli et al. 1997). Bu proteinlerin stroma hücrelerince de ifadelendiği gösterilmiştir (Takechi ve Kuwabara et al. 1993, Kobayashi ve Kubota et al. 1998, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Bu hücrelerin lif sentezinde ve organize olmuş hücrelerin haberleşmesinde ve kasılmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Mezansım kökenli hücrelerde eksprese olduğu bilinen (Kreis ve Vale 1999) ve bir ara filaman proteini olan vimentinin bu hücrelerdeki varlığı (Kasper ve Stosiek et al. 1988, Takechi ve Kuwabara et al. 1993, Nanaev ve Kohnen et al. 1997, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007) bu görüşü destekler.

İGKS hücreleri *in vitro* ortama alındıklarında iki farklı morfolojide gözlenir: fusiform yapıda, fusiform çekirdekli, kollajen sentezleyen hücreler (tip-2) ve daha köşeli sitoplâzmalı, yuvarlak, girintili-çıkıntılı çekirdekli ve belirgin çekirdekçikli hücreler (tip-1) olmak üzere (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Bu hücrelerin İGKS dokusundan izole edildikten sonra miyofibroblastlara özgü α -düz kas aktini ve pansitokeratin ifadesinin kültür ortamında sürdüğünü fakat desmin ifadesinin olmadığı izlenmiştir (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Mezankimal kök hücre belirteci olan vimentin ifadesi kültür ortamına alınan İGKS hücrelerinde de devam eder. İGKS kök hücrelerinin CD105, CD73, CD90 gibi MKH özgü belirteçleri ifade ettiği gösterilmiştir (Çizelge 2.9.1.) (Dominici ve Le Blanc et al. 2006). Bunun yanında hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45 ve CD34 ve MKH de olmadığı bilenen insan lökosit antijeni (HLA)-DR bakımından negatiftirler (Dominici ve Le Blanc et al. 2006). TGF- β ailesinin bir üyesi olan BMP-4 kök hücrelerin gelişiminde ve düzenlenmesinde rol oynadığı bilinir (Koh ve Kim et al. 2008). İGKS hücrelerinde de ifade edilir. Düşük düzeyde de olsa embriyonik kök hücre belirteci olan Oct-4 (Weiss ve Medicetty et al. 2006), Nanog (Carlin ve Davis et al. 2006) gibi bazı transkripsiyon faktörlerini mRNA ve protein düzeyinde ifade ederler.

**Çizelge 2.9.1. İGKS hücrelerinde varlığı bilinen hücre yüzey belirteçleri
(Can ve Karahüseyinoğlu, 2007'den alınmıştır).**

Belirteçler	Varlığı
CD10	+
CD13	+
CD14	-
CD29 (integrin β 1)	+
CD31 (PECAM)	-
CD33	-
CD34	-
CD38	-
CD44 (HCAM)	+
CD45	-
CD49b (integrin α 2)	+
CD49c (integrin α 4)	+
CD49d (integrin α 3)	+
CD49e	+
CD51 (integrin α 5)	+
CD54 (ICAM-1)	-/+
CD56	-
CD73 (SH3)	+
CD90 (Thy-1)	+
CD105 (endoglin,SH2)	+
CD106 (VCAM-1)	-/+
CD117 (c-kit)	-/+
CD123 (IL-3 receptor)	-
CD133	-
CD146	+
CD166 (ALCAM)	+
CD235a (glycophorin A)	-
HLA-1	+
HLA-DR (MHC class II)	-
HLA-DP (MHC class II)	-
HLA-DQ (MHC class II)	-
HLA-A,B,C (MHC class I)	+
HLA-G (MHC class I)	-
STRO-1	-
Oct-4	-/+
Nanog	+
SSEA-4	-
Sox-2	+

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. İnsandan Göbek Kordonunun Elde Edilmesi, Laboratuvara Transferi ve Ön İşlem Aşamaları

Bu çalışmada insan kök hücresi eldesi amacıyla göbek kordonu bağ dokusu (Wharton peltesi) kullanıldı. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 121-3211 no'lu kararla onaylanmıştır. Komplikasyonsuz bir hamilelik dönemi geçiren ve herhangi bir sistemik hastalığı olmayan anne adayının “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu”nu okuyup onaylaması halinde peroperatuvar sezaryen sırasında 25 cm uzunluğunda göbek kordonu parçası alındı. Bu materyal doğum sonrasında göbek kordonu bağlandıktan sonra kordonun plasenta tarafında kalan bölümünün kesilerek hızla taşıma ortamına (%3 Penisilin-Streptomisin (Sigma; P0781), 7,5 µg/ml Amphotericin B’li (Sigma; A 2942) steril Leibovitz L15 (Hyclone; SH 30525.02) kültür ortamına aktarılmasıyla elde edildi ve laboratuvara ulaştırıldı. Bu işlemler için 20 adet kordon (ortalama anne yaşı: 29) kullanıldı. Göbek kordonu laboratuvara getirildikten hemen sonra laminar akışlı kabin içinde steril koşullarda arterler ve ven mekanik olarak uzaklaştırıldı ve kalan doku makas ve bisturi yardımıyla çok küçük parçalara bölündükten sonra 3 kez PBS (fosfat tamponlu tuzlu su Sigma; P 4447) ile yıkanıp 250g’de 5 dakika santrifüjlendi. Çöken doku parçalarından hücre izolasyonu yapıldı (Bkz. 3.2.) veya kontrollü dondurma ve vitrifikasyon işlemlerine alındıktan sonra çözülüp hücre izolasyonları yapıldı.

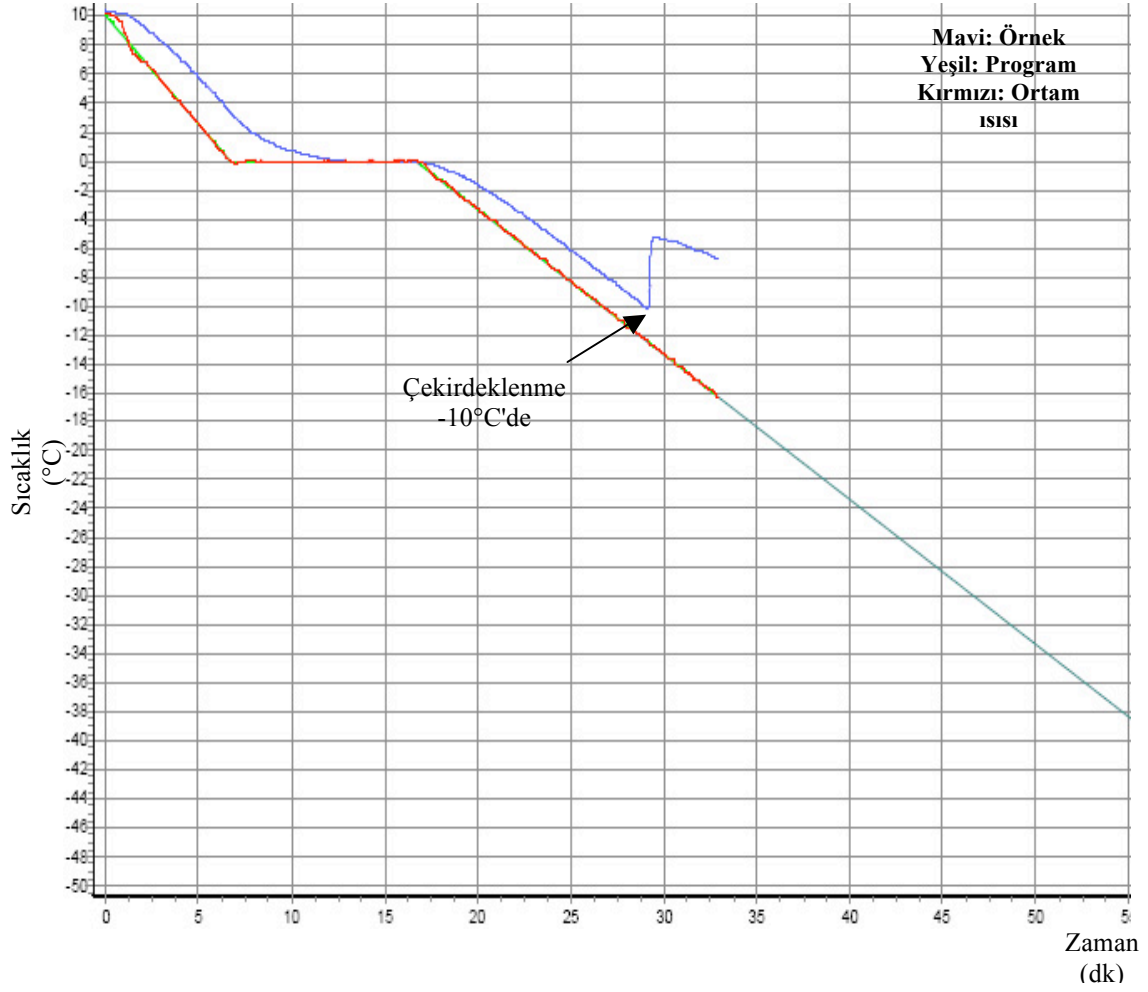
3.2. Dondurma Öncesi İnsan Göbek Kordonu Stroma Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültüre Edilmeleri

Ön işlem aşamalarından sonra elde edilen doku parçalarının üç katı miktarda % 0,1 kollajenaz tip B’li (Roche; 1088831) kültür ortamında (DMEM –F 12 Ham’s Sigma; D0547), %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma; P0781), 2,5 µg/ml Amphotericin B (Sigma; A 2942), %10 FBS (Sigma; F7524) 2-3 saat 37°C su banyosunda sallanarak sindirildi (*digestion*). Daha sonra üzerine 2mg/ml dispaz (Sigma; D4818) eklenerek 30 dakika 37°C su banyosunda sallanarak ileri sindirme işlemi yapıldı. Doku homojenizasyonu sağlandıktan sonra hücreler 70 µm’lik elekten geçirildi ve filtre edilmiş materyal üzerine en az üç katı PBS eklenip 350g’de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen çökelti kültür ortamıyla karıştırılıp 60 cm² polistren petri kabına ekildi. Üç gün sonra kültür kabına

yapışmamış hücreler dPBS (Dulbecco's PBS) ile yıkanıp kültür ortamı her üç günde bir değiştirildi. Hücreler % 100 çoğalma düzeyine ulaştığında Trypsin EDTA (Sigma;T3924) ile 5 dakika 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde kaldırılıp, hücre sayımı yapıldı. Pasajlama işleminde 60 cm²'lik petriye 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin 5-7 gün süresince çoğalmaları sağlandı. Her pasaj sonunda hücreler kaldırılıp Vicell cihazı (Beckman Coulter) ile tripan mavisi tekniğine dayanarak hücre sayım yapıldı. Tripan mavisi tekniğinde ölü hücrelerde hücre zarı bütünlüğü bozulduğundan hücre zarından içeri tripan mavisi boyası girer ve hücre mavi boyanır. Canlı hücrelerde ise hücre zarı sağlam olduğundan içeri boya girişi olamaz. Bu şekilde canlı ve ölü hücre ayrımı sağlanmış olur.

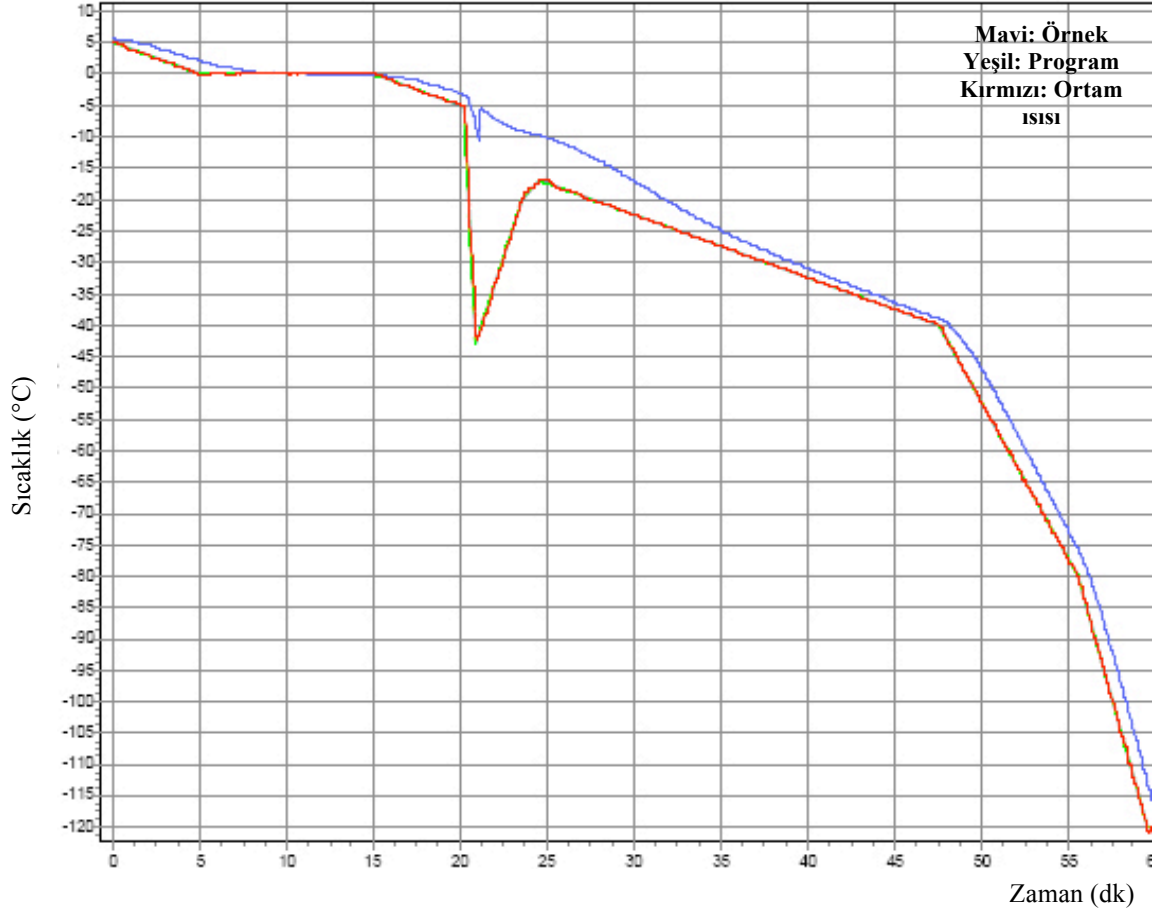
3.3. Göbek Kordonunun Uygun Şartlarda Dondurulması

Ön işlem aşamalarından sonra doku 0,5 ml olacak şekilde 5 ml'lik dondurma tüplerine (5ml cryovial, Nunc) dağıtıldı. Üzerine sıcaklığı 4°C olan 4 ml dondurma çözeltisi Leibovitz L15, 0,1M sükröz (Merck; K26042551), 1,5M DMSO (Sigma; D8386), %20 FBS (Sigma; F7524) eklendi. 4°C buzdolabında 30 dakika bekletildikten sonra bilgisayar kontrollü dondurma sistemine (SY-LAB, ICECUBE 14S) alındı. Dokunun ve içinde bulunduğu çözeltinin çekirdeklenme derecesini belirlemek için test eğrisi oluşturuldu. Test eğrisi sonucu gizli ısı çıkışının -10°C'de sıcaklıkta olduğu belirlendi (Şekil 3.3.1.). Çekirdeklenme gerçekleşmeden -10°C'den önce -5,2°C'de ortamın ısı düşürülerek gizli ısı çıkışının kontrol edilmesi amaçlanarak doğrusal termal profil sağlanarak uygun dondurma programı oluşturuldu (Şekil 3.3.2).



Adım	Sıcaklık (°C)	Hız (°C/dk)	Zaman (dk)
0	10	0	0
1	0	-2	10
2	0	0	5
3	-40	-1	40

Şekil 3.3.1. Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan test eğrisi. Oluşturulan test eğrisi sonucu termal profilde çekirdeklenmenin -10°C olduğu gözlemlendi.



Adım	Sıcaklık (°C)	Hız (°C/dk)	Zaman (dk)
0	5	0	0
1	0	-1	5
2	0	0	10
3	-5,2	-1	5,2
4	-43	-58,15	0,65
5	-20	8,52	2,7
6	-17	3	1
8	-40	-1 ve (-0.3)	22,98
9	-80	-5	8
10	-120	-10	4

Şekil 3.3.2. Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan program eğrisi. Test eğrisi sonucuna göre oluşturulan programda $-5,2^{\circ}\text{C}$ 'de ortamın ısı $-58,15^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ düşürülerek gizli ısı çıkışı baskılandı ve örneğin ısıısının doğrusal şekilde düşüşü sağlanarak donduruldu.

Cihaz aracılığıyla -120°C sıcaklığa ulaşan doku hemen -196°C nitrojen tankına kaldırıldı.

3.4. Dondurma Sonrası İnsan Göbek Kordonu Dokusunun Çözülmesi ve Stroma Hücrelerinin İzolasyonu

Nitrojen tankından (-196°C) çıkarılan tüp hemen 37°C su banyosunda 5 dakika tutuldu. Daha sonra L15 (Leibovitz's L15) içerisindeki dereceli sükröz çözeltilerinde (sırasıyla 0,25 M, 0,1M, 0,05M) beşer dakika bekletilip 250g'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst faz atılıp üzerine kültür ortamı eklendi. Bu aşamadan sonra hücre izolasyonuna geçildi (Bkz. 3.2.).

3.5. Dondurma Öncesi ve Sonrası Kök Hücrelerin Yapısının ve Potansiyelinin Ölçümü

3.5.1.Hücre proliferasyonölçümleri

Yirmi dört kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler 3, 5, 7, 9, 11. günlerde tripsin-EDTA ile kaldırılıp Vicell cihazıyla tripan mavisi tekniğine dayalı şekilde sayıldı. Her pasaj sonunda hücreler %100 çoğalma düzeyine ulaştığında kaldırılıp, hücre sayımı yapıldı ve pasajlandı. Sayım sonucu toplam hücre sayısı ve sağlam hücre miktarı belirlendi.

3.5.2. Dondurma öncesi ve sonrası hücrelerin immün histokimyasal işaretlenmesi

İGKS hücreleri oda ısısında % 3,5 PFA ile 30 dakika tespit edildikten sonra immün histokimyasal yöntemle flüoresan problemlerle işaretlendi.

Desmin boyama protokolü

- Yıkama (PBS'te, 30 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Desmin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma, D1033, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C nemli etüv)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10µm), 20 dakika (37° C nemli etüvde)

- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

Alfa-düz kas aktini boyama protokolü

- Yıkama (PBS'te, 30 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- ASMA fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma, katalog no: A5228, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10µm), 20 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

Vimentin boyama protokolü

- Yıkama (PBS'te, 30 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Vimentin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma, katalog no: V6630, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10µm), 20 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

Pansitokeratin boyama protokolü

- Yıkama (PBS'te, 30 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Pancytokeratin fare monoklonal anti-insan IgG (Sigma, katalog no: C2562, ABD), 1:100PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10µm), 20 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

CD 105 (Thy-1) boyama protokolü

- Yıkama (PBS'te, 30 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- CD 105 fare monoklonal anti-insan IgG (Beckton Dickinson, E90320-050, ABD), 1:5 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- FITC-konjuge keçi antifare IgG (Jackson immunoresearch, 115-095-166, ABD), 1:100 PBS'te dilüe, 90 dakika (37° C, nemli etüvde)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- 7-Aminoactinomycine D (Sigma; A9400, 10µm), 20 dakika (37° C nemli etüvde)
- Yıkama (PBS'te, 2x5 dakika)
- Kurulama (filtre kağıdı ile)
- Kapama (1 µg/ ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)

İmmünflüoresan görüntülemeler Zeiss LSM 510 lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi altında alındı.

3.5.3. RNA izolasyonu

Dondurma öncesi ve sonrası 60 cm²'lik petriye ekimi yapılan İGKS hücreleri % 100 çoğalma düzeyine ulaştığında ideal RNA izolasyon yöntemi olan TRIzol (Invitrogen) içerisinde homojenize edilerek -80°C'de saklandı. Bu örnekler -80°C'den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildikten sonra standart TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu yapıldı. Aşağıda TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu aşamaları verilmiştir:

1. Homojenize edilen hücreler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2. 200 µl kloroform (Applichem) eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12000 rpm de 15 dk. 4°C' de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol (Applichem) içeren yeni tüpe alındı.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
6. 12000 rpm de 10 dk. 4°C' de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine 1 ml DEPC (DEPC, Applichem) içeren %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk. 4°C' de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol (Riedel) döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurutuldu.
10. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su (% 0,1 DEPC'li su) eklendi.
11. 60°C' de 10 dk. bekletildi ve analize kadar -20°C' de, analiz sonrası -80°C' de saklandı.

3.5.4. RNA'ların kalite kontrolü

İzole edilen RNA'lar kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere denatüre jel elektroforezi (RNA elektroforezi; %1,5 Agaroz–formaldehid jel) ile incelendi, derişimleri Nanodrop ND-1000 cihazında ölçüldü.

Çizelge 3.5.4.1. Agaroz-formaldehid jel elektroforezi (RNA Elektroforezi)

Agaroz (Cambrex)	Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
MOPS tamponu	MOPS 0,221 M
	Na-Asetat-Trihidrat (Sigma) 0,05 M
	Na ₂ EDTA (Sigma) 0,01 M
Yükleme tamponu	Gliserol (Merck) %50
	Na ₂ EDTA(Merck) 1 mM
	BPB boya (Merck) %0,25
Etidyum bromür (Sigma)	10 mg/ml distile su
Formaldehid (Sigma)	
Formamid (Sigma)	

3.5.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, ImProm-II™ reverse transkriptaz enzimi (Promega) ve oligo(dT)15 primeri kullanıldı. Kalıp olarak 1µg RNA kullanıldı ve 0,5 µg/ µl oligo (dT)15 primeri ve RNaz içermeyen su ile 5 µl'ye tamamlanarak 70°C'de 5 dk. inkübe edildi.

Çizelge 3.5.5.1. cDNA sentezi

ImProm-II™tampon (5X) (Promega)	Tris-HCL 250 mM
	KCL 250 mM
	DTT 50 Mm
ImProm-II™ RT (Promega)	1 µl/reaksiyon
MgCl ₂ (Promega)	25 mM
Oligo(dT)15 primeri (Promega)	0,5 µg/µl
dNTP karışımı (Promega)	10 mM

İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 5 dk. bekletildi. Ayrı bir tüpte 15 µl reverse transkripsiyon karışımı hazırlandı

Çizelge 3.5.5.2. Revers transkripsiyon karışımı

	Son derişim	Hacim
RNaz içermeyen su		6,6 µl
Improm-II™ tampon (5X) (Promega)	1X	4 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 mM	2,4 µl
dNTP karışımı (10mM)	0,5 mM	1 µl
Improm-II™ Reverse Transkriptaz		1 µl
	Toplam:	15 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde 5µl RNA + primer karışımı, 15 µl reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda Applied Biosystems-9700 PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

25°C’de 5 dk

42°C’de 60 dk

70°C’de 15 dk

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 80 µl’ye sulandırıldı (20 µl cDNA +60 µl distile su = 80 µl).

3.5.6. Eş zamanlı PCR

İGKS dokusundan dondurma öncesi ve sonrası izole edilen hücrelerde yapısal genlerin ekspresyonu farklı pasajlarda alınan örneklerde, *Corbett Rotor-gene* 6000 cihazında RT-PCR yöntemi ile incelendi.

RT-PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla hücrelerden elde edilen cDNA örneğinden 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3’er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmıştır. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan *housekeeping* gen miktarı, taze İGKS dokusu ve donmuş İGKS dokusundan izole edilen hücrelerin pasajları arasında ifade düzeyleri karşılaştırılarak incelendi.

Çizelge 3.5.6.1. Eş zamanlı PCR

SYBR Green karışımı (Floresan boya) (2X) (Sigma)	20 mM Tris-HCL, PH: 8,3 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP, 0,4 mM dTTP, Stabilizatör, 0,05 u/ µl Taq DNA polimeraz, 100 mM KCl, 0,4 mM dATP Jump Start Taq antibody (Sigma), SYBR Green I boyası
MgCl ₂ (Sigma)	25 mM

Çizelge 3.5.6.2. RT-PCR koşulları

2X SYBR Green karışımı	5 µl
25mM MgCl ₂	1,2 µl
Forward primer (10pmol/ µl)	0,4 µl
Reverse primer (10pmol/ µl)	0,4 µl
cDNA	1,5 µl
Distile su	1,5 µl
Toplam:	10 µl

10 µl RT-PCR reaksiyonu *Rotor-gene 6000* cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

94°C'de 2 dk
94°C'de 1 s
60°C'de 15 } 45 Döngü

Çizelge 3.5.6.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz (Cambrex)	Moleküler biyoloji kullanımı saflığında
Tris-asetat tamponu (TAE) (pH: 8,0)	Tris baz (Merck) 2 M Glasiyel asetik asit (Merck) 1.14 ml Na ₂ EDTA (Merck) 0,5 M
Yükleme tamponu	Gliserol (Merck) 5,5 ml 1X TAE tamponu (Merck) 4,5 ml Orange Gboya (Merck) 0,01gr
Etidyum bromür (Sigma)	10 mg/ml distile su
Moleküler ağırlık belirleyicisi	100 bp DNA Ladder (Promega) (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 baz çifti)

Çizelge 3.5.6.4.Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri ve uzunlukları

Gen		Oligonükleotid dizisi	Bç
β-Aktin	F	5'-CCAACCGCGAGAAGATGACC-3'	20
	R	5'-GGAGTCCATCACGATGCCAG-3'	
CD 90 (Thy-1)	F	5'-CCGAACCAACTTCACCAG-3'	18
	R	5'-GATGCCCTCACACTTGAC-3'	
Vimentin	F	5'-AGACGGTTGAAACTAGAGATGG-3'	22
	R	5'-GCAGAAAGGCACTTGAAAGC-3'	20
BMP-4	F	5'-ACTACATGCGGGATCTTTACC-3'	21
	R	5'-TGGGATGTTCTCCAGATGTTC-3'	
Nanog	F	5'-AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG-3'	23
	R	5'-TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC-3'	24

3.5.7. Verilerin Analizi

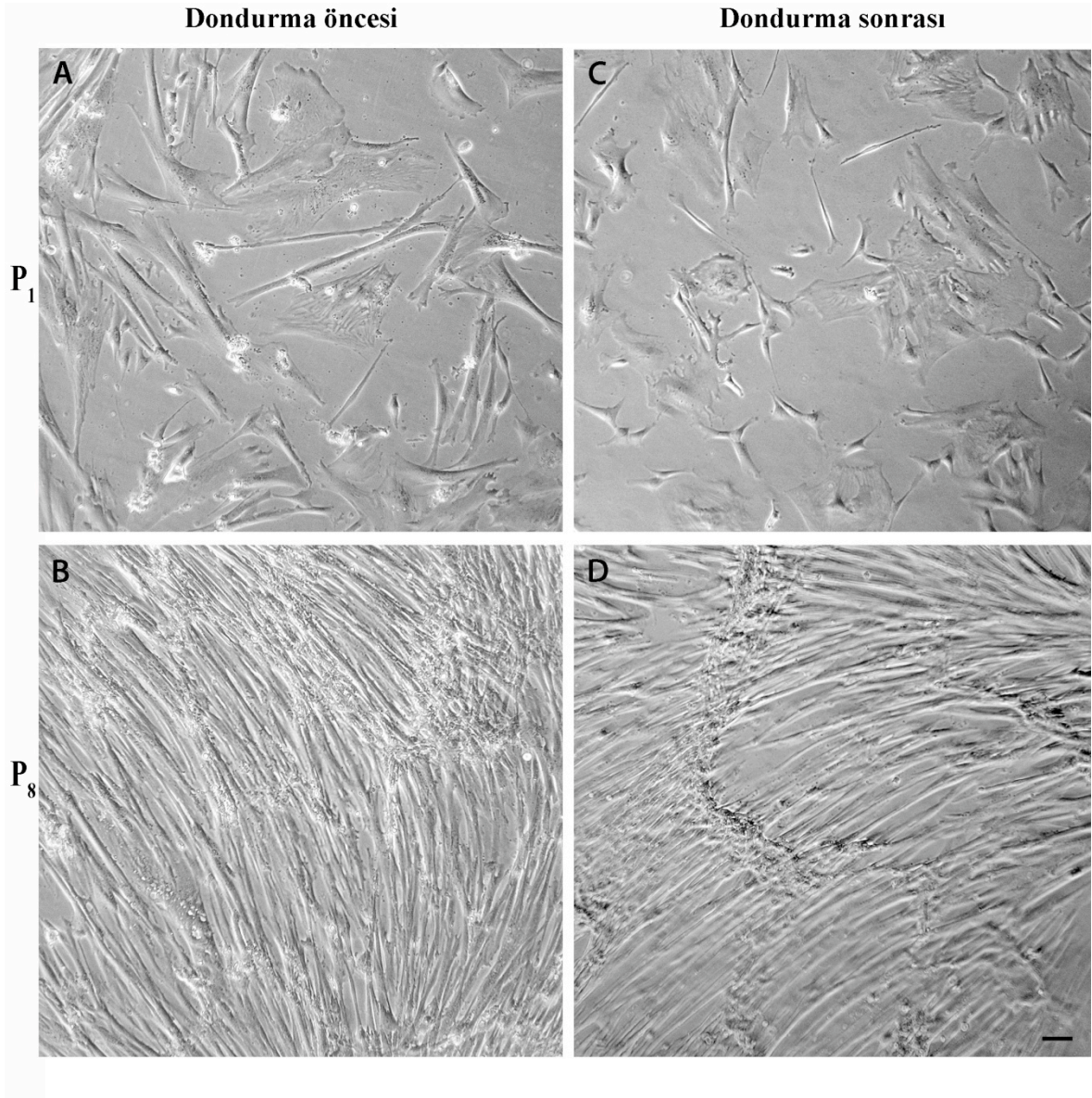
Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, RT-PCR sonuçları *Rotor-gene 6000 series software version 1.7 (Build 61)* yazılımı ile kantite edilmiş, korelasyon analizi ise XLSTAT 2008 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hücre Morfolojisi

Donmamış İGKS dokusundan hücre izolasyonu yapılıp *in vitro* ortama alındıklarında faz kontrast mikroskopuyla alınan canlı görüntülerde iki farklı morfolojide hücre izlendi. Hücrelerin bazıları çok geniş, poligonal sitoplazmalı olup belirgin gergi liflerine sahipken, diğerleri daha fusiformdu (Şekil 4.1.1A.). İGKS dondurulup çözüldükten sonra hücre izolasyonu yapılıp elde edilen hücreler donmamış (taze) dokudan elde edilen hücrelerle kıyaslandığında hücre morfolojilerinde herhangi bir farklılık gözlenmedi. Donmamış dokuda olduğu gibi poligonal ve fusiform sitoplazmalı olarak iki farklı morfolojide hücre izlendi (Şekil 4.1.1C.).

Hücreler sekizinci pasaja kadar kültüre edilip gruplar arasındaki morfolojik yapı incelendiğinde dondurma öncesi ve sonrası grupta hücre morfolojisinde bir farklılık gözlenmedi. Hücreler ilk pasajlarda iki farklı morfolojide gözlenirken pasajlar ilerledikçe poligonal sitoplazmalı hücrelerin sayısının azaldığı fusiform hücrelerin kültür ortamında baskın hale geldiği izlendi (Şekil 4.1.1B,D.).

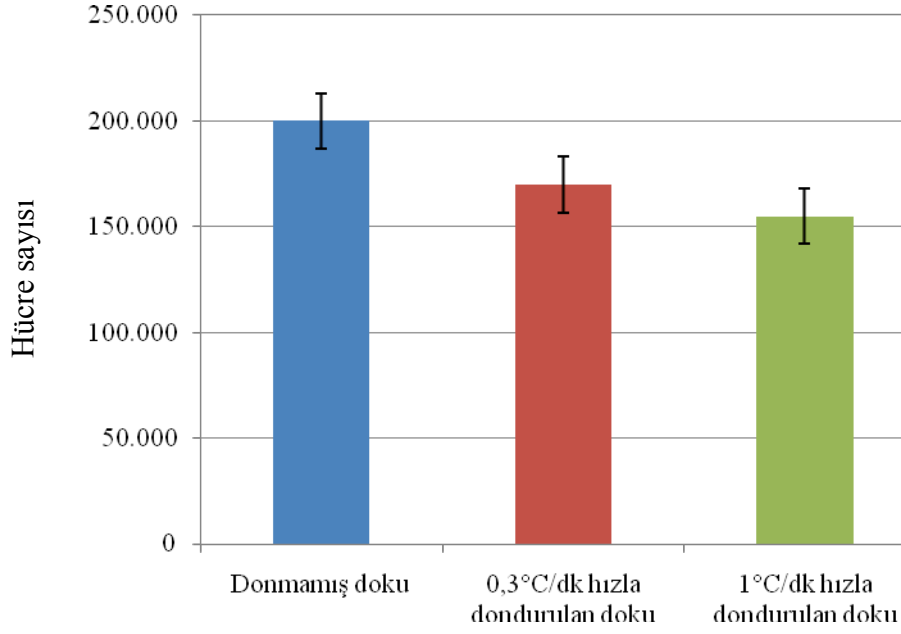


Şekil 4.1.1. Dondurma öncesi (A ve B) ve sonrası (C ve D) göbek kordonu stroması kök hücreleri. Dondurma öncesi izole edilmiş İGKS kök hücreleri kültür ortamına alındıklarında iki farklı morfolojide izlendi. Hücrelerden bazıları poligonal sitoplazmalı, ökromatik çekirdekli, gergi lifleri belirgin geniş hücreler olarak izlenirken, diğer hücreler fusiform sitoplazmalı, fibroblast benzeri hücrelerdi (A). Pasajlar ilerledikçe poligonal sitoplazmalı hücrelerin sayısının azaldığı fusiform hücrelerin kültür ortamında baskın hale geldiği izlendi (B). Dondurma sonrası izole edilmiş hücrelerin kültür ortamına alındıklarında da taze dokudan izole edilenlerdeki gibi iki farklı hücre tipi izlendi, özellikle erken pasajlarda poligonal hücreler bulunurken (C) ileri pasaj hücreleri fusiform şekildediydi (D). P: Pasaj, Ölçek çubuğu 10 µm.

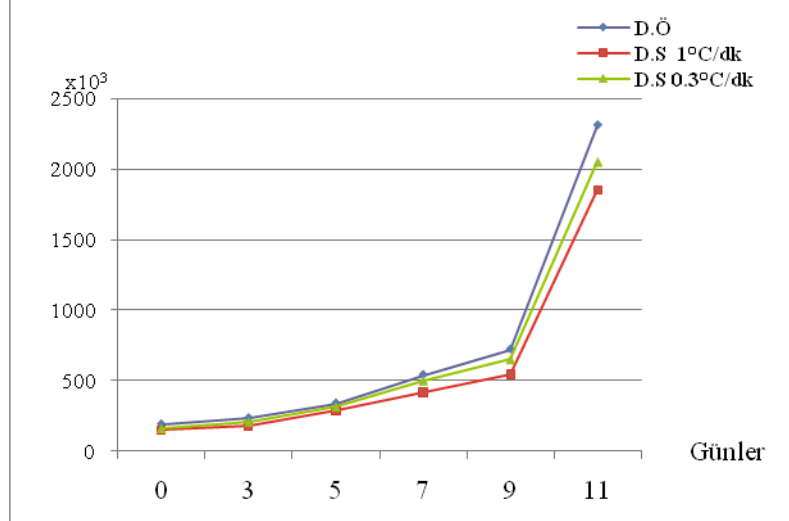
4.2. Hücre Sağkalım Oranları

Üzerinde çalıştığımız İGKS dokusunun iki farklı yöntem ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ve $1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$) kullanarak dondurulup çözüldükten sonraki hücre izolasyonu sonucu elde edilen hücre miktarı değerlendirilerek hücre sağkalım oranları belirlendi. Buna göre dokunun $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla dondurulması sonucu hücre sağkalım oranı $\% 85 \pm \%2,1$, $1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla doku dondurulması sonucu hücre sağkalım oranı $\%75 \pm \%3,4$ olarak saptandı (Şekil 4.2.1.).

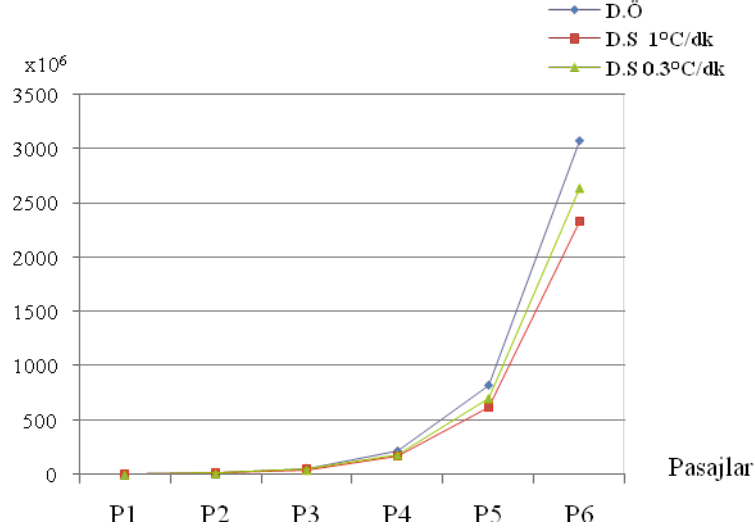
Hücreler kültür ortamına alındıkları ilk 14 günlük kültürlerinde (P_0) hücre sayımı yapılarak çoğalma eğrileri saptandı. Bunun sonucu, hücrelerin ilk 6-7 gün boyunca kültür ortamına adaptasyon süresi içinde, büyümenin ilk evresi olan bekleme aşamasını geçirdiği (*latent dönem* veya *lag fazı*), bunu izleyen 6-8 günde büyümenin ikinci evresi logaritmik faza (*log fazı*) geçtikleri gözlemlendi (Şekil 4.2.2.). Bu evrelerde hücrenin çoğalma hızı, hücre sayısının iki katına çıkma süresi hesaplanarak belirlendi. Hücreler izole edilip kültür ortamına alındıktan 11-14 gün sonra $\%100$ çoğalma düzeyine (konfluensi) ulaştı. Taze ve iki farklı hızda dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin çoğalma eğrileri pasajlar boyunca karşılaştırıldı (Şekil 4.2.3.). Uygulanan yöntemle dondurulan ve çözülüp kültür ortamına alınan hücrelerin çoğalma eğrisi incelendiğinde donmamış dokuya kıyasla farklılık gözlenmedi. Hücre sayısının iki katına çıkma süreleri incelendiğinde de anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.2.4.). P_3 - P_7 süresi içinde dondurulmamış örneklerde bu süre 3,46; dondurulmuş örneklerde ise 3,48 bulundu ($p>0.05$).



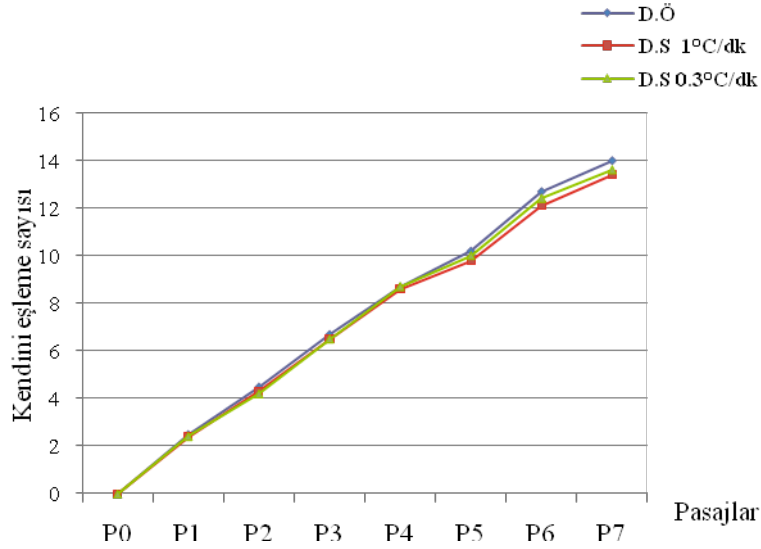
Şekil 4.2.1. Dondurulmamış İGKS, 0,3°C/dk ve 1°C/dk hızla dondurulan İGKS dokusundan kök hücresi izolasyonu sonucu elde edilen hücrelerin sağkalım değerleri. Dondurulmamış İGKS dokusuyla, 0,3°C/dk hızla dondurulan İGKS dokusu arasında hücre izolasyonundan sonra elde edilen hücre sayısında %15'lik bir azalma görülürken, 1°C/dk hızla dondurulduğunda arasındaki fark %25'e çıkmıştır.



Şekil 4.2.2. Hücrelerin izolasyondan hemen sonraki 11 günlük kültüründe (P₀) çoğalma eğrisi. Dondurulmamış, 0,3°C/dk ve 1°C/dk hızla dondurulan dokudan elde edilen İGKS hücrelerinin kültür ortamına alındıklarındaki çoğalma hızları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05). D.Ö: Dondurma öncesi, D.S: Dondurma sonrası



Şekil 4.2.3.Hücrelerin pasajları süresinde kültür ortamındaki çoğalma eğrisi. Yedi pasajlık süreçte dondurulmamış İGKS dokusundan izole edilen hücrelerin çoğalma eğrisi ile iki farklı hızla dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin çoğalma eğrileri kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmadığı saptandı ($p>0.05$). P₅ ve P₆ pasajlarında elde edilen hücre sayısı farkının başlangıçta ekilen hücre sayısı farkından (bkz. Şekil 4.2.1.) kaynaklandığı sonucuna varıldı. D.Ö: Dondurma öncesi, D.S: Dondurma sonrası.



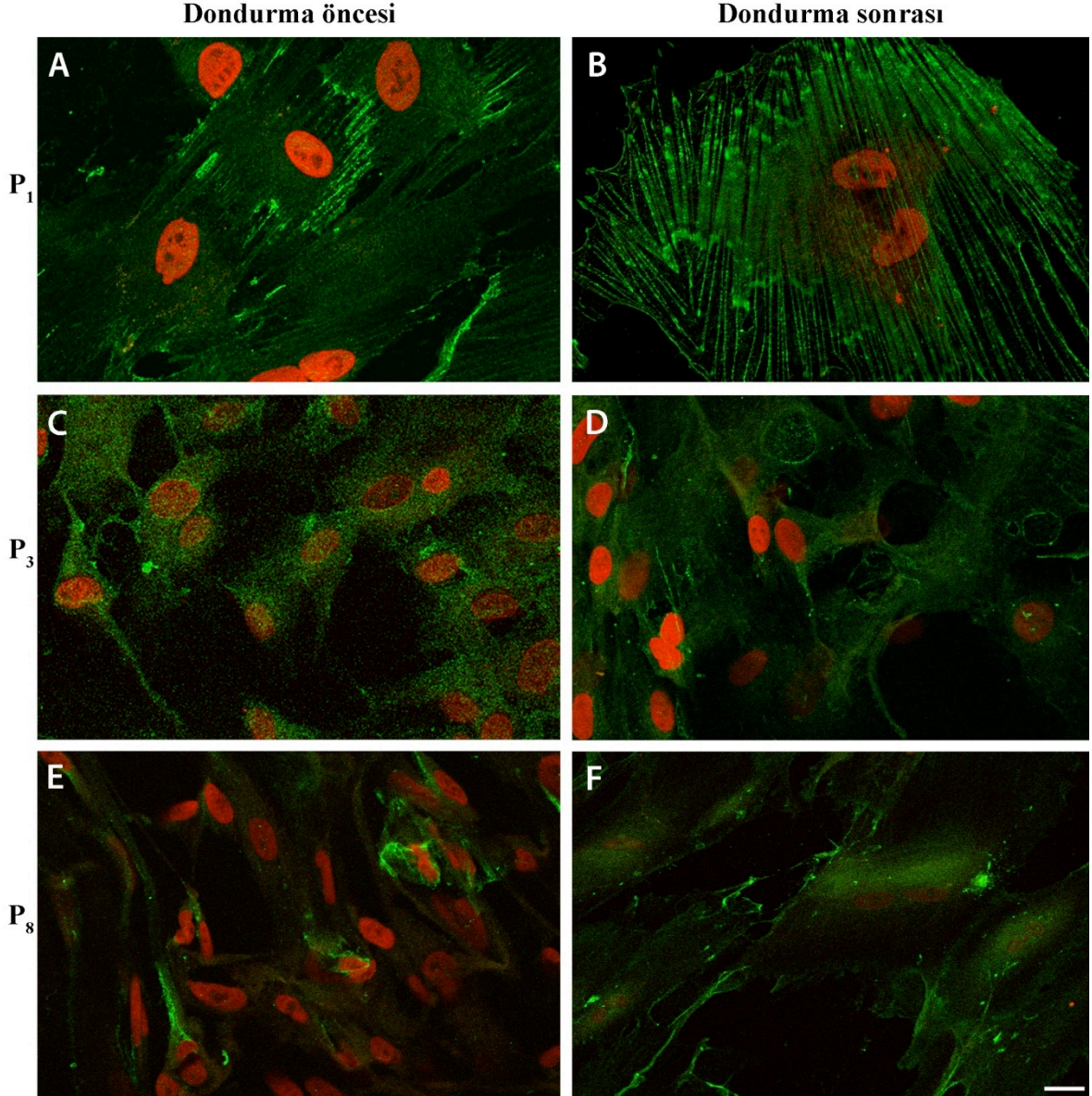
Şekil 4.2.4.Hücrelerin pasajları süresinde kültür ortamındaki kendini eşleme eğrisi. Dondurulmamış ve dondurulmuş İGKS dokularından elde edilen hücrelerin kültür ortamına alınarak pasajlanmaları boyunca kendini eşleme süreleri arasındaki fark incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). D.Ö: Dondurma öncesi, D.S: Dondurma sonrası.

4.3. Hücrelerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

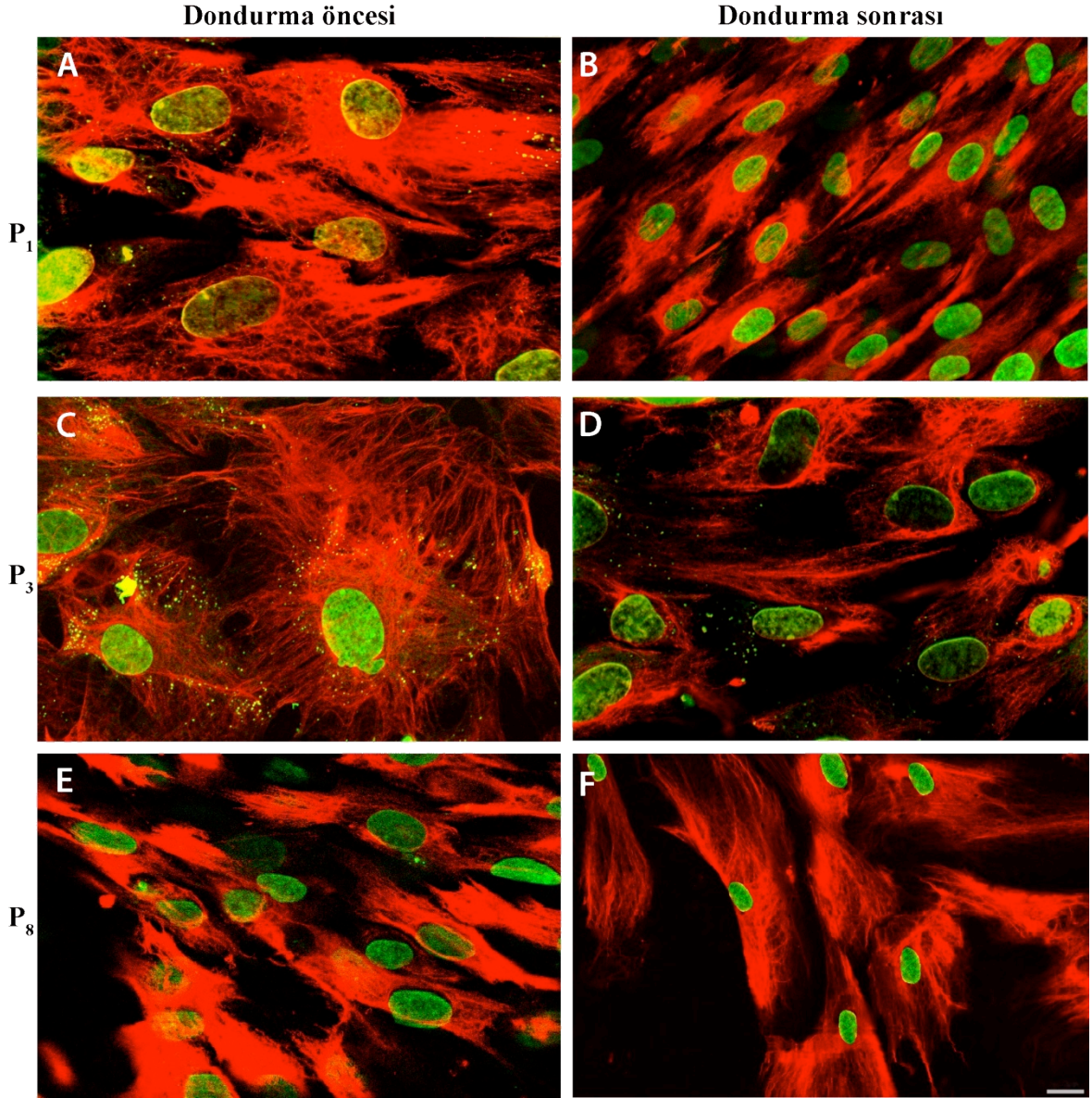
Çalışmanın bu aşamasında dondurulmamış ve dondurulmuş İGKS dokularından elde edilen hücrelerin yapısal bazı proteinlerinin hücre içindeki varlığı ve yaygınlığı immünflüoresan işaretleme sonrası konfokal mikroskobu yardımıyla analiz edildi. Sonuçlar Şekil 4.3.1.-4.3.4.'te özetlenmiştir.

Daha önce İGKS hücrelerinde ifade paternleri bilinen belirteçler açısından incelendiğinde, mezankimal kök hücre belirteci olan CD105 (endoglin) açısından donmamış dokudan ve donmuş dokudan izole edilen hücreler P₁, P₃ ve P₈. aşamalarda incelenmiş, her iki grupta da CD105 hücre yüzeyinde belirlenmiştir, varlığı ve yerleşimi bakımından herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.3.1.). Mezankimal ve endo-/ektodermal bir belirteç olan ve hücrede ara filaman olarak görev yapan vimentin ve sitokeratin açısından değerlendirildiğinde vimentin her iki grupta da tüm hücrelerde izlenirken (Şekil 4.3.2.) sitokeratinin her iki grup içinde poligonal sitoplazmalı hücrelerde belirgin varlığı saptandı (Şekil 4.3.3.). Kontraktıl proteinler olan desmin ve α -düz kas aktini bakımından incelendiğinde desminin pasajlar boyunca her iki grup hücrede de varlığı saptanmadı. Alfa-düz kas aktini'nin pasajlar boyunca yerleşimi ve dağılımı açısından dondurma öncesi ve dondurma sonrası grupları arasında fark saptanmadı (Şekil 4.3.4.).

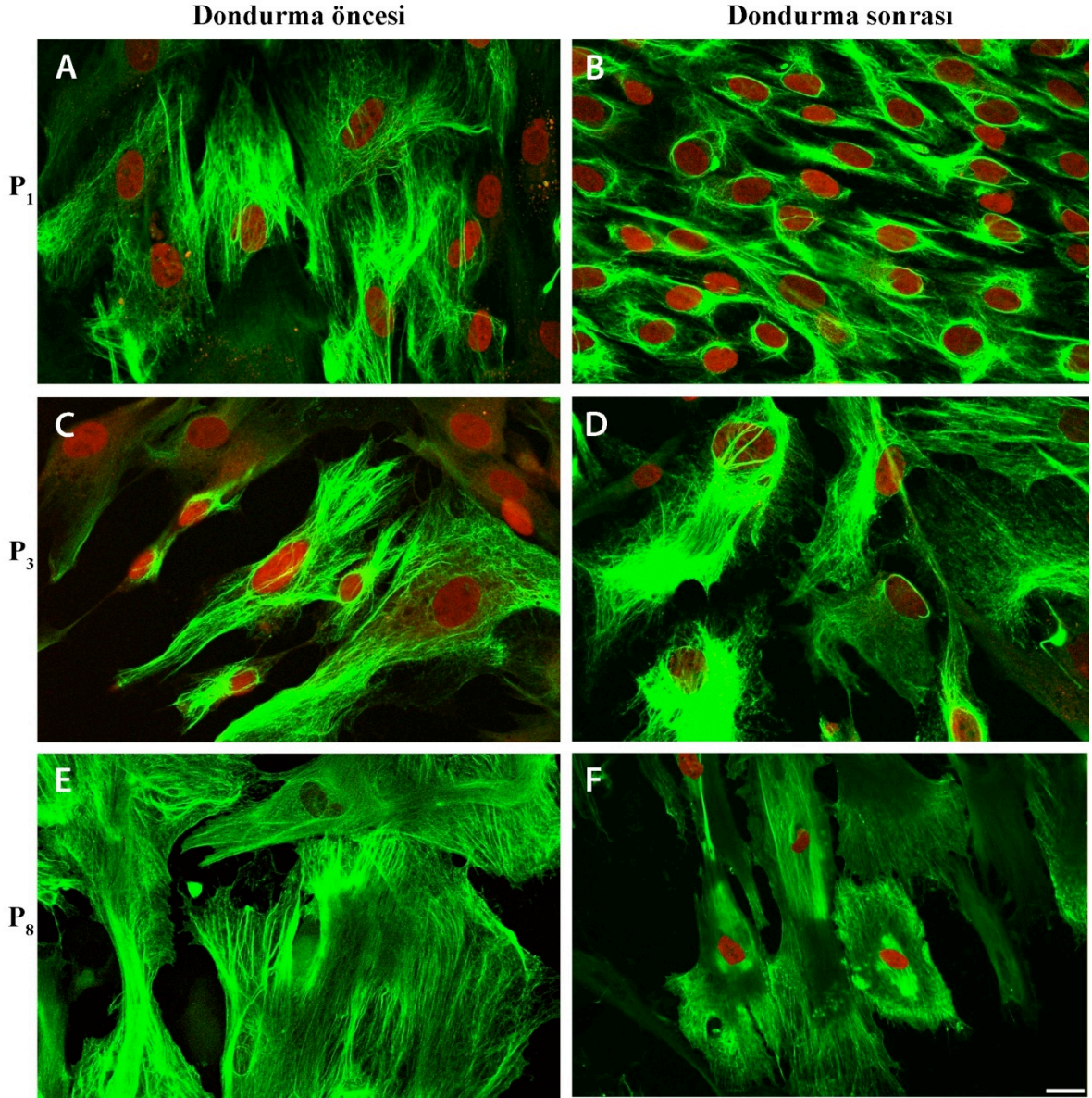
İGKS dokusunun çalışmada kullanılan 0,3°C/dk hızla dondurulup çözüldükten sonra izole edilen hücrelerin kültür ortamındaki mitotik sürecine bakıldığında hücrelerin interfaz, profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez aşamalarını sağlıklı bir şekilde geçtikleri izlendi (Şekil 4.3.5.).



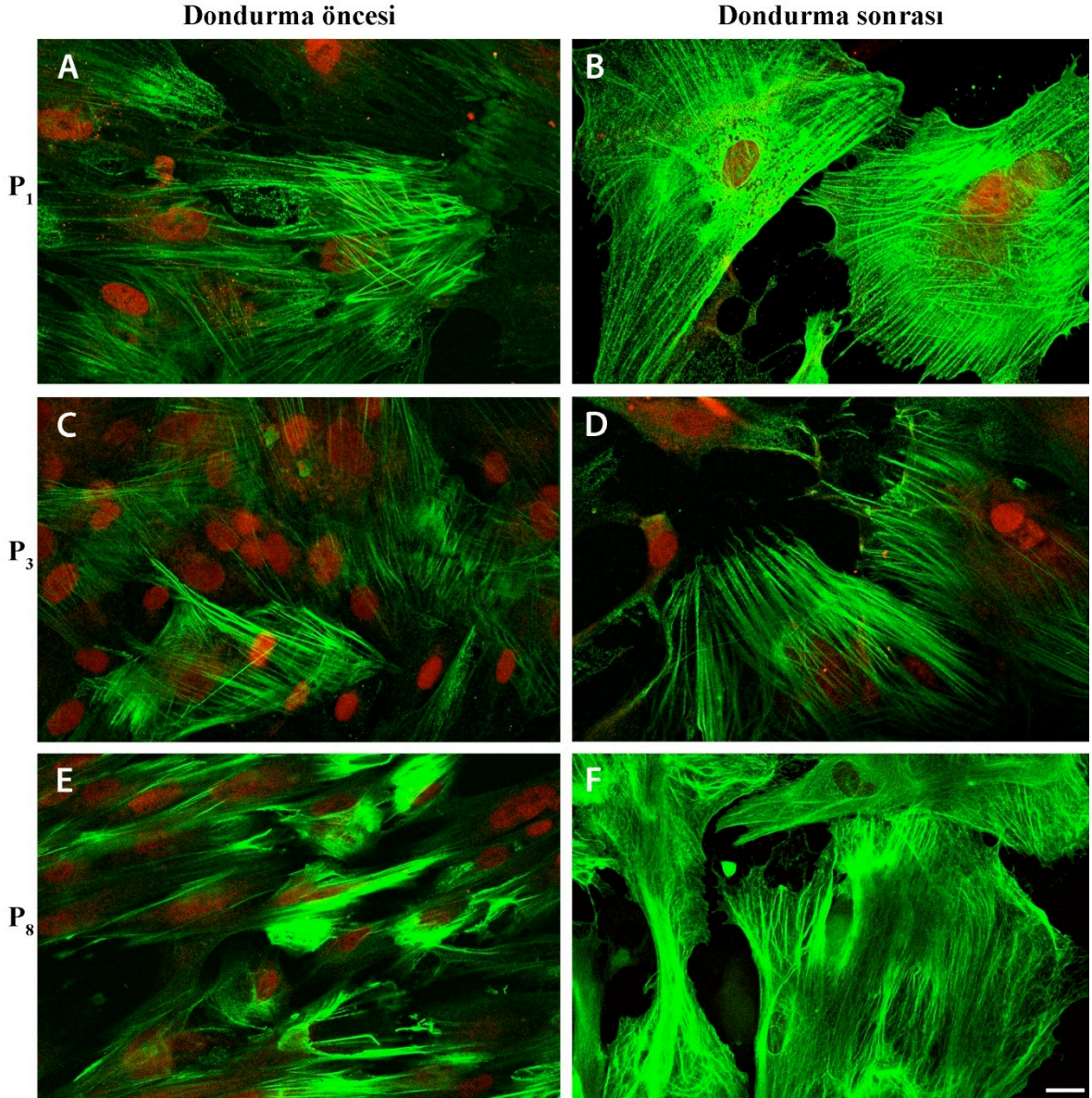
Şekil 4.3.1. İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki CD105 değerlendirilmesi. Dondurma öncesi P₁ (A), P₃ (C), P₈ (E) ve dondurma sonrası P₁ (B), P₃ (D), P₈ (F) de CD105 (yeşil), çekirdekler(kırmızı) olarak izlenmektedir. Taze ve dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin kültür ortamında CD105 ifade ettikleri gözlemlendi. CD105 tüm hücrelerde hücrenin substrata temas ettiği zar bölgesinde ince çizgisel olarak izlendi. Taze ve dondurulmuş dokudan elde edilen hücrelerin erken pasajlarında (P₁) dominant olan CD105 miktarı geç pasajlarda (P₈) azalmış olarak bulundu. Dondurma öncesi ve sonrası gruplar arasında pasajlar boyunca yerleşim ve miktar açısından bir fark belirlenmedi. Ölçek çubuğu 20 µm.



Şekil 4.3.2. İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki vimentin filamanlarının değerlendirilmesi. Dondurma öncesi P₁ (A), P₃ (C), P₈ (E) ve dondurma sonrası P₁ (B), P₃ (D), P₈ (F) de vimentin (kırmızı), çekirdekler (yeşil) olarak izlenmektedir. Dondurma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış dokudan elde edilen hücreler kültür ortamına alındığında tüm hücrelerde vimentin filamanlarının varlığı saptandı ve sitoplazmaya yaygın halde olduğu izlendi. Dondurma öncesi ve sonrası gruplarda pasajlar boyunca hücreler arasında vimentin dağılımı açısından bir fark saptanmadı. Dondurulan dokudan izole edilen hücrelerin ileri pasajlarında hücre sayısının daha az ve daha büyük olduğu izlendi. Ölçek çubuğu 20 µm.

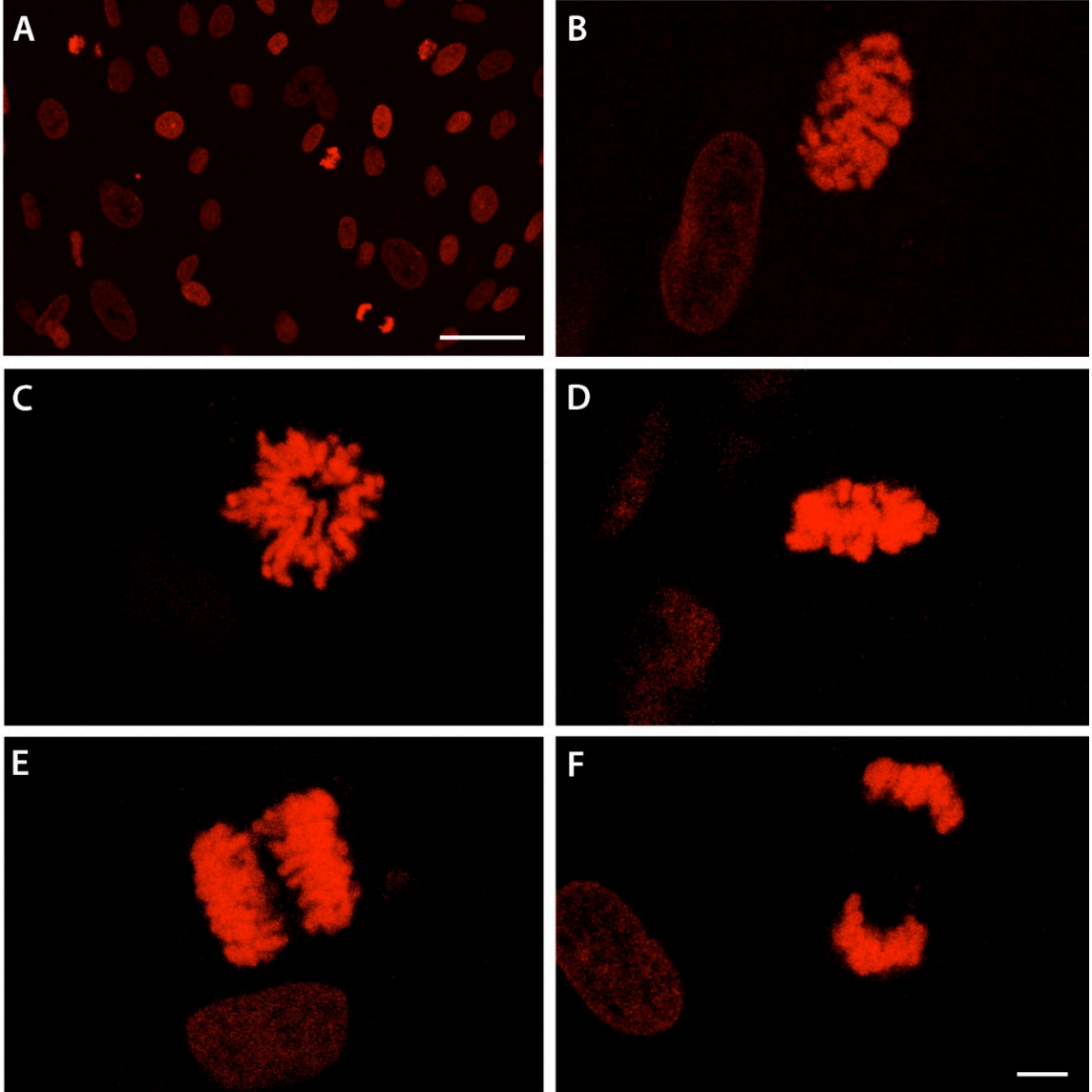


Şekil 4.3.3. İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki sitokeratinin değerlendirilmesi. Dondurma öncesi P₁ (A), P₃ (C), P₈ (E) ve dondurma sonrası P₁ (B), P₃ (D), P₈ (F) de sitokeratin filamanları (yeşil), çekirdekler (kırmızı) olarak izlenmektedir. Taze ve dondurulmuş dokudan izole edilen hücreler kültür ortamına alındığında sitokeratinin varlığı sadece bir grup hücrede saptandı. Bu hücrelerde sitoplazmada yaygın halde sitokeratin dağılımı söz konusuydu. Dondurma öncesi ve sonrası gruplardan izole edilen P₁ ve P₃ hücrelerinde sitokeratin dağılımı benzer iken, P₈ de sitokeratin filamanlarından pozitif olan hücre sayısında bir azalma belirlendi. Ölçek çubuğu 20 µm



Şekil 4.3.4. İnsan göbek kordonu stroma hücrelerinin kültür ortamındaki α -düz kas aktini değerlendirilmesi. Dondurma öncesi P₁ (A), P₃ (C), P₈ (E) ve dondurma sonrası P₁ (B), P₃ (D), P₈ (F) de α -düz kas aktini (yeşil), çekirdekler (kırmızı) olarak izlenmektedir. Pasajlar boyunca hücre sitoplazmasında yaygın olarak bulunmaktadır. Taze ve dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin kültür ortamında α -düz kas aktinini pasajlar boyunca ifade ettikleri gruplar arasında hücre içindeki dağılımı açısından bir fark olmadığı izlendi. Dondurulmuş dokudan izole edilen hücrelerin ileri pasajlarda büyüdüğü görüldü. Ölçek çubuğu 20 μ m

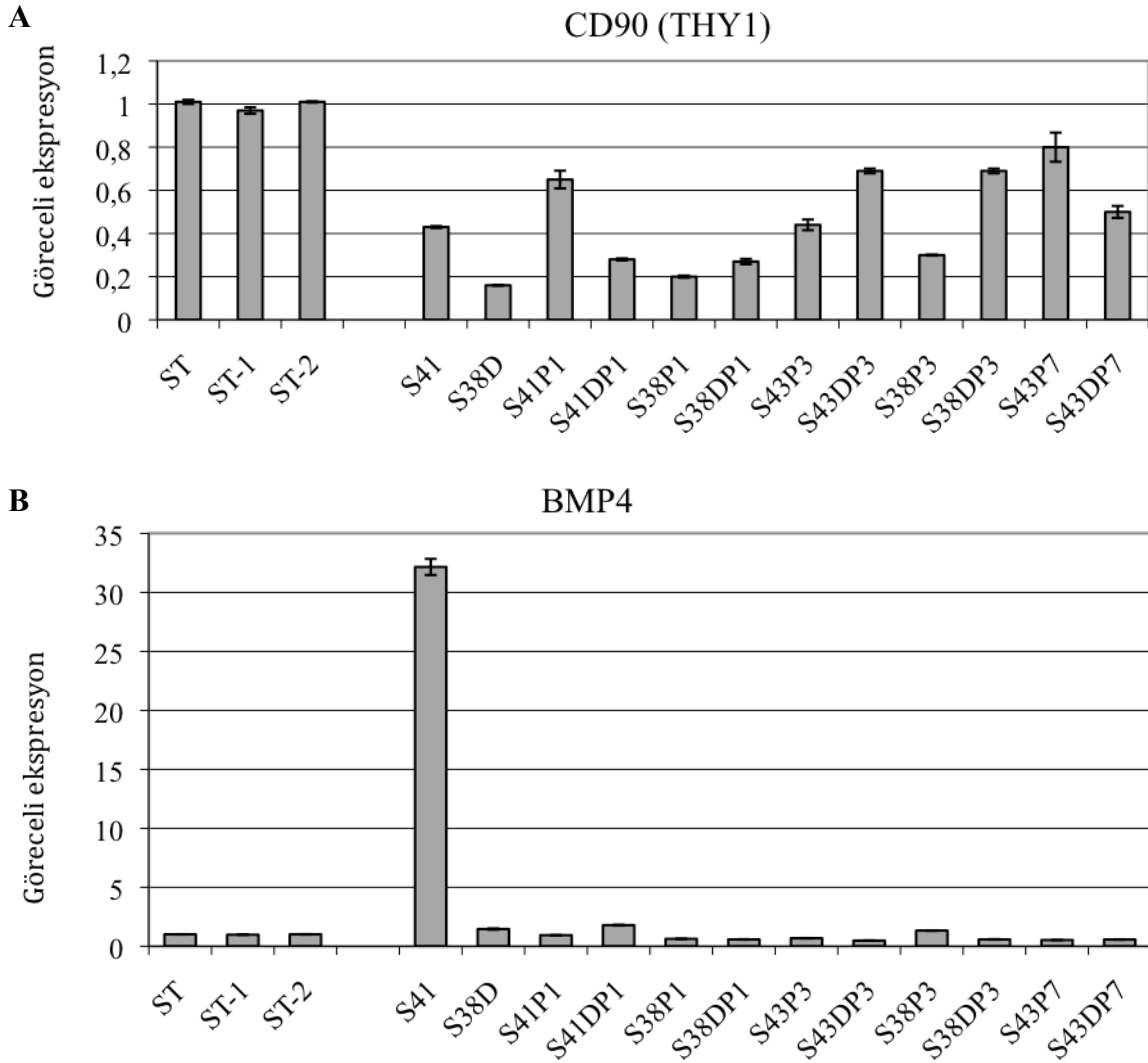
Dondurma sonrası mitotik aşamalar

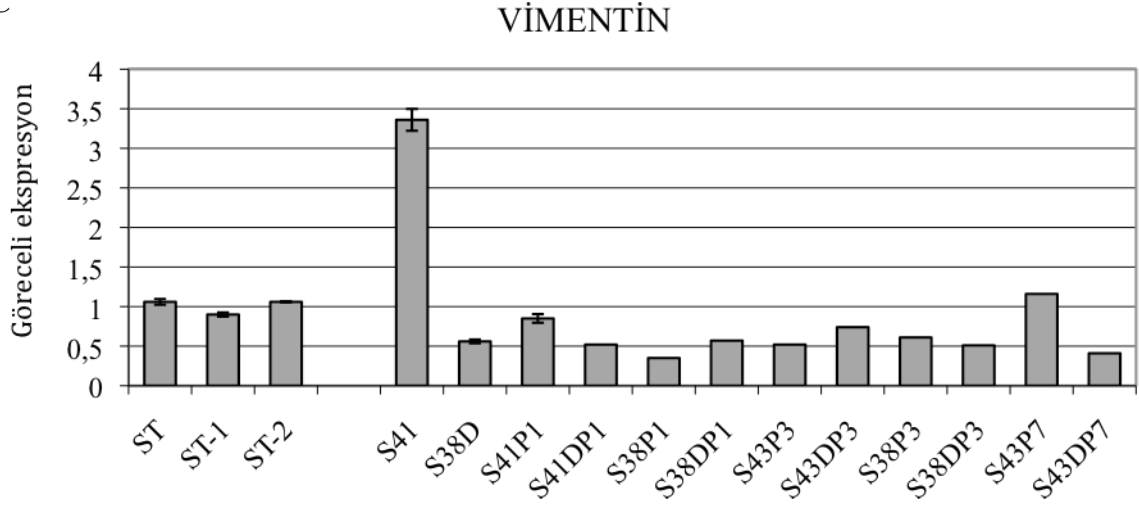
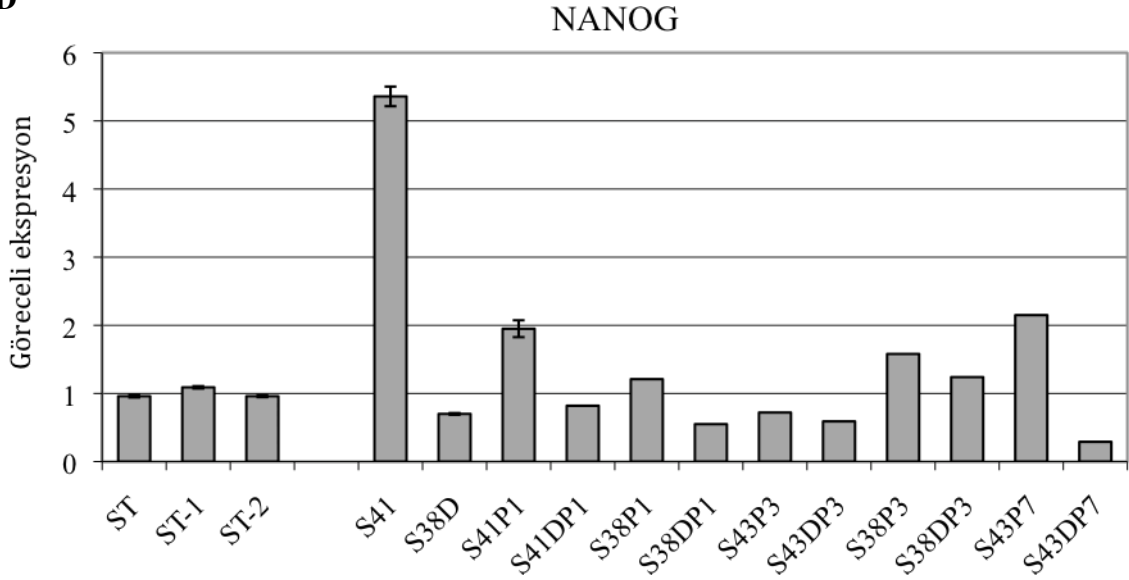


Şekil 4.3.5. Dondurma sonrası dokudan izole edilen hücrelerin mitoz bölünme aşamaları. Çekirdekler ve kromozomlar 7AAD (kırmızı) ile işaretlenmiştir. (A) Hücrelerin kültür ortamındaki genel görünümü. (B) Profaz. (C) Prometafaz. (D) Metafaz. (E) Anafaz A. (F) Anafaz B. Ölçek çubuğu (A) 50 μm , (B) 5 μm .

4.4. Hücrelerde Yapısal Gen İfadelerinin İncelenmesi

Taze ve dondurulmuş dokudan izole edilen hücreler kültür ortamına alınarak P₁, P₃ ve P₇ pasajlar sonunda daha önce dondurulmamış İGKS hücrelerinde ifade olduğu bilinen CD 90 (Thy1), vimentin, BMP-4 ve Nanog belirteçlerinin gen ifadeleri RT-PCR tekniğiyle belirlendikten sonra düzeyleri birbiriyle kıyaslandı. Örnekten örneğe aynı pasajlarda ifade miktarının değişebildiği gözlemlendi (Şekil 4.4.1.). Örnekler arasında izlenen varyasyonun dondurma çözme sonrasında izlenen varyasyondan daha fazla olduğu izlenirken, aynı örneğe ait taze ve dondurulmuş dokudan izole edilen hücrelerin kültür ortamındaki benzer pasajları arasında gözlenen değişimler “normal varyasyon” olarak değerlendirildi ve anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0,05$).

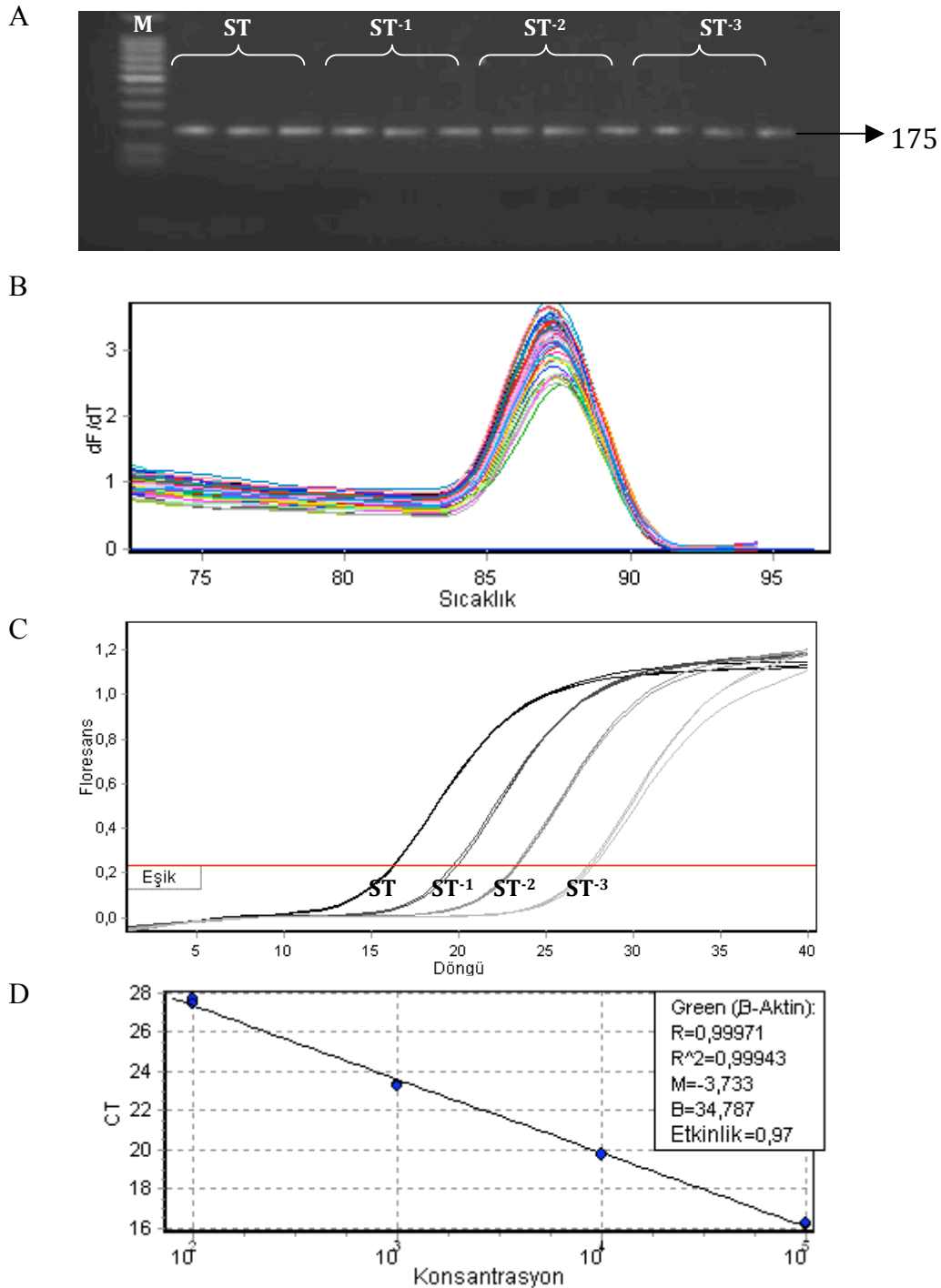


C**D**

Şekil 4.4.1. İGKS hücrelerinde ifade olduğu bilinen yapısal genler. S: örnekleri, P: pasajları ifade etmektedir. Dondurma öncesi ve dondurma sonrası İGKS dokusundan izole edilen hücreler kültür ortamına alındığında pasajlar ve örnekler arasındaki (A) CD90 (B) BMP4 (C) vimentin (D) nanog gen ifade düzeyleri kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.4.1. β -aktin gen ifadesi bulguları

Hücrelerdeki β -Aktin ifadesinin kantitatif analizinde dondurulmayan İGKS dokusundan izole edilen hücrelerden elde edilen cDNA ile hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görüldü. Agaroz jel elektroforezinde 175 bp. uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiş, bu bulgu erime eğrisi analizinde standartlar ve örneklerin aynı Tm derecesinde tepe noktası vermesi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.4.1.).



Şekil 4.4.2. β -aktin geni RT-PCR analizi sonuçları

A) Standartların agaroz jel elektroforezi sonuçları. **B)** Standartların ve örneklerin erime eğrisi grafiği. **C)** Standart dilüsyonlar için, gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **D)** Standart dilüsyonların Ct değerleri ve standartlara atfedilen varsayılan değerler kullanılarak elde edilen standart eğri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Literatüre yaptığı önemli katkılarıyla araştırma grubumuz İGKS mezankimal kök hücrelerinin izolasyon yöntemi, tanımlanması ve farklılaşma özelliklerinin yanı sıra, bu hücrelerin pek çok dinamiğine ilişkin veriye sahip bulunmaktadır. Bu durumda bu hücrelerin hem araştırmacılar hem de klinisyenler tarafından yaygın olarak kolay bir şekilde kullanılabilmesi amacıyla atılması gereken adımların başında bu hücrelerin elde edildiği kaynağın işleneceği merkeze ulaşıncaya kadar korunmasının sağlanması için gerekli koşulların yaratılması gerekmektedir. Günümüzde, organizmadan yaşam bağı kesmiş dokudaki hücrelerin canlılıklarının geçici süreyle durdurulması ve istenildiği zaman tekrar başlatılabilmesi için geçerli sistem dondurma işlemidir. Programlanabilen soğukta koruma yani kontrollü olarak dondurarak saklama işlemleri uzun zamandır IVF (in vitro fertilizasyon) merkezlerinde insan embriyonlarının dondurulması amacıyla kullanılmaktadır. Ovaryum dokusunun soğukta korunması ise bu konuda üzerinde en çok çalışma yapılan alanların başında gelmektedir. Buna karşın onarımsal tıbbın en güncel konusu olan kök hücre biyolojisinde kaynak dokuların korunmasına ilişkin girişimler henüz başlangıç aşamasındadır. İGKS'sının dondurulması ve ardından etkin şekilde kök hücrelerin elde edilebileceğini gösteren bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, İGKS'sının kontrollü dondurma yöntemiyle saklanmasının ardından elde edilen mezankimal kök hücrelerin özelliklerini ve etkinliklerini kaybetmedikleri pek çok açıdan gösterilmiştir.

Embriyonun, dokuların ve hücrelerin çeşitli amaçlarla saklanması amacıyla dondurma protokolleri üzerine gerçekleştirilen araştırmalar dondurma süresi, hızı ve dondurma çözeltileri gibi değişkenlerin işlemin başarısı üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir(Brockbank KGM 2001). Standart dondurma işlemlerinin mevcut olmamasının yanı sıra buna bağlı sonuçların da değerlendirilmesinde bir görüş birliğine varılmamış olup yöntemin etkinliği genellikle deneme-yanılma yöntemleriyle sınınmaya çalışılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerle dondurma öncesi ve sonrası hücrelerin özelliği pek çok açıdan değerlendirilebilmiştir. Bunun yanı sıra dondurma sonrası elde edilen veriler yaklaşık altı yıldır aynı laboratuvarın elde ettiği kümülatif verilerle kıyaslanma şansı bulmuştur.

İGKS dokusundan elde edilen mezankimal kök hücre miktarının kordon kanı ve kemik iliği mezankimal kök hücreleri ile kıyaslandığında daha fazla olduğu ve İGKS hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin 7. pasaj sonunda 300 kata ulaşarak bu hücrelerin çoğalma kapasitelerinin cesaret verici olduğu gösterilmiştir (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Bu araştırma kapsamında İGKS dokusu farklı protokollerle dondurma işlemlerine alınmış ve çözme işlemleri ardından elde edilen veriler dondurulmamış dokularla elde edilen verilerle pek çok yönden kıyaslandığında uygulanan protokollerin güvenilirliğini ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar 0,3°C/dk hızla yavaş dondurma yöntemiyle, uygun dondurma çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen dondurma işlemlerinin hücre morfolojisi, sağkalımı ve yapısal proteinler açısından orijinale yakın değerlerin elde edilebildiğini göstermiştir.

Yapılan bu çalışma İGKS'sının dondurulup çözülmesi sonucu bu dokudan elde edilen mezankimal karakterdeki hücrelerin donmamış dokuya kıyasla hücre morfolojilerini ve çoğalma kapasitelerini pasajlar sonucu koruduklarını ortaya koymuştur. Fenotipik olarak kordon matriksinde iki farklı alanın farklı hücrelerinin varlığı gösterilmiştir. İGKS dokusundan izole edilen hücreler kültür ortamına alındıkları erken pasajlarda bu iki morfolojik özelliğini koruduğu ve pasajlar ilerledikçe bir tip morfolojik karakterin baskın hale geldiğini ortaya konmuştur (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Yaptığımız çalışmalarda da gerek dondurulmuş gerekse dondurulmamış dokudan izole ettiğimiz hücrelerde bu iki farklı morfolojik özelliğe sahip hücreyle karşılaşmış ve pasajlar boyunca daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi tek tip hücrenin baskın hale geçtiği gözlenmiştir. Buda bize uygulanan dondurma yönteminin dokunun sahip olduğu hücreler üzerinde değişime neden olmadığını, doku yapısının dondurma işleminden önceki gibi korunduğunu ortaya koymuştur.

In vivo ve *in vitro* ortamdaki hücresel farklılaşma hücre morfolojisiyle, diğer bir değişle hücre içi ara filaman proteinlerin yerleşimiyle bağlantılıdır. Hücrelerde ifade bulan ara filamanlar embriyonik gelişim ve hücresel farklılaşma sırasında hücre tipine özgü dağılım göstermektedirler (Herrmann ve Aebi 2000). Bu durumda belirli hücre iskeleti elemanlarının, dokunun belirli bölgelerinde farklı ifade bulması ve bu hücrelerin dokudan izole edildikten sonra aynı özellikleri kültür ortamında koruyup korumadıklarının belirlenmesi bu hücrelerin yapısının incelenmesinde önemli olduğunu göstermektedir.

Sitokeratinler 55-69 kDa molekül ağırlığındaki proteinlerdir ve ekto-/endodermal kökenli epitel hücrelerinde gözlenirler. Sitokeratin 8, 17, 19 gibi bazı sitokeratin izoformları miyofibroblastik hücrelerde de ifade bulurlar (Bozhoklu ve Bannikov et al. 1989) ve pansitokeratin antikoruna tarafından tanınırlar. İGKS hücrelerinde benzer şekilde sitokeratinin ifadesiyle hücrelerin yapısının karakterizasyonu sağlanabilmektedir (Moll ve Zimbelmann et al. 1993). Pansitokeratinin göbek kordonu dokusunun damar duvarının etrafındaki hücrelerde, yani perivasküler alanda ifadelendiği ve kültür ortamında tip 1 olarak adlandırılan hücrelerde varlığı ortaya konmuştur (Nanaev ve Kohnen et al. 1997, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Dondurma işlemi sonucu elde edilen hücrelerde sitokeratin varlığının tek tip hücrede oluşu bu görüşü destekler. Dondurma öncesi ve sonrası grupta erken pasajlarda (P₁-P₃) sitokeratin miktarı değişmezken pasajlar ilerledikçe sitokeratin miktarının azalması sitokeratin içeren hücre sayısının azalmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Hücre içi yapısal protein olan vimentin 50 kDa'luk bir protein olup mezodermal kökenli hücrelerde bulunur (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). İGKS dokusunda vimentinin hem perivasküler hem de intervasküler alanda ifade bulduğu ve dokudaki hücrelerin izolasyonu sonucunda kültür ortamına alınan hücrelerin, her iki fenotipteki hücrede ifadelendiği Can ve ark. (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007) tarafından gösterilmiştir. Vimentin ifadesinin kültür ortamında da sürdürülüyor olması hücre tarafından mezankimal özelliklerinin korunduğunu gösteren önemli bir kanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Dondurma işlemi öncesi ve sonrası dokudan elde edilip kültür ortamına alınan hücrelerde her iki tip hücrede de vimentin varlığı İGKS hücrelerinin bu potansiyele sahip olduğunu destekler ve dondurma işleminin hücrelerin bu özelliğini etkilemediğini ortaya koyar.

Bir diğer mezankimal kök hücre belirteci de CD105 (endoglin) olan tip1 zar glikoproteinidir, hücre yüzeyinde lokalize olur ve TGF- β reseptör kompleksinin bir parçasıdır. Endotel hücrelerinde, aktive edilmiş makrofajlarda, fibroblast ve düz kas hücrelerinde varlığı gösterilmiştir. Hücre morfolojisini ve göçünü hücre içi iskeletini organize ederek etkilediği bilinmektedir (Sanz-Rodriguez ve Guerrero-Esteo et al. 2004). İGKS hücrelerindeki varlığı bazı gruplar tarafından gösterilmiştir (Wang ve Hung et al. 2004, Lupatov ve Karalkin et al. 2006). Bu çalışmada da dondurulan ve dondurulmayan dokudan elde edilen hücrelerin kültür ortamında CD105 pozitifitesi incelenmiştir. Erken pasajlarda CD105 dominantken pasajlar ilerledikçe varlığının azalması hücrelerin doğal

ortamlarından çıkarılarak kültür ortamına alınması sonucu gittikçe bu özelliklerini kaybettiklerini düşündürmektedir.

Bir diğer hücre iskeleti proteini olan desmin miyojenik bir proteindir ve tüm kordon stroması boyunca vimentinle aynı dağılım paternine sahiptir (Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Bu sebeple İGKS hücrelerinin miyofibroblastik özellikte olduğu düşünülmektedir (Takechi ve Kuwabara et al. 1993, Kadner ve Zund et al. 2004). Sarugaser ve ark. (Sarugaser ve Lickorish et al. 2005) bu hücrelerin dokudan çıkartılıp kültüre edildiklerinde desmin ifade etmediklerini bildirmiştir. Bunun nedeninin izolasyon veya kültür koşulları olabileceği ileri sürülmüştür. Taze ve dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin kültür ortamında desmin yönünden negatif oluşu bu bulguyu destekler. Benzer sonuçlar Darby ve ark. (Darby ve Skalli et al. 1990) tarafından da yara iyileşmesi sonucu ortaya çıkan miyofibroblastlarda desminin ifadelendiği, sadece α -düz kas aktinin ifadelendiği belirtilmiştir. Alfa-düz kas aktini miyofibroblastlara özgü bir proteindir. İGKS dokusunda ve kültüre edilen hücrelerinde erken pasajlarda kuvvetli pozitif bulunmuş pasajlar ilerledikçe ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (Mitchell ve Weiss et al. 2003, Sarugaser ve Lickorish et al. 2005, Karahuseyinoglu ve Cinar et al. 2007). Bu çalışmada taze ve dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin kültüre edilmesiyle α -düz kas aktinini ifade ettikleri görülerek varlığı desteklenmiştir.

İGKS hücrelerinde ifade olduğu bilinen belirteçlerden birisi olan BMP-4, TGF- β ailesinin bir üyesidir ve embriyonik gelişimin erken evresinde önemli bir sinyal molekülüdür. İGKS hücrelerinde de varlığı gösterilmiştir (Koh ve Kim et al. 2008). Nanog ise embrionik kök hücrelerin (EKH) kendini eşlemesinde görevi olan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. EKH'lerde pluripotent özelliğin devam ettirilmesinden sorumlu olduğu düşünülür (Wozney ve Rosen et al. 1988). Diğer bir belirteç ise CD90 (Thy-1) hücre yüzey molekülüdür ve MKH'lere özgü bir belirteçtir. Bir diğer mezankimal kök hücre belirteci de vimentin molekülüdür her iki molekülün de İGKS hücrelerinde varlığı gösterilmiştir (Can ve Karahuseyinoglu 2007). Taze ve dondurulmuş dokudan elde edilen hücreler kültür ortamına alınıp pasajlar boyunca bu belirteçlerin varlığı kıyaslandığında dondurulan dokudan elde edilen hücrelerin mezankimal kök hücre özelliklerini koruduğu saptanarak bu nedenle uygulanan dondurma yönteminin hücre potansiyelleri üzerine olumsuz etki göstermediği kanısına varılmıştır.

Birçok çalışma çekirdeklenme sonrası soğuma oranının hücre morfolojisini ve sağkalımını etkilediğini göstermiştir. Tavşan ovaryum dokusunun soğukta korunmasında en uygun dondurma hızının $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ olduğu gösterilmiştir (Neto ve Buff et al. 2008). Birçok araştırmacı benzer dondurma hızını embriyon dondurmada kullanmaktadır (KG , Neto ve Buff et al. 2008). Koyunların ovaryumlarında yapılan bir çalışmada çekirdeklenme sonrası dondurma hızı $2^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ olduğunda morfolojik hasarı olmayan çok sayıda folükülün korunduğu gözlenmiştir (Demirci ve Salle et al. 2002). İnsan ovaryum dokusunun kullanıldığı bir başka çalışmada yavaş dondurma yöntemiyle çekirdeklenme sonrası dondurma hızı $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ olarak belirlenmiş ve böylece folüküllerin daha iyi saklandığını gözlenmiştir (Gook ve Edgar et al. 1999). Buna karşın başka bir çalışmada fare ovaryum dokusunun 0°C 'den -84°C 'ye kadar geleneksel embriyon dondurma protokolü olan $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ile pasif dondurma olan $1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla dondurulması arasında folüküler gelişim açısından herhangi bir farklılık saptanmamıştır (Cleary ve Snow et al. 2001). Her ne kadar, farklı sonuçlar elde edilse de bu iki dondurma hızı ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ve $2^{\circ}\text{C}/\text{dk}$) yavaş dondurma oranı olarak nitelendirilir ve gözlenen bu farkların hücreden hücreye değişen ve donma esnasında gözlenen çekirdeklenme sonrası hücredeki dehidratasyon düzeyinin farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir. Hızlı dondurma oranlarında hücrenin suyunu kaybetmesi için zaman tanınmadığından donma sırasında hücre içinde hücre için ölümcül olan buz kristalleri oluşur. Bunun yanı sıra çok yavaş dondurma oranlarında da hücre suyunu fazlaca kaybederek hücrede hasara neden olan yüksek tuz derişimiyle karşı karşıya kalır. Bu çalışma sonucunda İGKS'sının su içeriği dikkate alındığında yüksek oranda hücreler arası sıvı içeren jöle kıvamında bir doku olması nedeniyle $0,3^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla dondurmanın $2^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ hızla oranla hücre sağkalım oranlarını daha yüksek oranda koruduğu bulunmuş; bu nedenle daha etkin bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu deneysel yaklaşım kurgulanırken hücre içine giren ve giremeyen kriyokoruyucu maddelerin rolünü de ortaya koymak gerekirdi. Literatürde birçok dondurma yöntemi tanımlanmaktadır. Genelde DMSO hücre içine giren en etkin kriyokoruyucu madde olarak gösterilir. Hücre içine girmeyen kriyokoruyucu madde olarak sükrözün kullanımının sağkalım oranlarını arttırdığı gösterilmiştir. Hücre içine giren ve girmeyen kriyokoruyucu maddelerin birlikte kullanımıyla sağkalım oranlarının önemli ölçüde arttırıldığı bildirilmiştir. Sükrözle DMSO'nun kullanımı trehalozla DMSO'nun kullanımından daha etkin bulunmuştur (Neto ve Buff et al. 2008). Şekerlerle hücre içine giren kriyokoruyucu

maddelerin bir kimyasal bağlantısı mevcut değilse de Marsella ve ark. (Marsella ve Sena et al. 2008) sükrözün yararlı etkisini göstermiştir. Sükröz fosfolipit zarların polar kısımlarıyla hidrojen bağı yaparak hücre zarlarını ve proteinlerini sabitleştirip etkisini gösterir. Bu özellik susuz koşullarda hücre zarının bütünlüğünün korunmasını sağlar. Ayrıca soğuma esnasında lipit faz ayrımı sırasındaki sıcaklığı ayarlar (Crowe ve Mouradian et al. 1984). Sükröz biyomoleküllerin hücre zarlarının ve hücrelerin donma sırasında korunma oranını artırır. Bu çalışmada kullanılan DMSO ve sükröz çiftinin İGKS dokusunu donma esnasında oluşan hasardan etkin bir şekilde koruduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda İGKS hücrelerinde ifade olduğu bilinen BMP-4, Nanog, CD90, vimentin ifade profilleri (Koh ve Kim et al. 2008) dondurulup çözülen İGKS dokusundan izole edilen hücrelerde aynı ifade düzeyinde saptanmıştır. Ayrıca yapısal proteinler olan vimentin, CD105, α -düz kas aktini, pansitokeratinin hücre içi dağılımında bir farklılık gözlenmeyerek, çalışma sonuçları doğrultusunda yavaş dondurma yöntemiyle dondurup daha sonra çözme işleminin hücre potansiyelleri üzerinde herhangi bir değişime neden olmadığından bu yöntemin İGKS dokusunu dondurmada etkin bir yol olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- Agca, Y. (1994). "Post-thaw survival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed in vitro produced bovine embryos after vitrification."
- Arakawa, T., J. F. Carpenter, Y. A. Kita, and J. H. Crowe. (1990). "The basis for toxicity of certain cryoprotectants: an hypothesis." *Cryobiology* **27**: 401-415.
- Bagis, H.H. Odaman, et al. (2002). "Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos." *Mol Reprod Dev* **61**(2): 173-9.
- Bankowski, E.K. Sobolewski, et al. (2004). "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* **42**(2): 175-81.
- Begin, I.B. Bhatia, et al. (2003). "Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solidsurface vitrification (SSV) methods." *Theriogenology* **59**: 1839-1850.
- Bozhoklu, M.G. A. Bannikov, et al. (1989). "[Local expression of cytokeratins 8, 17 and 18 in the mesenchyme and smooth muscles in the early stages of human organogenesis]." *Ontogenez* **20**(3): 250-7.
- Brockbank KGM, C. J., Taylor MJ (2001). *Cryopreservaton Manual. A Guide to Cryopreservation Techniques*. Mariette, USA, ThermoForma Scientific, Publishing Group.
- Bustin, M.F. Catez, et al. (2005). "The dynamics of histone H1 function in chromatin." *Mol Cell* **17**(5): 617-20.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 23-39.
- Can, A. ve S. Karahuseyinoglu (2007). "Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells." *Stem Cells* **25**(11): 2886-95.
- Carlin, R.D. Davis, et al. (2006). "Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells." *Reprod Biol Endocrinol* **4**(1): 8.
- Chou, Y. H.O. Skalli, et al. (1997). "Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions." *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 49-53.
- Cleary, M.M. Snow, et al. (2001). "Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an Ischemic environment." *Cryobiology* **42**(2): 121-33.
- Conconi, M. T.P. Burra, et al. (2006). "CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential." *Int J Mol Med* **18**(6): 1089-96.
- Crowe, L. M.R. Mouradian, et al. (1984). "Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities." *Biochim Biophys Acta* **769**(1): 141-50.

- Cseh, S.J. Corselli, et al. (1997). "The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages." *Theriogenology* **48**(1): 43-50.
- Cseh, S.W. Horlacher, et al. (1999). "Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions." *Theriogenology* **52**(1): 103-13.
- Darby, I.O. Skalli, et al. (1990). "Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing." *Lab Invest* **63**(1): 21-9.
- Demirci, B.B. Salle, et al. (2002). "Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep." *Fertil Steril* **77**(3): 595-600.
- Dinnyes, A.Y. Dai, et al. (2000). "High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer." *Biol Reprod* **63**(2): 513-8.
- Dominici, M.K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **8**(4): 315-7.
- Eyden, B. P.J. Ponting, et al. (1994). "Defining the myofibroblast: normal tissues, with special reference to the stromal cells of Wharton's jelly in human umbilical cord." *J Submicrosc Cytol Pathol* **26**(3): 347-55.
- Farrant, J.H. Lee, et al. (1977). "Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cells." *Ciba Found Symp*(52): 49-67.
- Farrant, J.C. A. Walter, et al. (1977). "Structural and functional aspects of biological freezing techniques." *J Microsc* **111**(1): 17-34.
- Fawcett, D., Ed. (1966). *An Atlas of Fine Structure*. London, Saunders Company.
- Fu, Y. S.Y. C. Cheng, et al. (2006). "Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism." *Stem Cells* **24**(1): 115-24.
- Gook, D. A.D. H. Edgar, et al. (1999). "Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol." *Hum Reprod* **14**(8): 2061-8.
- Hamada, H.M. Kobune, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy." *Cancer Sci* **96**(3): 149-56.
- Herrmann, H. ve U. Aebi (2000). "Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics." *Curr Opin Cell Biol* **12**(1): 79-90.
- Kadner, A.G. Zund, et al. (2004). "Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study." *Eur J Cardiothorac Surg* **25**(4): 635-41.

- Kaidi, S.I. Donnay, et al. (2000). "Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival." *Cryobiology* **41**(2): 106-15.
- Karahuseyinoglu, S.O. Cinar, et al. (2007). "Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys." *Stem Cells* **25**(2): 319-31.
- Karahuseyinoglu, S.C. Kocaefe, et al. (2008). "Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells." *Stem Cells* **26**(3): 682-91.
- Kasper, M.P. Stosiek, et al. (1988). "Coexpression of cytokeratins and vimentin in hyaluronic acid-rich tissues." *Acta Histochem* **84**(1): 107-8.
- Kobayashi, K.T. Kubota, et al. (1998). "Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly: expression and localization of alpha-smooth muscle actin." *Early Hum Dev* **51**(3): 223-33.
- Koh, S. H.K. S. Kim, et al. (2008). "Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats." *Brain Res* **1229**: 233-48.
- Kreis, T. ve R. Vale (1999). "Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins." Oxford, Oxford University Press, Oxford.
- Leibo, S. ve K. Oda (1993). "High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone." *Cryoletters* **14**: 133-144.
- Lupatov, A. Y.P. A. Karalkin, et al. (2006). "Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells." *Bull Exp Biol Med* **142**(4): 521-6.
- Majno, G.G. Gabbiani, et al. (1971). "Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle." *Science* **173**(996): 548-50.
- Marsella, T.P. Sena, et al. (2008). "Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing." *Reprod Biomed Online* **16**(2): 257-67.
- Mazur, P. (1963). "Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing." *J Gen Physiol* **47**: 347-69.
- Mazur, P. (1988). "Stopping biological time. The freezing of living cells." *Ann N Y Acad Sci* **541**: 514-31.
- Medicetty, S.A. R. Bledsoe, et al. (2004). "Transplantation of pig stem cells into rat brain: proliferation during the first 8 weeks." *Exp Neurol* **190**(1): 32-41.
- Mitchell, K. E.M. L. Weiss, et al. (2003). "Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia." *Stem Cells* **21**(1): 50-60.

- Moll, R.R. Zimbelmann, et al. (1993). "The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas." *Differentiation* **53**(2): 75-93.
- Morris, J. (2007). *ASYMPTOTE GUIDE TO CRYOPRESERVATION*. Cambridge, England, Asymptote Ltd.
- Nanaev, A. K.G. Kohnen, et al. (1997). "Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord." *Placenta* **18**(1): 53-64.
- Neto, V.S. Buff, et al. (2008). "Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue." *Fertil Steril* **89**(5 Suppl): 1348-56.
- Nolan, T.R. E. Hands, et al. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nat Protoc* **1**(3): 1559-82.
- Nowshari, M. A. ve G. Brem (1998). "Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure." *Theriogenology* **50**(7): 1001-13.
- Nowshari, M. A. ve G. Brem (2000). "The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos." *Theriogenology* **53**(5): 1157-66.
- Özkavukcu, S.E. Erdemli, et al. (2008). "Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa." *J Assist Reprod Genet* **25**(8): 403-11.
- Palasz, A. T.S. Alkemade, et al. (1993). "Sodium hyaluronate as a substitute for biological protein in bovine and mouse freezing." *Cryobiology* **30**: 172-178.
- Palasz, A. T. ve R. J. Mapletoft (1996). "Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes." *Recent advances. Biotechnol. Adv.* **14**(127-149).
- Park, S. P.E. Y. Kim, et al. (2000). "Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids." *Hum Reprod* **15**(8): 1787-90.
- Parry, E. W. ve D. R. Abramovich (1972). "The ultrastructure of human umbilical vessel endothelium from early pregnancy to full term." *J Anat* **111**(Pt 1): 29-42.
- Pugh, P.A. Aankaersmith, et al. (1998). "Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival." *Theriogenology* **50**: 495-506.
- Rachakatla, R. S.F. Marini, et al. (2007). "Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors." *Cancer Gene Ther.*
- Rall, W. F. ve G. M. Fahy (1985). "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification." *Nature* **313**(6003): 573-5.
- Rall, W. F.D. S. Reid, et al. (1984). "Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods." *Cryobiology* **21**(1): 106-21.

- Sanz-Rodriguez, F.M. Guerrero-Esteo, et al. (2004). "Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins." *J Biol Chem* **279**(31): 32858-68.
- Sarugaser, R.D. Lickorish, et al. (2005). "Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors." *Stem Cells* **23**(2): 220-9.
- Schneider, U. ve P. Mazur (1987). "Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight-cell mouse embryos." *Cryobiology* **24**(1): 17-41.
- Shaw, J. M.L. L. Kuleshova, et al. (1997). "Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran." *Cryobiology* **35**(3): 219-29.
- Sumida, S. (2006). "Transfusion and transplantation of cryopreserved cells and tissues." *Cell Tissue Bank* **7**(4): 265-305.
- Suva, D.G. Garavaglia, et al. (2004). "Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells." *J Cell Physiol* **198**(1): 110-8.
- Takechi, K.Y. Kuwabara, et al. (1993). "Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells." *Placenta* **14**(2): 235-45.
- Taylor, M. J.L. H. Campbell, et al. (2001). "Comparison of Unisol with Euro-Collins solution as a vehicle solution for cryoprotectants." *Transplant Proc* **33**(1-2): 677-9.
- Taylor, M. J. ve C. J. Hunt (1985). "A new preservation solution for storage of corneas at low temperatures." *Curr Eye Res* **4**(9): 963-73.
- Vajta, G. (2000). "Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals." *Anim Reprod Sci* **60-61**: 357-64.
- Wang, H. S.S. C. Hung, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord." *Stem Cells* **22**(7): 1330-7.
- Wang, J. (2000). "A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation." *Cryobiology* **41**: 1-9.
- Weiss, M. L.S. Medicetty, et al. (2006). "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease." *Stem Cells* **24**(3): 781-92.
- Weiss, M. L.K. E. Mitchell, et al. (2003). "Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain." *Exp Neurol* **182**(2): 288-99.
- Wong, M. L. ve J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." *Biotechniques* **39**(1): 75-85.
- Wozney, J. M.V. Rosen, et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* **242**(4885): 1528-34.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Deniz BALCI

Doğum Yeri : ADANA

Doğum Tarihi : 29/10/1983

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Bilimkent Lisesi (2000)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2004)

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

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2006-2008)

Yayımları (SCI ve diğer): Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. Karahuseyinoglu S, Kocaefe C, Balci D, Erdemli E, Can A. Stem Cells. 2008 Mar; 26(3):682-91. Epub 2008 Jan 10.