

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNİN HÜCRELER ARASI MADDE
YOĞUNLUĞUNUN DEĞİŞTİRİLEREK FARKLILAŞTIRILMA
SÜREÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

HAZIRLAYAN

Arş. Gör. Berrin ÖZDİL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

İZMİR

2017

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİNİN HÜCRELER ARASI MADDE
YOĞUNLUĞUNUN DEĞİŞTİRİLEREK FARKLILAŞTIRILMA
SÜREÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

HAZIRLAYAN

Arş. Gör. Berrin ÖZDİL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

İZMİR

2017

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Ayşegül UYSAL

Üye : Prof. Dr. Sevinç İNAN

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Değerli danışmanım Prof. Dr. Hüseyin Aktuğ Hocamıza, Ege Üniversitesi bünyesinde bir birey olmanın önemini aşılmasıyla birlikte, düşüncelerimi geliştirebilmem ve gerçekleştirebilmemde adımlar atmam için ortam oluşturması ile sunduğu kıymetli bilimsel katkılardan dolayı, en derin takdir ve teşekkürlerimi sunmak isterim. Kendisinin danışmanlığında Yüksek Lisans derecemi almış olacağım için ayrıca kendimi şanslı hissetmekteyim.

Hoşgörüsü, sunduğu bilimsel katkılar ve laboratuvar kaynaklarını kullanmamı sağladığından dolayı Prof. Dr. Gülperi Öktem Hocamıza teşekkür ederim.

Prof. Dr. Altuğ Yavaşoğlu, Vildan Bozok Çetintaş ve Prof. Dr. Yiğit Uyanıkgil Hocalarımıza sunduğu bilimsel katkılardan dolayı ve laboratuvar kaynaklarını kullanmamı sağladığından dolayı teşekkür ederim.

Sağladığı huzurlu çalışma ortamının yanı sıra bilimsel katkılarından dolayı değerli Anabilim Dalı Başkanımız sevgili hocamız Prof. Dr. Ayşegül Uysal'a teşekkürü borç bilirim. Aynı zamanda Prof. Dr. Ayşegül Uysal ve Prof. Dr. Hüseyin Aktuğ Hocalarımıza, bilimsel anlamda bizi destekleyerek ve motive ederek bizi geliştirmeleri ve ileriki dönemler içinde kaygılarımızı azaltarak; her zaman bilimsel açıdan yükselmenin insanı doğru yere getireceği inancını aşılama yoluyla onlara minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Bilimsel anlamda öğrencileri destekleyip hayal kurmaya teşvik eden, histolojinin zenginliğini sözcüklere eşsiz bir şekilde döküp hikayeleştirerek anlatan ve görseller ile histoloji aşkını aşılaman Prof. Dr. Meral Baka'ya onu dinleme şansı bulduğum için teşekkür ederim.

Yüksek Lisans süresince her türlü sıkıntımızı paylaştığımız güler yüzlü yardımsever Uzman abimiz Fatih Oltulu'ya teşekkür ederim.

Kayıtlarda doktora öğrencisi olarak görünse de bilgi hazinesi ve yardımsever tavrıyla Yüksek Lisans sürecinde hep yanımda olan ve her türlü desteği bana sağlayarak gerek ablalık gerek hocalık gerekse arkadaşlık yapan Eda Açıkgöz'e teşekkür ederim. Aynı bir bakış açısı yaratarak bize biyofiziğin kapılarını aralayan,

tezimin bir sonraki basamağında bize yol gösterici olacak olan sevgili Günnur Görücü Güler Hocama da teşekkür ederim.

Tez döneminde ve diğer bilimsel çalışmalarımızda hep yanımda olan ve hem kişiliği ile hem de akademik kimliği ile bana örnek olan, her istediğimde yardımını esirgemeyip istediğimden kat kat fazlasını karşılıksız yapan çalışmaktan yorulmayan sevgili arkadaşım Dr. Duygu Çalık Kocatürk'e teşekkür ederim.

Ortak çalışmalarımızın dinamosu Yasemin Adalı'ya güler yüzlülüğü, hoşgörüsü, güvenilirliği ve arkadaşlığı ile birlikte histolojik uygulamalar konusunda arka planda hep öğretici olması ve deneyimlerini paylaşmasıyla hep yanımda olduğu için teşekkür ederim.

Yüksek Lisans sürecinde güler yüzlülüğü ile bize neşe veren ve histolojik tekniklerde her sorunumuza çare olan sevgili arkadaşım Aylın Buhur'a teşekkür ederim. Ayrıca yeri geldiğinde teknik terimleri çevirmemde yardımcı olan arkadaşım Çevik Gürel'e, bilimsel olarak istediği her konuda kendini sınırsız yetiştirebilecek olan ve her konuda yardımcı olan güler yüzlü arkadaşım Gökçe Ceren Kuşçu'ya teşekkür ederim.

Özellikle sevgili Veysel Bay'a öncelikle sabrı, daha sonra tavrı ve sevgisi ile uzakta ve yakında bana verdiği sonsuz desteği için teşekkür ederim.

Sonuncu ama en önemli olarak, bütün fedakarlıkları yapıp benim her zaman arkamda olan aileme; özellikle annem Sibel Özdil'e sonsuz güven ve destekleri için minnettarlığımı sunarım.

İzmir, Temmuz 2017

Berrin ÖZDİL

Özet

Fare Embriyonik Kök Hücrelerinin Hücreler Arası Madde Yoğunluğunun Değiştirilerek Farklılaştırılma Süreçlerinin Araştırılması

Doku formunu oluşturan hücresel bileşenlerin sürekliliği ve özelleşmesi hem yetişkin hem de gelişmekte olan organizmalarda önemli işlemlerdir. Pluripotent embriyonik kök hücreler, primitif organizmanın iç hücre külesinden elde edilir. Bu hücrelerin farklılaşması kademeli olarak gerçekleşir ve hücrelerin pluripotent özellikleri giderek azalır. Hücreler, hem hücre içi hem de hücre dışı sinyalleri sürekli olarak alırlar, böylelikle iç metabolik aktivitelerini düzenlerler. Niş, kök hücrelerin farklılaşmanın en önemli belirleyicilerinden biri olarak bilinir ve *in vitro* koşullarda *in vivo* ekstra selüler matriks (ESM) modelini taklit etmek için kullanılan birçok hidrojel vardır. En yaygın olarak kullanılan hidrojellerden biri matrijeldir. Bununla birlikte, kök hücrenin farklılaşma kapasitesi için matrijelin katkısı ve bu hidrojinin protein konsantrasyonu hakkında literatürde sınırlı bilgi vardır. Farklılaşmayı moleküler seviyede tespit etmek ve ayırt etmek için, evre-spesifik embriyonik antijen 1 (stage specific embryonic antigen 1=SSEA-1) ve Octamer-Binding Transcription Factor $\frac{3}{4}$ (Oct3/4) olarak adlandırılan embriyonik kök hücre belirteçleri kullanılır. SSEA-1 belirteci, diferansiye olmamış fare embriyonik kök hücre (fEKH) tanımlamasında kullanılır. Osteopontin (OPN = SPP1), farklılaşmada osteojenik belirteçlerden biridir ve osteoblastik hücrelerde eksprese edildiği bilinmektedir. Çalışmamızda, hücre döngüsü ve immünofloresan (IF) boyamalar aracılığıyla fEKH kapasitesi ve farklılaşma kabiliyeti manipüle edilerek sürecin geliştirilmesi amaçlandı. Üç farklı konsantrasyon (2, 4, 6 mg/ml) ve üç zaman noktasına odaklanıldı (gün 1, 3, 6). Kök hücre kimliğini ve osteoblastik farklılaşmayı gözlemlemek için sırayla SSEA-1 ve OPN proteinlerine özel boyamalar yapıldı. fEKH'lerin kök hücre özelliklerinin, hücre döngüsü ve IF ile gösterilen ekstraselüler matriks protein konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği sonucuna varıldı. Gelecekteki çalışmalarda, *in vitro* olarak kök hücre farklılaşmasındaki ilerlemeler ile rejeneratif tıp alanında hücre-doku bazında replasman altyapısı sağlanacaktır. Dahası, ekstraselüler matriks ile fEKH etkileşimleri, ortak sinyal yolları kullandıkları için karsinogenez, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ve fibrotik bağ doku kökenli mekanizmaları da aydınlatılabilir.

Anahtar Kelimeler: Fare Embriyonik Kk Hücresi; Matrijel; Bazal Membran;
Diferansiyasyon; Hücre Döngüsü



Abstract

Investigation of The Differentiation Course of Mouse Embryonic Stem Cell Depending on The Extracellular Matrix Concentration

Maintenance and specification of the cellular components with constitution of the tissue form are important processes in both in the adult and developing organisms. Pluripotent embryonic stem cells are obtained from the inner cell mass. Differentiation of embryonic stem cells gradually occurs and pluripotency of the cells progressively decreases. Cells continuously receive both intracellular and extracellular signals, in this way, regulate the inner metabolic activity. Niche of the stem cells are known to be one of the most important determinants for the differentiation and there are several hydrogels used for mimicking the extracellular matrix (ECM) pattern *in vivo* in *in vitro* conditions. One of the most widely used hydrogels is matrigel. However, there is limited knowledge about the additive effect of the matrigel and its protein concentration for differentiation capacity of the stem cell. To detect and distinguish differentiation at molecular level, there are several embryonic stem cell markers as stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1) and Oct3/4. SSEA-1 markers are used in the mouse undifferentiated embryonic stem cell identification. OPN is one of the osteogenic markers in differentiation, and known to be expressed in osteoblastic cells. Our study aimed to improve our ability to manipulate the mouse Embryonic Stem Cell (mESC) capacity and differentiation capability via cell cycle, immunofluorescence (IF). We selected three different concentrations (2, 4, 6 mg/ml) and focused on three time points (day 1, 3, 6). To observe stem cell identity and osteoblastic differentiation, we stained SSEA-1 and osteopontin (OPN=SPP1), respectively. We concluded that the characteristics of the mESCs vary due to ECM protein concentration, shown by cell cycle and IF. In future studies, improvement the knowledge about stem cell differentiation *in vitro* will be the groundwork of the cell-tissue replacement in the field of regenerative medicine. Moreover, mESC interactions with ECM may shed light upon the carcinogenesis, epithelial mesenchymal transition (EMT) and fibrotic connective tissue based mechanisms, since they use common signaling pathways.

Key Words: Mouse Embryonic Stem Cell; Matrigel; Basement Membrane; Differentiation; Cell Cycle

İçindekiler

Özet	i
Abstract	iii
Tablolar Listesi.....	vii
Şekiller Listesi.....	ix
Grafikler Listesi	xiii
Simgeler ve Kısaltmalar Listesi	xiv
BÖLÜM I.....	1
1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM II.....	3
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genel Kavramlarıyla Embriyoloji.....	3
2.2. Embriyolojik Süreç.....	3
2.3. Kök Hücre Tanımı ve Ortaya Çıkışı	7
2.4. Epitelyal ve Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Farklılaşma	9
2.5. Embriyonik Belirteçler.....	11
2.5.1. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri	11
2.5.2. Embriyonik Kök Hücre Çalışmaları	13
2.6. Mezenkimal Kök Hücre ve Belirteçleri	14
2.6.1. Mezenkimal Kök Hücre Tanımı	14
2.6.2. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri.....	14
2.6.3. Mezenkimal Kök Hücre Çalışmaları.....	15
2.7. Osteopontin	16
2.8. Hücre Döngüsü Evreleri	17
2.8.1. Kök hücrelerde hücre döngüsü	17
2.9. Hücreler Arası Madde	20

2.9.1.	Hücreler Arası Maddenin Tanımı ve Bağ Dokusu ile İlişkilendirilmesi	20
2.9.2.	Matrijel Kavramı.....	21
2.9.3.	DeneySEL Hidrojeller ve in vivo uygulamalar.....	22
BÖLÜM III		31
3.	Gereç ve Yöntem	31
3.1.	Deney Grupları	31
3.2.	Hücre Kültürü	31
3.3.	Hücre Besi Yeri Hazırlama	31
3.4.	Hücre Açma	32
3.5.	Hücre Dondurma.....	33
3.6.	Hücrelerin Pasajlanması.....	33
3.7.	Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi.....	35
3.8.	Hücrelerin Faz-Kontrast Görüntülenmesi	36
3.9.	Hücreler Arası Maddenin Hazırlanması	37
3.10.	Fosfat Tamponlu Salin / Fosfat dengeleme Solüsyonu (PBS) Hazırlanması	37
3.11.	Matrijelin Alikotlanması	37
3.12.	Matrijel ile Yüzey Kaplaması	38
3.13.	Hücrelerin Matrijel Kaplanmış Yüzeye Ekilme Süreci.....	40
3.14.	Fare embriyonik kök hücrelerin immünofloresan çalışmasında sabitlemesi için paraformaldehit solüsyonunun hazırlanması	43
3.15.	Fare embriyonik kök hücrelerin hücre döngüsü analizi çalışmasında sabitlemesi/tespitlenmesi için %70'lik etanol solüsyonunun hazırlanması.....	43
3.16.	Kullanılan Yöntemler	43
3.16.1.	İmmünofloresan Boyama.....	43
3.16.2.	İmmünofloresan Boyamaların Görüntülenmesi	45
3.16.3.	Hücre Döngüsü Analizi	45
3.17.	Analizler.....	46

3.17.1. İmmünofloresan boyama analizleri	46
3.17.2. Hücre Döngüsü analizi.....	47
BÖLÜM IV	49
4. BULGULAR.....	49
4.1. Faz-Kontrast Görüntülemeler	49
4.2. İmmünofloresan Görüntülemeler	57
4.3. Hücre Döngüsü.....	61
BÖLÜM V	70
5. TARTIŞMA	70
BÖLÜM VI.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
BÖLÜM VII.....	74
7. KAYNAKLAR	74
BÖLÜM VIII	- 1 -
8. EKLER.....	- 1 -
8.1. Koloni yapıları için Uygulanan İstatistik Tabloları	- 1 -
8.1.1. Tanımlayıcı İstatistikler	- 1 -
8.1.2. İstatistiksel Alan Karşılaştırması.....	- 3 -
8.1.3. İstatistiksel Çevre Karşılaştırması.....	- 5 -
8.1.4. İstatistiksel En-Boy Oranı Karşılaştırması	- 7 -
8.1.5. İstatistiksel Yuvarlaklık Karşılaştırması.....	- 8 -
BÖLÜM IX.....	- 9 -
9. ÖZGEÇMİŞ	- 9 -

Tablolar Listesi

Tablo 1: Siklin ve siklin bağımlı kinazlar ile hücre içindeki fonksiyonları (78)	19
Tablo 2: Matrijel içeriğindeki bazal membran bileşenleri (91)	26
Tablo 3: Bazal membran uygulanan hücre ve dokuların farklılaşması (91)	27
Tablo 4: Matrijel ve kartrijel ile bazal membranda çoğunlukla bulunan kolajen tip I proteini ile laminin I glikoproteininin tabaka yüzeyinde, biyoreaktörde ve in vivo tümör içersinde farklılaşma kapasitesi (100)	29
Tablo 5: Deney grupları. HD: hücre döngüsü, IF: immünofloresan boyama	31
Tablo 6: Hücre analizatör cihazı ile hücre sayımı ile hemositometre ve görüntüleme ile yapılan sayım karşılaştırması	36
Tablo 7: Matrijel karışım tablosu	40
Tablo 8: Deney aşamalarında kullanılan kimyasallar	47
Tablo 9: Deney aşamalarında kullanılan cihazlar	48
Tablo 10: 3. günde 4 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)	- 1 -
Tablo 11: 3. günde 6 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)	- 2 -
Tablo 12: 6. günde 4 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)	- 2 -
Tablo 13: 6. günde 6 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)	- 2 -
Tablo 14: Alan değerleri için karşılaştırmalı F-test	- 3 -
Tablo 15: Alan değerleri için karşılaştırmalı t-test	- 4 -
Tablo 16: Çevre değerleri için karşılaştırmalı F-test.....	- 5 -

Tablo 17: Çevre değerleri için karşılaştırmalı t-test.....	- 6 -
Tablo 18: En-boy değerleri için karşılaştırmalı F-test	- 7 -
Tablo 19: En-boy değerleri için karşılaştırmalı t-test	- 7 -
Tablo 20: Yuvarlaklık değerleri için karşılaştırmalı F-test	- 8 -
Tablo 21: Yuvarlaklık değerleri için karşılaştırmalı t-test	- 8 -



Şekiller Listesi

Şekil 1: Spermatogonyum ve oosit oluşumu sonrası zigot oluşumu	4
Şekil 2: Fertilizasyon sonrası oositsin bölünmesi sonucu 2, 4, 8 hücreli yapıların oluşması ve daha sonra yapının hızlı bölünmeler sonucunda morula ve erken blastosist aşamalarının şematik gösterimi	5
Şekil 3: Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılması	5
Şekil 4: Kök hücrelerin farklılaşma kaynaklarına göre sınıflandırılması	6
Şekil 5: 2000'li yıllara kadar embriyonik kök hücrelerin gelişimi (19).....	7
Şekil 6: LIF molekülü iki farklı yoldan fare embriyonik kök hücrelerin (fEKH'lerin) bölünmesini ve kendini yenilemesini sağlar (29).	8
Şekil 7: EMT aşamalarında belirteç olarak kullanılan moleküller (44).....	10
Şekil 8: Embriyonel gelişim döneminde aktifleşen EMT ile ilgili yollar (42).....	11
Şekil 9: Hücre döngüsü (17)	17
Şekil 10: Mekanik karaktere göre hücre kaderinin belirlenmesi (106).....	28
Şekil 11: Hücre açma aşamasında kullanılan su banyosunun fotoğrafı	32
Şekil 12: Santrifüj cihazı.....	33
Şekil 13: Hücre sayımı için kullanılan solüsyon prensibi (A ve C) ve kullanılan solüsyon (B)	35
Şekil 14: Faz-kontrast görüntüleme için kullanılan aydınlık alan mikroskobu	36
Şekil 15: Matrijel kaplaması aşamasında çalışma ortamı	38
Şekil 16: Matrijel ekimi (A) şematik ve (B) fotoğraflanmış görüntüsü.....	39
Şekil 17: Yüzeydeki hidrojelini eşit olarak yayılması için kullanılan çalkalayıcı	39
Şekil 18: Hücre sayımı ve canlılık ile hücre döngüsünde kullanılan Muse cihazı.....	40

Şekil 19: Hücre analizatörü cihazından alınan örnek sayım ve canlılık sonucu	41
Şekil 20: Hücre ekilme sürecinde çalışma ortamı	41
Şekil 21: Matrijel polimerleşmesinden sonra hücre ekimi	42
Şekil 22: Matrijel kaplaması olmadan hücre ekimi	42
Şekil 23: İmmünofloresan boyama prosedürü	44
Şekil 24: Hücrelere vorteks eşliğinde soğuk etanol eklenmesi	46
Şekil 25: Örnek hücre döngüsü sonuç tablosu	47
Şekil 26: Stok matrijel solüsyonunun 1:1, 1:2 ve 1:3 fEKH besi yeri ile seyreltikten sonra kaplama yapılıp, fEKH'lerin yüzeye ekilmesi sonrasındaki 1. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü	49
Şekil 27: Stok matrijel solüsyonunun 1:1, 1:2 ve 1:3 fEKH besi yeri ile seyreltikten sonra kaplama yapılıp, fEKH'lerin yüzeye ekilmesi sonrasındaki 3. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü	50
Şekil 28: Stok matrijel solüsyonunun 1:1, 1:2 ve 1:3 fEKH besi yeri ile seyreltikten sonra kaplama yapılıp, fEKH'lerin yüzeye ekilmesi sonrasındaki 6. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü	51
Şekil 29: Matrijelin fEKH besi yeri ile seyreltilerek 2, 4, 6 mg/ml protein konsantrasyonundaki kaplamanın yapılmasından ve matrijelin polimerizasyonundan sonra, fEKH'lerin yüzeye ekilmesini takip eden 1. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü	52
Şekil 30: Matrijelin fEKH besi yeri ile seyreltilerek 2, 4, 6 mg/ml protein konsantrasyonundaki kaplamanın yapılmasından ve matrijelin polimerizasyonundan sonra, fEKH'lerin yüzeye ekilmesini takip eden 3. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü	53
Şekil 31: Matrijelin fEKH besi yeri ile seyreltilerek 2, 4, 6 mg/ml protein konsantrasyonundaki kaplamanın yapılmasından ve matrijelin polimerizasyonundan	

sonra, fEKH'lerin yüzeye ekilmesini takip eden 6. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.....	54
Şekil 32: Hücrelerin farklı konsantrasyondaki matrijel üzerinde 1. günleri.....	55
Şekil 33: Hücrelerin farklı konsantrasyondaki matrijel üzerinde 3. günleri.....	55
Şekil 34: Hücrelerin farklı konsantrasyondaki matrijel üzerinde 6. günleri.....	55
Şekil 35: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey üzerindeki OPN protein ifadenmesi	58
Şekil 36: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi	58
Şekil 37: fEKH'lerin 2 mg/ml protein kaplaması üzerindeki OPN protein ifadenmesi	59
Şekil 38: fEKH'lerin 2 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi	59
Şekil 39: fEKH'lerin 4 mg/ml protein kaplaması üzerindeki OPN protein ifadenmesi	59
Şekil 40: fEKH'lerin 4 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi	60
Şekil 41: fEKH'lerin 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki OPN protein ifadenmesi	60
Şekil 42: fEKH'lerin 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi	60
Şekil 43: Kaplama yapılmayan kontrol yüzeyi üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili.....	62
Şekil 44: 2 mg/ml protein yüzey üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	62

Şekil 45: 4 mg/ml protein yüzey üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	63
Şekil 46: 6 mg/ml protein yüzey üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	63
Şekil 47: Kaplama yapılmayan kontrol yüzeyi üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili.....	64
Şekil 48: 2 mg/ml protein yüzey üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	64
Şekil 49: 4 mg/ml protein yüzey üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	65
Şekil 50: 6 mg/ml protein yüzey üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	65
Şekil 51: Kaplama yapılmayan kontrol yüzeyi üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili.....	66
Şekil 52: 2 mg/ml protein yüzey üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	66
Şekil 53: 4 mg/ml protein yüzey üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	67
Şekil 54: 6 mg/ml protein yüzey üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili	67

Grafikler Listesi

Grafik 1: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni alan grafiği	56
Grafik 2: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni çevre grafiği	56
Grafik 3: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni yuvarlaklık grafiği.....	56
Grafik 4: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni en-boy oranı grafiği	57
Grafik 5: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey ile 2, 4, ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki 1, 3, ve 6 gün inkübasyonundan sonraki G0/G1 fazı hücre döngüsü analizi.....	68
Grafik 6: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey ile 2, 4, ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki 1, 3, ve 6 gün inkübasyonundan sonraki S fazı hücre döngüsü analizi	68
Grafik 7: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey ile 2, 4, ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki 1, 3, ve 6 gün inkübasyonundan sonraki G2/M fazı hücre döngüsü analizi.....	69

Simgeler ve Kısaltmalar Listesi

%	: Yüzde işareti
-	: Eksi işareti
+	: Artı işareti
>	: Büyüktür işareti
AFP	: Alfa fetoprotein
AKM	: Atomik kuvvet mikroskopisi
ATCC	: American Type Culture Collection
BM-40 Osteonektin=SPARC	: Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich=
BSA	: Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumine)
CD	: cluster of differentiation
cdk	: Siklin bağımlı kinazlar
cdk4	: Siklin bağımlı kinaz 4
cdk6	: Siklin bağımlı kinaz 6
CO ₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindol
DAX1	: Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1
DIA	: Diferansiyasyonunu inhibisyon aktivitesi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	: Di-metilsilokzan
DNA	: Deoksiribonükleik asit

ECM	: Extracellular matrix
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EHS	: Engelbreth-Holm-Swarm
EKH	: Embriyonik kök hücre
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş (epithelial mesenchymal transition)
ERK	: Extracellular regulated kinases
ESM	: Ekstra selüler matriks
ESRRB	: Estrogen Related Receptor Beta
FAK	: Focal adhesion kinase
FBS	: Fötal sığır serumu (fetal bovine serum)
fEKH	: Fare embriyonik kök hücre
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor)
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
G1	: Hücre döngüsündeki G1 (gap 1) fazı
G2	: Hücre döngüsündeki G2 (gap 2) fazı
GFP	: Yeşil floresan protein (green fluorescence protein)
gp140	: HIV-1/Clade B
gr	: Gram
HCG	: Human Koryonik Gonadotropin Hormon
HD	: Hücre döngüsü
HLA	: Human leukocyte antigen

IF	: İmmünofloresan boyama
INK4	: Siklin bağımlı kinaz inhibitör ailesi
IPS cell)	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre (induced pluripotent stem cell)
JAK	: Janus Kinase
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum di hidrojen fosfat
kPa	: Kilo paskal
LIF	: Lösemi inhibitör faktörü (leukemia inhibitory factor)
M	: Mitoz fazı
M	: Molar
mESC	: Mouse Embryonic Stem Cell
mg	: Miligram
mg/ml	: Bir mililitrede bulunan miligram miktarı
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
N	: Normal
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	: 7 sulu sodyum fosfat di bazik
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NASA	: National Aeronautics and Space Administration

°C	: Derece
Oct4	: Octamer-Binding Transcription Factor 4
OPN	: Osteopontin
PBS	: Tuzlu Fosfat Tamponu (phosphate buffered saline)
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PFA	: Paraformaldehit
pH	: Power of Hydrogen
PSF	: Point spread function
Rb	: Retinoblastoma
RIF1	: Replication Timing Regulatory Factor 1
rMSC	: Rheasus mezenkimal kök hücre
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Rotation per minute
S	: Sentez fazı
SALL4	: Spalt Like Transcription Factor 4
Sox2	: Sex Determining Region Y-Box 2
SPARC	: Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich=
Osteonektin=BM-40	
SPP1	: Osteopontin
SSEA-1	: Evre-spesifik embriyonik antijen 1 (stage specific embryonic antigen 1)
SSEA-3	: Stage-specific embryonic antigen 3

SSEA-4	: Stage-specific embryonic antigen 4
STAT3	: Signal transducer and activator of transcription 3
TBX3	: T-Box Protein 3
TCL1	: T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A
TGF- β	: Transforming growth factor- β
UV	: Ultra viyole (morötesi) ışın
VSMC	: Vasküler düz kas hücresi
Wnt	: Wingless-Type MMTV Integration Site Family
ZEB	: Zinc finger E-box-binding
ZFP281	: Zinc Finger Protein 281
ZIC3	: Zinc Finger Protein ZIC 3

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Doku, hücre ve hücre dışında bulunan maddeden meydana gelmektedir ve hücreler arası madde içerisinde bolca kolajenle birlikte dokudan dokuya varlığı ve konsantrasyonu farklılık gösteren makro moleküllerden oluşmaktadır. Hücreler arası madde doku içerisinde bulunan hücreler tarafından sentezlenmekte olup, hücrelerin atıklarını ortamdan uzaklaştırarak, hücreler tarafından oluşturulan salgıları yönlendirir, ayrıca besin taşıyan sıvıdan gelen molekülleri hücrelere aktarır. Hücreler arası maddedeki moleküller hücreler tarafından tanınabilir ve reseptörler aracılığıyla hücre sinyal yollarında aktifleşmeye neden olabilir (1).

Laboratuvar çalışmalarında, *in vivo* koşulları *in vitro* ortamda sağlayabilmek adına birçok bileşik hücreler arası madde olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarının kökeninde ise hücrelerin göçü, invazyonu, yara iyileşmesindeki mekanizmaları ve ayrıca diferansiyasyon kapasitelerinin araştırılması yatar.

Embriyonik kök hücreler hızlı bölünme kapasitesine sahipken pluripotensi özelliklerini korurlar. Kök hücreler çalışmalarda kaynaklarına göre birçok kökenden olabilirken embriyonik kök hücreler mezenkimal ve IPS hücreler düşünüldüğünde farklılaşma kapasitesi en yüksek olan embriyonik kök hücreler önemli bir noktadadır. Bu hücreler, hücre transplantasyon tedavilerinde klinik çalışmalarda önemli potansiyele sahiptir ve bunun alt tabanını oluşturacak ilgiler temel bilimle sağlanabilir (2).

Hücreler arası madde olarak çalışmalarda yaygın kullanılan ve bazal membran içeriğinin izolasyonu ile elde edilen matrijel literatürlerde birçok noktada kullanılmıştır; fakat fEKH'lerin diferansiyasyon kapasitesini belirlemek amacıyla ve buna ek olarak farklı konsantrasyonlarda hücreleri ne yönde etkileyebileceği ile ilgili literatür bilgisi bulunmamaktadır. Embriyonik kök hücreler dışarıdan aldıkları sinyal doğrultusunda diferansiyasyon kapasitesini korur ya da diferansiye olur; birçok çalışma besi yeri içerisindeki moleküler konsantrasyonu değiştirerek istenilen yöne doğru hücrelerin diferansiyasyonunu sağlamaya çalışmıştır (3).

fEKH'leri, çevresel koşul ve ara madde uygulamasıyla farklılaşma yönünde etkilenebilir. Bu tezde amaç minimum değişimle farklılaştırmayı sağlamak; böylece hücredeki kapasiteyi ortaya çıkarmaktır, bir diğer deyişle, fEKH hattının ekildiği ortamdaki yoğunluğa bağlı olarak embriyonik kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin ne olduğunu ortaya koymaktır. Çalışma 2 boyutlu ortam ile 2.5 boyutlu ortamın kıyaslaması şeklinde olup, gelecek çalışmalarda 3 boyutlu olarak tasarlanabilecek projelere öncülük yapacaktır. fEKH'ler farklı konsantrasyondaki hücreler arası maddeden (matrijelden) aldıkları sinyaller doğrultusunda hem morfolojik hem immünofloresan yöntemi ile kök hücre belirteci ve osteoblastik değişim hem de hücre döngüsündeki farklılık ortaya çıkarılmıştır.



BÖLÜM II

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genel Kavramlarıyla Embriyoloji

Embriyoloji, tek bir hücreden organizmaya kadar geçen sürede gerçekleşen hücresel, moleküler ve yapısal etmenleri inceler (4).

Hayat döngüsü altı temel süreçten meydana gelir, bunlar:

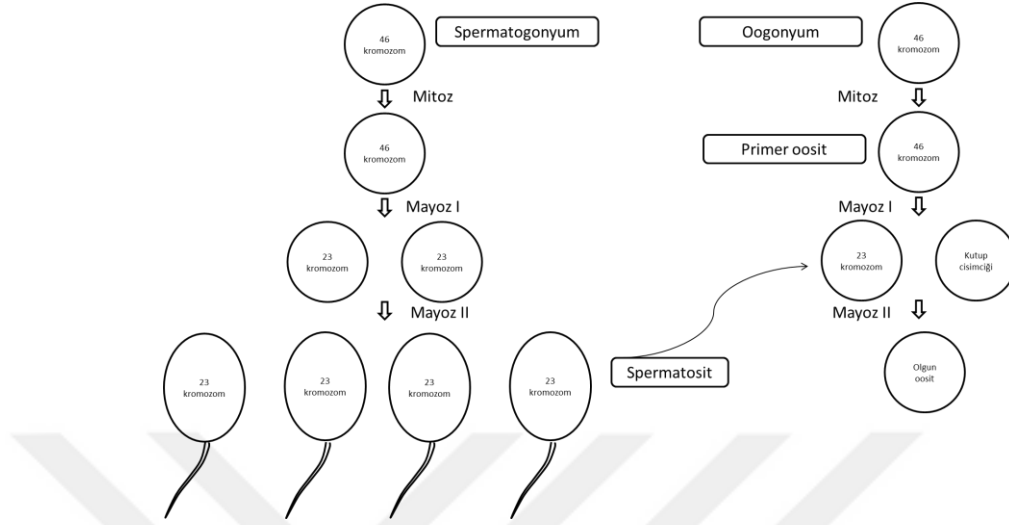
1. Fertilizasyon
2. Yarıklanma
3. Gastrulasyon
4. Organogenez
5. Metamorfoz
6. Gametogenezdır (5).

Embriyoloji alanına yaklaşım anatomik, deneysel ve genetik çalışmalar olarak sınıflandırılabilir. Anatomik çalışmalar diğer çalışma gruplarına veri sağlar (5). Embriyonik kök hücre çalışmaları hem temel bilim çalışmalarında hem de klinik ve mühendislik çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Temel bilimde yapılan çalışmaların klinik yansımaları uzun vadeli olsa da yeni bilgilerin açığa çıkarılması, tüme varımda önemlidir. Embriyonik kök hücrelerin tüm vücut hücrelerine dönüşebilme kapasitesi hücre-doku değişim terapilerinde en önemli kullanılabilir aday olmaktadır (6).

2.2. Embriyolojik Süreç

Kök hücrelerin oluşması için hayat döngüsünün ilk aşaması olan fertilizasyonun gerçekleşmesi gerekir. Memeli organizmada sadece germ hücreleri mayoz geçirir. Erkekte spermatogonya, dişide oogonya belirli aşamaları geçirdikten sonra sırasıyla spermatozoon ve oosit hücrelerine dönüşür. Organizmanın meydana gelmesi için

gerçekleşen ilk oluşum spermatazoon ve oositin bir araya gelerek zigotu oluşturmasıdır (4).

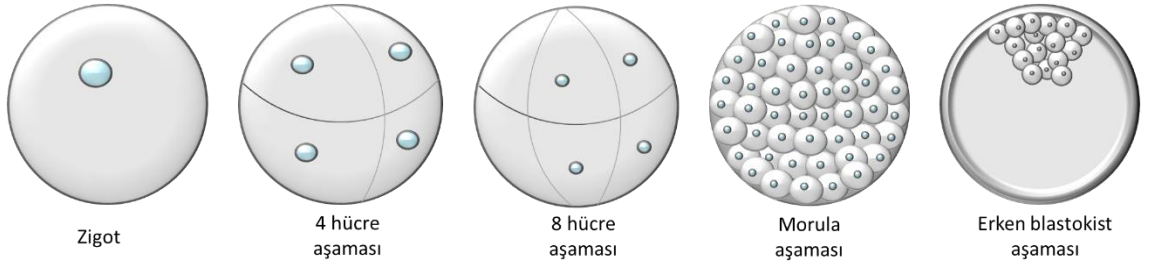


Şekil 1: Spermatogonyum ve oosit oluşumu sonrası zigot oluşumu

(Kromozom sayıları insana uygun şekilde belirtilmiştir.)

Fertilizasyon sonucu diploid oosit oluşur ve zigot olarak adlandırılır (Şekil 1). Zigot hiyerarşik sistemde en yukarıdaki kök hücredir (7) ve mitotik bölünmelerle blastomerleri oluşturur. Zigotik bölünmeler sonucu oluşan 8 ayrı hücre totipotent hücredir (4,8,9). Totipotent hücreler tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip kök hücrelerdir. Bu hücreler, organizmayı oluşturacak her türlü hücre türüne dönüşebilmektedir (9). Blastomer yapısını oluşturan bu hücreler yaklaşık 3 gün boyunca totipotent hücrelerdir (9).

Hücreler organizma bazında kök hücreler, farklı farklılaşma sürecindeki somatik hücreler ve germ hücreleri olmak üzere üç farklı kategoride sıralanabilir (7,10). Kök hücreler bölünme sonucunda oluşan hücrelerde hem kendi yedeğini hem de farklılaşacak hücreyi oluşturabilirler (3). Bu durum kanser gelişiminde de kanser kök hücrelerin (tümör başlatıcı hücrelerin) oluşumunu desteklemektedir ve buna dayalı olarak kök hücre çalışmaları kanser çalışmalarının alt yapısını oluşturabilmektedir (10,11).



Şekil 2: Fertilizasyon sonrası oositsin bölünmesi sonucu 2, 4, 8 hücreli yapıların oluşması ve daha sonra yapının hızlı bölünmeler sonucunda morula ve erken blastosist aşamalarının şematik gösterimi

Zigotun arka arkaya hızlı bir şekilde bölünmesiyle totipotent 2, 4 ve 8 blastomerli embriyo oluşur (Şekil 2). Sonraki bölünmelerle, morula evresi ve blastosist evresi ile hücreler totipotent özelliklerini pluripotent seviyesi düzeyine indirerek kararlanır ve farklılaşmış olurlar. Blastosist yapısında iç yüzeyde bulunan ve iç hücre kütleleri olarak adlandırılan hücreler embriyonik kök hücrelerdir (7,8,12). Hücre kültürü çalışmalarında, bu hücreler köken alınarak embriyonik kök hücre çalışmaları yapılmaktadır (10). Tek hücrenin bölünerek 8 hücreye ulaşmasıyla oluşan hücreler eş hücrelerdir ve farklılaşmamıştır (4). Bu hücrelerin izolasyonu ile 8 hücrenin birbirinden ayrılması ve tek tek kullanılması embriyonik kök hücre kaynağını oluşturur (4).

Doku bazında ise yetişkin kök hücreler bulunmakta ve bu hücreler sınırlı sayıda fakat birden fazla hücreye farklılaşabilmektedir, bu hücreler multipotent hücrelerdir.

Kök hücrelerin sınıflandırılması farklılaşma kapasitelerine göre ve kaynaklarına göre iki şekilde sınıflandırılabilirler.



Şekil 3: Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılması

Kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri totipotent, pluripotent, multipotent olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 3). Fertilizasyon sonrası insanda yaklaşık 4 gün hücreler totipotent özelliğe sahiptir ve her hücre yeni bir organizma oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Herhangi bir uyarım ile hücrelerin birbirinden ayrılması tek yumurta ikizlerini bu şekilde meydana getirir (7). Beşinci günden itibaren hücreler pluripotent hale geçer. Hücre kütlesi küresel bir yapı oluşturmuştur. Bu yapıdaki her hücre pluripotent özellikleri sebebiyle her dokuya farklılaşabilme kapasitesine sahiptir, fakat yapıdan ayrılırlarsa tam bir organizma oluşturamazlar. Pluripotent hücrelerin blastosist yapısından ayırıp farklı ortam koşullarında tutulduğunda 200'den fazla hücre çeşidine dönüştüğü belirtilmiştir (8,13). Hücreler daha sonraki aşamada pluripotent karakterden multipotent karaktere dönüşürler. Bu hücreler yetişkin kök hücrelerdir ve belirli sayıda hücre tipine dönüşebilirler. Örneğin, derinin bazal kısmında bulunan hücreler yukarıya doğru değişerek farklı tipte hücrelere fenotiplenirler (8).

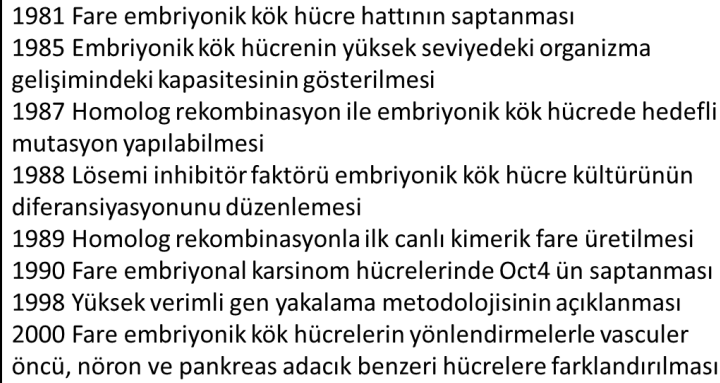


Şekil 4: Kök hücrelerin farklılaşma kaynaklarına göre sınıflandırılması

Kök hücreler kaynaklarına göre ise embriyonel, yetişkin ve fötal (kordon kanı) kök hücreler olarak sınıflandırılırlar (Şekil 4) (8). Embriyonel kök hücreler daha öncede belirtildiği gibi blastosist aşamasında yapıdan ayrılarak elde edilir ve deneysel olarak kullanılır (14). Embriyonik kök hücrelerin telomer uzunluğu somatik hücrelere göre fazladır (15,16). Telomerler, kromozomların uç bölgelerinde bulunan, tekrarlı nükleotid sekansına sahip heterokromatin yapıdaki kodlama yapmayan bölgelerdir. Bu alanlar, hücre bölünmesi sonucunda kromozomların kısalmasını engellerken aynı zamanda kromozomların birbiri ile birleşmesini engeller (17).

2.3. Kök Hücre Tanımı ve Ortaya Çıkışı

Kök hücrenin genel tanımı, sınırsız bölünme yeteneğine sahip, özelleşmiş olgun hücre tiplerinin gelişmesine kaynak olan hücre olarak belirtilebilir (7,16). Kök hücreler dokuların ve organların oluşumu için gereken temel hücrelerdir. “*Omnis cellula e cellula*” Rudolph Virchow’un sözleriyle her hücre kendine benzeyen bir başka hücreden meydana gelir ve bu durum kök hücre çalışmalarına rejeneratif tıp açısından bakıldığında özetleyici bir tanımlama olmuştur (18). Kök hücre terimi ilk olarak bitki çalışmalarında karşımıza çıkmakla beraber bitkilerin meristem bölgesinden yeni bir oluşum gerçekleştiğini anlatmak için kullanılmıştır (7).



1981 Fare embriyonik kök hücre hattının saptanması
1985 Embriyonik kök hücrenin yüksek seviyedeki organizma gelişimindeki kapasitesinin gösterilmesi
1987 Homolog rekombinasyon ile embriyonik kök hücrede hedefli mutasyon yapılabilmesi
1988 Lösemi inhibitör faktörü embriyonik kök hücre kültürünün diferansiyasyonunu düzenlemesi
1989 Homolog rekombinasyonla ilk canlı kimerik fare üretilmesi
1990 Fare embriyonal karsinom hücrelerinde Oct4 ün saptanması
1998 Yüksek verimli gen yakalama metodolojisinin açıklanması
2000 Fare embriyonik kök hücrelerin yönlendirmelerle vasculer öncü, nöron ve pankreas adacık benzeri hücrelere farklılaştırılması

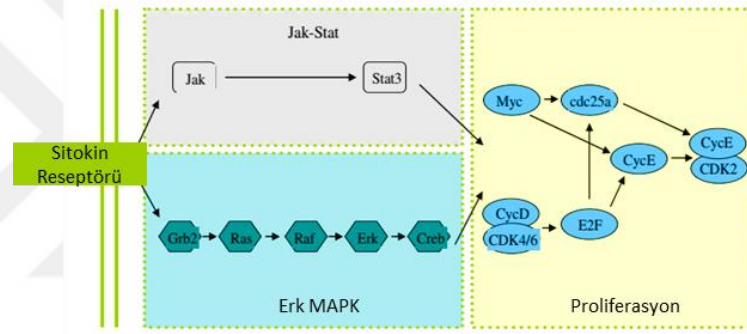
Şekil 5: 2000’li yıllara kadar embriyonik kök hücrelerin gelişimi (19)

Deneysel kök hücre çalışmaları ise, 1960’lı yıllarda hematopoietik kök hücrelerin keşfi ile başlamış ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre çalışmaları ile devam etmiştir (8). Embriyonik kök hücre 1981 yılında iki bağımsız çalışma grubu tarafından (20,21) fEKH’ler blastosistin iç hücre kütesinden izole edilmiş ve tekrarlı bir şekilde bölünmesi sağlanmıştır (Şekil 5) (21). Blastosistin iç hücre kütesini saran ve dış kısımda bulunan kısım trofoektodermdir. Trofoektoderm hücreleri ileriki safhalarda plasentayı oluştururken, iç küre kütesi gelişecek embriyodaki yapıyı oluşturmaktadır (4).

1991 yılında Matsui ve arkadaşları primordiyal germ hücrelerini fare kökenli izole etmiştir (22). Daha sonra primordiyal germ hücre ile ilgili çalışmalar hızlanmış ve diğer organizmalarda bulunan germ hücrelerinin izolasyonu ve bu hücrelerle ilgili olan çalışmalara devam edilmiştir. Örneğin, sığırlarda birçok embriyonel pluripotensi

ile ilgili araştırılma yapılmıştır (23–25). İnek embriyolarının pluripotent özelliği 1994 yılında gösterilmesine rağmen (26) 2001 yılına kadar inek embriyonik kök hücre üretimi yapılmamıştır (27). 1990'lı yıllarda sinir kök hücreleri tespit edilmiş ve diğer dokularda da varlıkları bulunmuştur. Hayvan deneyleri çalışmalarında kök hücrelerin uzun vadeli beklenti insanlar için bütün bir organ ve/veya uzuv oluşturulabilmesidir.

Devamlı kendini yenileme özelliği hem kök hücrelerde hem de kanser hücrelerinde ortaktır, fakat ortak mekanizma kullanıp kullanmadıkları henüz belli değildir. Kendini yenileyebilme özelliğini tetikleyen iç ve dış mekanizmalar kısmi olarak bilinmektedir. *In vitro* ortamda tetiklemek ve diferansiyasyonu ertelemek amacıyla fEKH besi yerine genellikle LIF eklenir (Şekil 6), böylece hem LIF reseptörü hem de gp140 yoluyla JAK/STAT yolağı aktiflenir (28,29).



Şekil 6: LIF molekülü iki farklı yoldan fare embriyonik kök hücrelerin (fEKH'lerin) bölünmesini ve kendini yenilemesini sağlar (29).

JAK/STAT yolağının aktiflenmesi sonucu ise STAT3 dimerleşir ve kendi kendini yenileme karakterine özel genleri aktifler. İnsan embriyonik kök hücresi ise fEKH'lerinden farklı olarak LIF ilavesine bağlı olarak değil büyüme faktörlerinin etkisine ve FGF ile TGFb yolağı etkisiyle kök hücre karakterini devam ettirmektedir (30–32). fEKH'leri LIF eksikliğinde de koloniler oluşturmakta, bu da hem içsel hem dışsal mekanizmalarda başka moleküllerin ve olayların önemini ortaya çıkarmaktadır (33). Bu aşamada JAK/STAT yolağının kendini yenileme mekanizmasındaki rolünün aydınlatılmasının önemli olduğu düşünülmektedir (29). Diferansiyasyon kapasitesinin içsel mekanizmalarda Nanog, Oct4 ve STAT3 molekülleriyle ilgili olduğu da bilinmektedir (34–37).

Rejeneratif tıp araştırmalarında bazı organizmaların nasıl kendini yenilediği merak konusudur ve kök hücrelerin bu alanda kullanılmaya çok yatkın bir materyal olduğu bilinmektedir; embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerin yanında IPS hücrelerde kullanılarak birçok konu üzerinde (ovaryal organoidler (38), otoimmün hastalıklar (39), diyabet (40) vb.) birçok farklı araştırmalar yapılmaktadır. Kök hücrelerin karakteristiğine göre hücreler aynı doku kaynaklı ya da diğer dokulara dnştrbilmesi olasılıklı çalışmalar sürmektedir. Omurgasız canlılarda rejenerasyon daha sıklıkla karşılaşılan bir durumken, yüksek omurgalı canlılarda bu durum çok kısıtlıdır (7).

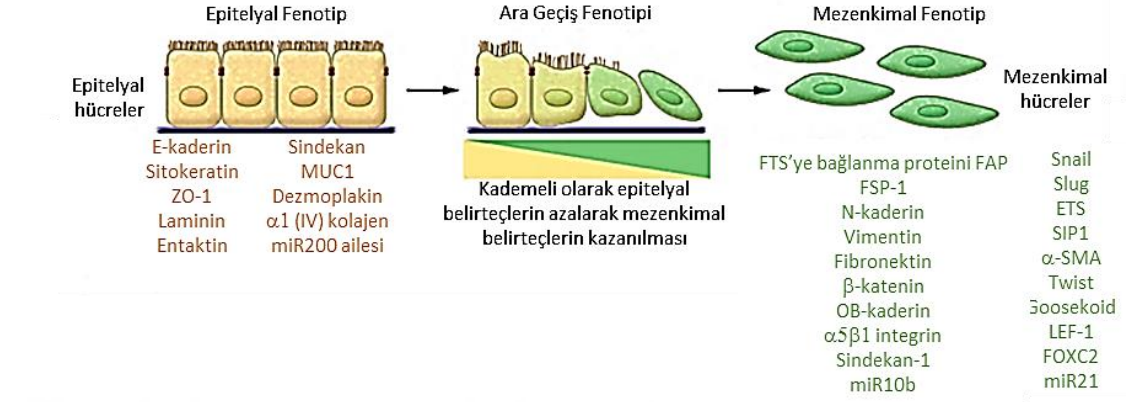
Kök hücreler simetrik ve asimetrik olarak bölünebilirler. Hücrelerin bu bölünme karakteristiği, onların kaynak kök hücrelerinin azalmamasını, aynı zamanda farklılaşabilecek hücrelerin meydana gelmesini sağlar. Simetrik bölünmede kök hücreler kendilerine eş iki yeni hücre ya da farklılaşacak iki yeni hücre meydana getirirken, asimetrik bölünme sonucu oluşacak hücrelerden biri kök hücre kaynağı hücre olarak kalır, diğerisi ise farklılaşır (3).

Asimetrik bölünme durumunda organlarda yetişkin kök hücre kaynağının bulunmasının yanında, dokuların yenilenmesi de sağlanmış olur (7). Kök hücreler içerisinde bulunmadıkları ortamların hücrelerine de farklılanabilirler, bu da onların plastisite özelliklerini göstermektedir. Kök hücrelerin sonsuzluğu, JAK/STAT sinyal yolağının aktif olması ile beraber TGF- β , ve Notch sinyal yolaklarının aktivatörlerinin transkripsiyonel olarak aktif olması, büyüme faktörlerini ve hücreler arası maddeyi hissedebilmeleri, hücre döngüsünde G1 fazında takılmaları ya da döngüde ilerlemeleri, strese karşı dirençli olup DNA tamiri, protein katlanmaları, ubiquitinasyon ve detoksifikasyon mekanizlarının iyi olması, kromatin modellemesinde DNA helikazlar üzerinden DNA metilasyonu ve histon deasetilasyon mekanizlarını kullanmaları ve translasyonun Vasa tipi RNA helikazlar ile gerçekleştirmelerine dayandırılmaktadır (7).

2.4. Epitelyal ve Mezenkimal Geçiş (EMT) ve Farklılaşma

Hücrelerin hücrelerden meydana geldiği yaklaşık olarak 165 yıldır bilinse de (41,42) hücre-hücre ve hücre-hücre dışı bölge arasındaki etkileşimin sonuçları güncel

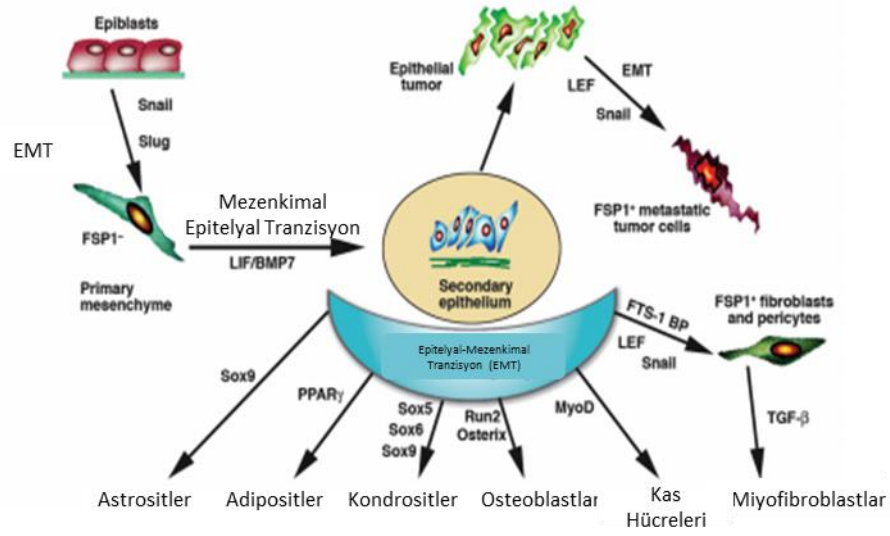
araştırma konularındandır. Epitelyal karakteri terk edip mezenkimal karaktere geçiş düşüncesi ilk defa Elizabeth Hay tarafından 1980'lerde savunulmuştur (43).



Şekil 7: EMT aşamalarında belirteç olarak kullanılan moleküller (44)

EMT sürecinde polarize olmuş ve bazal membran üzerine oturmuş olan epitelyal hücreler biyokimyasal değişimlerle mezenkimal ve fibroblastik hücre fenotipine dönüşür ve migrasyon kapasitesini yükselterek invazif hale gelir, ayrıca apoptoza karşı dirençli hale gelerek ESM bileşenlerini daha fazla üretir (44). Embriyonik gelişim için gerekli olan bu süreçte hücreler, hücre-hücre bileşimindeki komponentleri kaybeder ve hücre iskelet sistemini yeniden düzenler (Şekil 7) (45), E-kaderin ve alfa-kaderin ekspresyon düzeyi azalırken, N-kaderin, vimentin ve fibronektin ekspresyonunu artırır ve hipoksik ortam nedeniyle metastaz indüklenir (41,44,46,47); ESM komponentlerini yıkarak hareketli hale geçerler (41).

Malign kanserin ilerlemesi için EMT'nin gerçekleşmesiyle beraber invazif karakterin kazanılması durumu gerçekleşir (41). EMT ayrıca diğer birçok patolojik süreçte de görülen bir durumdur (41,45).



Şekil 8: Embriyonel gelişim döneminde aktifleşen EMT ile ilgili yollar (42)

EMT süresince özellikle TGF- β , Wnt ve Notch olmak üzere birçok yolk etkilidir (Şekil 8). EMT sürecini tetikleyici transkripsiyon faktörlerinin büyük bölümünü Snail, ZEB ve TWIST proteinleri kontrol eder (41,48). EMT embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, organ gelişimi ve kanser ilerlemesi ile ilgili bir süreçtir (41,46,49). Gelişimsel süreçte epitelyal hücrelerin polaritelerini kaybetmesi ve bağlantı komplekslerinin yeniden oluşturulması gerçekleşir. Örneğin bu durum tübülogenez, meme bezinin dallanması, gastrulasyon, böbrek ve damak gelişiminde gerçekleşir (41,46). EMT sürecinde olan hücreler belirli proteinleri daha fazla sentezlerler ve bu proteinler EMT belirteci olarak kullanılmaktadır (Şekil 7) (44).

2.5. Embriyonik Belirteçler

2.5.1. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri

Embriyonik kök hücre belirteçleri genellikle hücrelerin pluripotensi ve kendini yenileme özelliklerinin düzenlenmesi için gerekli olan transkripsiyon faktörleridir. miRNA'ların güncel hale gelmesinden sonra ise embriyonik kök hücreye özel miRNA sekansları bulunmaya çalışılmaktadır (50), fakat belirteç olarak henüz kullanılmamaktadır.

Pluripotent embriyonik kök hücrelerin karakterizasyonu ve izolasyonu aşamasında embriyonik kök hücre belirteçleri ihtiyacı duyulmuştur. Embriyonik kök

hücreler kendilerine has transkripsiyon faktörler, yüzey belirteçleri, yolak bağımlı belirteçler ve lektin-peptid belirteçler olarak sıralanabilir (51). Transkripsiyon faktörlerinden en bilinen belirteçler Oct4, Sox2, NANOG, ESRRB, TBX3, TCL1, NAC1, DAX1, SALL4, ZFP281, RIF1 ve ZIC3 molekülleridir ve bu moleküller kendi ekspresyonlarını ve diğer ilgili gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (52).

Embriyonik kök hücrelerin boyutları diğer hücelere göre daha küçük olmakla birlikte sitoplazma çekirdek oranı yüksektir. Embriyonik kök hücreler tutundukları yüzey üzerinde '*embrioid body*' olarak isimlendirilen kolonileri oluşturur. Hızlı bölünme ve diferansiyasyon kapasitesi ile kanser hücrelerinin davranışsal özelliklerini de sergilerler. Embriyonik kök hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilebilmesi ve ayrıştırılması için moleküler bazda bazı tanımlamalar yapılmıştır. Örneğin SSEA-1 ve Oct4 ifadelenmesi embriyonik kök hücre varlığını göstermektedir (34). Bu moleküller genellikle immünolojik tekniklerle gösterilse de akış sitometrisi ile de hücrelerin ayrıştırılması sağlanmaktadır (8).

2.5.1.1. Oct ³/₄

Embriyonik kök hücrenin Oct-4 ifade etmesi o hücrenin pluripotensi özelliğini koruduğunu göstermektedir ve hücre sayısı arttıkça iç kısımda kalan germ hücrelerinde ifadelenme sürerken genellikle periferik kısımdakiler ekspresyonu kaybedebilir (7,53).

2.5.1.2. SSEA-1

Bazı hücre hatlarının gösterdiği üzere insan embriyonik kök hücresi ile fEKH'si eşit olarak embriyonik kök hücre karakterini göstermezler. Örneğin insan embriyonik kök hücresi diferansiyasyon sırasında trofoblast hücreleri tarafından üretilen AFP ve HCG'yi eksprese eder. Fakat, fEKH'lerinin genellikle ekstraembriyonik seriye dönüşmediği düşünülmektedir. İnsan embriyonik kök hücresi embriyonik gelişim safhasına bağlı olarak diferansiyasyondan önce SSEA-3, SSEA-4, tümör ret antijen TRA-1-60 ve TRA-1-81 yüzey antijenlerini, farklılaşmak üzere SSEA-1 genini eksprese ederken, fEKH'leri farklılaşmak üzere sadece SSEA-1 genini eksprese eder. Ayrıca LIF'e duyarlılık kapsamında insan embriyonik kök hücresi LIF molekülüne anlamlı bir yanıt vermezken ve ilgili reseptörün varlığı düşük seviyedeysen,

fEKH'sinin *in vitro* ortamda diferansiye olmaması LIF molekülünün takviyesine bağlanmıştır (7).

2.5.2. Embriyonik Kök Hücre Çalışmaları

Embriyonik kök hücre çalışmalarında diferansiyasyon kapasitesi çalışması iki boyuttaki çalışmalarla sınırlıdır. Üç boyutlu kök hücre çalışmalarında ise ko-kültür uygulaması çalışmaları yeni yeni başlamıştır. İnsan ya da mürin embriyonik kök hücreleri pasaj sonrası farklılaşmadan rutin olarak büyümeleri için firmalarca önerilen bir tabaka (*feeder layer*) yüzeyine ekilmektedir (7). *In vitro* ortamda ise embriyonik kök hücreler sadece iç hücre kütesinde bulunmakta ve ektoderm, mezoderm, endoderm olmak üzere üç öncül germ tabakasına dönüşmektedir (7). Ardından öncül hücreler somatik hücrelere dönüşerek organizmayı meydana getirmektedir. Kültür ortamında embriyonik kök hücreler belirlenen optimal ortamda büyütülür ve simetrik bölünerek farklılaşmadan kalır. Hücrelerin bölünmesi, telomer uzunluğunu telomeraz geninin aktivitesi sayesinde değiştirmez (7).

Embriyonik hücrelerin *feeder* yüzey olmaksızın farklılaşmaması için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bunun öncülerinden Austin Smith 1988 yılında bufalo sıçan karaciğer hattında bulunan polipeptid faktörü, embriyonik kök hücre diferansiyasyonunu inhibisyon aktivitesi (DIA), bulunduğunu savunmuştur. Ayrıca bu protein sekansının insandaki LIF ile eş olduğu belirtilmiş ve diferansiyasyonu durdurmak için benzer reseptörlere bağlandıkları savunulmuştur (54). Embriyonik kök hücrelerin *in vitro* büyütülmesi sırasında bu faktörün kullanılmaması durumunda pluripotensi belirteci olan SSEA-1 proteinin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (54).

2.5.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Klinik Alanda Kullanımı

İnsan embriyonik kök hücrelerin klinik çalışmalarda kullanılması etik kuralları gereği yapılmamaktadır. Geçtiğimiz yıllarda planlanan insan embriyonik kök hücresi kaynaklı çalışmaların başlatılması ertelenmiştir (55).

2.6. Mezenkimal Kök Hücre ve Belirteçleri

2.6.1. Mezenkimal Kök Hücre Tanımı

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileme kapasitesine sahip, multipotent öncü hücreler olup mezodermal orijinli olan adiposit (56,57), osteosit (58,59) ve kondrositlere (60,61) dönüşebilmektedir. Genellikle kemik iliğinden izole edilirler, bunun yanında adiposit doku (62), plasental doku (63), amniyotik sıvı (63) ve göbek kordonu (64) kaynaklı olarak da elde edilebilirler (65). Mezenkimal kök hücre tanımı iki farklı şekilde yapılmaktadır. İlk tanıma göre postnatal, kendini yenileyebilir ve multipotent hücrelerdir ve iskeletal sistemindeki hücelere dönüşebilir. Klonojenik öncü hücreler memeli kemik iliğindeki perivasküler hücrelerdir. Bu hücrelerin *in vivo* transplantasyonu minyatür kemik yapılarının oluşumunu gerçekleştirmiştir. İkinci tanımlama ise mezenkimal kök hücreler, kök hücre ya da mezenkimal hücre olmak zorunda değildir. Bu hücreler aynı zamanda multipotent stromal hücreler (66), mezenkimal stromal hücreler, ya da medikal sinyal hücreleri (63) olarak da adlandırılmaktadır. Bu tanımlamalardaki çatışmalar bir ortak noktada birleşmektedir. Mezenkimal kök hücre bağ dokusu elemanları olan hücelere diferansiye olabilir (63). Bu hücrelerin kültürleri yapılabilir ve immünolojik hastalıklarda tedavi ajanı olarak kullanılma çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca farklı hastalıklarda (otizm, idrar tutamama ve diğer birçok hastalık) aday tedavi ajan olarak denemeler sürmektedir, fakat sonuçlandırılmış bir gelişme bulunmamaktadır (67).

2.6.2. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri

Mezenkimal kök hücrelerin hematopoetik hücrelerden ayrımı ilkel olarak yüzeye yapışma kapasitelerine göre yapılmaktadır. Mezenkimal kök hücreler yüzeye yapışırken, hematopoetik karakteristiğinden olayı diğer hücreler yüzmektedir (67). Mezenkimal kök hücrelerin seçiminde belirteç olarak birçok molekül belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerinin belirlenmesinde hücre-yüzey belirteç ekspresyonunun uyumlu olması tavsiye edilir; popülasyonun %95'den fazlası CD105, CD73 ve CD90 eksprese etmeliyken %2'sinden fazlası CD45, CD34, CD14 ya da CD11b, CD79a ya da CD19 ve HLA sınıf 2 eksprese etmemesi gerekir (66). Bunların dışında genellikle mezenkimal kök hücreler Stro-1 pozitifdir (68).

Mezenkimal kök hücrelerin yerleşimi ve diferansiyasyonu, transplantasyon histoloji ve sonrasında yapılan mikroskopik gözlemlere dayanarak takip ve diferansiyasyon belirtecine göre belirlenir. Bunun için hücreler çeşitli etiketlerle boyandıktan sonra (örneğin GFP) transplante edilir ve yerleşimi takip edilir (69).

2.6.3. Mezenkimal Kök Hücre Çalışmaları

Çeşitli kaynaklardan izole edilen kök hücreler yağ, kemik ve kıkırdak hücrelerine dönüşebilme kapasitesine sahip hücrelerdir ve *in vitro* koşullarda kültüre edildikten sonra kimyasal olarak indüklenir ve istenilen yukarıda belirtilen hücre tipine dönüştürülebilir. Bu özelliği nedeniyle mezenkimal kök hücreler klinik öncesi ve klinik vakalarda kullanılabilecek terapötik ajan olarak görülmektedir ve birçok hastalıkta tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerden mezenkimal kökenli olmayan hücrelerin eldesi (örneğin nöral sistem) de çalışmalar arasındadır (63). Mezenkimal kök hücre kullanımında iki ana problem bulunmaktadır. Bunlardan ilki genel mezenkimal kök hücre belirteçlerinin spesifik olmaması, ikincisi ise hücre takip moleküllerinin ve ajanlarının güvenilirliğinin kuşkulu olmasıdır (69).

2.6.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Alanda Kullanımı

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileyebilme özelliğinin yanı sıra multipotent özelliğe sahiptir. Mezenkimal kaynaklı hücrelerin yanı sıra endodermal ve ekzodermal kaynaklı hücrelerin (hepatosit, nöron, kardiyomiyosit gibi) eldesi için kullanılabilir (65). Mezenkimal kök hücrelerin lenfositlerle etkileşimi sonucu ortaya çıkan immün baskılayıcı ve antiinflamatuvar etkileri klinik açıdan kullanılmak istenmektedir. Kemik kırıkları, osteolitik kemik tümörü cerrahisi veya osteonekroz sonrasında sıklıkla görülür. Bu bağlamda, otolog ya da allojenik mezenkimal kök hücreler ile kemik dokusu mühendisliği yaygın olarak geliştirilmiştir (58).

Mezenkimal kök hücrelerden adiposit hücrelerine diferansiyasyon klinik açıdan yanık tedavilerinde büyük önem taşımaktadır, çünkü tedavi aşamasında yumuşak doku eldesi zorlu bir süreçtir (56). Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler ise hem adipoz dokunun kolay ulaşılabilirliğinden, hem de invazif karakterin minimum olmasından dolayı daha avantajlıdır, ayrıca öncü hücre sayısı yüksektir (62). Adipoz

kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin belirteçleri türe göre değişebilmektedir ve literatürde belirtilmiştir (62).

2.7. Osteopontin

O-glikozile yapısal fosfoprotein olan osteopontin (OPN) çeşitli dokularda sentezlenir ve vücut sıvılarına salınır. Ayrıca kalp, böbrek, akciğer, kemik, beyin, gastrointestinal sistem, eklemler, karaciğer ve yağ dokusunda hasar ve enflamasyona cevap olarak yüksek ifadelenir (70) ve korneal iltihaplanma ve onarım sırasında dokularda da bol miktarda eksprese olan bir matriks glikofosfoproteinidir (71). Ayrıca, artan OPN ifadesi, artmış hücre mobilizasyonu, sağkalım ve aktivite ile ilişkilendirilmiştir (72). OPN'nin dokularda aktif hale gelmesiyle fiziksel zorlukların azalması sonucunda hücrenin şeklini dinamik olarak yeniden şekillendirmeye yetecek yeteneği, göç davranışları için önemlidir gibi görünmektedir. Hücre iskeletinin düzenlenmesiyle belirlenen hücre sertliğindeki değişimi kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini etkileyen bir özelliktir. Hücre sertliğindeki azalması desmosomal proteinleri şifreleyen genlerdeki N-terminal mutant hücrelerindeki artan yara iyileşmesi hızıyla doğru orantılıdır. Bu çalışmalar göstermiştir ki hücre sertliği ile hücre hareketi arasında sıkı bir ilişki vardır (73).

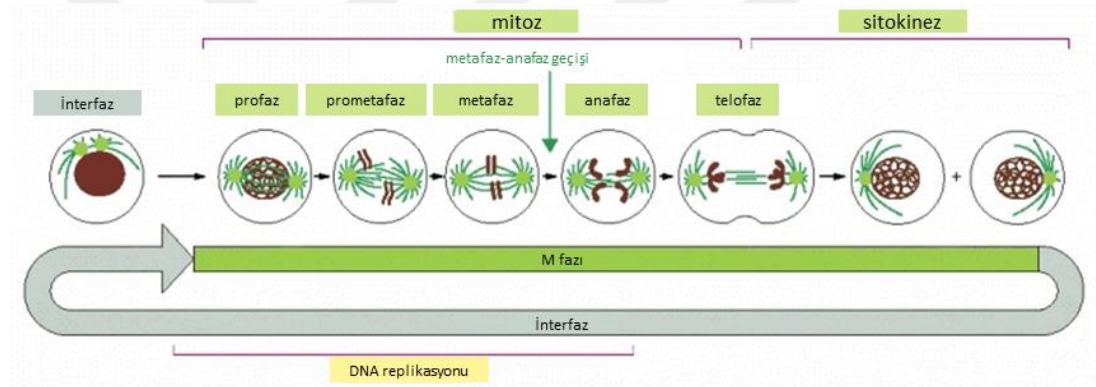
OPN integrin b1, FAK ve ERK yollağıyla rMSC'lerin Young Modülünü azaltır. Young modülüs ile karakterize edilen hücre sertliğindeki değişimin hücre migrasyon davranışındaki değişimi bulunmuştur. Hücrenin göçü üzerindeki bilinen düzenleyici fonksiyonunun FAK yolaklarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. VSMC'leri OPN ile tedavi etmek, OPN'ye bağlı VSMC'lerin migrasyonuna aracılık eden FAK'ın fosforilasyonuna neden olabilir (74). OPN'nin çeşitli hücrelerde ERK'in fosforilasyonunu ve aktivasyonunu indüklemeye kabiliyeti belirlenmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde artmış OPN ekspresyonu ERK aktivasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (75). Buna ek olarak, OPN, ERK'nin fosforilasyonu yoluyla vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonunu arttırmış ve ERK inhibitörü, kısmen OPN ile indüklenen insan göbek kordonu endotel hücresi hareketliliği, proliferasyonu ve tüp oluşumunu inhibe ettiği düşünülmüştür (76).

Ayrıca çalışmalarda OPN ve hücre iskeleti ilişkisi gösterilmek üzere, OPN'e maruz bırakılan rMSC'ler ile kontrol grubu arasında aktin sitoskeleton düzenlemesinin farkı gözlenmiştir. Bu sonuç ise OPN'nin hücre sertliğini azaltma üzerindeki etkisini desteklemiştir (74).

2.8. Hücre Döngüsü Evreleri

2.8.1. Kök hücrelerde hücre döngüsü

Hücre döngüsü, hücre içindeki siklin ve siklin bağımlı kinaz moleküllerinin periyodik olarak belirli kurallar halinde aktifleştirilip susturulması çerçevesinde gerçekleşen bir süreçtir ve amaç tam olarak DNA dizisini kopyalayıp yavru hücre meydana getirerek hücre sayısını artırmaktır (17).



Şekil 9: Hücre döngüsü (17)

Hücre döngüsü interfaz ve M fazını içerir. İnterfaz G1, S ve G2 fazlarını kapsar ve her bir fazda mitoz fazı için gerekli olacak olan moleküller üretilir. Hücrenin bölünebilmesi için gerekli moleküllerin sentezlenmesi ve ayrıca genetik materyalin sentezlenerek iki katına çıkarılması, böylece bölünmede genetik materyalce eş iki hücre oluşturulması sağlanmaktadır (Şekil 9) (17).

Bir hücre bölündükten sonra büyüme ve yeniden bölünmeye karar vermesi aşamasına kadar G1 fazında kalacaktır. Hücrelerin bu faz aşamasında kalma süresi hücre tipine göre değişmektedir. Hücrelerin biyolojik aktiviteleri mitoz aşamasına göre yüksektir. Bu aşamada protein sentezi ile birlikte organel sayısı da artmaktadır. G1 fazında, hücrenin mitojenik ve büyümeyi önleyici sinyalleri bütünleştiği ve

hücre döngüsünün ilerlemesine, durmasına veya çıkışına karar verdiği açıktır. Hem maya hem de memeli hücrelerinde G1 fazında önemli bir kontrol noktası belirlenmiştir. Mayadaki başlangıç ve memeli hücrelerindeki sınırlama olarak anılan bu nokta, hücrenin DNA replikasyonuna ve hücre döngüsünü tamamlayabileceğine karar verdiği noktadır 1-3 (17).

Hücre döngüsünde DNA eşlenmesi S fazında gerçekleşir ve zaman olarak hücre döngüsünün neredeyse yarısını kapsar. S fazı memelilerde yaklaşık olarak 12 saat sürer (17). S fazının sonucunda genetik materyal iki katında çıkmış, kromozomlar replike edilmiştir. Replikasyon ve eşleme aşaması genetik materyalin mutasyona en açık olduğu süreçtir (17).

G2 fazında hücre içerisinde hızlı protein sentezi devam etmektedir. Bu proteinler mitoz aşamasında kullanılmak üzere üretilmektedir. Daha sonra M fazı başlar. Bu faz aşamasında kromozomların segregasyonu ve mitoz gerçekleşir ve sona doğru sitokinez başlar. Bu faz memelilerde yaklaşık 1 saat sürer (17). Bu aşama alt fazlara bölünmüş ve genetik materyalin lokalizasyonu ve yoğun hale gelme süreci faza göre farklılık göstermektedir. Alt fazlar profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak ayrılmaktadır. Profaz sürecinde nükleus membranı dağılır, kromozomlar yoğunlaşır (77). Nükleus membranı degrades olur ve kromozomlar yoğunlaşarak kardeş kromatidler halinde iğ iplikçiklerine tutunurlar. Metafaz aşamasında kromozomlar metafaz çizgisi olarak adlandırılan hücrenin ortasında dizilirler ve anafaz kısmına geçildiğinde kromozomlar kutuplara çekilirler (17).

Hücreler, bölünme aşamasından sonra tekrar döngünün başlangıcına geçmiş bulunurlar. Hücreler bazı durumlarda dinlenme aşamasına yani G0 aşamasına geçer. Ayrıca bu faza sessizlik (*quiescence*) fazı da denir. Senesens içerisinde olan hücreler de G0 fazında bulunmaktadır. Sinir hücreleri bölünmeyen/nadir bölünen hücreler olarak bilinirken G0 fazında olan hücrelerdir. Hızlı bölünen hücreler (örneğin hepatositler ve epitel hücreleri) G0 fazına girmeden direkt G1 fazına girer (17).

Hücre döngüsündeki kontrol noktaları hem normal hücrelerde hem de sağlıklı olmayan hücrelerde önemli bir araştırma noktasıdır. Bu nedenle DNA hasarına yol açan ajanlar, mikrotübül inhibitörleri, antimetabolitler, topoizomeraz inhibitörleri

üzerinden çalışan terapötik ilaçlar hücre döngüsü kontrolünde kontrol noktalarının etkinliğinin düzenlenmesi ile birlikte hücre kaderini etkileyen büyüme ve apoptotik mekanizmaları tetiklenebilir (77).

Her siklin, siklin kutusu (*cyclin box*) adı verilen sekansa sahiptir ve bu bölgeleri siklin bağımlı kinazları (cdk) aktive eder. Siklinler sadece hücre döngüsünü değil aynı zamanda transkripsiyonel regülasyonu, DNA hasar tamiri, diferensiyasyon gibi süreçlerde de görevlidir (Tablo 1) (78). Siklin bağımlı kinazların fosforilasyonu kinaz aktivitesini olumlu ya da olumsuz etkileyebilir (78). Siklinlerin ubiquitinlenerek degradasyonunun sağlanması, hücre döngüsünde önemli aşamaların gerçekleştirilmesini sağlar (78).

Tablo 1: Siklin ve siklin bağımlı kinazlar ile hücre içindeki fonksiyonları (78)

Siklinler	İlgili Siklin Bağımlı Kinazlar (cdk)	Fonksiyonlar
A	cdk1(cdc2), cdk2	S faza giriş ve geçiş Yüzey bağımlı büyüme
B1, B2	cdk1	G2 fazından çıkış Mitoz
C	cdk8	Transkripsiyonel regülasyon G0 dan S fazına geçiş
D1, D2, D3	cdk4, cdk6	G0 dan S fazına geçiş
E	cdk2	G0/G1dan S fazına geçiş
F	?	G2 dan M fazına geçiş
G1, G2	cdk5	DNA hasarına cevap
H	cdk7	cdk aktivasyonu Transkripsiyonel regülasyon DNA tamiri
I	?	
K	?	Transkripsiyonel regülasyon cdk aktivasyonu
T1, T2	cdk9	Transkripsiyonel regülasyon

D-tipi siklinler hücrenin G0 fazından çıkarak hücre döngüsüne girmesini tetikler (77). D siklinlerin degradasyonu diğer siklinler gibi inişli çıkışlı değildir ve etkinlikleri büyüme faktörlerine dayanmaktadır ve cdk4 ve cdk6 ile etkileşip aktive ederler. G1 kontrol noktasında en önemli proteinlerden biri olan Retinoblastoma (Rb) ve Rb ilgili proteinleri siklin D'nin primer substratıdır. Hücre döngüsündeki fazlara göre siklinler ve siklin bağımlı kinazların aktif halde bulunmaktadır (Tablo 1) (77).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak çalışan proteinlerden biri p21'dir ve p21 hem cdk4 ile hem de PCNA ile etkileşime girer. Hücre döngüsünü siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerini inaktive ederek ve PCNA proteinine bağlanıp DNA sentezini

inhibe ederek durdurur. p21 geninin olmadığı durumda hücre G1 kontrol noktasında DNA hasarı olsa bile hücre döngüsüne devam eder (34). p27 ve p57, p21 gibi siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksler üzerinden çalışır (36-38). INK4 protein ailesinde (p16, p15, p18, p19) hücre döngüsünde görev alan inhibitörlerdir; siklin D ile cdk4 ve cdk6 proteinleri ile etkileşime girerler (78).

Embriyonik kök hücrelerin bölünme hızları yüksektir. Fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin diferansiyasyon aşamasında G1 fazını arttırdığı görülmüştür, bu bilgi de embriyonik kök hücrelerin kısa G1 fazda olması pluripotent karakterinin ayırt edici özelliğidir (79). Rb, G1 kontrol noktasında G1 fazından S fazına geçişte görevlidir, hücrenin S fazına hazır olup olmadığını kontrol eder ve Rb'nin cdk'lar ile fosforilasyonu sonucunda aktifliğini kaybederek hücrenin S fazına geçmesi sağlanır. Embriyonik kök hücrelerde Rb genellikle inaktif halde bulunur ve hücre D-siklinlere ve cdk inhibitörlerine karşı da yanıt vermez (78).

2.9. Hücreler Arası Madde

2.9.1. Hücreler Arası Maddenin Tanımı ve Bağ Dokusu ile İlişkilendirilmesi

Hücreler arası maddeler olarak *in vitro* ve *ex vivo* çalışmalarda hidrojeller kullanılmaktadır. Hidrojeller fibrin ya da alginat gibi doğal maddeler olabilmekte birlikte sentetik hidrojellerde (örneğin Poli-etilen glikol) varlığını sürdürmekte ve gelişime açık bir konu olarak günümüzde belirmektedir. Hidrojeller, içeriğindeki değişen su miktarına ve çeşitli fiziksel kimyasal olaylara bağlı olarak çapraz ağlar oluşturan yapılar halindedir. Hidrojeller, su bazlı malzemelerdir ve tasarlanmaları biyofiziksel ve biyokimyasal olaylara dayanır. Bu malzemeler şırınga ve kateterler aracılığıyla minimum invazif tekniklerle kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır. Hidrojel yapıları enjekte edildiği süre boyunca akışa izin verebilecek şekilde, enjeksiyondan sonra ise kısa sürede jel formuna dönecek şekilde tasarlanmaktadır (80).

Desenli cam yüzeyler, elastomerik filmler, hidroksiapatit seramikler ve fibriler köpükler de dahil olmak üzere, bir dizi biyolojik-sistemik sistem geliştirilmiştir. Bununla birlikte, hidrojeller hücre kültürü için en umut verici seçenek olarak ortaya

çıkıştır, çünkü doğal ekstraselüler matrikslerin belirgin elementlerini taklit ederler, mekaniği birçok yumuşak dokununkine benzer ve hücrenin adhezyonunu ve protein tutulmasını destekleyebilirler (81).

Hücrelerin transmembran proteinler aracılığıyla ekstraselüler matriksle etkileşime geçmesi, hücre içi sinyallerin değişimini, fosforilasyon ve defosforilasyon ile (82) ve hücre iskeletinin farklı organize olması ile sonuçlanır (83,84). Ekstraselüler matriks içerisinde düzenleyici olarak birçok protein bulunmaktadır ve bunlardan bazıları trombospondin 1 (85) ve 2 (86), SPARC, osteonektin, BM-40 (87,88) ve OPN (89,90) dir.

2.9.2. Matrijel Kavramı

Matrijel, temel olarak laminin, tip IV kolajen ve entaktin ve proteoglikanlar ve büyüme faktörleri de dahil olmak üzere çeşitli diğer bileşenlerden oluşan Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkom tümörlerinden izole edilerek elde edilen temel membran türevi bir hidrojeldir (Tablo 2). Matrijel, kolajen ve diğer doğal hidrojellerin sunduğu pek çok avantajı sunar ve genellikle hücre göçü, anjiyogenez ve tümör gelişimini incelemek için kullanılmaktadır. Matrijelin önemli dezavantajları arasında mekanik ve biyokimyasal özellikler bakımından tümörjenik orijinli olması, çeşitli bileşim içermesi ve alımdan alıma değişkenlik içermesi bulunur (80).

Bazal membran proteinlerinin EHS tümörlerinden steril bir şekilde izole edilerek jel halinde kullanılabilen matrijel, yüzey kaplaması ve 3 boyutlu ortam oluşturmayı destekleyerek hücre morfogenezi, diferansiyasyonu ve büyümesine yardımcı olur (91). EHS tümörü benign tümördür ve fare içerisinde hızlı büyür, fazla miktarda bazal membran bileşeni sunar (91). Tümör malignitesini ölçmek için çoğunlukla kullanılan boyden kemotaksis çemberleri porlu yüzeyin amniyon, kolajen tip IV ve matrijel kaplamasıyla gerçekleştirilmektedir.

Mekanik biyoloji topluluğu için özel ilgi, hücre tepkileri saptamak için sertleştirilebilen, yumuşatılmış ya da tersine sertleştirilebilen ve yumuşatılmış mekanik olarak dinamik hidrojellerdir. Bu mekanik olarak dinamik yüzeyler mekanik dozlamının hücre davranışına etkisinin araştırılmasına olanak tanır (80).

EHS tümör dokusu hücre ve serumdan türetilmiş proteinlerden arındırılmak için % 20 NaCl ile yıkanır ve büyük ölçüde matriks içeren elde, 2 M üre ile ekstre edilerek protein-protein etkileşimi kırılır. Santrifüjden sonra, viskoz süpernatant PBS içerisinde soğukta diyaliz edilir. Ortaya çıkan solüsyon 37°C'ye ısıtıldığında kuvvetli berrak bir jel oluşur (91). Steril bir madde elde etmek için, ekstrakte litre başına beş mililitre kloroform ilavesi yapılır ve bir sonraki diyaliz aşamasında kloroformdan arındırılır. Bu materyal daha sonra John Hassell tarafından Matrijel olarak adlandırılmıştır (91).

Matrijelin stok solüsyonu, besi yerinde 10-15 mg/ml protein içerecek şekilde hazırlanmaktadır. Matrijel dondurulmuş halde saklanmakta, gece boyunca +4°C'de bekletildiğinde sıvı hale geçmektedir. Jel hale gelmesi için ise 24-37°C'de 30 dakika inkübe edilmesi gerekmektedir ve tekrar dondurulduğunda sıvı hale geçmemektedir (91). Hücreler jel haline gelmiş yüzey üzerine ekilebildiği gibi, solüsyon halinde karıştırılarak jelleşme de sağlanabilir (91).

2.9.3. Deneysel Hidrojeller ve *in vivo* uygulamalar

Hücre bazlı çalışmalar için uygulanan standart prosedürler hücrelerin düz bir yüzeyde, fizyolojik olmayan koşullardaki katılıkta polistren ya da cam yüzey üzerinde gerçekleştiği bilinmektedir. Bu koşullarda yapılan çalışmalar kolaylığından ve uygulanabilirliğinden ötürü daha çekici olsa da hücreleri *in vivo* koşullara göre farklı davranışlar sergileyebilir. Örneğin *in vivo* koşullarda böyle olmamasına rağmen, hücreler standart prosedür uygulandığında daha düz ve uzanmış bir morfoloji sergilemesine, hatta bazı deney tasarımlarında uygulanan ilaç niteliğindeki maddeye karşı farklı cevap vermesine ve hatta diferansiyasyona bağlı fenotipinde değişimlere rastlanmıştır (81). Organoid teknolojisi hücre kültürü ve ksenograf çalışmaların ara modelidir ve birçok kanser türünü modellemek için (örneğin kolorektal, prostat ve pankreatik) kullanılmaktadır. Bu metod ile kanser hücrelerinin 3 boyutlu ortama geçişi ve adaptasyonu standart hücre kültüründen farklıdır. Hücrelerin organoid tasarımda hücre matriks ve hücre etkileşimleri *in vivo* koşullardakine daha benzerdir. Bu organoid tasarım ile standart tekniği karşılaştıran birçok araştırma bulunmakta, bu tasarımla oluşturulan deney tasarımlarının *in vivo* cevaplara daha yakın olduğu gösterilmiştir (92). Standart hücre kültürü koşulları 2 boyutlu olarak isimlendirilmekte olup, hücreler sadece üst kısımdan sinyal alabilmekte, fakat organoid metod ile

hücreler tüm çevresi/yüzeyi boyunca dışarıdan sinyal alabilmektedir (81). Ayrıca bu yöntem kişiye özel tedavi seçeneğinin ön denemelerini oluşturmaktadır. Böylece organoid teknolojisi ile tasarlanmış deneyler hem daha spesifik yanıt vermekte, hem de kişiye özgü tedavilerde uygulanabilecek ilacın yanıtını en uygun şekilde belirlemede uygun olabilmektedir (92).

Hidrojellerin hücre davranışını düzenleyen temel olayları açığa çıkaran bir dizi hücre oluşumunda yararlı olduğu kanıtlanmıştır ve geleneksel hücre kültürlemesi ile mümkün olmayan çeşitli hücre tiplerinin gelişmesi ve yöneltilmesi için aracı olmuştur. Farklı deneylerde, EKH'ler tipik olarak konvansiyonel kültürde birkaç gün içinde kendiliğinden farklılaştıkları halde hidrojel kültüründe daha karmaşık bir yanıt göstermişlerdir. Hücreler pluripotensi belirteçlerini hidrojel dinamiğine bağlı olarak LIF eklentisi olmadığı durumda, hiyalüorik asit eklentisinde (93) ve diğer glikozaminoglikanların (94) eklentisinde göstermişlerdir (91).

İlaç taramasının modelleri olarak hidrojel kullanan çalışmalarda, katı, kolajenden zengin substratlar üzerine yetiştirilen hücreler, yumuşak alt tabakalar üzerindeki hücrelerden çok kemoterapilere karşı daha fazla direnç göstermişlerdir. Hücrenin davranışındaki mekanik etki araştırmalarında, sert substratlarda yetişen akciğer fibroblastları miyofibroblast farklılaşmasına uğramış ve daha sonra yumuşak yüzeye geçtiğinde kasılma fenotipini korumuşlardır. Hücrelerin geçmişteki mekanik ortamların belleğini koruduğu ihtimalini ortaya çıkaran bu çalışma sonraki denemelerde yanlılık yaratabilir (95). Bunlar hidrojel kültür platformlarının kullanıldığı birkaç örnek olmasına rağmen, hücresel sonuçların bu sistemlerde standart kültüre göre oldukça farklı olabileceği açıklık getirmişlerdir (96).

Hidrojel oluşumu, sıvı öncü çözeltilerin, hidrojel bileşenlerini birleştirmek için fiziksel (kovalent olmayan) veya kimyasal (kovalent) çapraz bağlama kullanılarak elde edilebilen katı maddelere geçişini içerir. Peptit veya protein bazlı sistemlerin çoğunluğu fiziksel çapraz bağlama süreciyle oluşturulur, örneğin, kolajen hidrojellerinde, çözünen fibriller arasındaki etkileşimler zamanla lif ve ağ bağlantısına dönüşür. Peptid hidrojelleri genellikle amfifilik veya jelasyon esnasında b-tabakaları gibi supramoleküler yapılara kendiliğinden yerleşebilen diğer tamamlayıcı sekanslarla işlenir (97). Diğer doğal malzemeler yük etkileşimleri yoluyla bir araya getirilebilir;

örneğin iki değerlikli katyonlar, anyonik alginat polimerlerin jelleşmesini indükler. Sentetik polimerler ayrıca fiziksel çapraz bağlanmayı sağlamak için çeşitli işlevsel gruplarla modifiye edilmiştir (98).

Zincir halinde oluşan polimerizasyon için hidrojel içerisinde reaktif grupların (akrilatlar, metakrilatlar veya akrilamidler gibi) kovalent reaksiyonunu indüklemek gibi çeşitli uyaranlar (örneğin, redoks başlatma veya foto-başlatma) hedef alınabilir (99). Bu gibi preparatlarda hücrelerle birlikte kullanılacağı zaman, hücrenin ölümünü en aza indirmek ve genel olarak hücresel fonksiyonunu korumak için polimerizasyon sürelerini kısaltmak ve toksik olmayan başlatıcılar kullanmak önemlidir. Fotopolimerizasyon yoluyla üretilen serbest radikallerin hücrelere, özellikle de hassas primer hücre tiplerine zarar verdiği bildirilmiştir. Bu nedenle, hücre tipleri için uygun çapraz bağlanma prosedürlerini araştırmak önemlidir. Alternatif olarak, kademeli büyüme polimerizasyonu, karıştırma üzerine doğrudan reaksiyona giren iki veya daha fazla hidrojel öncüsü kombine edildiğinde oluşur. Belki de bu tipin hidrojel oluşumu için en yaygın reaksiyonu, çok fonksiyonlu monomerler ve çapraz bağlayıcılar arasındaki Michael tipi ilave reaksiyonudur. Yine, polimerizasyon zamanının ve reaktiflerin, hücre kapsüllenmesinin hücreye uygun bir şekilde oluşacak şekilde tasarlanması önemlidir. Her iki kimyasal çapraz bağlama örneğinde, jelatin, kapsülleme işlemi sırasında hücrelerin çökmesini önlemek için yeterince hızlı olması gereklidir (100).

Hidrojellerin mekanik, şişme, por boyutu ve bozunum dahil olmak üzere karakterize edilebilmesi için çeşitli özellikleri vardır. Ticari kitleri satın alırken veya belirli hidrojel tariflerini izlerken, bunlar zaten bilinebilir ve her kullanıcı tarafından karakterize edilmesi gerekmez (92).

İki boyutlu hidrojel film mekaniği tipik olarak, örneğin yüzeyinde tarama yapmak için kullanılan mikron boyutlu konsol propları nedeniyle hücre ölçeğinde substrat mekanik özelliklerini ölçmek için en uygun teknik olan atomik kuvvet mikroskopisi (AKM) ile değerlendirilir. Sıkıştırma veya çekme testi gibi sırasıyla bir materyali itererek veya çekerek toplu mekanik özellikler sağlayan veya başka tarama yöntemleri, 3 boyutlu hidrojellerin mekanik özelliklerini karakterize etmek için kullanılabilir (92).

Teknik olarak jelasyon zamanı ve kayma modülü gibi zamana bağlı özellikler, hidrojel oluşum hızını veya bir malzemenin jelleşme sonrası rahatlatma kabiliyetini karakterize etmek için kesilme kuvvetlerinin uygulandığı reoloji kullanılarak ölçülür. Bir başka önemli hidrojel özelliği, hidrojel içine alınan su veya tampon miktarı olarak tanımlanan şişme özelliğidir ve ölçmek için basit bir özelliktir. Polimer ağının hidrofilitasının yanı sıra bağlı çapraz bağlanma dengesinin bir göstergesidir, daha sert ağlar tipik olarak daha düşük şişme gösterirler.

Hidrojin ağ boyutu veya moleküler por özelliği tipik olarak nanometre ölçeğindedir ve matriks boyunca besin dahil tüm moleküllerin akışını etkileyebilir. Düşük şişme ve daha yüksek modülüs daha küçük moleküler por boyutuna işaret ettiğinden hidrojel şişme davranışı ve mekanik özellikler ilişkilidir. Hidrojin bozunması, mekanik ve zamanla şişme karakterinde değişime neden olabilir ve bu hücrenin hareketinde, yayılma ve çekiş kuvveti oluşumu gibi hücre davranışlarını etkiler (91).

Hidrojel, hücre kültüründen önce, gama veya mikrop öldürücü UV ışınlaması, etilen oksit maruziyeti, önceden oluşturulmuş hidrojellerin etanol ile muamele edilmesi veya yoğun karbon dioksit gazı sterilizasyonu kullanılarak sterilize edilebilir. Hücrenin kapsüllenmesi aşamasında ise öncü solüsyonlar hidrojel oluşumundan önce sterilize edilmelidir. Bu, ya filtreleme yoluyla (eğer çözeltiler çok yapışkan değilse) ya da çözeltinin ya da kuru polimerin mikrop öldürücü UV radyasyonu ile gerçekleştirilebilir. Bütün bu yaklaşımlar etkili olmakla birlikte, hidrojin fiziksel özelliklerini bozmayan, denatüre etmeyen veya başka şekilde başka bir yöntemi değiştirmeyecek bir tekniği seçmek için dikkatli olmak gerekir. Örneğin, uzun UV uygulaması, kolajeni denatüre edebilir ve işlevsel hidrojellerde peptit parçalanmasına neden olabilir, örneğin gama ışınlaması alginatı degrades edebilir. Ticari hidrojel kiti bileşenleri tipik olarak önceden sterilize edilmiş olarak sağlanır veya spesifik sterilizasyon talimatları içerebilir (91).

Kolajen, doğal dokuların birincil organik bileşenidir ve insan vücudundaki tanımlanmış 29 kolajen tipinin yaklaşık %90'ı fibrillerden oluşmaktadır. Tip I kolajen en sık görülen tiptir ve birçok dokunun temel yapısal bileşenidir. Her dokuda yüksek oranda bulunması nedeniyle kolajen odaklı çalışma çekici olmuştur. Kolajen II ve III

tipleri ve glikozaminoglikanlar gibi diğer bileşenler de dahil edilebilirken, kolajen hidrojel çoğunlukla tip I kolajenden oluşur. Kolajen ile aynı amino asit dizisine sahip, fakat üçlü sarmal karaktere sahip olmayan jelatin de yaygın bir şekilde kullanılan bir hidrojel malzemedir. Hidrojel olarak kullanılan kolajen genellikle asit veya pepsin ile çözülmüş tip I kolajen solüsyonlarından türetilmekte, sıklıkla fare kuyruk tendonundan elde edilmektedir. Bu düşük pH'lı solüsyonlar spontan fibrilogenезis ve jelasyonu önlemek için düşük sıcaklıkta depolanır (101).

Kolajen hidrojeller hücre veya kültür ortamı varlığında oluşabilecek kolajen fibril kendi kendine çaprazlama başlatmak için sıcaklığı ve pH'ı yükseltmek suretiyle oluşturulur. Jelleşme fizyolojik koşullar altında yaklaşık 30 dakika içinde ve esnek biçimde kalıplanabilen şekillerde oluşur. Sıcaklık, hidrojel mimarisini önemli derecede etkilemektedir; daha düşük jelasyon sıcaklıkları, daha büyük fibrillerin oluşumuna neden olur (102).

Kolajen hidrojel mekaniği kolajen konsantrasyonu ile belirlenir, ancak bu, bu özelliklerin bağımsız kontrolünü sınırlayan yapışkan ligand yoğunluğundaki değişikliklere bağlıdır. Kolajen fibrillerin bozunabilirliğini esaslı olarak değiştiren kapsamlı kimyasal çapraz bağlanma olmaksızın daha sert sertlik (>1 kPa) olan kolajen hidrojelleri üretmek de zordur (91).

Kolajen içeren hidrojellerden en önemlisi bileşiklerden birisi de matrijeldir.

Tablo 2: Matrijel içeriğindeki bazal membran bileşenleri (91)

Bazal Membran Bileşenleri			
Bol Bulunan Bileşenler <ul style="list-style-type: none"> Laminin Tip IV kolajen Perlekan (Heparan sülfat proteoglikan) Nidojen/Entaktin 	Proteazlar <ul style="list-style-type: none"> MMP-2 MMP-9 uRuOkinaz Doku spesifik plazminojen aktivatörü 	Büyüme Faktörleri <ul style="list-style-type: none"> TGFβ FGF EGF PDGF IGF 	Diğer Proteinler <ul style="list-style-type: none"> Amilaz Transferin Klusterin

Hücrelerin moleküler sinyalleşmeler doğrultusunda hücreler arası madde ile etkileşim çalışmalarından biri 1975 yılında yapılmış, laminin yüzeye epitelyal,

endotelial ve tümör hücresi yapışırken, fibroblast hücresinin yapışmadığı görülmüştür (91,103).

Hücre tipine bağlı olarak matrijel varlığına karşı cevap farklıdır (Tablo 3) Örneğin endotel hücresi matrijel yüzeyine bir saat içinde tutunup yapışmış ve uzanmıştır, bir gün sonra ise hücreler lümen morfolojisini gösteren yapıları oluşturmuştur (91,104).

Tablo 3: Bazal membran uygulanan hücre ve dokuların farklılaşması (91)

Hücre/eksplant	Cevap
Hücre hatları	
Prostat ^a	Asinar oluşumu , bezler
Tükürük ^a	Asinar oluşumu, amilaz üretimi
Meme epiteli ^a	Kanal ve lümen oluşumu, yüksek kazein
MDCK ^a	Polarize kist
Pankreas ^a	Asinar diferansiyasyonu
Schwann hücreleri ^a	Diferansiyasyon
İntestinal hücreler ^a	Diferansiyasyon
Kemik hücreleri	Kanalikül oluşumu
Primer hücreler	
Sertoli	Kolumnar epitelyum
Hepatositler ^a	Düzenli morfoloji, albümin üretimi
Kondrositler	Kıkırdak oluşumu
Endotelial hücreler ^a	Kapiller tüpler ve lümen
Endometriyal hücreler	Kolumnar epitelyum, bezler
Ovidukt epiteli	Siliar hücreli tüpler
Doku eksplantları	
Nöral krest	Uzantılar
Dorsal kök gangliası	Miyelin üretimi ile uzantılar
İmmatür foliküller	Kıl büyümesi
Aortik halka	Damar uzantıları
Ookinetez (zigot)	Malarya parazitinin sporogenik gelişimi

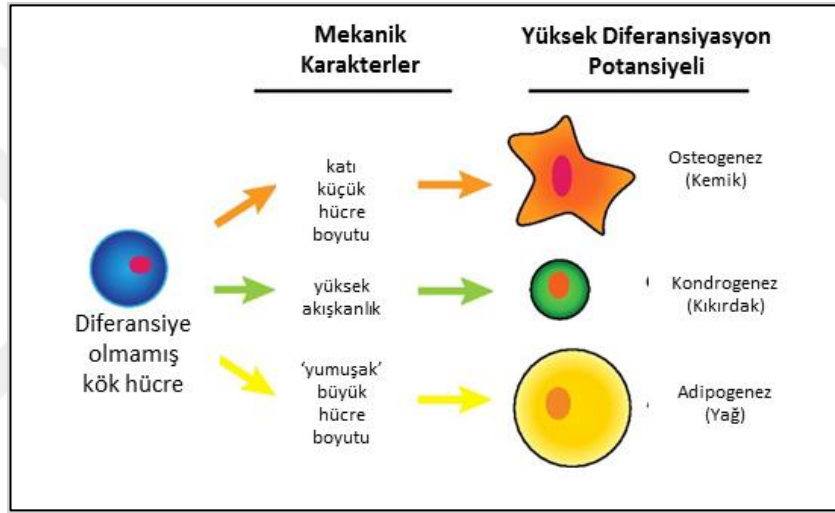
^aPrimer ve hücre hattını temsil eder

Kanser çalışmaları için farelere enjekte edilen tümör hücreleri sadece tümör hücrelerinin enjeksiyonu ile matrijel ve tümör karışımı enjeksiyonuna göre daha başarısızdır. Normalde farede büyütülemeyecek olan tümör tipleri, matrijel karışımı içinde enjekte edildiğinde tümör oluşumu gerçekleşmiştir. Benzer olarak biyopsi sonucu elde edilen tümör hücreleri de farelerde daha kolay tümör oluşumunu sağlamıştır. Aynı zamanda, tümör hücreleri matrijel içerisinde daha hızlı büyümüştür

(91,105). Ayrıca matrijel ile metastatik kansere sahip olan hastadan alınan 9-20 ml kan karıştırıldığında da nude farede tümör oluşunu gerçekleştirmiştir (91).

Embriyonik Kök Hücrelerin Farklılaştırılması İçin Kullanılan Yöntemler

Hücreler dışarıdan gelen sinyallerle birlikte kendi içindeki etkileşimi düzenleyip diferansiyasyon kapasitesini şekillendirmektedir. Bu aşamalarda dışarıdan gelen sinyallerin *in vitro* koşullar altında biyokimyasal, biyofiziksel ve mekanik olarak gerçekleştirerek çalışmalar yürütülmekte ve hücrelerin kapasitelerini çalışmanın amacı yönüne çekebilmektedir.



Şekil 10: Mekanik karaktere göre hücre kaderinin belirlenmesi (106)

Embriyonik kök hücrelerin dışarıdan aldıkları ilk moleküler sinyal hücreler arası madde kaynaklıdır, bu nedenle niş, kök hücrenin farklılaşmasını yönlendirmek için önemli bir kaynaktır (Şekil 10). Hücreler arası madde, hücreye desteklik sağlarken, aynı zamanda büyüme faktörlerini ve sitokinleri barındırdığı için biyolojik sinyaller de üreterek hücrenin farklılaşma kapasitesini belirler (100). Deborah Philp ve arkadaşları, embriyonik kök hücrelerin istenilen yönde farklılaşmasını sağlamak için Rhesus maymun embriyonik kök hücrelerini farklı matris ile büyütürken hücrelerin diferansiyasyon kapasitesini araştırmışlardır. Araştırmacıların kullandığı stok matrijel 11-13 mg/ml konsantrasyonda olup, kartrigel için kullandıkları karışımda tip 1 kolajen 3 mg/ml, laminin 1 mg/ml'dir. Deney aşamasında ise 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 mg/ml besi yeri içerisine ya da feeder yüzeye eklemek için, 11-13 mg/ml matrijel yüzey

oluşturmak için kullanan araştırmacılar, kartrijeli 5.6 mg/ml konsantrasyonda kullanmışlardır. Kartrijel için buzağı dizi küçük parçalara ayrılıp sıvı azotta bekletildikten sonra ezilip tuz, üre ve guanidine maruz bırakılıp diyaliz aşamasından sonra DMEM besisi yerinde çözülmüştür. Çalışma NASA tarafından desteklenen biyoreaktör ile oluşturulduğunda diferansiyasyon kapasitesi morfolojik olarak tablodaki (Tablo 3) gibi olmuştur. Bazal membran karakterindeki matrijeli ve kendi oluşturdukları kartrijeli karşılaştırmış, matrijelin immatur glandular/epitelyal farklılaşmasını sağlamıştır. Kartrijel ise hücreleri olgun ve kalsifiye olmuş kıkırdak hücrelerine dönmesi sağlanmıştır (Tablo 4) (100).

Tablo 4: Matrijel ve kartrijel ile bazal membranda çoğunlukla bulunan kolajen tip I proteini ile laminin I glikoproteininin tabaka yüzeyinde, biyoreaktörde ve *in vivo* tümör içersinde farklılaşma kapasitesi (100)

Farklı ekstraselüler matris bileşenlerinin maymun embriyonik kök hücre diferansiyasyonuna <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> etkisi			
Matriks	Tek katman (Monolayer)	Biyoreaktör	<i>In vivo</i>
-	Diferansiyasyon yok	Diferansiyasyon yok	Belirlenemedi
Kolajen I	Diferansiyasyon yok	Yapılmadı	Yapılmadı
Laminin-I	Diferansiyasyon yok	Diferansiyasyon yok	Yapılmadı
Matrijel	İmmatür bezler	Çok sayıda immatür bezler	Belirlenemedi
Kartrijel	Diferansiyasyon yok	Kıkırdak nodülleri	Kıkırdak nodülleri

In vivo test edilen hücreler tek katman ve biyoreaktör kültürlerden elde edilmiştir.

11. günde Rhesus maymun embriyonik kök hücreleri matrijel yüzeyinde tübüler yapılar oluşturmuşlardır. Araştırmacılar bu aşamada oluşan bu yapıdan hücreleri koparmanın zor olduğunu belirtmiş kümelenme dolayısıyla görüntülemenin zorlaştığını bu nedenle hücreleri kesit alarak hematoksilen eozin boyamayla görüntülemişlerdir (100).

Embriyonik Kök Hücrelerin Farklılaştırılmasında Kullanılan Hücreler Arası Maddeler

Bazal membran bileşenleri gelişmekte olan embriyoda belirgin olarak sentezlenir ve iki hücreli safhada laminin eksprese edilirken, gastrulasyonda belirgin bir bazal membran gözlenmektedir. Kök hücrelerin temas ettiği ilk hücreler arası madde bazal membran olduğundan, bu bileşenin kök hücre farklılaşmaları üzerinde

önemli bir etkisi vardır (91). 1988 yılında yayınlanan çalışmada matrijel nöral krest hücrelerinin çıkıntı oluşumunu fazlalaştırdığı görülmüştür. Bu çalışmadan sonra matrijelin diferansiyasyon kapasitesini de değiştirebileceği düşünülüp, diferansiye olmayan embriyonik kök hücreler üzerinde matrijel kullanımı başlamıştır. Embriyonik kök hücreler standart olarak feeder fare fibroblast hücreler üzerinde kültürlenmektedir, fakat bu durumda fare endojen virüsü nedeniyle kontaminasyon riski bu metodun uygulanım ve sonuçlarında tereddüt oluşturmaktadır. Buna karşın, insan embriyonik kök hücrelerinin fare fibroblast besiyeri içerisinde matrijel üzerinde kültürlendiği görülmüştür. Yetişkin kas dokusundaki kas fiberlerinden izole edilen ve matrijel üzerinde kültürlenmiş kararlanmış kök hücrelerin miyositlere ve aynı zamanda osteoblast ve adipositlere diferansiye olduğu görülmüştür. Aynı zamanda matrijel içeriğindeki glikoproteinlerden biri olan laminin üzerinde kültüre edilen kök hücrelerin nöral hücrelere diferansiye edildiği belirtilmiştir (91). Matrijel üzerinde kültüre edilen maymun blastosist kök hücresi bez benzeri yapılar oluşturmuştur (91).

BÖLÜM III

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Deney Grupları

Deney dizaynı fEKH'lerin hücreler arası madde konsantrasyonuna verdiği tepkiyi ölçme amaçlı olduğu için hücreler arası madde olarak üç farklı konsantrasyon denendi. Ayrıca bu üç konsantrasyon 1., 3. ve 6. gün olacak şekilde çalışmalar sürdürüldü. İmmünofloresan boyama örnekleri 3. ve 6. günü olacak şekilde hazırlandı (Tablo 5).

Tablo 5: Deney grupları. HD: hücre döngüsü, IF: immünofloresan boyama

Gün	Yüzey
1. Gün (HD)	Kaplama olmayan
3. Gün (IF ve HD)	2 mg/ml matrijel
6. Gün (IF ve HD)	4 mg/ml matrijel
	6 mg/ml matrijel

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmada, firmadan satın alınan fEKH'si kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına ait olan Moleküler Embriyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi ve deneyler laminar kabin içerisinde yapıldı. Laminar kabin içerisine alınan tüm materyaller %70'lik etanol ile sterilize edildi ve her çalışma başlangıcı ve sonunda UV ışığı ile laminar kabin sterilizasyonu tamamlandı.

3.3. Hücre Besi Yeri Hazırlama

fEKH kültürü 'serum ve antibiyotik içeren fare embriyonik kök hücre büyüme besi yeri ile fare embriyonik kök hücresi serumsuz antibiyotikli tam büyüme besi yerine fare embriyonik kök hücresine özel FBS %10 oranda karıştırılacak şekilde hazırlanan besi yeri ile gerçekleştirildi.

3.4. Hücree Açma

Hücree açılmadan önce sıcak su banyosu 37°C'ye ayarlandı. Laminar kabinde hücrenin ekileceği flaska taze kültür besi yeri eklendi ve hücre ekimine hazır olması için, ısı ve gaz dengesini sağlamak amacıyla 37°C, %5 CO₂ olan inkübatöre yerleştirildi.

Sıcak su banyosu (Şekil 11) 37°C'de dengelendikten sonra önceden dondurulmuş kriyo tüpler -80°C'den alınarak su banyosuna getirildi. Kriyo tüp içerisinde çözünmenin başlaması için tüp yarısı su içinde olacak şekilde hafifçe sallanarak yaklaşık 2 dakika bekletildi. Yarısından fazlası çözünen kriyo tüp laminar kabine alınmadan önce %70'lik etanol ile sterilize edildi.



Şekil 11: Hücree açma aşamasında kullanılan su banyosunun fotoğrafı

37°C'de ısıtılan 9 ml kültür besi yeri içerisinde çözünen hücre solüsyonu yavaşça eklendi. Toplamda yaklaşık 10 ml olan solüsyon 5 dakika, 1000 rpm'de santrifüj edildi (Şekil 12). Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücreler kültür besi yeri ile tekrar çözüldü ve 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Bu iki santrifüj aşamasıyla hücreler kriyo protektan olan DMSO dan kurtarılmış oldu. İkinci santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve hücreler 1 ml kültür besi yerinde pipetlenerek çözüldü ve önceden ısıtılan kültür besi yeri içerisinde (flask içerisinde) ekildi.



Şekil 12: Santrifüj cihazı

24 saat sonra, (DMSO'dan tamamen arındığından emin olmak amacıyla) kültür besiyeri değiştirildi. Kültür besiyeri her iki günde bir değiştirildi ya da taze besiyeri eklemesi yapıldı. Hücreler yüzeyi %80 kapladığı zaman pasajlama yapıldı. Hücreler deneylerde ikinci pasajdan sonra kullanıldı. Embriyonik kök hücre olmaları sebebiyle hücreler sadece pasaj 3-6 arasında kullanıldı.

3.5. Hücre Dondurma

fEKH'leri %80-90 olacak şekilde flask yüzeyini kapladığında pasaja hazır hale geldiler ve pasajlar arası bu süre yaklaşık 7 gün sürdü. Pasaj 6 sonrası hücrelerin morfolojileri değişti, hücreler uzamaya başladı, bu nedenle deneylerde kullanılmadı. Hücre dondurma için, hücreler normal pasaj prosedüründe olduğu gibi önce var olan kültür besiyerinin atılması, daha sonra kalıntı halindeki serumun uzaklaştırılması için serumsuz (yıkama) besiyerine maruz bırakılması ve ardından tripsin-EDTA ile 3-5 dakika, 37°C, %5 CO₂ olan inkübatöre yerleştirilmesiyle devam etti. Yüzeyden ayrılan hücreler santrifüj edildi ve pellet fEKH'sine özgü olan dondurma besiyeri ile karıştırıldı ve -80°C'ye kaldırıldı.

3.6. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler her pasajdan önce mikroskop altında görüntülendi. Yüzey kaplaması %80-90 olduğunda hücreler pasajlandı.

Kullanılmadan önce, tripsin-EDTA solüsyonu, fEKH besiyeri ve yıkama için kullanılan serumsuz besiyeri +4°C'den oda sıcaklığına çıkarıldı. fEKH'ler, kendilerine özgü, diferansiyasyonu önleyen flasklar üzerinde büyütüldü. Büyüklük

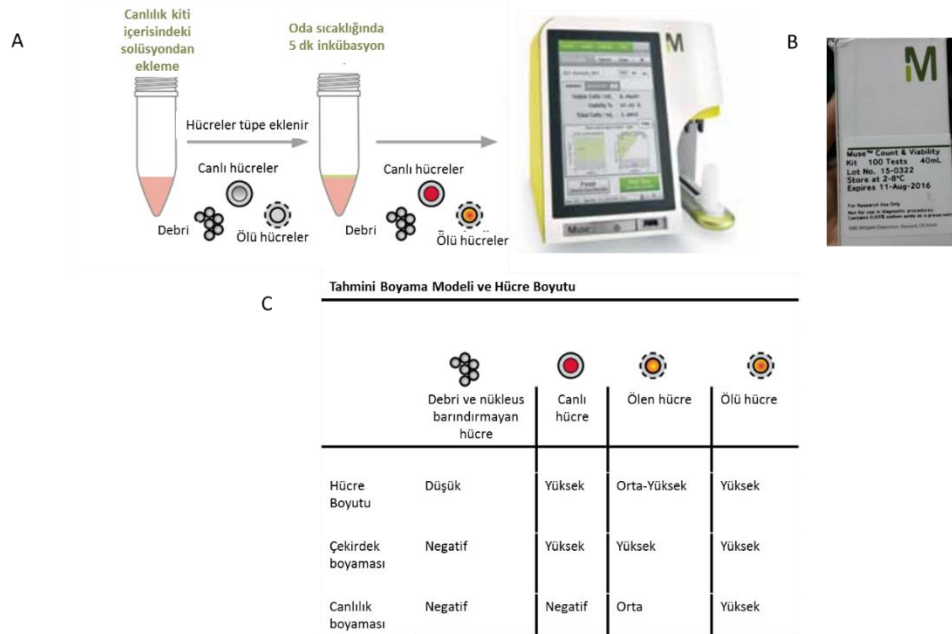
olarak T75 flasklar kullanıldı. Pasaj için mikroskop altındaki gözlemden sonra flask, laminar kabinete alındı ve içerisindeki besi yeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Yıkama için yaklaşık 3 ml serumsuz besi yeri kullanıldı, böylece flask içerisindeki serum ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra fEKH'lerin yüzeyden ayrılması için flask içerisine 2 ml tripsin-EDTA solüsyonu konuldu ve çalkalandı, yaklaşık 1,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu aspire edildi. Flask, tripsin aktivasyonunun maksimum olması için inkübatöre kondu ve 5 dakika inkübe edildi. Bu süre zarfında yeni çıkarılan flask içerisine 10 ml taze fare embriyonik besi yeri eklendi ve (ısı-gaz dengesi sağlanması için) inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin kaldırma aşamasından sonra kullanılacak 15 ml falkon tüp hazırlandı.

İnkübasyon sonrası hücreler daha yuvarlak şekilli olup, çoğunluğu tripsin içerisinde asılı haldeydi. Kimyasal olarak yüzeyden ayırmanın yanı sıra hücreler gerektiğinde mekanik olarak, flaskın sağ, sol ve alt yüzeyine hafifçe vurularak da kaldırıldı ve mikroskop altında gözlemlendi. Hücrelerin tripsine fazla maruz kalması hücreleri kötü etkilemektedir. Flask laminar kabinete alındı ve tripsin etkisini durdurmak için 2 ml serum içeren besi yeri flaska eklendi. Toplamda yaklaşık 3 ml olan flask içerisindeki solüsyon 5 ml'lik pipet ile yaklaşık 10 kez bas çek yapıldı, böylece mekanik kuvvet ile yüzeye halen tutulan hücrelerin de kaldırılması sağlandı. Solüsyon toplandı ve daha önceden çıkarılan 15 ml falkon tüpe aktarıldı. Flask mikroskop altında gözlemlendi ve içerisinde bir miktar daha hücre topluluğu olduğu görüldü. Bu hücreler yaklaşık 5 ml lik besi yeri ile tekrar bas çek yapılarak yıkandı ve falkon tüpe eklendi. Yıkama sonrasında flask yüzeyinde kalan hücre sayısının minimum (neredeyse hiç) olması sağlandı. Falkon tüp 1000 rpm, 5 dakikaya ayarlı santrifüje yerleştirildi ve uygun denge ile santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası, üst faz aspire edildi ve falkon tüpün dibinde bulunan pellet hafif darbelerle kalan solüsyon ile çözüldü. Daha sonra 1 ml yeni fare embriyonik besi yeri ile pellet homojen bir şekilde çözüldü. Belirlenen miktar kadar daha önce inkübatöre yerleştirilen flask içerisine eklendi ve eşit şekilde dağılım için X-Y koordinatlarında hareket ettirildi ve mikroskop altında kontrol edildikten sonra inkübatöre yerleştirildi. Kalan hücre deneyler için sayıldı ve bu doğrultuda kullanıldı.

3.7. Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi

Hücre sayısının belirlenmesi için öncelikle hemositometre denendi. Bunun için 1 ml içinde çözünmüş hücre solüsyonu içerisinde 10 mikrolitre alındı ve 90 mikrolitre besi yeri ile karıştırıldı. Bu karışıma 1:1 oranında tripan mavisi eklendi ve hemositometreye yüklendi. Hücreler mikroskop altında sayıldı. Sayım olarak hücreler belirlenebildiği halde, tripan mavisinin yarattığı kontrast nedeniyle canlılıkla ilgili kesin veri elde edilemediği için hücre analizatör cihazı ve hücre sayım ve canlılık kiti de hücre sayımı için kullanıldı (Şekil 13). Bunun için besi yerinde çözülmüş 1 ml hücreden 20 mikrolitre alındı ve 380 mikrolitre kit içerisindeki solüsyon vorteks ile karıştırıldı. Karışım prosedürün önerdiği gibi 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Bu 5 dakikalık inkübasyondan sonra solüsyon tekrar vorteks ile karıştırıldı. Karışım hücre analizatör cihazı ile hücre sayım ve canlılığı programıyla yürütüldü. Bunun sonucunda karışımdaki mililitre bazında hücre sayısı ve canlılığı belirlendi. Hücre sayısı ve canlılığın belirlenmesi kit içerisindeki eklenen solüsyondaki iki farklı floresan boyanın birisinin sadece canlı hücreleri boyarken diğerinin ölü olan hücreleri boyamasıyla gerçekleşti (Şekil 13). Hücre canlılık tespiti için diğer metodlarla kullandığımız metod Tablo 6’da karşılaştırılmıştır.



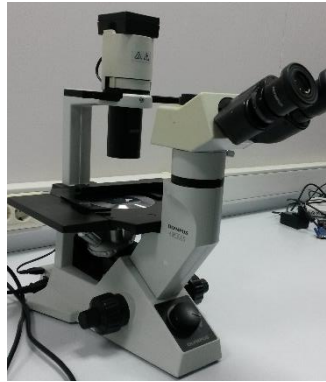
Şekil 13: Hücre sayımı için kullanılan solüsyon prensibi (A ve C) ve kullanılan solüsyon (B)

Tablo 6: Hücre analizatör cihazı ile hücre sayımı ile hemositometre ve görüntüleme ile yapılan sayım karşılaştırması

	Muse Hücre Analizatörü	Manuel Hemositometre	Otomatik görüntüleme bazlı sayım cihazı
Örnek formu	Tüp bazlı	Lam bazlı	Lam bazlı
Boyama tipi	Floresan boya	Tripan mavisi	Tripan mavisi
Kullanıcı bias derecesi	Minimal	Belirgin bias	-
Hücre sayısında değişkenlik	Farklılık yok	Hücre sayısı konsantrasyona bağlıdır ve örnekten örneğe değişebilir	Sayım yapılan hücre sayısı belirgin değil, konsantrasyon bağımlı
Sayım yapılan hücre sayısı	Daha yüksek hücre sayısı, yüksek istatistiksel anlam	Daha az hücre	Daha az hücre
Veri elde süresi	1-2 dakika	Manuel sayım dolayısıyla daha yavaş	Yaklaşık 1 dakika
Örnek okuma/analizde esneklik	Boyama sonrası örneği okutmak için daha yüksek esneklik	Örnekler boyamanın hemen ardından analiz edilmelidir	Örnekler boyamanın hemen ardından analiz edilmelidir
Veri alımı	Dosya alımında kolaylık, tekrarlanabilir analiz	Manuel kayıt, okuma sonrası okumanın kaybı	Dosya alımında kolaylık

3.8. Hücrelerin Faz-Kontrast Görüntülenmesi

fEKH'leri pasaj öncesi ve sonrası da dahil olmak üzere belirli aralıklarla deneysel olarak gözlemlendi ve fotoğraflandı (Şekil 14). Bunun için inverted mikroskop kullanıldı. Bu mikroskopta ışık kaynağı yukarıda olup, objektifler hücrelerin altındadır. Hücrelerin faz kontrast olarak 1., 3. ve 6. gün fotoğrafları çekildi.



Şekil 14: Faz-kontrast görüntüleme için kullanılan aydınlık alan mikroskobu

3.9. Hücreler Arası Maddenin Hazırlanması

Hücreler arası madde olarak matrijel solüsyonu kullanıldı. Stok solüsyon alikotlanarak -80°C 'de saklandı. Belirli sayıda matrijel alikot bir gün öncesinden buz içerisine $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye çıkarıldı. Çalışmanın yapılacağı gün inkübatörde, inkübasyon aşamasına kadar matrijel ile olan kısımda buz üzerinde gerçekleştirildi.

3.10. Fosfat Tamponlu Salin / Fosfat dengeleme Solüsyonu (PBS) Hazırlanması

Stok solüsyon olarak PBS 10X olacak şekilde hazırlandı. Bunun için aşağıdaki malzemeler hassas terazide 1000 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözüldü.

-80 gr NaCl

-25,6 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

-2 gr KCl

-2 gr KH_2PO_4

Solüsyon pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı ve filtrelendi. Oda sıcaklığında kimyasal dolabında saklandı.

Kullanım için hazırlanan 10X PBS stok solüsyonundan 100 ml alındı ve 900 ml distile su ile karıştırıldı, filtrelendi. Böylece kullanıma hazır 1X pH 7.4 PBS hazırlanmış oldu.

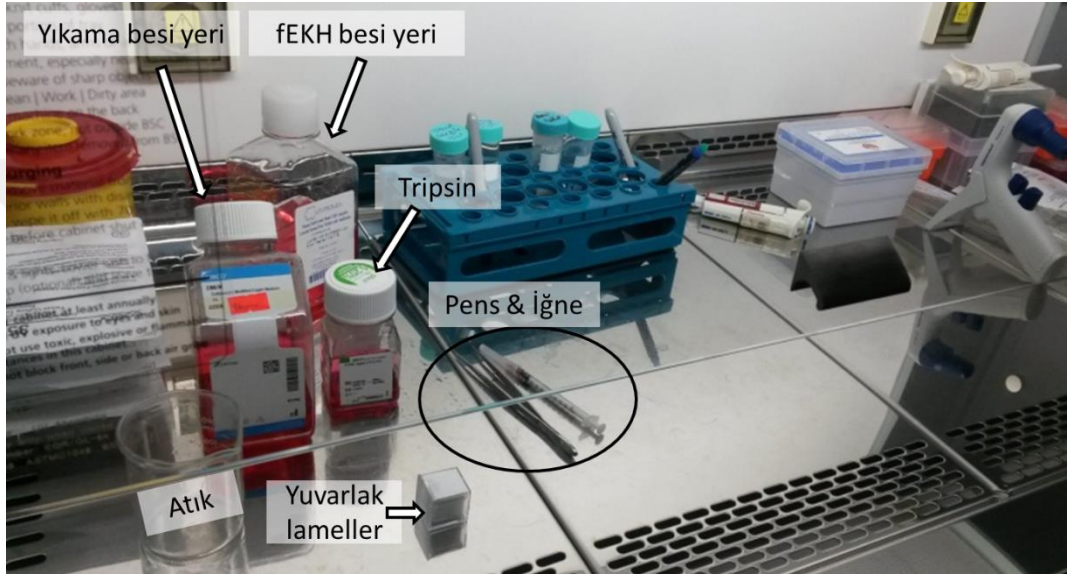
3.11. Matrijelin Alikotlanması

Matrijel alikotlanması için öncelikle -80°C 'de bulunan stok matrijel bir gün öncesinden buz içerisinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye çıkarıldı. Buz içerisine mikrotüpler yerleştirildi ve soğumaya bırakıldı. Aynı zamanda kullanılacak tip uçları buza yakın olacak şekilde soğumaya bırakıldı. Soğuma sonrası matrijel solüsyonunu her soğutulan mikrotüpe, soğutulmuş tip uçlarıyla yaklaşık 200 mikrolitre matrijel eklenerek, alikotlar halinde -80°C 'de saklandı.

3.12. Matrijel ile Yüzey Kaplaması

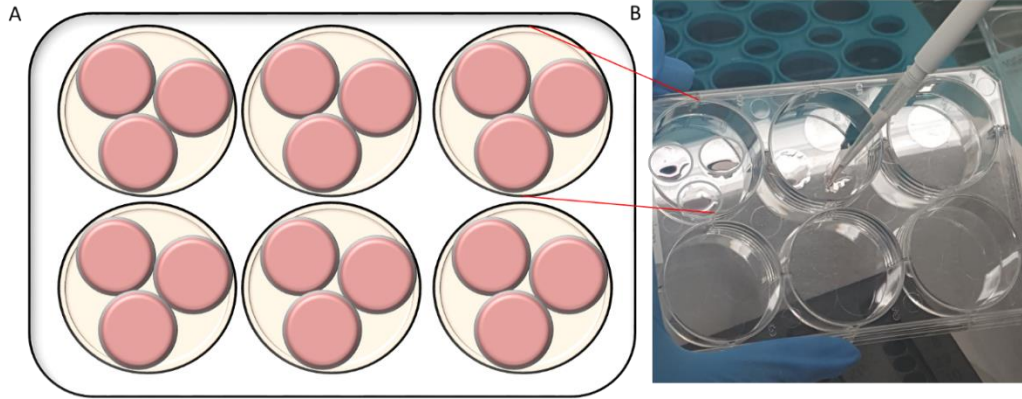
Kullanımdan bir gün önce, matrijel alikotlar, -80°C 'den buz içerisinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye çıkarıldı. Matrijel kaplaması iki farklı deney tasarımı için farklı uygulandı.

İmmünofloresan boyaması için 6 kuyucuklu plate kullanıldı. Her bir kuyucuk içerisine 3 adet 15 mm lamel kondu. Lamelleri yerleştirmek için pens ve ucu kırılmış iğne ucu kullanıldı (Şekil 15).



Şekil 15: Matrijel kaplaması aşamasında çalışma ortamı

Lamellerin her birine seyreltilmiş (Tablo 7) 15 mikrolitre matrijel yayıldı. Bunun için matrijel lamel üzerine noktalar halinde kondu ve tip ucuyla dağıtıldı (Şekil 16). Tüm lameller kaplandıktan sonra buz üzerinde çalkalayıcı (Şekil 17) üzerine kondu. Yaklaşık on dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildikten sonra 6 kuyucuklu plate üzeri etanol ile sterilize edildi ve $5\% \text{CO}_2$, 37°C olan inkübatöre matrijel polimerizasyonu için yerleştirildi ve polimerizasyon için geçerli olan süre zarfında fEKH'leri pasajlandı ve hücre sayımı yapıldı. Polimerizasyon süresi yaklaşık 30 dakika sürdü. (Matrijel ürün olarak soğuk ortamda sıvı, sıcak ortamda polimerleşme ile katı hale geçer.)



Şekil 16: Matrijel ekimi (A) şematik ve (B) fotoğraflanmış görüntüsü

Hücre döngüsünün belirlenmesi için hücre sayısının yüksek tutulması gerektiği, fakat konsantrasyon değişikliği nedeniyle herhangi bir etki yaratmamak için hücre sayısı yüzey genişliğiyle orantılı olarak artırıldı. Daha açık belirtmek gerekirse, immüno Floresan ile hücre döngüsü için kullanılan hücre sayısı mililitre bazında aynı uygulandı, fakat yüzey alanı genişlediği için hücre sayısı da artmış oldu. Hücre döngüsünün belirlenmesi için her deney düzeneğinde bir konsantrasyon denemesi için ikişer kuyucuk kullanıldı. Yüzey alanı ile doğru orantılı olarak her kuyucuğa 78,4 mikrolitre matrijel noktalar halinde kondu. Matrijel kaplaması yapmadan önce 6 kuyucuklu plateler buz üzerinde bir süre bekletildi, böylece matrijelin yüzeyde yayılması daha kolay ve hızlı oldu. Tüm kuyucuk yüzeyinin kaplandığına emin olduğunda 6 kuyucuklu plate buz üzerinde yaklaşık on dakika yüzeyin düz olması için çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra polimerizasyon için %5 CO₂, 37°C olan inkübatöre yaklaşık 30 dakika beklemek üzere yerleştirildi. Polimerizasyon süresince fEKH'leri pasajlandı ve hücre sayımı yapıldı.



Şekil 17: Yüzeydeki hidrojelini eşit olarak yayılması için kullanılan çalkalayıcı

Tablo 7: Matrijel karışım tablosu

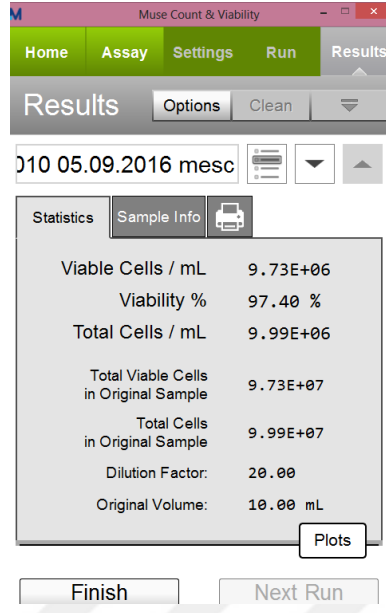
Protein Konsantrasyonu	Matrijel miktarı	Besi yeri miktarı	Toplam
9.3 mg/ml	100 mikrolitre	0 mikrolitre	100 mikrolitre
4.65 mg/ml	50 mikrolitre	50 mikrolitre	100 mikrolitre
3.1 mg/ml	33.3 mikrolitre	66.6 mikrolitre	100 mikrolitre
6 mg/ml	64.5 mikrolitre	35.5 mikrolitre	100 mikrolitre
4 mg/ml	43 mikrolitre	57 mikrolitre	100 mikrolitre
2 mg/ml	21.5 mikrolitre	78.5 mikrolitre	100 mikrolitre

3.13. Hücrelerin Matrijel Kaplanmış Yüzeğe Ekilme Süreci

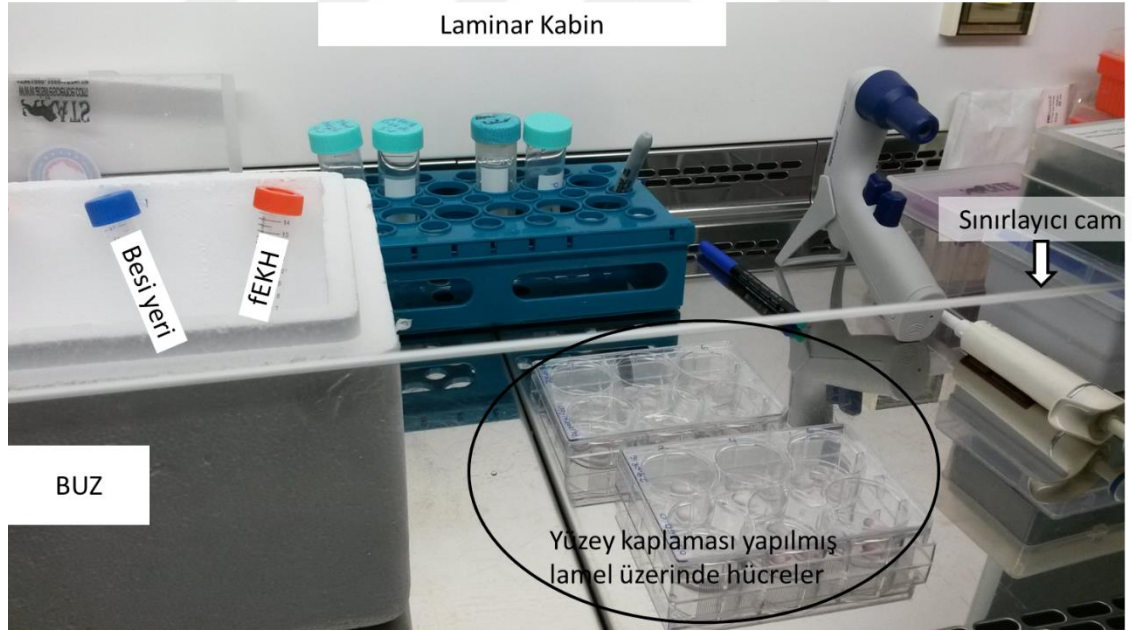
İnkübatör içerisinde bırakılan matrijelin polimerleşme zamanı pasaj ve sayım işlemlerinin sonuna denk gelecek şekilde bir planlama yapıldı. Hücreler sayım için hücre sayımı bölümünde anlatıldığı gibi hazırlandı ve cihaza (Şekil 18) yerleştirildi. Cihaz mililitre içerisindeki canlılık yüzdesini ve hücre sayısını ekranında belirtti (Şekil 19). Bu veriler cihazda depolandı.



Şekil 18: Hücre sayımı ve canlılık ile hücre döngüsünde kullanılan Muse cihazı.



Şekil 19: Hücre analizatörü cihazından alınan örnek sayım ve canlılık sonucu



Şekil 20: Hücre ekilme sürecinde çalışma ortamı

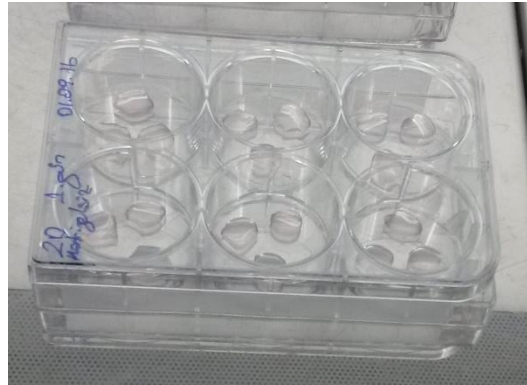
Hücre sayısı belirlendikten sonra mililitrede 10^5 hücre olacak şekilde hücre solüsyonu besi yeri ile seyreltildi. İnkübatörden alınan matrijel kaplı lamellere/kuyucuklara seyreltilmiş hücre solüsyonu eklendi (Şekil 20) ve yüzey

dağılımı eşit olması için X-Y koordinatlarında hareket ettirildi (Şekil 21). Daha sonra örnekler mikroskop altına kontrol edildi ve inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 21: Matrijel polimerleşmesinden sonra hücre ekimi

Kontrol olarak matrijel kaplaması olmadan hücrelerin direk olarak lamel üzerine ekildi ve matrijel kaplaması olan örneklerle aynı koşullarda yetiştirildi (Şekil 22).



Şekil 22: Matrijel kaplaması olmadan hücre ekimi

3.14. Fare embriyonik kök hücrelerin immüno Floresan çalışmasında sabitlenmesi için paraformaldehit solüsyonunun hazırlanması

Paraformaldehit (PFA) ile yapılan çalışmalar tartım dışında çeker ocak içerisinde gerçekleştirildi. Tartım sırasında koruyucu maske kullanıldı. 4 gr paraformaldehit terazide ölçüldü ve erlen içerisindeki 100 ml 1X PBS içerisine eklendi. Erlen sıcaklığı 60°C'yi geçmeyecek şekilde hazırlanan ısıtıcıda paraformaldehit çökeltisi çözünene kadar ara ara çalkalanarak beklendi. Az miktarda çökelti kaldığında içerisine birkaç damla 1N NaOH eklendi ve solüsyonun şeffaflaşması sağlandı. Solüsyon pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı ve filtrelendi. 50 ml lik falkon tüplere paylaştırıldı ve tüplerin ağız kısmı parafilm ile kapatılarak +4°C'de, %4'lük PFA kullanılmaya hazır halde bekletildi. İmmüno Floresan boyaması hazırlık aşamasında hücrelerin sabitlenmesi/tespit edilmesi (fiksasyonu) için kullanıldı.

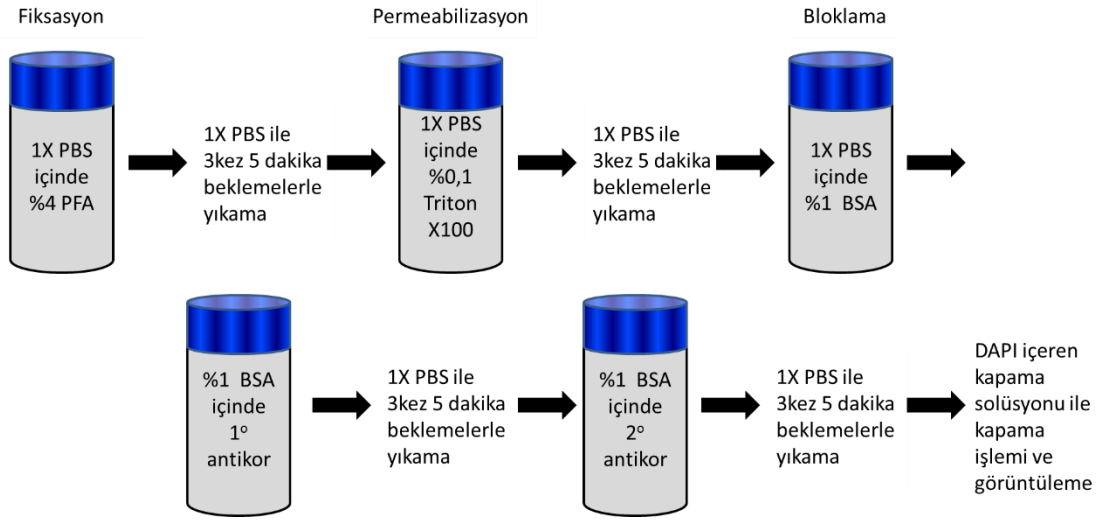
3.15. Fare embriyonik kök hücrelerin hücre döngüsü analizi çalışmasında sabitlenmesi/tespitlenmesi için %70'lik etanol solüsyonunun hazırlanması

%100 (absolut) etanol solüsyonunu, distile su ile seyreltilerek %70'lik etanol hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Bu solüsyon hücre döngüsü analizinde kullanılan hücrelerin fiksasyonunda kullanıldı.

3.16. Kullanılan Yöntemler

3.16.1. İmmüno Floresan Boyama

İmmüno Floresan boyama için öncelikle FEKH'ler pasajlandı ve hücrelerin sayısıyla birlikte canlılığına bakıldı. Hücre sayısı mililitrede 10^5 adet olacak şekilde hücre solüsyonu seyreltildi. 6 kuyucuklu plate içerisine yerleştirilen ve matrijel kaplanan yüzey üzerine 100'er mikrolitre seyreltilmiş hücre kondu ve hücrelerin tutunması için yaklaşık 4 saat inkübatörde bekletildi. Kontrol grubu için hücreler kaplama yapılmamış lamel üzerine ekildiler. 4 saat sonunda kuyucuklar 1'er ml taze besi yeri ile dolduruldu. Hücreler 1., 3. ve 6. gün hücreler %4 PFA ile sabitlendi. Boyama yapılmaya kadar +4°C'ye yerleştirildi ve Şekil 23'deki protokol izlendi.



Şekil 23: İmmüno Floresan boyama prosedürü

Boyamanın yapılacağı gün hücreler +4°C'den çıkarıldı, 1X PBS içerisinde çözülmüş %0.25 Triton X100 içerisinde 15 dakika bekletildi. Bu aşama hücre zarının geçirgenliğini artırdı. Tritonun fazla maruziyetinden kurtulmak için 15 dakika sonunda hücreler 3 kez 5 dakika aralıklarda 1X PBS ile yıkandı. Antikora bağlanma kapasitesinde spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için hücreler 1X PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik BSA (Bovine Serum Albumin) de 1 saat bekletildi. Daha sonra düz yüzeye parafilm kaplandı ve lameller parafilm yüzey üzerine yerleştirildi. OPN ve SSEA-1 proteinlerine spesifik birincil antikorlar kullanıldı. OPN birincil antikorunu 1/100 olacak şekilde SSEA-1 birincil antikorunu 1/50 olacak şekilde 1X PBS içerisinde hazırlanmış %1 lik BSA ile seyreltildi. Parafilm kaplı yüzey ıslatılmış gazlı bez üzerinde (antikorların kurummasını engelleyecek nemli ortam sağlanabilmesi için) köpük kutu içerisinde yerleştirildi ve bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün oda sıcaklığına alınan lameller 6 kuyucuklu plate içerisinde kondu ve birincil antikorunun uzaklaştırılması için 3 kez 5 dakika aralıklarda 1X PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra çalışmalar karanlık ortamda gerçekleştirildi. İkincil antikorlar, birincil antikorlara uygun olarak, OPN için tavşana karşı üretilen ve SSEA-1 için fareye karşı üretilen antikora bağlanacak şekilde seçildi. İkincil antikor FITC, 1/100 olacak şekilde 1X PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik BSA ile seyreltildi. Daha sonra düz yüzeye parafilm kaplandı ve lameller parafilm yüzey üzerine yerleştirildi. Her lamel üzerine 100 mikrolitre ikincil antikorlar eklendi ve parafilm kaplı yüzey ıslatılmış gazlı bez

üzerinde köpük kutu içerisine yerleştirildi. Kutu oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bu sürecin sonunda lameller 6 kuyucuklu plate içerisine alındı, ikincil antikorunun uzaklaştırılması için 3 kez 5 dakika aralıklarda 1X PBS ile yıkandı.

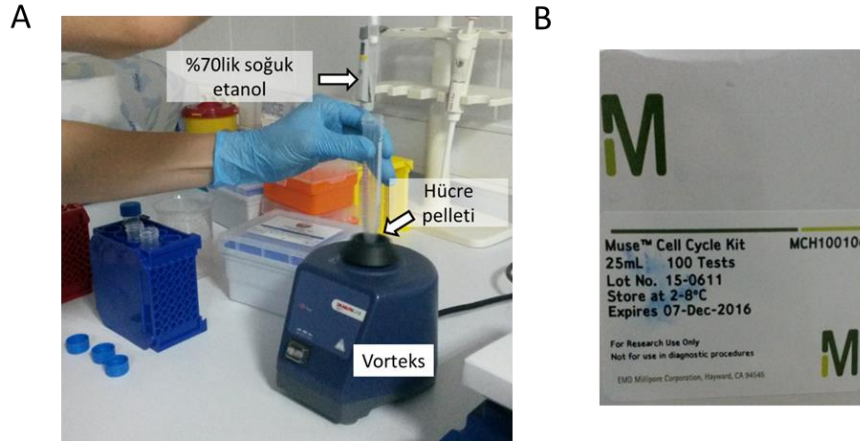
Boyama işlemi kapatma işlemi ile devam etti. Bunun içi lamalar etiketlendi ve her birine birer damla DAPI içeren kapama solüsyonu damlatıldı. Lameller hücre kaplaması solüsyon tarafına gelecek şekilde kapatıldı ve üzerine hafifçe basılarak fazla solüsyonun uzaklaştırılması sağlandı. Yaklaşık bir saat, +4°C’de bekletildi ve kapama solüsyonunun kuruması sağlandı. Uzun süreli saklama için lamel çevresi oje ile kapatıldı ve karanlık kutu içerisinde +4°C’de tutuldu.

3.16.2. İmmünofloresan Boyamaların Görüntülenmesi

+4°C’de tutulan örnekler oda sıcaklığına getirildi, böylece cam yüzeylerdeki buğulu görüntü engellendi. Görüntüler 10X, 20X ve 40X objektiflerle ve kısmi olarak 100X objektif ile Olympus BX50 mikroskop ile görüntülendi.

3.16.3. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi için hücreler 6 kuyucuklu plate içerisine direk olarak kaplama yapılan matrijel üzerine hücre konsantrasyonu mililitrede 10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Kontrol grubu için hücreler aynı konsantrasyonda matrijel kaplaması olmadan eklendi. Hücrelere 1., 3. ve 6. gün genel pasaj protokolü uygulandı. Her kuyucuk için yapılan pasaj ayrı örnek olarak değerlendirildi. Yüzeyden kaldırılan hücreler 1000 rpm’de, 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı ve 1300 rpm’de, 10 dakika santrifüj edildi. Toplamda üç santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve her örneğe -20°C’de saklanan %70’lik soğuk etanol solüsyonundan 1’er mililitre vorteks eşliğinde yavaşça eklendi ve örnekler -20°C’de bir gece bekletildi (Şekil 24-A).



Şekil 24: Hücelere vorteks eşliğinde soğuk etanol eklenmesi

Ertesi gün örnekler 1300 rpm’de, 10 dakika santrifüj edildi. Etanolü uzaklaştırmak üzere yapılan santrifüjün ardından hücre pelleti 1X PBS’de çözünerek 1000 rpm ‘de, 10 dakika sanrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet 200 mikrolitre hücre döngüsü ajanı (Şekil 24-B) eklendi ve vorteks yapıldı. Hücreler, oda sıcaklığında, 30 dakika karanlık ortamda bekletildi. Bu süreç sonunda örnekler hücre analizatör cihazında okutuldu.

3.17. Analizler

Çalışmada deneyler 3 kez tekrarlanarak istatistiksel olarak farkların belirlenmesi hedef alındı.

3.17.1. İmmünofloresan boyama analizleri

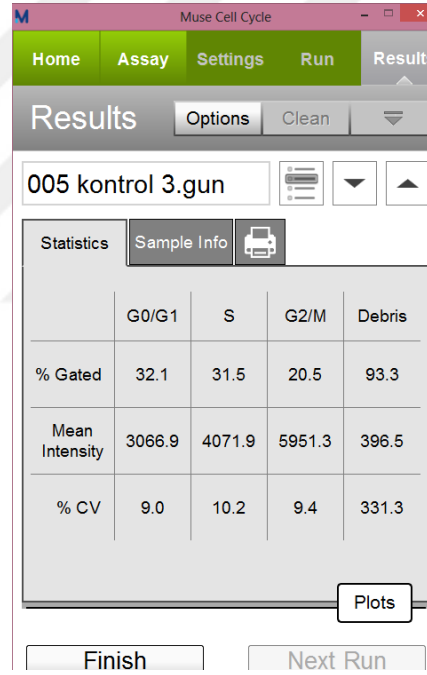
Fotoğrafları çekilen hücreler ImageJ programı ile değerlendirildi. Bunun için fotoğraflar ImageJ programında açıldı. Renk kaynaklı herhangi bir sapma olmaması için örnekler ‘Split Channels’ sekmesi ile renk kanallarına ayrıldı ve FITC ile etiketlenen proteinler baz alınacağından yeşil kanaldaki fotoğraflar seçildi.

Seçilen fotoğraflarda arka plan ışmasını gidermek için ‘subtract background’ sekmesi kullanıldı ve ‘rolling ball radius’ 50 piksel olarak belirlendi ve tüm fotoğraflara uygulandı. Hücrelerin zaman geçtikçe koloni formları oluşturmasından ötürü fotoğraf çekimleri iki farklı fazda netlik kazandı. Çalışma farklılaşma ve koloni formlarından ayrılan hücelere doğru yoğunlaştı ve bu gövdeden çıkan hücelere göre

odaklama yapıldı. Görüntünün daha net elde edilebilmesi için 2 boyutlu ortama uygulanabilecek genellikle z de görüntülemeye karşılaşılan bulanıklık gidermek için kullanılan 'deconvolution' eklentisi belirlenmeye çalışıldı. Bunun için öncelikle nokta yayılım fonksiyonu (*point spread function (PSF)*) elde edildi daha sonra ise hücrelerin PSF'ye göre dekonvolüsyon edilmesi sağlandı ve hücrelerin bu aşmadan sonra protein ifadenmesi karşılaştırıldı.

3.17.2. Hücre Döngüsü analizi

Hücre döngüsü analizinde hücre döngüsü tablo olarak cihazdan üç faz olarak alındı. Hücreler fazlarına göre G0/G1, S veya G2/M fazında olarak belirlendi ve hücre analizatör cihazından değerler tablo halinde alındı (Şekil 25).



	G0/G1	S	G2/M	Debris
% Gated	32.1	31.5	20.5	93.3
Mean Intensity	3066.9	4071.9	5951.3	396.5
% CV	9.0	10.2	9.4	331.3

Şekil 25: Örnek hücre döngüsü sonuç tablosu

Excel programıyla istatistiksel analizler t-test ile yapıldı ve sonuçlar %95 güvenilirlik aralığına göre karşılaştırıldı.

Deneyler süresince kullanılan malzemeler ve cihazlar kullanım amaçları ile birlikte Tablo 8 ve Tablo 9'da belirtilmiştir.

Tablo 8: Deney aşamalarında kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Kullanım Amacı
Mouse embryonic stem cell expansion media with serum and antibiotics' (LOT# 1412172302-01) (CELPROGEN)	fEKH'lerin besi yeri ortamı olarak kullanıldı.
Mouse embryonic stem cell complete growth serum-free media with antibiotics' (LOT#1412172301-01) (CELPROGEN)	fEKH'lerin besi yeri ortamı olarak kullanıldı.
FBS for mESC (ATCC)	fEKH'lerin besi yerine serum ihtiyacını karşılamak için eklendi.
Matrigel (Corning)	fEKH'lerin diferansiyasyon kapasitelerini ölçmek amacıyla yüzey kaplaması için kullanıldı.
Trypsin-EDTA (Lonza)	fEKH'lerini flask yüzeyinden ayırmak için kullanıldı. Kültüre edilen adeziv hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için kullanılan kimyasal
Count&Viability kit (Milipore)	fEKH'lerin flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra, deneylerde kullanılmak üzere canlılığını ve sayısını belirlemek için kullanıldı.
Cell Cycle kit (Milipore)	fEKH'lerin hücre döngüsündeki değişimlerini belirlemek amacıyla kullanıldı.
Etanol (Merck)	Hücre döngüsü değişimini belirlemek üzere yapılan çalışmalarda fiksatif olarak kullanıldı.
DMSO	fEKH'lerinden stok hücre oluşturmak üzere kriyoprezervasyon için kullanıldı.
PBS	Yıkamalarda kullanılmak üzere 10X hazırlanıp daha sonra distile su ile 1X olacak şekilde seyreltilip kullanıldı.
NaCl (JT Baker)	PBS hazırlamak için kullanıldı.
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O (JT Baker)	PBS hazırlamak için kullanıldı.
KCl (Carlo Erba)	PBS hazırlamak için kullanıldı.
KH ₂ PO ₄ (Carlo Erba)	PBS hazırlamak için kullanıldı.
Paraformaldehit (Merck)	Paraformaldehit hazırlamak için kullanıldı.

Tablo 9: Deneş aşamalarında kullanılan cihazlar

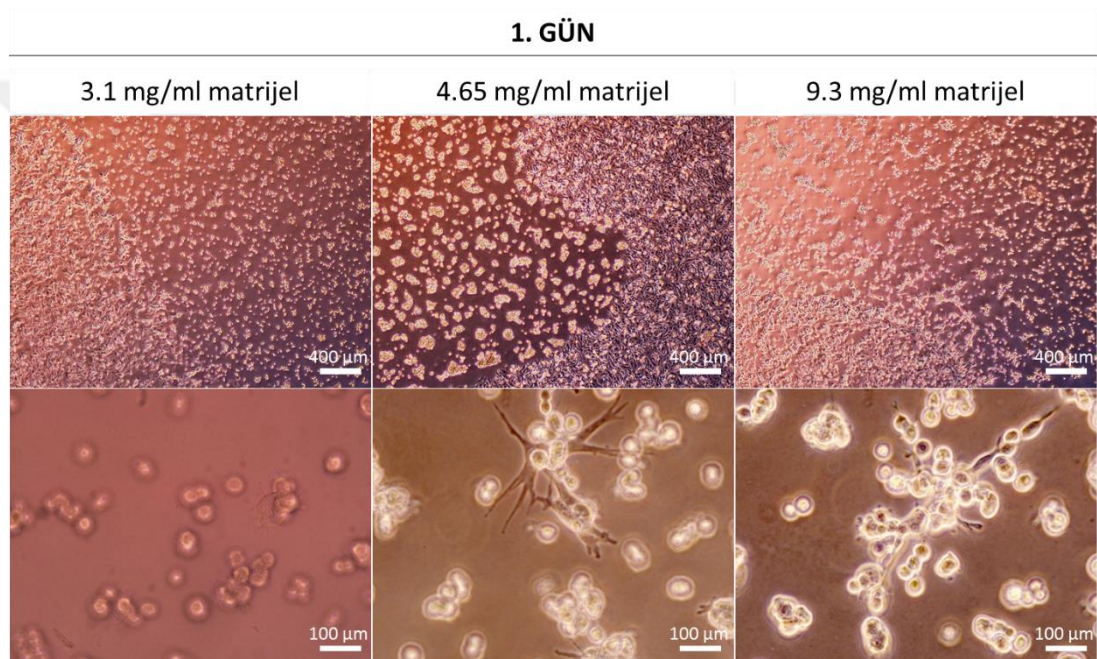
Gereç	Kullanım Amacı
Laminar kabin (Esco, ABD)	Hücre kültürü ve sterilite gerektiren tüm çalışmalar kabin içerisinde gerçekleştirildi.
Inverted mikroskop (Shimadzu UV-1208)	fEKH'lerin gözlemlenmesi ve görüntülenmesi için kullanıldı.
Santrifüj (Eppendorf 5804 R)	fEKH'nin pasajı sırasında ve hücre döngüsünün belirlenmesi için gerçekleştirilen deneyler aşamasında kullanıldı.
İnkübatör (Binder, Germany)	fEKH'lerin yaşama koşullarını (%5 CO ₂ ve 37°C) sağlamak amacıyla kullanıldı.
Su banyosu (Nüve BM 402)	fEKH'lerinin çözülmesi aşamasında kullanıldı.
Muse Cell Analyzer (Milipore)	Hücre canlılığı ve sayısının belirlenmesinde ve hücre döngüsünün belirlenmesinde kullanıldı.
Vorteks (Dragonlab, China)	Hücre döngüsünün belirlenmesi aşamasında ve immüno Floresan boyamada antikorların hazırlık aşamasında kullanıldı.
Floresan mikroskop (Olympus BX 50, Japan)	İmmüno Floresan boyamaları gözlemek ve görüntülemek için kullanıldı.
Manyetik karıştırıcı (Wisestir, Germany)	Paraformaldehit ve PBS hazırlık aşamasında kullanıldı.
Hassas terazi (Precisa, Switzerland)	Paraformaldehit ve PBS hazırlık aşamasında kullanıldı.
Çalkalayıcı	Matrijel kaplamasında yüzey dağılımını eşitlemek amacıyla kullanıldı.
Buz makinasi	Matrijel ile yapılan deneylerde kullanılan malzemelerin dondurulması aşamasında ve matrijelin katılaşmasını önlemek amacıyla kullanıldı.

BÖLÜM IV

4. BULGULAR

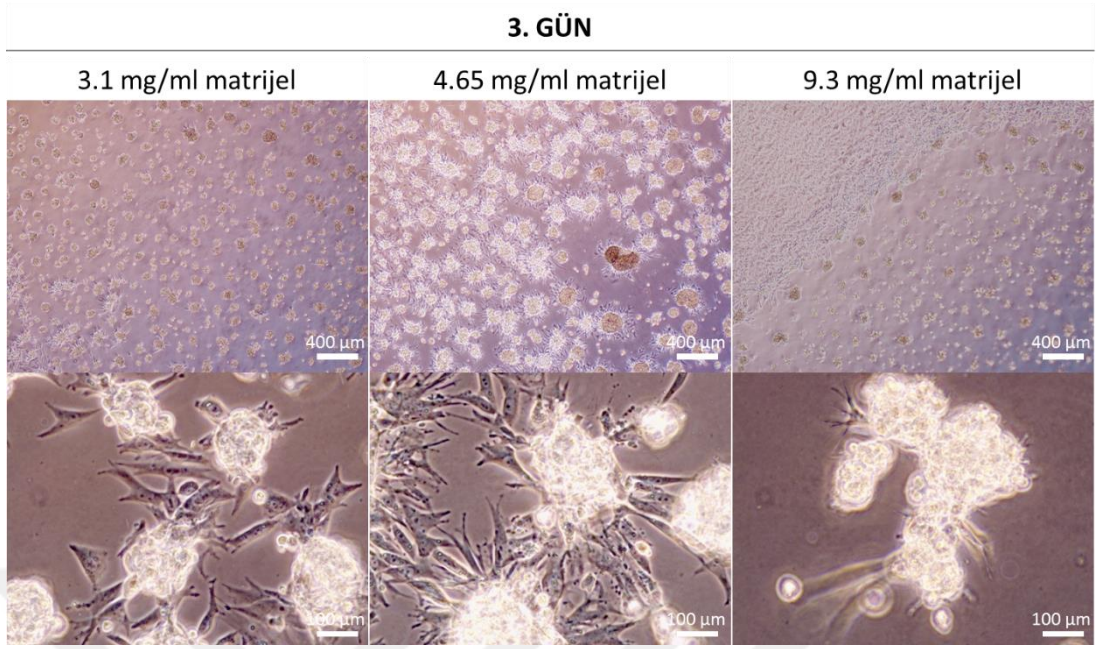
4.1. Faz-Kontrast Görüntülemeler

fEKH'leri yüzey kaplaması yapıp matrijelin polimerizasyonu gerçekleştirildikten sonra eşit miktarda yüzeylere ekildi. İlk denemeler stok solüsyonun konsantrasyonuna bağımlı şekilde gerçekleştirildi ve hücrelerin morfolojik olarak yapılarına bakıldı. Faz-kontrast fotoğrafları 4X ve 10X objektifler ile çekildi.



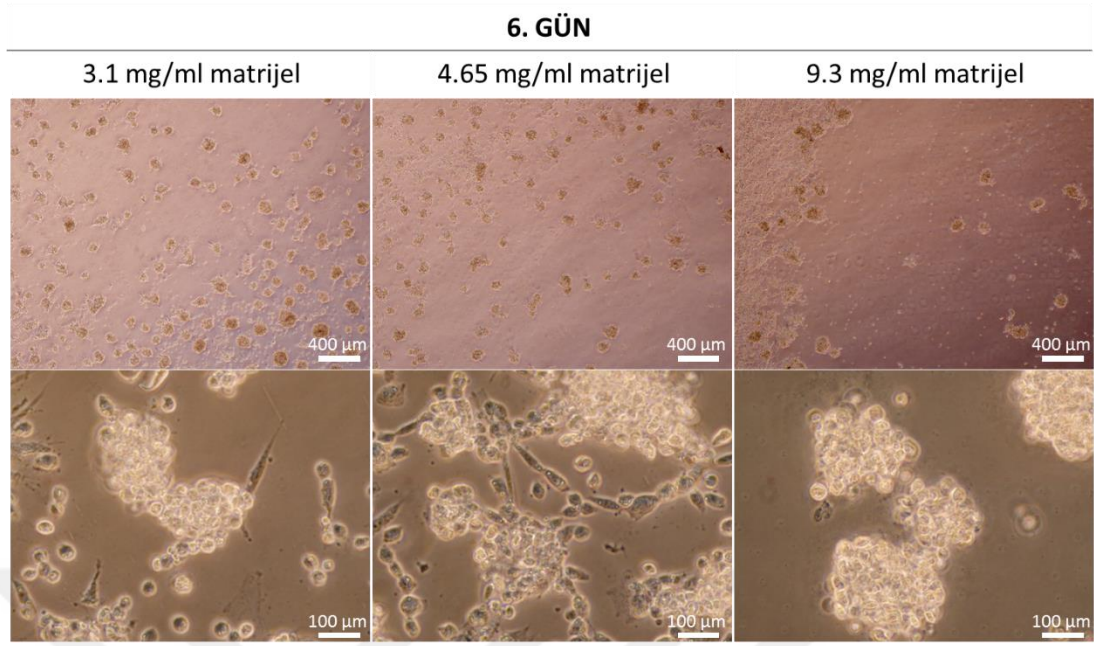
Şekil 26: Stok matrijel solüsyonununun 1:1, 1:2 ve 1:3 fEKH besi yeri ile seyrelttikten sonra kaplama yapıp, fEKH'lerin yüzeye ekilmesi sonrasındaki 1. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.

Şekil 26'da görüldüğü gibi hücreler 3.1 mg/ml protein kaplaması üzerinde koloni oluşturmazken ve tek tek dağılım gösterirken, 4.65 ve 9.3 mg/ml protein kaplaması üzerinde koloniler oluşturdu. Hücrelerin koloniden formundan çıkışları 4.65 mg/ml protein kaplamasında daha belirgindi.



Şekil 27: Stok matrijel solüsyonununun 1:1, 1:2 ve 1:3 fEKH besi yeri ile seyrelttikten sonra kaplama yapıp, fEKH'lerin yüzeye ekilmesi sonrasındaki 3. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.

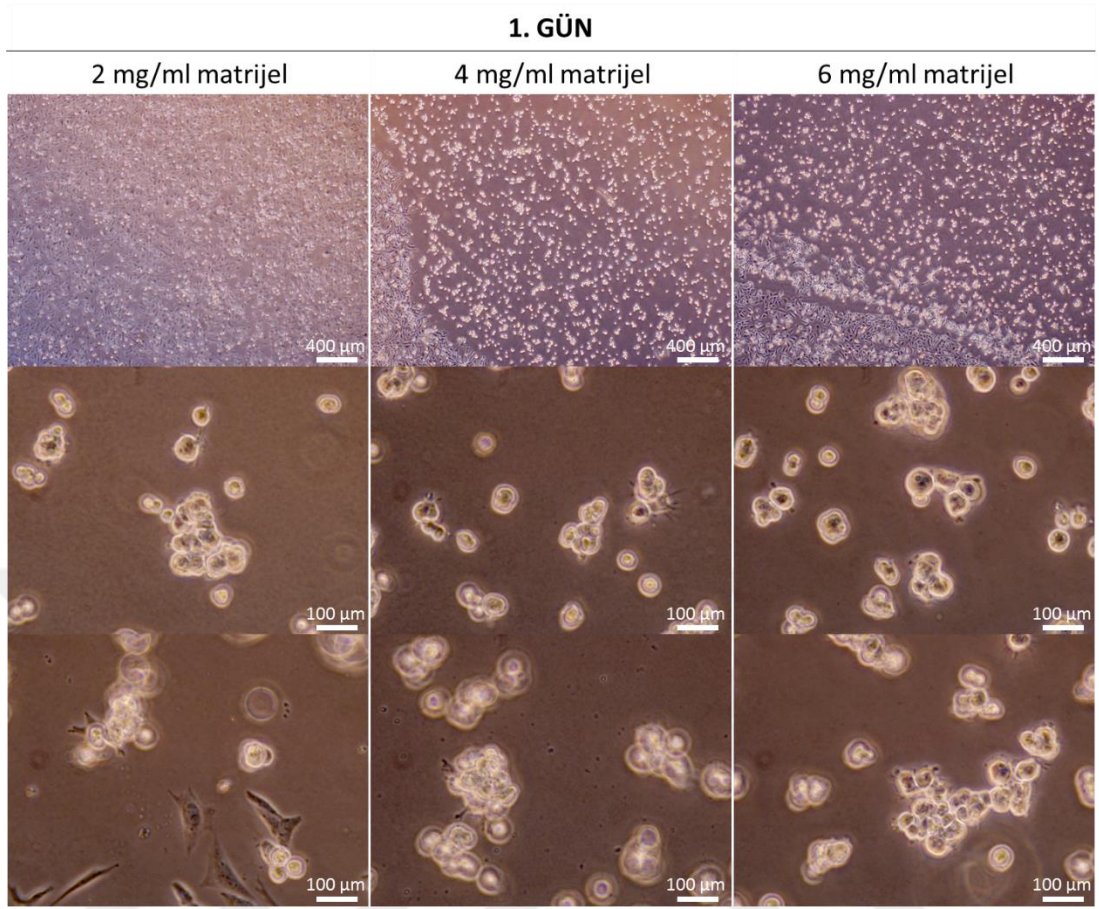
Şekil 27'de görüldüğü gibi hücreler 3.1 mg/ml protein kaplaması üzerinde daha küçük alanda koloni oluştururken, 4.65 ve 9.3 mg/ml protein kaplaması üzerinde kolonilerin yüzeyi daha büyüktü. Hücrelerin koloniden formundan çıkışları ise 3.1 ve 4.65 mg/ml protein kaplamasında belirgin ve yaklaşık iken 9.3 mg/ml protein kaplaması üzerinde çok nadir gözlemlendi.



Şekil 28: Stok matrijel solüsyonununun 1:1, 1:2 ve 1:3 fEKH besi yeri ile seyrelttikten sonra kaplama yapıp, fEKH'lerin yüzeye ekilmesi sonrasındaki 6. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.

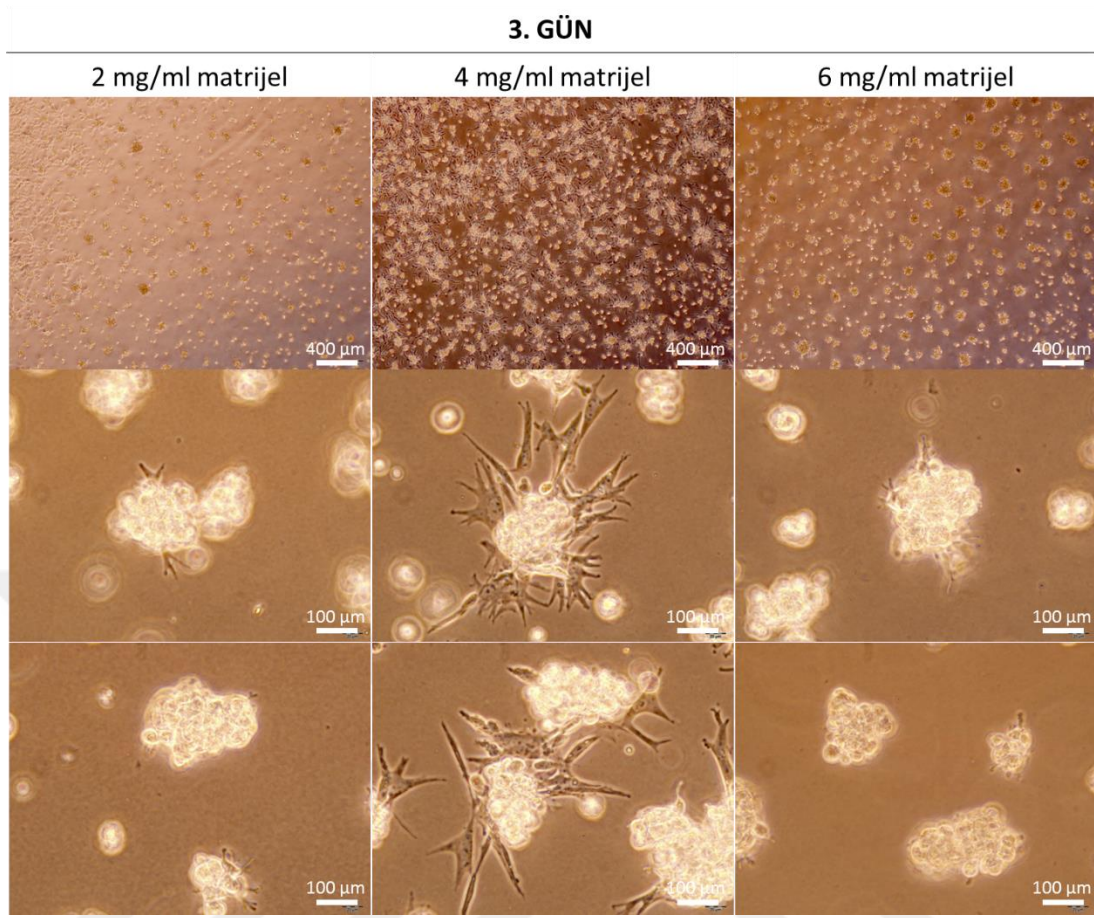
Şekil 28'de görüldüğü gibi her üç kaplama konsantrasyonunda da hücreler koloni oluşturdu, fakat koloniden çıkma durumu 9.3 mg/ml protein kaplamasında diğer kaplamalara göre daha nadir gözlemlendi.

İlk aşama sonucuna göre hücreler morfolojik olarak 3.1 ve 4.65 mg/ml protein kaplaması üzerinde daha fazla koloniden ayrılırlarken, 9.3 mg/ml hücrelerde daha az hücre koloniden ayrıldı. 3.1 ve 4.65 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücreler benzer özellik gösterirken, 9.3 mg/ml protein kaplamasında hem koloni çıkışı, hem de hücrenin yüzeye tutunması diğer gruplara göre daha azdı. Bu sonuca göre hücreler daha sonraki aşamalarda 2, 4 ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerine ekildi.



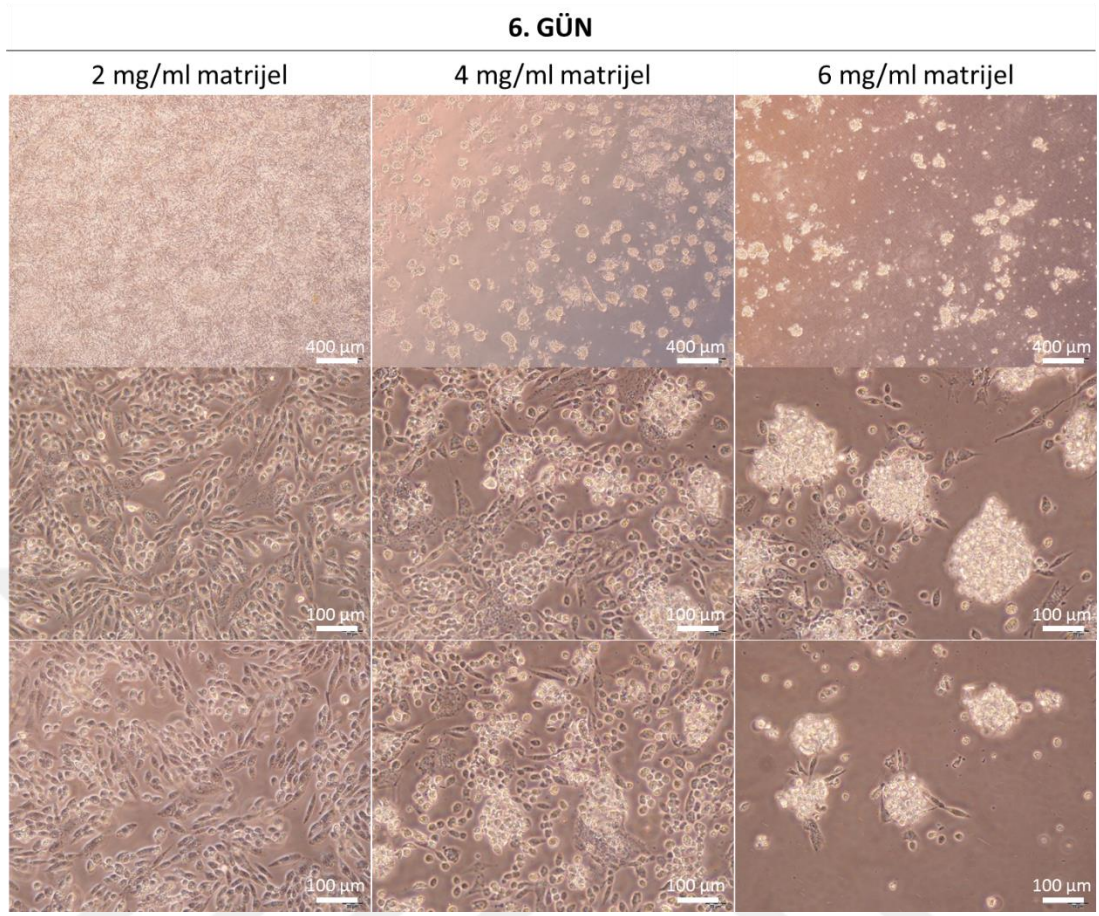
Şekil 29: Matrijelin fEKH besi yeri ile seyreltilerek 2, 4, 6 mg/ml protein konsantrasyonundaki kaplamanın yapılmasından ve matrijelin polimerizasyonundan sonra, fEKH'lerin yüzeye ekilmesini takip eden 1. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.

Şekil 29'da görüldüğü gibi hücreler 1. gün yüzey üzerinde ya tek hücre halinde ya da küçük gruplar halinde yapışmış olarak görüntülendi. 4 ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerinde hücreler yuvarlak hücre formuna yakın halde bulunurken, 2 mg/ml protein kaplaması üzerinde bazı hücreler polarize halde bulundular.



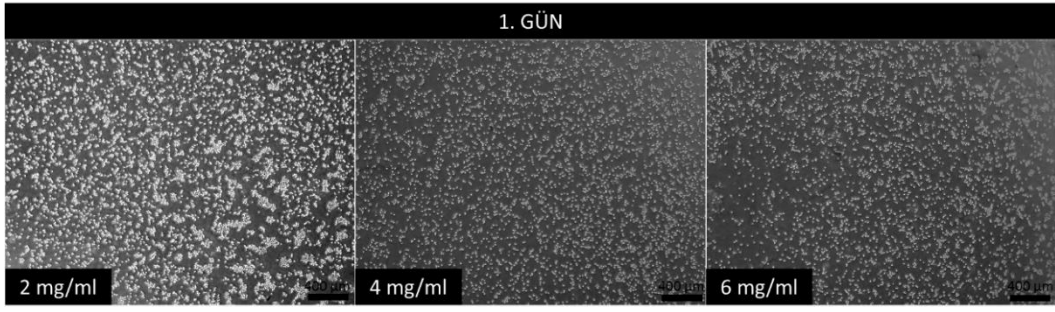
Şekil 30: Matrijelin fEKH besi yeri ile seyreltilerek 2, 4, 6 mg/ml protein konsantrasyonundaki kaplamanın yapılmasından ve matrijelin polimerizasyonundan sonra, fEKH'lerin yüzeye ekilmesini takip eden 3. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.

Şekil 30'da görüldüğü gibi hücreler 3. gün yüzeyde koloni formu oluşturdu. 2 mg/ml protein kaplaması üzerinde hücreler diğer kaplamalara göre daha küçük koloni formları oluştururken, diğer kaplamalardan farklı olarak 4 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücreler koloni formundan çıkış yapmaya başladılar.



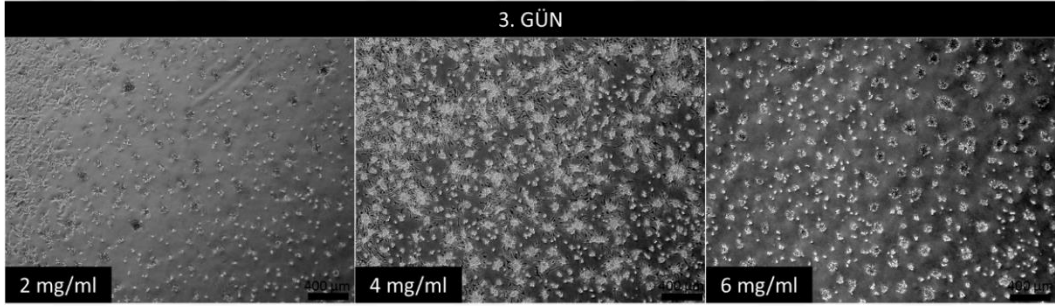
Şekil 31: Matrijelin fEKH besi yeri ile seyreltilerek 2, 4, 6 mg/ml protein konsantrasyonundaki kaplamanın yapılmasından ve matrijelin polimerizasyonundan sonra, fEKH'lerin yüzeye ekilmesini takip eden 6. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.

Şekil 31'de görüldüğü gibi hücreler 6. günde 2 ve 4 mg/ml protein kaplamasında yüzeyi kapladı, 6 mg/ml'de ise yıkamalar sonrası yüzeyden kopan hücreler fazlaydı. 2 mg/ml protein kaplamasında hücreler koloni formu oluşturmazken, 4 ve 6 mg/ml'de koloni formları belirgindi ve 4 mg/ml protein kaplamasında koloni formundan çıkan hücreler daha fazlaydı.



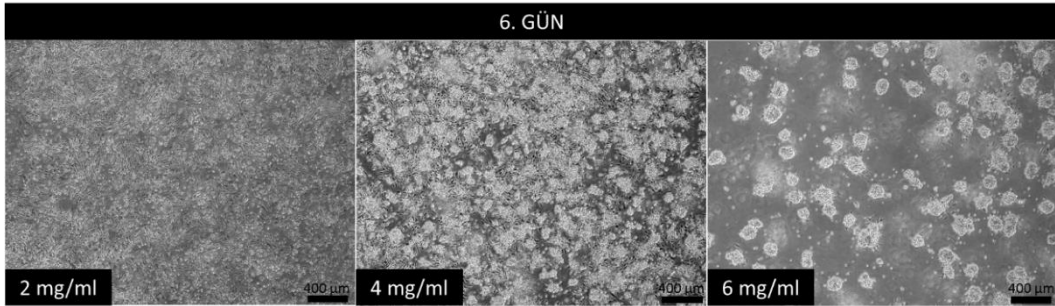
Şekil 32: Hücrelerin farklı konsantrasyondaki matrijel üzerinde 1. günleri.

Koloni yapıların oluşumu ilk gün net olarak görülemedi fakat hücrelerin 1. gün sonunda yüzeye tutunması gözlemlendi. Hatta matrijel varlığında yüzeye tutunma ekimden 2 saat içinde gerçekleşti fakat hücrenin yayılımı belirgin değildi (Şekil 32).



Şekil 33: Hücrelerin farklı konsantrasyondaki matrijel üzerinde 3. günleri.

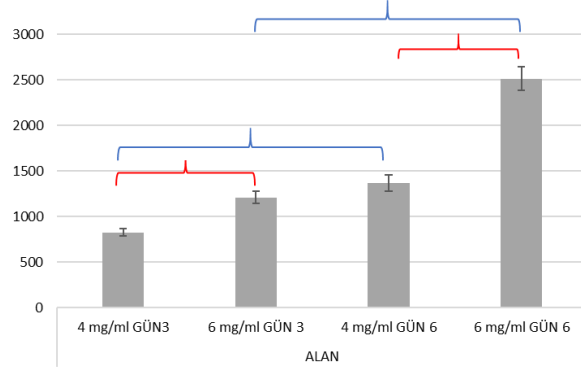
Koloni yapıların oluşumu 3. gün 4 ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerinde net olarak görüldü (Şekil 33).



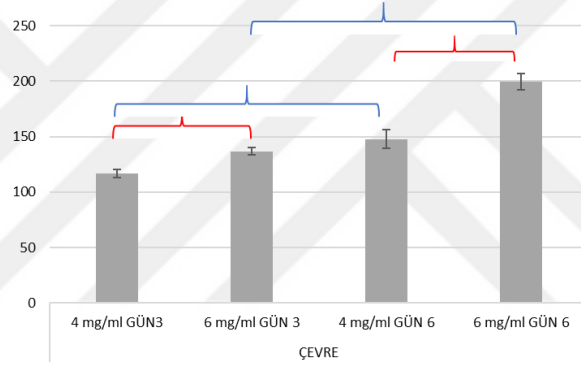
Şekil 34: Hücrelerin farklı konsantrasyondaki matrijel üzerinde 6. günleri.

Ekim sonrası 6. günde 2 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücreler koloni formu oluşturmazken, 4 ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücreler belirgin

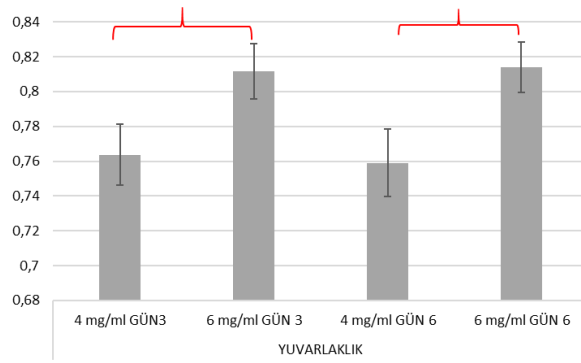
şekilde bu yapıları oluşturdu. Ayrıca 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hüresiz yüzey alanı diğer kaplamalara göre daha fazladır (Şekil 34).



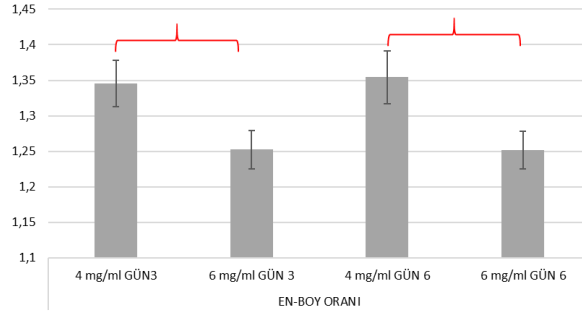
Grafik 1: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni alan grafiği



Grafik 2: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni çevre grafiği



Grafik 3: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni yuvarlaklık grafiği



Grafik 4: fEKH'lerin matrijel üzerindeki koloni en-boy oranı grafiği

Koloni yapısı incelendiğinde 2 mg/ml protein kaplamada hücreler koloni formunu diğer konsantrasyondaki kaplamalar kadar belirgin gerçekleştirmedi. Hem 3. hem de 6. günlerde alan ve çevre değerlerine bakıldığında 6 mg/ml protein kaplaması 4 mg/ml protein kaplamasına göre istatistiksel açıdan farklı olarak yüksekti (Grafik 1, Grafik 2). Ayrıca kolonilerin büyümesi gün bazında gösterildi (Grafik 1, Grafik 2). Koloniden çıkan hücre sayılarının 4 mg/ml protein kaplaması üzerinde daha fazla olduğundan 6 mg/ml kaplamada yuvarlaklık fazla iken, en boy oranı daha düşüktü (Grafik 3, Grafik 4).

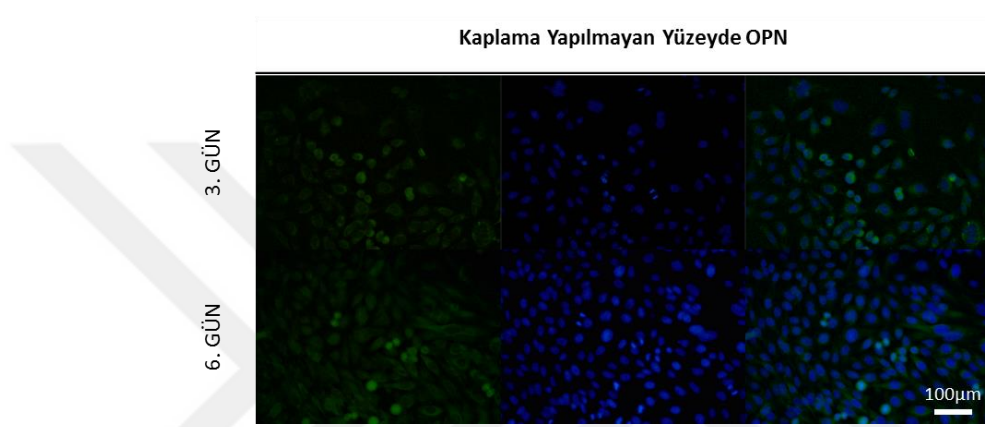
4.2. İmmüno Floresan Görüntülemeler

fEKH'ler yüzey kaplaması yapıp matrijelin polimerizasyonu gerçekleştirildikten sonra eşit miktarda yüzeylere ekildi. fEKH'ler OPN ve SSEA-1 spesifik primer antikolar ile etiketlendi ve daha sonra primer antikora spesifik sekonder antikolarla floresan ışık altında görülebilecek şeklini aldı. Tüm hücre grupları aynı protein için yaklaşık olarak aynı süre sınırlamasında pozlandı ve kalitatif karşılaştırmalar yapıldı. Koloni içeren görüntülerde koloni dışında olan hücrelere göre karşılaştırma yapıldı.

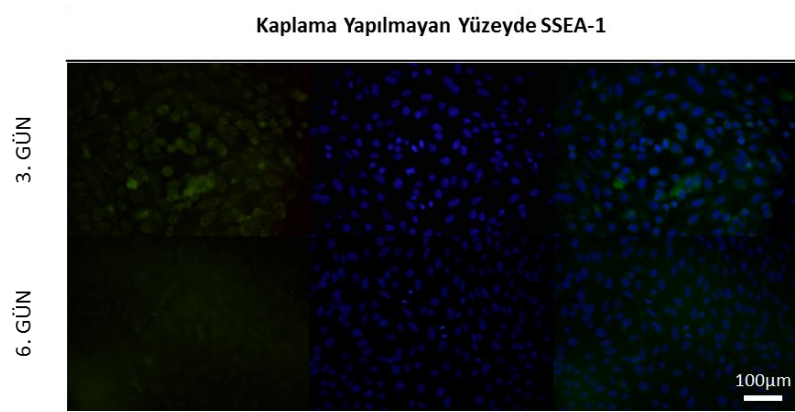
SSEA-1 ekspresyon düzeyi kaplama yapılmış ve yapılmamış yüzeylerde gün bazında azaldı. 2 mg/ml protein kaplaması ve kaplama yapılmamış gruptaki hücreler karşılaştırıldığında, 2 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücrelerde SSEA-1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu görüldü. Genel olarak 2 ve 4 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ekspresyon düzeyi aynı iken, 4 mg/ml protein kaplamasında fokal alanlarda daha yüksek ekspresyon görüldü. 3. gün 2, 4, 6 mg/ml

protein kaplaması üzerindeki hücrelerin SSEA-1 seviyeleri benzerdi (Şekil 36, Şekil 38, Şekil 40, Şekil 42).

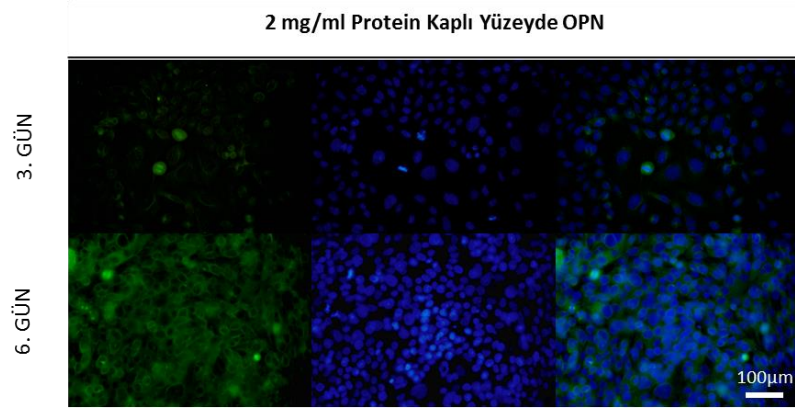
OPN ekspresyon düzeyleri 6.gün 3. güne göre 2 ve 6 mg/ml protein kaplamasında daha yüksekti, fakat 4 mg/ml protein kaplaması üzerinde 3. ve 6. gün OPN ekspresyonları benzerdi. Ayrıca, 6. günde 4 ve 6 mg/ml protein kaplama yapılmış yüzey üzerindeki hücrelerin OPN ekspresyon düzeyi benzerdi (Şekil 35, Şekil 37, Şekil 39, Şekil 41).



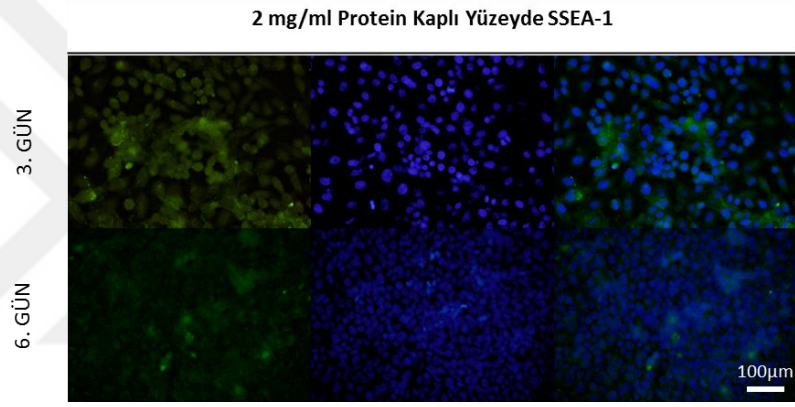
Şekil 35: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey üzerindeki OPN protein ifadenmesi



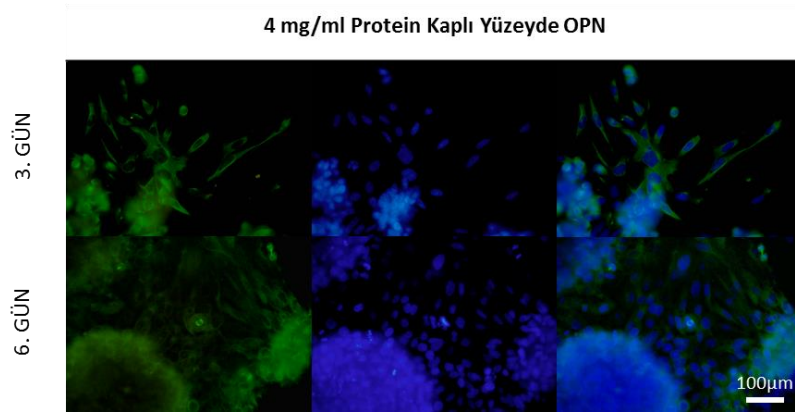
Şekil 36: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi



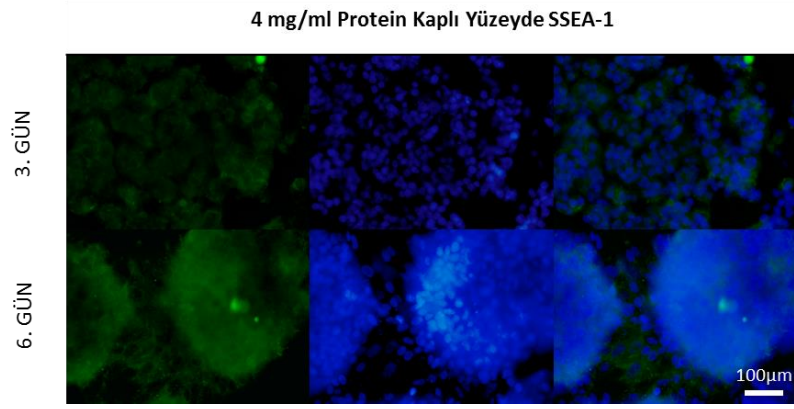
Şekil 37: fEKH'lerin 2 mg/ml protein kaplaması üzerindeki OPN protein ifadenmesi



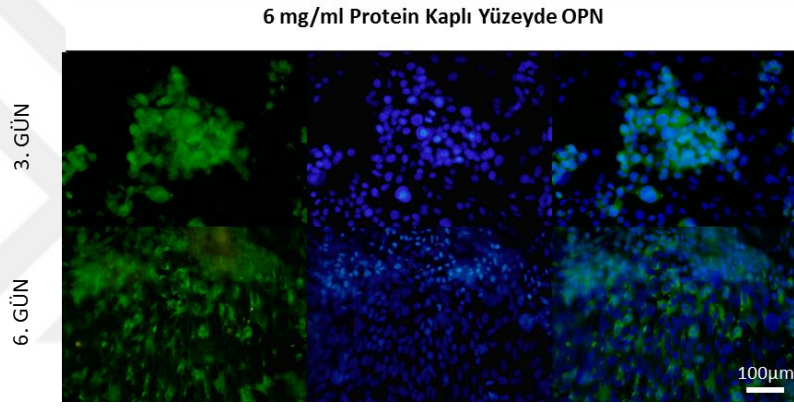
Şekil 38: fEKH'lerin 2 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi



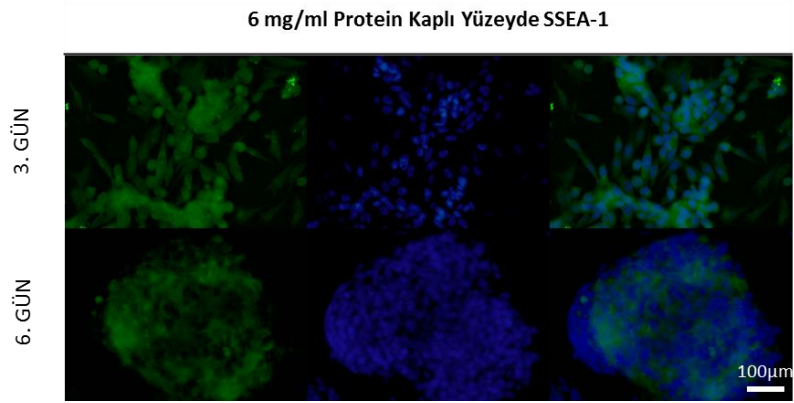
Şekil 39: fEKH'lerin 4 mg/ml protein kaplaması üzerindeki OPN protein ifadenmesi



Şekil 40: fEKH'lerin 4 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi



Şekil 41: fEKH'lerin 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki OPN protein ifadenmesi



Şekil 42: fEKH'lerin 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki SSEA-1 protein ifadenmesi

4.3. Hücre Döngüsü

fEKH'leri yüzey kaplaması yapıp matrijelin polimerizasyonu gerçekleştikten sonra eşit miktarda yüzeylere ekildi. Fazlar gün bazında ve protein konsantrasyonu bazında karşılaştırıldı (Şekil 43-54) (Grafik 5-8).

Kontrol grubunun (yüzey kaplaması olmayan grubun) karşılaştırmaları yapıldığında, sadece G0/G1 fazında 1. ve 3. günler arasında fark yoktu, diğer karşılaştırmalarda istatistiksel olarak fark görüldü.

3. günde 2 ile 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücreler arasında ve 4 ile 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki hücreler arasında G0/G1 fazında fark yoktur. Kaplama yapılan diğer yüzeylerde 3. gün G0/G1 fazında fark vardır.

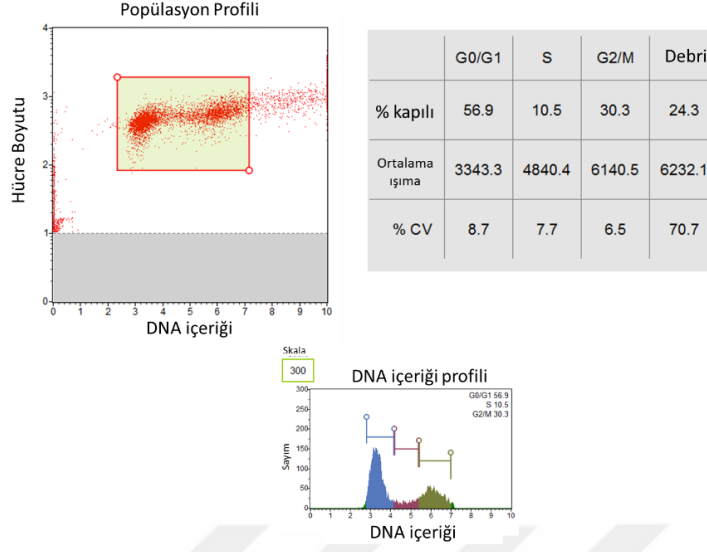
1. gün kontrol 1. gün 6 mg/ml arasında G0/G1'de ve G2/M'de fark görülmedi.

6. gün 2-4 mg/ml arasında, 3. gün kontrol ile 2 mg/ml arasında ve 3. gün 2 mg/ml ile 6 mg/ml arasında S'de fark görülmedi.

3. gün 2 mg/ml ile 4 mg/ml arasında ve 1. gün 2 mg/ml ile 1. gün 4 mg/ml arasında G2/M de fark görülmedi.

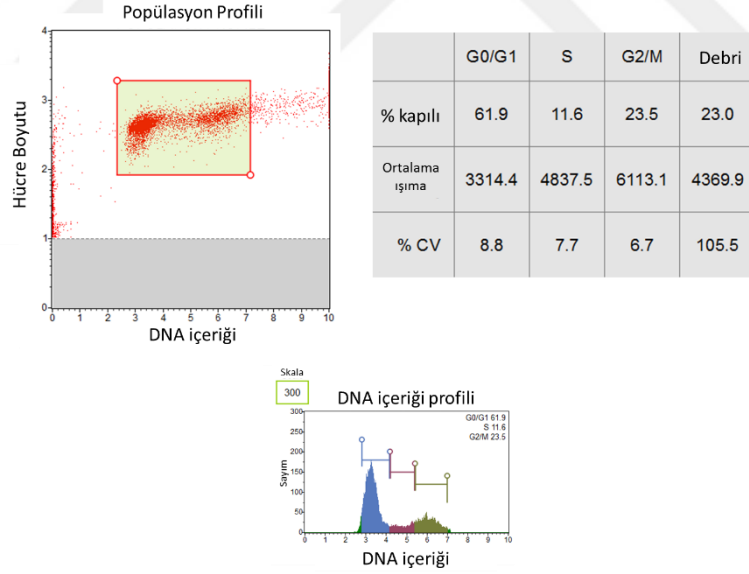
Tüm gruplarda 3. günde S fazında artış olurken, 6. günde S fazında düşüş ve G0/G1 fazında artış görüldü.

Kontrol 1. GÜN



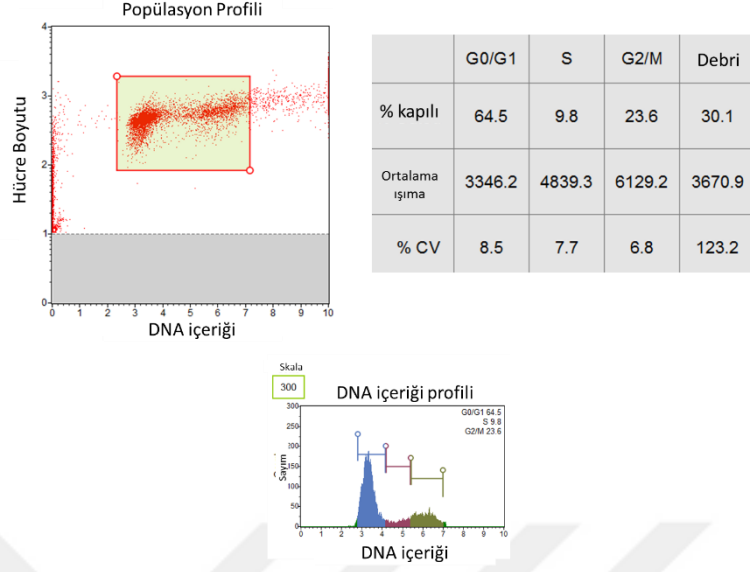
Şekil 43: Kaplama yapılmayan kontrol yüzeyi üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

2 mg/ml kaplama 1. GÜN



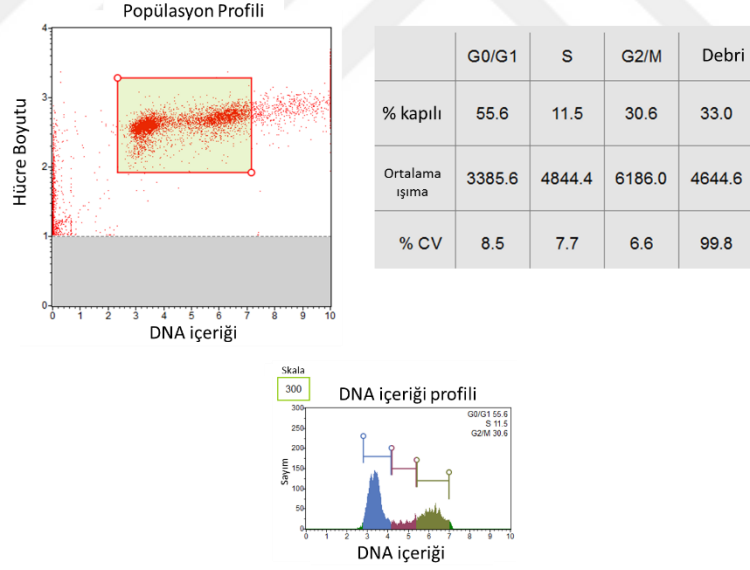
Şekil 44: 2 mg/ml protein yüzey üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

4 mg/ml kaplama 1. GÜN



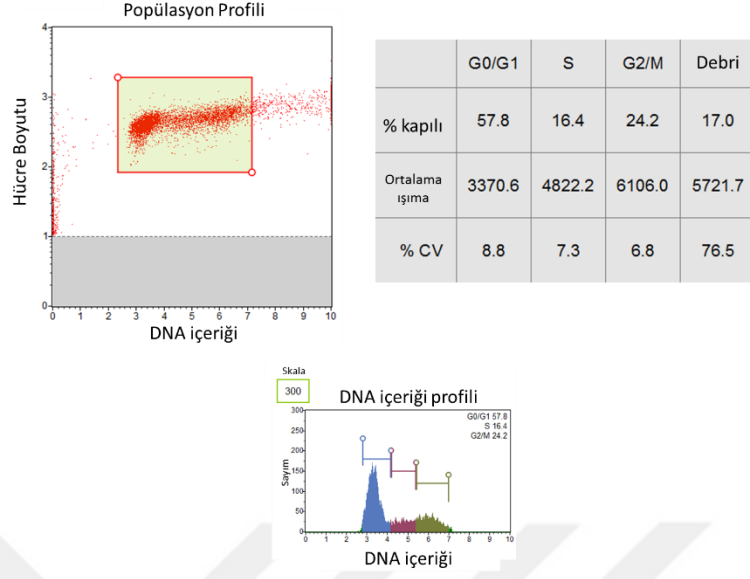
Şekil 45: 4 mg/ml protein yüzey üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

6 mg/ml kaplama 1. GÜN



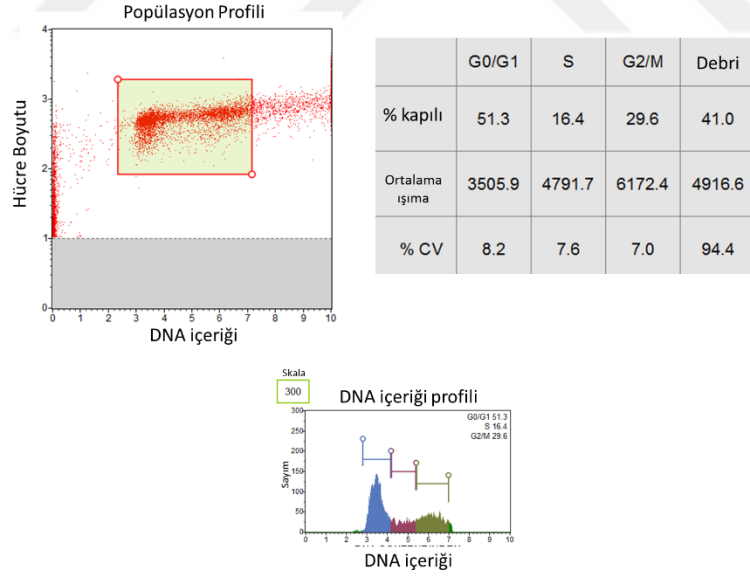
Şekil 46: 6 mg/ml protein yüzey üzerinde 1 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

Kontrol 3. GÜN



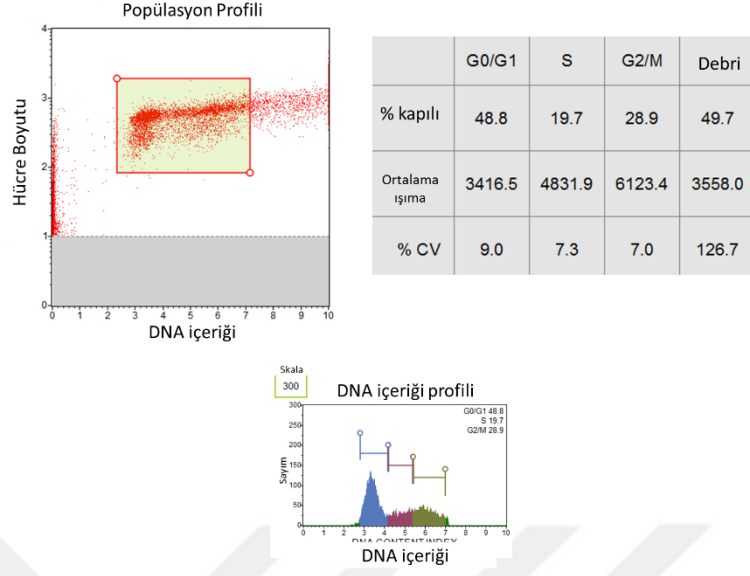
Şekil 47: Kaplama yapılmayan kontrol yüzeyi üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

2 mg/ml kaplama 3. GÜN



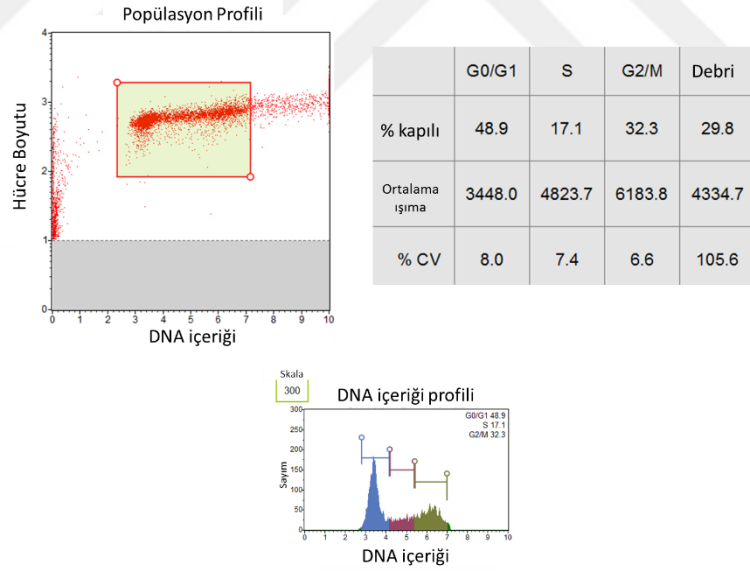
Şekil 48: 2 mg/ml protein yüzey üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

4 mg/ml kaplama 3. GÜN



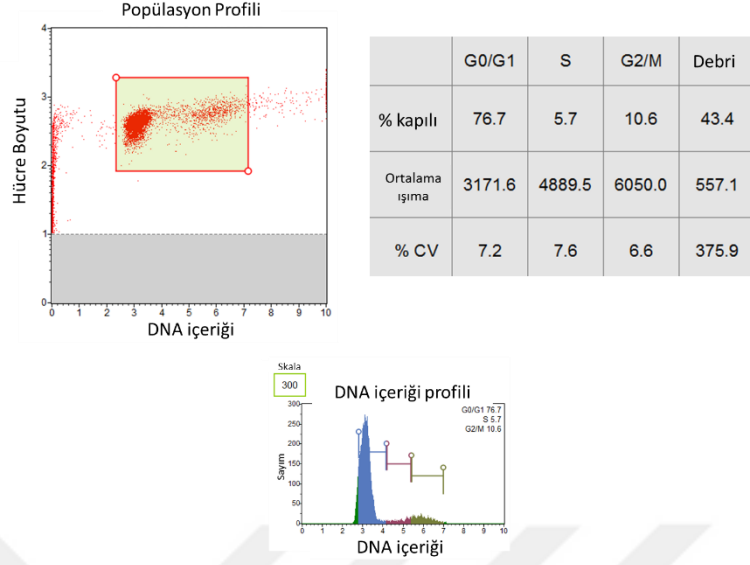
Şekil 49: 4 mg/ml protein yüzey üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

6 mg/ml kaplama 3. GÜN



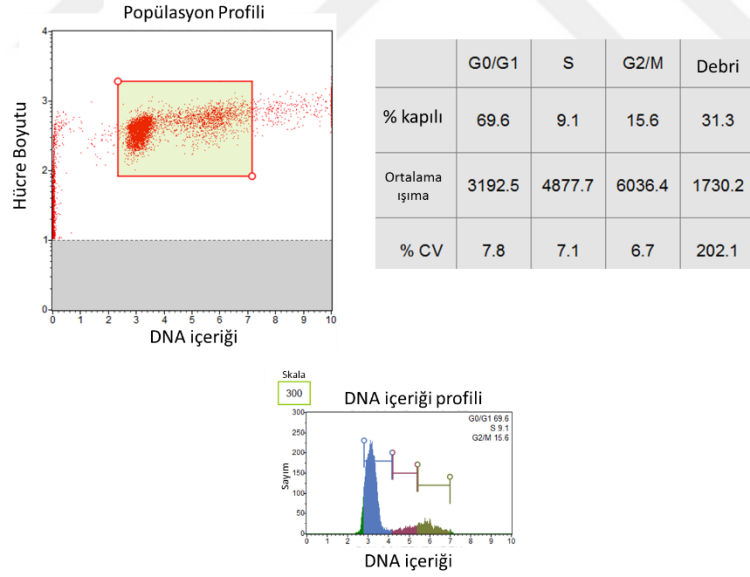
Şekil 50: 6 mg/ml protein yüzey üzerinde 3 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

Kontrol 6. GÜN



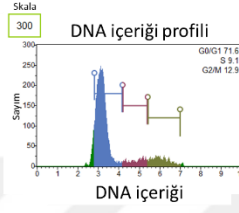
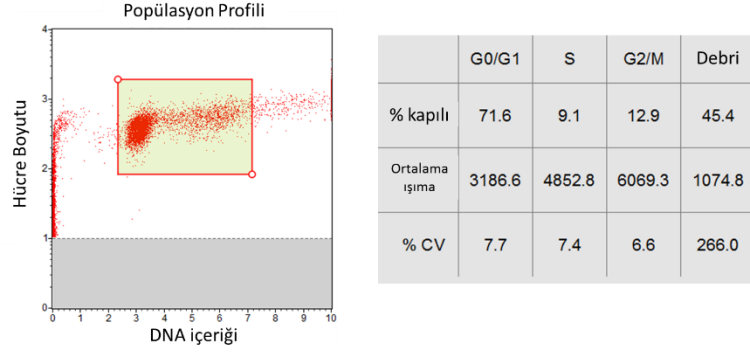
Şekil 51: Kaplama yapılmayan kontrol yüzeyi üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

2 mg/ml kaplama 6. GÜN



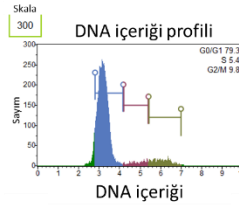
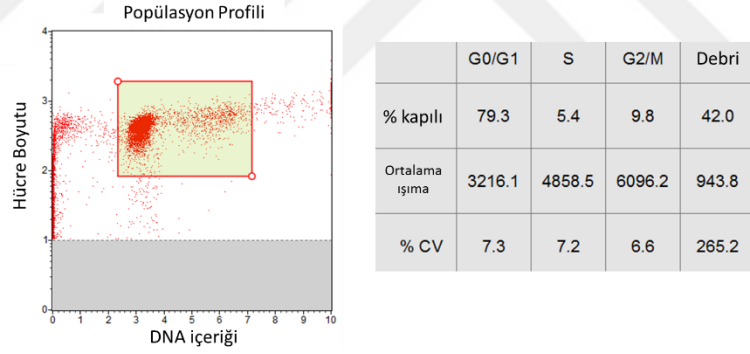
Şekil 52: 2 mg/ml protein yüzey üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

4 mg/ml kaplama 6. GÜN

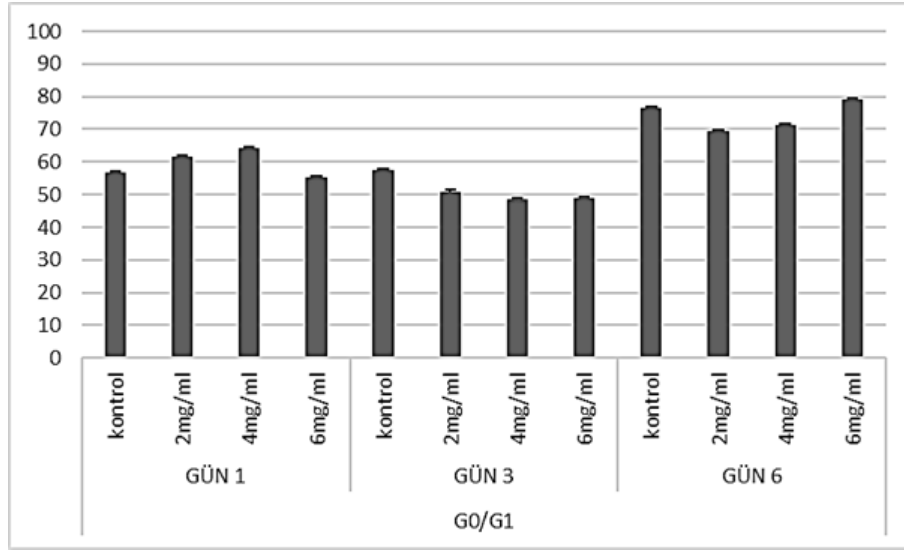


Şekil 53: 4 mg/ml protein yüzey üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili

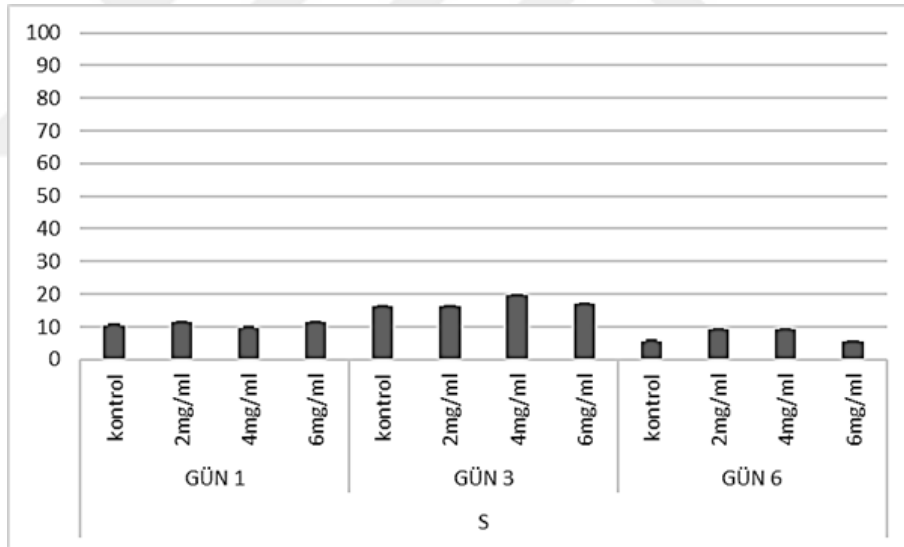
6 mg/ml kaplama 6. GÜN



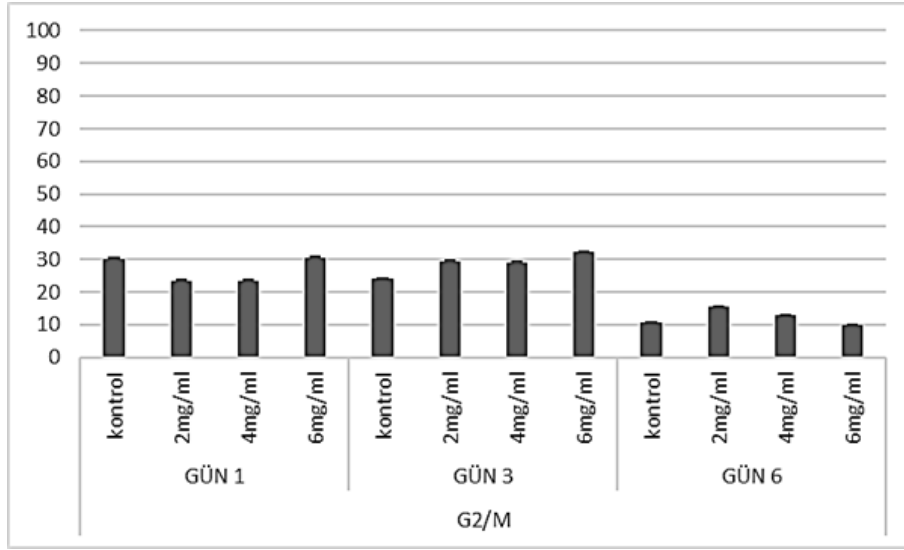
Şekil 54: 6 mg/ml protein yüzey üzerinde 6 gün inkübe edilen hücrelerin hücre döngüsü örnek popülasyon grafiği, faz dağılımı ve DNA içeriği profili



Grafik 5: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey ile 2, 4, ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki 1, 3, ve 6 gün inkübasyonundan sonraki G0/G1 fazı hücre döngüsü analizi



Grafik 6: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey ile 2, 4, ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki 1, 3, ve 6 gün inkübasyonundan sonraki S fazı hücre döngüsü analizi



Grafik 7: fEKH'lerin kaplama yapılmayan yüzey ile 2, 4, ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerindeki 1, 3, ve 6 gün inkübasyonundan sonraki G2/M fazı hücre döngüsü analizi

BÖLÜM V

5. TARTIŞMA

fEKH'ler, pluripotensi özelliği nedeniyle birçok araştırma konusunun temelindeki açığa kavuşmamış soruların cevabı olarak görülmekte ve soruların cevabını aramak için temel materyal olarak kullanılmaktadır. fEKH'ler ile gerçekleştirilen araştırmalar etik kurul gerektirmez ve üzerinde çok çalışıldığı için literatür kaynağı yüksek olan hücre hatlarındandır. Kök hücrelerin diferansiyasyon kapasitesinin sınırlarının açığa çıkarılması birçok patolojik olgunun tedavi edilebilmesinin yanı sıra rejeneratif tıp alanında da önemli kapasiteye sahip bu hücrelerin tedavi ajanı olarak kullanılma olasılığını artırmaktadır. Farklılaşma kapasitesinin açığa çıkarılması birçok kimyasal ve fiziksel uyarım sonucu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan besi yerinin ve ekim yapılacak yüzeyin özelliği yine birçok araştırmanın konusu olmuştur.

Kök hücre diferansiyasyonunun minimum olması için birçok yüzey kaplaması yapılmakta ayrıca feeder hücre yüzeyi de kullanılmaktadır. Kök hücreler asimetrik ve simetrik bölünebilirler ve asimetrik bölündüklerinde bir stok hücresi bir de diferansiye olacak hücreyi oluştururlar. Embriyonik kök hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşme potansiyeline sahip olduklarından hücre-doku değişim terapilerinde en önemli kullanılabilir aday olmaktadır (6). Embriyo gelişiminde hala büyük bilinmezlikler var olurken, embriyonik kök hücre çalışmaları da hızla ilerlemektedir. Embriyonik kök hücreyi tanımlayıcı belirteçler, izolasyon aşamalarını kolaylaştırmaktadır. Kök hücreler aynı zamanda kanser hücreleriyle ortak yolları paylaştığından yapılan kök hücre çalışmaları kanser çalışmalarına, kanser çalışmaları ise kök hücre çalışmalarına yol gösterici olmaktadır. ESM'nin kanser hücrelerinde etkilerinin miRNA ekspresyonundaki değişimi gösterilmiştir (107) ve bu çalışmalar fEKH'ler için de ESM'nin önemini araştırılmasına yönlendirmektedir.

ESM birleşimini *in vitro* taklit edebilmek için hidrojeller kullanılmaktadır. Hidrojeller kök hücre kaderini kontrol edebilir ve biyofiziksel ve biyokimyasal sinyaller vasıtasıyla işlev görür. Hidrojel temelli sinyaller, topoğrafya, bozunma,

mekanik ve yapışma gibi unsurları içerebilir; bunların hepsi 3 boyutlu mikro ortamlarda kök hücre farklılaşmasını etkilemiştir (80).

Biz bu çalışmamızda, kök hücre belirteci olarak fEKH'lerde sıklıkla kullanılan SSEA-1 protein ifadenmesini belirleyici olarak kabul ettik. Diferansiyasyon belirteci olarak ise OPN belirteci osteoblastik (mezektimal) diferansiyasyon yol gösterici oldu. Çalışmanın dayandığı temel 'dış sinyallerin embriyonik kök hücrelerin davranışlarını ve hücre kaderini manipüle etmede bize yardımcı olabilir mi ve biz hücre dışı komponent olarak kullanılabilir bazal membran bileşeninin gücünü deneysel olarak gözlemleyebilir miyiz?' sorusuydu. Hücreleri ekim sonrası 1., 3. ve 6. günlerde sabitledikten sonra hücrelerin morfolojik, immünohistokimyasal ve hücre döngüsü sonuçları değerlendirildi. Hücreler 1. gün sonunda sabitlendiğinde yıkama aşamalarına maruz kaldıklarından yüzeyde yıkama sonrasında çok az hücre kaldı, bunun için immünofloresan boyamalarda karşılaştırma yapabilmek için elimizden çok az hücre kaldı. Gün ve protein konsantrasyon değerleri arttıkça hücreleri yüzeyden enzimatik olarak ayırmak zorlaştı ve 6. gün 6 mg/ml protein yüzeyindeki hücreler normal pasaj aşamasından daha uzun süre tripsine maruz bırakıldı.

Morfolojik olarak hücreler kontrol ve 2 mg/ml protein kaplaması yüzeyi üzerinde benzer seyretti, 4 mg/ml protein kaplaması yüzeyinde ise hücreler 3. gün koloni formundan çıkan hücreler ile epitelyal morfoloji sergileyen hücreleri oluşturdu. En belirgin değişim 4 mg/ml protein kaplamasında 3. günde gerçekleşti.

İmmünofloresan görüntülerine göre beklenen gibi kök hücre karakteri gün geçtikçe azaldı, SSEA-1 protein ekspresyon seviyesi azaldı. OPN ekspresyonu ise 6. gün 3. güne göre daha yüksek seyretti ve 6. gün 4 ve 6 mg/ml kaplama yüzeyleri arasında benzer özellik gösterdi. İmmünofloresan görüntülerde çalışma ile bağımsız olarak ayrıca OPN protein ışınımının bölünen hücrede mikrotübüller üzerinde yoğunlaştığı görüldü.

Hücre döngüsü analizine göre hücreler 1. ve 3. gün benzer faz trendi gösterirken, 6. gün G0/G1 fazında hücre yüzdesi yükseldi. Bu hücrelerin artık pluripotent özelliklerini kaybederek G1 kontrol noktasına yakalandıklarını ve hücre döngüsünün uzadığını gösterdi.

Bu çalışma ilk defa matrijel kaplaması yapılmış yüzeylerde fEKH'lerinin kök hücre kapasitesini göstermek amacıyla SSEA-1 ile boyasını gösterdi. Ayrıca farklı protein konsantrasyonu üzerindeki hücrelerin OPN ekspresyon düzeyini göstererek osteoblastik hücre oluşumu için gerekli minimum dış etken ile osteogenezi oluşturma yönteminin temel araştırması oldu.

Hücre biyologları, materyal bilim araştırmacıları ve mühendisleri arasındaki işbirliği için kurulan diyaloglar yeni jenerasyon hidrojel sistemlerinin biyolojik karmaşıklığın artmasıyla ilgili önemli zorlukların üstesinden gelmeyi sağlayacaktır (80).



BÖLÜM VI

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

fEKH'leri, çevresel koşul ve ara madde uygulamasıyla farklılaşma yönünde etkilenebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda fEKH'si veya insan embriyonik kök hücresi kullanılmış olup, hücreler arası madde olarak kullanılan matrijel yoğunluğu literatürde belirtilmemiştir.

fEKH'leri yüzey kaplaması olmayan kontrol grubu ile 2, 4, 6 mg/ml protein kaplaması üzerine ekildi ve 1., 3., ve 6. gün karşılaştırmalar yapıldı. Hücreler kök hücre kapasitesini gösterebilmek adına SSEA-1 ile IF boyanırken, osteoblastik değişim için OPN ile boyandı. Dıştan gelen sinyallerin hücrenin hücre döngüsü üzerinden etkisine bakmak için ise hücre döngüsü analizi yapıldı.

fEKH'lerinin farklı konsantrasyondaki yüzeye verdiği cevap, hücrelerin yüzeye bağımlı olarak değiştirilipileceğini gösterdi. Hücreler kaplama olmayan ve 2 mg/ml protein kaplaması olan yüzeyde yüzeyi kaplayarak genişleyip zaman geçtikçe fibroblastik bir morfolojiye geçiş yaparken, 4 ve 6 mg/ml protein kaplaması üzerinde koloniler oluşturmayı tercih etti. Sonuç olarak; minimum dış etki maksimum değişim 4 mg/ml protein konsantrasyonu üzerine ekilen fEKH'lerinde görüldü ve matriks protein konsantrasyonunun hücreleri etkilediği sonucuna varıldı.

Bu çalışma ileriki çalışmalara kaynaklık edecek olup hem temel bilim adına organoid tasarımı için hem de klinik açıdan hücre-doku tedavilerinde öncülük edecektir. Bunun dışında çalışmamız embriyonik kök hücre kaynaklı olduğundan ve bu hücrelerin kanser hücreleriyle birçok ortak noktası bulunduğundan kanser ve fibrosis mekanizmalarının detaylandırılmasında da katkı sağlayabilir.

BÖLÜM VII

7. KAYNAKLAR

1. Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap. In: Solakoğlu Seyhun, editor. Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2015. p. 1–3.
2. John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, E. Donnall Thomas, James A. Thomson ISW. Essentials of Stem Cell Biology. 2nd ed. Lanza, Robert, John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, E. Donnall Thomas, James A. Thomson ISW, editor. Academic Press; 2009.
3. Özdil Berrin, Gürel Çevik, Kılıç Kubilay Doğan, Kuşçu Gökçe Ceren, Adalı Yasemin AH. Hücre içi trafik ve hücre davranış özellikleri. Ege Tıp Derg [Internet]. 2017;56(2):102–10. Available from: http://www.egetipdergisi.com.tr/pdf/pdf_EGE_843.pdf
4. Sadler TW. Langman's medical embryology. [Internet]. 12th ed. United States: Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 3 p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101562744>
5. Gilbert SF. Developmental biology [Internet]. Sinauer Associates; 1994. Available from: <https://books.google.com.tr/books?id=LTQQAQAAMAAJ>
6. Lerou PH, Daley GQ. Therapeutic potential of embryonic stem cells. Blood Rev. 2005 Nov;19(6):321–31.
7. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004;18(6):827–42.
8. KARAŞAHİN T. Embriyonik kök hücreler. 2014;9(1):65–71. Available from: <http://dergipark.gov.tr/ercivet/issue/5828/77497>
9. Borsos M, Torres-Padilla M-E. Building up the nucleus: nuclear organization

in the establishment of totipotency and pluripotency during mammalian development. *Genes Dev.* 2016 Mar;30(6):611–21.

10. Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. 1st ed. DİLMEN Y, editor. Ankara: AKADEMİSYEN TIP KİTABEVİ; 2014.
11. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol.* 2017 Aug;232(8):2008–18.
12. Graves KH, Moreadith RW. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev.* 1993 Dec;36(4):424–33.
13. Baran, Özlem Pamukçu; Nergis, Yusuf; Bahçeci S. Göbek kordonu kan ve stromal kökenli hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşması. *Dicle Tıp Derg* [Internet]. 2007;34(3):233. Available from: <http://www.diclemedj.org/upload/sayi/56/Dicle Med J-02635.pdf>
14. Yang J, Wu C, Stefanescu I, Horowitz A. Analysis of Retinoic Acid-induced Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells in Two and Three-dimensional Embryoid Bodies. *J Vis Exp.* 2017 Apr;(122).
15. Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol.* 2004 May;269(2):360–80.
16. Varela E, Schneider RP, Ortega S, Blasco MA. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep;108(37):15207–12.
17. Alberts B, Johnson A LJ. *Molecular Biology of the Cell An Overview of the Cell Cycle* [Internet]. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
18. Sauer IM. Tissue engineered grafts--160 years after R. Virchow's Omnis Cellula e Cellula. Vol. 99, *Transplantation*. United States; 2015. p. 462–3.

19. Downing GJ, Battey JFJ. Technical assessment of the first 20 years of research using mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2004;22(7):1168–80.
20. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul;292(5819):154–6.
21. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1981 Dec;78(12):7634–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349323/>
22. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* [Internet]. 2017 Jun 8;70(5):841–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90317-6](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90317-6)
23. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*. 1998 May;280(5367):1256–8.
24. Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod*. 1996 Jan;54(1):100–10.
25. Van Stekelenburg-Hamers AE, Van Achterberg TA, Rebel HG, Flechon JE, Campbell KH, Weima SM, et al. Isolation and characterization of permanent cell lines from inner cell mass cells of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 1995 Apr;40(4):444–54.
26. Sims M, First NL. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Jun 21;91(13):6143–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC44154/>
27. Mitalipova M, Beyhan Z, First NL. Pluripotency of bovine embryonic cell line

- derived from precompacting embryos. *Cloning*. 2001;3(2):59–67.
28. Welling M, Geijsen N. Uncovering the true identity of naive pluripotent stem cells. *Trends Cell Biol*. 2013 Sep;23(9):442–8.
 29. Zhu H, Yang H, Owen MR. Combined microarray analysis uncovers self-renewal related signaling in mouse embryonic stem cells. *Syst Synth Biol*. 2007 Dec;1(4):171–81.
 30. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000 Nov;227(2):271–8.
 31. Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, et al. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(5):770–8.
 32. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov;282(5391):1145–7.
 33. Dani C, Chambers I, Johnstone S, Robertson M, Ebrahimi B, Saito M, et al. Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev Biol*. 1998 Nov;203(1):149–62.
 34. Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2005 Feb;280(7):5307–17.
 35. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003 May;113(5):631–42.
 36. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May;113(5):643–55.

37. Dowell KG, Simons AK, Bai H, Kell B, Wang ZZ, Yun K, et al. Novel insights into embryonic stem cell self-renewal revealed through comparative human and mouse systems biology networks. *Stem Cells*. 2014 May;32(5):1161–72.
38. Jung D, Xiong J, Ye M, Qin X, Li L, Cheng S, et al. In vitro differentiation of human embryonic stem cells into ovarian follicle-like cells. *Nat Commun*. 2017 Jun;8:15680.
39. Sargent A, Bai L, Shano G, Karl M, Garrison E, Ranasinghe L, et al. CNS disease diminishes the therapeutic functionality of bone marrow mesenchymal stem cells. *Exp Neurol*. 2017 Jun;
40. Arana M, Kumar A, Ashwathnarayan A, Atari M, Barajas M. Type 1 diabetes treatments based on stem cells. *Curr Diabetes Rev*. 2017 Jun;
41. Son H, Moon A. Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. *Toxicol Res [Internet]*. 2010 Dec 20;26(4):245–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834497/>
42. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1776–84.
43. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8–20.
44. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest [Internet]*. 2009 Jun 1;119(6):1420–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689101/>
45. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell [Internet]*. 2009;139(5):871–90. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867409014196>
46. Grunert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. Vol. 4, *Nature reviews*.

- Molecular cell biology. England; 2003. p. 657–65.
47. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature*. 2006 May;441(7092):444–50.
 48. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Feb 21;15(3):178–96.
 49. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442–54.
 50. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*. 2003 Aug;5(2):351–8.
 51. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012 May;17(6):6196–236.
 52. Zuzana K. G1 Phase Regulation in Mouse Embryonic Stem Cells in the context of DNA Damage and Self-Renewal [Internet]. Palacky University; 2010. Available from: <https://theses.cz/id/9s1ta2/124125-171702994.pdf>
 53. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*. 1998 Feb;71(1–2):89–98.
 54. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1988 Dec;336(6200):688–90.
 55. Cyranoski D. Trials of embryonic stem cells to launch in China [Internet]. Available from: <https://www.nature.com/news/trials-of-embryonic-stem-cells-to-launch-in-china-1.22068>
 56. Scott MA, Nguyen VT, Levi B, James AW. Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2011 Oct 28;20(10):1793–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182038/>

57. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000 Mar;275(13):9645–52.
58. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells* [Internet]. 2013 Oct 26;5(4):136–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812518/>
59. Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008 May;3(2):131–45.
60. Choi JR, Yong KW, Choi JY. Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2017 May;
61. Sun AX, Lin H, Fritch MR, Shen H, Alexander PG, DeHart M, et al. Chondrogenesis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in 3-Dimensional, Photocrosslinked Hydrogel Constructs: Effect of Cell Seeding Density and Material Stiffness. *Acta Biomater*. 2017 Jun;
62. Arana M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. *Methods Mol Biol*. 2013;1036:47–61.
63. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011 Jul;9(1):11–5.
64. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* [Internet]. 2004 Feb 18;103(5):1669 LP-1675. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/103/5/1669.abstract>
65. Kim N, Cho S-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med* [Internet]. 2013 Jul 1;28(4):387–402. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712145/>

66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
67. Bianco P. “Mesenchymal” stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:677–704.
68. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2007 Feb 19;9(1):204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1860068/>
69. Lin C-S, Xin Z-C, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013 Sep;28(9):1109–16.
70. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5–6):333–45.
71. Miyazaki K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Ikeda K, Kon S, et al. Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Apr;49(4):1367–75.
72. Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CAG, et al. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2002 Aug;17(8):1486–97.
73. Charras G, Sahai E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014 Dec;15(12):813–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3897>
74. Zou C, Luo Q, Qin J, Shi Y, Yang L, Ju B, et al. Osteopontin promotes mesenchymal stem cell migration and lessens cell stiffness via integrin beta1,

- FAK, and ERK pathways. *Cell Biochem Biophys*. 2013 Apr;65(3):455–62.
75. Robertson BW, Bonsal L, Chellaiah MA. Regulation of Erk1/2 activation by osteopontin in PC3 human prostate cancer cells. *Mol Cancer* [Internet]. 2010 Sep 26;9:260. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3098013/>
76. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* [Internet]. 2009 Jul 13;28(38):3412–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.189>
77. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:295–312.
78. Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Apr;29(4):559–73.
79. Pauklin S, Vallier L. The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity. *Cell* [Internet]. 2017 Jun 15;155(1):135–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.031>
80. Burdick JA, Mauck RL, Gerecht S. To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2017 Jun 8;18(1):13–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.004>
81. Caliarì SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Meth* [Internet]. 2016 May;13(5):405–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3839>
82. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995 Apr;268(5208):233–9.
83. Bornstein P, Duksin D, Balian G, Davidson JM, Crouch E. Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci*. 1978 Jun;312:93–105.

84. Adams JC. Methods in cell-matrix adhesion. Introduction. *Methods Cell Biol.* 2002;69:3–5.
85. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000 Dec;19(7):597–614.
86. Bornstein P, Armstrong LC, Hankenson KD, Kyriakides TR, Yang Z. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol* [Internet]. 2000;19(7):557–68. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X00001049>
87. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* [Internet]. 2000 Jun 1;218(2):235–59. Available from: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200006\)218:2%3C235::AID-DVDY2%3E3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2%3C235::AID-DVDY2%3E3.0.CO)
88. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix. *Matrix Biol* [Internet]. 2000 Dec;19(7):569–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X00001050>
89. Denhardt DT, Noda M, O’Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001 May;107(9):1055–61.
90. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000 Dec;19(7):615–22.
91. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005 Oct;15(5):378–86.
92. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov.* 2017 May;7(5):462–77.
93. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin-- a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem.* 1979

Oct;254(19):9933–7.

94. Hassell JR, Robey PG, Barrach HJ, Wilczek J, Rennard SI, Martin GR. Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Aug;77(8):4494–8.
95. Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater*. 2014 Jun;13(6):645–52.
96. Bhattacharya M, Malinen MM, Lauren P, Lou Y-R, Kuisma SW, Kanninen L, et al. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *J Control Release* [Internet]. 2012;164(3):291–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912005391>
97. Aggeli A, Bell M, Boden N, Keen JN, Knowles PF, McLeish TC, et al. Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes. *Nature*. 1997 Mar;386(6622):259–62.
98. Appel EA, del Barrio J, Loh XJ, Scherman OA. Supramolecular polymeric hydrogels. *Chem Soc Rev*. 2012 Sep;41(18):6195–214.
99. Lin C-C, Anseth KS. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharm Res*. 2009 Mar;26(3):631–43.
100. Philp D, Chen SS, Fitzgerald W, Orenstein J, Margolis L, Kleinman HK. Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation. *Stem Cells*. 2005 Feb;23(2):288–96.
101. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*. 2010 May;10(9):1886–90.
102. Koutsopoulos S, Zhang S. Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, Matrigel and Collagen I. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(2):5162–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112004382>

103. Terranova VP, Aumailley M, Sultan LH, Martin GR, Kleinman HK. Regulation of cell attachment and cell number by fibronectin and laminin. *J Cell Physiol.* 1986 Jun;127(3):473–9.
104. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1589–98.
105. Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, Zain M, Sweeney M, Jicha DL, et al. Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Jun;83(11):769–74.
106. González-Cruz RD, Fonseca VC, Darling EM. Cellular mechanical properties reflect the differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2012 Jun 12;109(24):E1523–9. Available from: <http://www.pnas.org/content/109/24/E1523.abstract>
107. Price KJ, Tsykin A, Giles KM, Sladic RT, Epis MR, Ganss R, et al. Matrigel basement membrane matrix influences expression of microRNAs in cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Oct;427(2):343–8.

BÖLÜM VIII

8. EKLER

8.1. Koloni yapıları için Uygulanan İstatistik Tabloları

Çalışma gruplarının birbirinden istatistiksel olarak farklı olup olmadığını belirlemek için f test ve t test yapıldı. F test sonucunda eğer f kritik değeri f değerinden büyükse t test de varyanslar eşit alındı (kırmızı ile belirtilenler); eğer küçük ise t testler eşit olmayan varyanslar olarak işlem yapıldı (sarı ile belirtilenler). Genel değerleri göstermek amacıyla tanımlayıcı istatistikler tablosu oluşturuldu. Bu işlemler excel programı ile gerçekleştirildi.

8.1.1. Tanımlayıcı İstatistikler

Koloni yapılanmalarının analizi için öncelikle Excel programı ile Tanımlayıcı İstatistik yapıldı (Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13).

Tablo 10: 3. günde 4 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)

<i>Alan (piksel)-3gün-4mg/ml</i>		<i>Çevre (piksel)-3gün-4mg/ml</i>		<i>En-Boy oranı-3gün-4mg/ml</i>		<i>Yuvarlaklık-3gün-4mg/ml</i>	
Ortalama	824,98	Ortalama	116,96154	Ortalama	1,34582	Ortalama	0,76376
Standart Hata	41,50871	Standart Hata	3,472786526	Standart Hata	0,032530559	Standart Hata	0,0176768
Ortanca	785,5	Ortanca	115,9925	Ortanca	1,306	Ortanca	0,766
Kip	740	Kip	#N/A	Kip	1,187	Kip	#N/A
Standart Sapma	293,5109	Standart Sapma	24,55630902	Standart Sapma	0,230025792	Standart Sapma	0,1249941
Örnek Varyans	86148,63	Örnek Varyans	603,0123128	Örnek Varyans	0,052911865	Örnek Varyans	0,0156235
Basıklık	-0,23902	Basıklık	-0,291569512	Basıklık	-0,656980513	Basıklık	-1,056583
Çarpıklık	0,489088	Çarpıklık	0,271952617	Çarpıklık	0,525358605	Çarpıklık	-0,028016
Aralık	1208	Aralık	103,566	Aralık	0,824	Aralık	0,437
En Büyük	346	En Büyük	71,962	En Büyük	1,022	En Büyük	0,542
En Küçük	1554	En Küçük	175,528	En Küçük	1,846	En Küçük	0,979
Toplam	41249	Toplam	5848,077	Toplam	67,291	Toplam	38,188
Say	50	Say	50	Say	50	Say	50
En Büyük(1)	1554	En Büyük(1)	175,528	En Büyük(1)	1,846	En Büyük(1)	0,979
En Küçük(1)	346	En Küçük(1)	71,962	En Küçük(1)	1,022	En Küçük(1)	0,542
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	83,41487	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	6,978825807	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,065372607	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,0355229

Tablo 11: 3. günde 6 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)

Alan (piksel)-3gün-6mg/ml		Çevre (piksel)-3gün-6mg/ml		En-Boy oranı-3gün-6mg/ml		Yuvarlaklık-3gün-6mg/ml	
Ortalama	1208,175	Ortalama	136,946775	Ortalama	1,252325	Ortalama	0,811725
Standart Hata	65,70636	Standart Hata	3,569308087	Standart Hata	0,026958144	Standart Hata	0,0159249
Ortanca	1191	Ortanca	135,2885	Ortanca	1,203	Ortanca	0,831
Kip	#N/A	Kip	#N/A	Kip	1,088	Kip	0,858
Standart Sapma	415,5635	Standart Sapma	22,57428645	Standart Sapma	0,170498272	Standart Sapma	0,1007179
Örnek Varyans	172693	Örnek Varyans	509,5984088	Örnek Varyans	0,029069661	Örnek Varyans	0,0101441
Basıklık	0,954881	Basıklık	0,081306399	Basıklık	0,952918409	Basıklık	-0,423804
Çarpıklık	0,740377	Çarpıklık	0,249780752	Çarpıklık	1,052976934	Çarpıklık	-0,480501
Aralık	1981	Aralık	106,841	Aralık	0,749	Aralık	0,412
En Büyük	448	En Büyük	88,846	En Büyük	1,025	En Büyük	0,564
En Küçük	2429	En Küçük	195,687	En Küçük	1,774	En Küçük	0,976
Toplam	48327	Toplam	5477,871	Toplam	50,093	Toplam	32,469
Say	40	Say	40	Say	40	Say	40
En Büyük(1)	2429	En Büyük(1)	195,687	En Büyük(1)	1,774	En Büyük(1)	0,976
En Küçük(1)	448	En Küçük(1)	88,846	En Küçük(1)	1,025	En Küçük(1)	0,564
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	132,9037	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	7,219607058	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,054527993	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,0322112

Tablo 12: 6. günde 4 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)

Alan (piksel)-6gün-4mg/ml		Çevre (piksel)-6gün-4mg/ml		En-Boy oranı-6gün-4mg/ml		Yuvarlaklık-6gün-4mg/ml	
Ortalama	1368,125	Ortalama	147,656755	Ortalama	1,35435	Ortalama	0,758975
Standart Hata	92,9447	Standart Hata	8,406722246	Standart Hata	0,037352626	Standart Hata	0,019396
Ortanca	1287	Ortanca	150,787	Ortanca	1,314	Ortanca	0,7615
Kip	#N/A	Kip	#N/A	Kip	1,614	Kip	0,62
Standart Sapma	587,8339	Standart Sapma	53,1687799	Standart Sapma	0,236238748	Standart Sapma	0,1226712
Örnek Varyans	345548,7	Örnek Varyans	2826,919157	Örnek Varyans	0,055808746	Örnek Varyans	0,0150482
Basıklık	0,641847	Basıklık	0,700013827	Basıklık	-0,478220192	Basıklık	-0,940861
Çarpıklık	0,541347	Çarpıklık	-0,49665369	Çarpıklık	0,721740621	Çarpıklık	-0,226494
Aralık	2830	Aralık	237,291	Aralık	0,85	Aralık	0,433
En Büyük	118	En Büyük	14,995	En Büyük	1,039	En Büyük	0,529
En Küçük	2948	En Küçük	252,286	En Küçük	1,889	En Küçük	0,962
Toplam	54725	Toplam	5906,2702	Toplam	54,174	Toplam	30,359
Say	40	Say	40	Say	40	Say	40
En Büyük(1)	2948	En Büyük(1)	252,286	En Büyük(1)	1,889	En Büyük(1)	0,962
En Küçük(1)	118	En Küçük(1)	14,995	En Küçük(1)	1,039	En Küçük(1)	0,529
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	187,9984	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	17,00420075	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,075552817	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,0392322

Tablo 13: 6. günde 6 mg/ml matrijel üzerinde fEKH'lerinin koloni yapıları için yapılan tanımlayıcı istatistikler (Alan, çevresi en-boy oranı ve yuvarlaklık)

Alan (piksel)-6gün-6mg/ml		Çevre (piksel)-6gün-6mg/ml		En-Boy oranı-6gün-6mg/ml		Yuvarlaklık-6gün-6mg/ml	
Ortalama	2514,46	Ortalama	199,402856	Ortalama	1,25136	Ortalama	0,81388
Standart Hata	131,8135	Standart Hata	7,490786963	Standart Hata	0,026387656	Standart Hata	0,0145267
Ortanca	2433,5	Ortanca	201,1705	Ortanca	1,2225	Ortanca	0,8175
Kip	2787	Kip	#N/A	Kip	1,073	Kip	0,885
Standart Sapma	932,062	Standart Sapma	52,96786258	Standart Sapma	0,186588903	Standart Sapma	0,1027193
Örnek Varyans	868739,6	Örnek Varyans	2805,594467	Örnek Varyans	0,034815419	Örnek Varyans	0,0105513
Basıklık	10,19998	Basıklık	8,249062349	Basıklık	3,176735029	Basıklık	0,6763606
Çarpıklık	2,223088	Çarpıklık	0,722470087	Çarpıklık	1,689725308	Çarpıklık	-0,886151
Aralık	6425	Aralık	405,9412	Aralık	0,855	Aralık	0,438
En Büyük	580	En Büyük	20,3718	En Büyük	1,034	En Büyük	0,529
En Küçük	7005	En Küçük	426,313	En Küçük	1,889	En Küçük	0,967
Toplam	125723	Toplam	9970,1428	Toplam	62,568	Toplam	40,694
Say	50	Say	50	Say	50	Say	50
En Büyük(1)	7005	En Büyük(1)	426,313	En Büyük(1)	1,889	En Büyük(1)	0,967
En Küçük(1)	580	En Küçük(1)	20,3718	En Küçük(1)	1,034	En Küçük(1)	0,529
Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	264,8891	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	15,05329999	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,05302798	Güvenirlilik Düzeyi(95,0%)	0,0291925

8.1.2. İstatistiksel Alan Karşılaştırması

8.1.2.1. Koloni Yapılarının Alanı-F test

Tablo 14: Alan değerleri için karşılaştırmalı F-test

F-Test Varyanslar için İki Örnek			F-Test Varyanslar için İki Örnek		
	<i>Alan-3.gün-4mg/ml</i>	<i>Alan-3.gün-6mg/ml</i>	<i>Alan-6.gün-4mg/ml</i>	<i>Alan-6.gün-6mg/ml</i>	
Ortalama	824,98	1208,175	1368,125	2514,46	
Varyans	86148,63224	172693,0199	345548,6763	868739,5596	
Gözlem	50	40	40	50	
df	49	39	39	49	
F	0,498854165		0,397758652		
P(F<=f)					
tek-uçlu	0,01079982		0,001805698		
F Kritik					
iki-uçlu	0,608734983		0,598632616		

F-Test Varyanslar için İki Örnek			F-Test Varyanslar için İki Örnek		
	<i>Alan-3.gün-4mg/ml</i>	<i>Alan-6.gün-4mg/ml</i>	<i>Alan-3.gün-6mg/ml</i>	<i>Alan-6.gün-6mg/ml</i>	
Ortalama	824,98	1368,125	1208,175	2514,46	
Varyans	86148,63224	345548,6763	172693,0199	868739,5596	
Gözlem	50	40	40	50	
df	49	39	39	49	
F	0,249309687		0,198785721		
P(F<=f)					
tek-uçlu	3,29413E-06		4,7376E-07		
F Kritik					
iki-uçlu	0,608734983		0,598632616		

8.1.2.2. Koloni Yapılarının Alanı-t test

Tablo 15: Alan değerleri için karşılaştırmalı t-test

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Alan-3.gün-4mg/ml	Alan-3.gün-6mg/ml	Alan-6.gün-4mg/ml	Alan-6.gün-6mg/ml	
Ortalama	824,98	1208,175	1368,125	2514,46	
Varyans	86148,63224	172693,0199	345548,6763	868739,5596	
Gözlem	50	40	40	50	
Birikimli					
Varyans	124503,5313		636870,8727		
Öngörülen					
Ortalama					
Farkı	0		0		
df	88		88		
t Stat	-5,119443355		-6,771417666		
P(T<=t)	8,92474E-07		6,87029E-10		
tek-uçlu	1,662354029		1,662354029		
t Kritik	1,78495E-06		1,37406E-09		
tek-uçlu	1,987289865		1,987289865		
P(T<=t)					
iki-uçlu					
t Kritik iki-					
uçlu					

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Alan-3.gün-4mg/ml	Alan-6.gün-4mg/ml	Alan-3.gün-6mg/ml	Alan-6.gün-6mg/ml	
Ortalama	824,98	1368,125	1208,175	2514,46	
Varyans	86148,63224	345548,6763	172693,0199	868739,5596	
Gözlem	50	40	40	50	
Birikimli					
Varyans	201110,0154		560264,3886		
Öngörülen					
Ortalama					
Farkı	0		0		
df	88		88		
t Stat	-5,709429037		-8,226880209		
P(T<=t)	7,54507E-08		7,96257E-13		
tek-uçlu	1,662354029		1,662354029		
t Kritik	1,50901E-07		1,59251E-12		
tek-uçlu	1,987289865		1,987289865		
P(T<=t)					
iki-uçlu					
t Kritik iki-					
uçlu					

8.1.3. İstatistiksel Çevre Karşılaştırması

8.1.3.1. Koloni Yapılarının Çevresi-F test

Tablo 16: Çevre değerleri için karşılaştırmalı F-test

F-Test Varyanslar İçin İki Örnek			F-Test Varyanslar İçin İki Örnek		
	Çevre-3.gün-6mg/ml	Çevre-3.gün-4mg/ml	Çevre-6.gün-6mg/ml	Çevre-6.gün-4mg/ml	
Ortalama	136,946775	116,96154	199,402856	147,656755	
Varyans	509,5984088	603,0123128	2805,594467	2826,919157	
Gözlem	40	50	50	40	
df	39	49	49	39	
F	0,845087899		0,992456562		
P(F<=f)					
tek-uçlu	0,295335646		0,485503232		
F Kritik					
iki-uçlu	0,598632616		0,608734983		

F-Test Varyanslar İçin İki Örnek			F-Test Varyanslar İçin İki Örnek		
	Çevre-3.gün-4mg/ml	Çevre-6.gün-4mg/ml	Çevre-3.gün-6mg/ml	Çevre-6.gün-6mg/ml	
Ortalama	116,96154	147,656755	136,946775	199,402856	
Varyans	603,0123128	2826,919157	509,5984088	2805,594467	
Gözlem	50	40	40	50	
df	49	39	39	49	
F	0,213310774		0,181636518		
P(F<=f)					
tek-uçlu	3,1324E-07		1,33353E-07		
F Kritik					
iki-uçlu	0,608734983		0,598632616		

8.1.3.2. Koloni Yapılarının Çevresi-t test

Tablo 17: Çevre değerleri için karşılaştırmalı t-test

t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Çevre-3.gün-4mg/ml	Çevre-3.gün-6mg/ml	Çevre-6.gün-4mg/ml	Çevre-6.gün-6mg/ml	
Ortalama	116,96154	136,946775	147,656755	199,402856	
Varyans	603,0123128	509,5984088	2826,919157	2805,594467	
Gözlem	50	40	40	50	
Öngörülen					
n					
Ortalama Farkı	0		0		
df	86		84		
t Stat	-4,013115055		-4,595617981		
P(T<=t) tek-uçlu	6,37628E-05		7,5295E-06		
t Kritik tek-uçlu	1,662765449		1,663196679		
P(T<=t) iki-uçlu	0,000127526		1,5059E-05		
t Kritik iki-uçlu	1,987934206		1,988609667		
t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Çevre-3.gün-4mg/ml	Çevre-6.gün-4mg/ml	Çevre-3.gün-6mg/ml	Çevre-6.gün-6mg/ml	
Ortalama	116,96154	147,656775	136,946775	199,402856	
Varyans	603,0123128	2826,919157	509,5984088	2805,594467	
Gözlem	50	40	40	50	
Birikimli					
Varyans	1588,607391		1788,050759		
Öngörülen					
n					
Ortalama Farkı	0		0		
df	88		88		
t Stat	-3,630413833		-6,962713912		
P(T<=t) tek-uçlu	0,000237313		2,87152E-10		
t Kritik tek-uçlu	1,662354029		1,662354029		
P(T<=t) iki-uçlu	0,000474626		5,74304E-10		
t Kritik iki-uçlu	1,987289865		1,987289865		

8.1.4. İstatistiksel En-Boy Oranı Karşılaştırması

8.1.4.1. Koloni Yapılarının En-Boy Oranı -F test

Tablo 18: En-boy değerleri için karşılaştırmalı F-test

F-Test Varyanslar için İki Örnek			F-Test Varyanslar için İki Örnek		
	En-Boy Oranı-3.gün-6mg/ml	En-Boy Oranı-3.gün-4mg/ml		En-Boy Oranı-6.gün-6mg/ml	En-Boy Oranı-6.gün-4mg/ml
Ortalama	1,252325	1,34582	Ortalama	1,25136	1,35435
Varyans	0,029069661	0,052911865	Varyans	0,034815419	0,055808746
Gözlem	40	50	Gözlem	50	40
df	39	49	df	49	39
F	0,549397776		F	0,623834456	
P(F<=f) tek-uçlu	0,027726648		P(F<=f) tek-uçlu	0,058877076	
F Kritik iki-uçlu	0,598632616		F Kritik iki-uçlu	0,608734983	

F-Test Varyanslar için İki Örnek			F-Test Varyanslar için İki Örnek		
	En-Boy Oranı-3.gün-4mg/ml	En-Boy Oranı-6.gün-4mg/ml		En-Boy Oranı-3.gün-6mg/ml	En-Boy Oranı-6.gün-6mg/ml
Ortalama	1,34582	1,35435	Ortalama	1,252325	1,25136
Varyans	0,052911865	0,055808746	Varyans	0,029069661	0,034815419
Gözlem	50	40	Gözlem	40	50
df	49	39	df	39	49
F	0,948092701		F	0,834965137	
P(F<=f) tek-uçlu	0,426089161		P(F<=f) tek-uçlu	0,281964701	
F Kritik iki-uçlu	0,608734983		F Kritik iki-uçlu	0,598632616	

8.1.4.2. Koloni Yapılarının En-Boy Oranı -t test

Tablo 19: En-boy değerleri için karşılaştırmalı t-test

t-Test: Eşit Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	En-Boy Oranı-3.gün-4mg/ml	En-Boy Oranı-3.gün-6mg/ml		En-Boy Oranı-6.gün-4mg/ml	En-Boy Oranı-6.gün-6mg/ml
Ortalama	1,34582	1,252325	Ortalama	1,35435	1,25136
Varyans	0,052911865	0,029069661	Varyans	0,055808746	0,034815419
Gözlem	50	40	Gözlem	40	50
Birikimli Varyans	0,042345434		Öngörülen		
Öngörülen			Ortalama Farkı	0	
Ortalama Farkı	0		df	73	
df	88		t Stat	2,251973716	
t Stat	2,141799619		P(T<=t) tek-uçlu	0,01366608	
P(T<=t) tek-uçlu	0,017486297		t Kritik tek-uçlu	1,665996224	
t Kritik tek-uçlu	1,662354029		P(T<=t) iki-uçlu	0,027332159	
P(T<=t) iki-uçlu	0,034972593		t Kritik iki-uçlu	1,992997126	
t Kritik iki-uçlu	1,987289865				

t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	En-Boy Oranı-3.gün-4mg/ml	En-Boy Oranı-6.gün-4mg/ml		En-Boy Oranı-3.gün-6mg/ml	En-Boy Oranı-6.gün-6mg/ml
Ortalama	1,34582	1,35435	Ortalama	1,252325	1,25136
Varyans	0,052911865	0,055808746	Varyans	0,029069661	0,034815419
Gözlem	50	40	Gözlem	40	50
Öngörülen			Öngörülen		
Ortalama Farkı	0		Ortalama Farkı	0	
df	83		df	86	
t Stat	-0,172210607		t Stat	0,025580984	
P(T<=t) tek-uçlu	0,431845587		P(T<=t) tek-uçlu	0,489825409	
t Kritik tek-uçlu	1,663420175		t Kritik tek-uçlu	1,662765449	
P(T<=t) iki-uçlu	0,863691174		P(T<=t) iki-uçlu	0,979650819	
t Kritik iki-uçlu	1,98895978		t Kritik iki-uçlu	1,987934206	

8.1.5. İstatistiksel Yuvarlaklık Karşılaştırması

8.1.5.1. Koloni Yapılarının Yuvarlaklığı-F test

Tablo 20: Yuvarlaklık değerleri için karşılaştırmalı F-test

F-Test Varyanslar İçin İki Örnek			F-Test Varyanslar İçin İki Örnek		
	Yuvarlaklık-3.gün-6mg/ml	Yuvarlaklık-3.gün-4mg/ml		Yuvarlaklık-6.gün-6mg/ml	Yuvarlaklık-6.gün-4mg/ml
Ortalama	0,811725	0,76376	Ortalama	0,81388	0,758975
Varyans	0,010144102	0,015623533	Varyans	0,010551251	0,01504823
Gözlem	40	50	Gözlem	50	40
df	39	49	df	49	39
F	0,64928348		F	0,701162231	
P(F<=f) tek-uçlu	0,082743582		P(F<=f) tek-uçlu	0,119099981	
F Kritik iki-uçlu	0,598632616		F Kritik iki-uçlu	0,608734983	

F-Test Varyanslar İçin İki Örnek			F-Test Varyanslar İçin İki Örnek		
	Yuvarlaklık-6.gün-4mg/ml	Yuvarlaklık-3.gün-4mg/ml		Yuvarlaklık-3.gün-6mg/ml	Yuvarlaklık-6.gün-6mg/ml
Ortalama	0,758975	0,76376	Ortalama	0,811725	0,81388
Varyans	0,01504823	0,015623533	Varyans	0,010144102	0,010551251
Gözlem	40	50	Gözlem	40	50
df	39	49	df	39	49
F	0,963177155		F	0,961412281	
P(F<=f) tek-uçlu	0,455689966		P(F<=f) tek-uçlu	0,453312025	
F Kritik iki-uçlu	0,598632616		F Kritik iki-uçlu	0,598632616	

8.1.5.2. Koloni Yapılarının Yuvarlaklığı-t test

Tablo 21: Yuvarlaklık değerleri için karşılaştırmalı t-test

t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Yuvarlaklık-3.gün-4mg/ml	Yuvarlaklık-3.gün-6mg/ml		Yuvarlaklık-6.gün-4mg/ml	Yuvarlaklık-6.gün-6mg/ml
Ortalama	0,76376	0,811725	Ortalama	0,758975	0,81388
Varyans	0,015623533	0,010144102	Varyans	0,01504823	0,010551251
Gözlem	50	40	Gözlem	40	50
Öngörülen Ortalama Farkı	0		Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	88		df	76	
t Stat	-2,015988954		t Stat	-2,26572656	
P(T<=t) tek-uçlu	0,023425547		P(T<=t) tek-uçlu	0,013157672	
t Kritik tek-uçlu	1,662354029		t Kritik tek-uçlu	1,665151353	
P(T<=t) iki-uçlu	0,046851094		P(T<=t) iki-uçlu	0,026315343	
t Kritik iki-uçlu	1,987289865		t Kritik iki-uçlu	1,99167261	

t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek			t-Test: Farklı Varyanslar Varsayarak İki Örnek		
	Yuvarlaklık-3.gün-6mg/ml	Yuvarlaklık-6.gün-4mg/ml		Yuvarlaklık-3.gün-6mg/ml	Yuvarlaklık-6.gün-6mg/ml
Ortalama	0,76376	0,758975	Ortalama	0,811725	0,81388
Varyans	0,015623533	0,01504823	Varyans	0,010144102	0,010551251
Gözlem	50	40	Gözlem	40	50
Öngörülen Ortalama Farkı	0		Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	84		df	84	
t Stat	0,182336804		t Stat	-0,099975778	
P(T<=t) tek-uçlu	0,427878872		P(T<=t) tek-uçlu	0,460300889	
t Kritik tek-uçlu	1,663196679		t Kritik tek-uçlu	1,663196679	
P(T<=t) iki-uçlu	0,855757745		P(T<=t) iki-uçlu	0,920601779	
t Kritik iki-uçlu	1,988609667		t Kritik iki-uçlu	1,988609667	

BÖLÜM IX

9. ÖZGEÇMİŞ



BERRİN ÖZDİL

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 01.07.1990

Doğum Yeri: Balıkesir-Türkiye

Vatandaşlık: Türk

İLETİŞİM

Adres: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bornova- İzmir Türkiye 35100

e-posta: ozdlberrin@gmail.com

Telefon: +90 505 748 95 83

GÖREV

2015 Ekim/Devam

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ÖYP Araştırma Görevlisi (35. Madde Uyarınca Görevlendirme)

2015 Eylül/Devam

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ÖYP Araştırma Görevlisi

EĞİTİM

2015 Sonbahar/Devam

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek lisans Not Ortalaması 3.82/4.00

2013-2014 Bahar/Devam

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Doktora Derecesi Not Ortalaması 3.67/4.00

2013-2014 Sonbahar

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Yüksek Lisans Derecesi Not Ortalaması 3.50/4.00

2009-2013

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Lisans Derecesi Not Ortalaması 3.45/4.00

2004-2008

İzmir Anadolu Öğretmen Lisesi, (Yabancı Dil Ağırlıklı), İzmir, Türkiye Not Ortalaması 4.87/5.00

YAYINLAR

- Duygu Çalık Kocatürk, Berrin Özdil, Yasemin Adalı, Sinan Hoca, Serra Kamer, Gülperi Öktem, Çevik Gürel, Ayşegül Uysal, Hüseyin Aktuğ. Radiosensitivity of Glioblastoma Multiforme And Astrocytes Cell Lines in The Cell Signalling Aspects (2017-manuskript International Journal of Radiation Biology dergisine gönderildi)
- Fatih Oltulu, Duygu Çalık Kocatürk, Yasemin Adalı, Berrin Özdil, Eda Açıkgoz, Çevik Gürel, Ayşegül Uysal, Altuğ Yavaşoğlu, Gülperi Öktem, Hüseyin Aktuğ. Comparative molecular analysis of autophagy and mTOR pathways in mouse embryonic stem cell, lung cancer and somatic fibroblast cell lines (2017-manuskript RSC Molecular Biosystems dergisine gönderildi)
- Berrin Özdil, Çevik Gürel, Kubilay Doğan Kılıç, Gökçe Ceren Kuşçu, Yasemin Adalı, Hüseyin Aktuğ. Hücre içi trafik ve hücre davranış özellikleri (2017)
- Ayşegül Uysal, Fatih Oltulu, Duygu Çalık Kocatürk, Berrin Ozdil. Deri ve Deri eklerinin Embriyonik Gelişimi. Güncel Dermatoloji Dergisi (2016)
- U. Horzum+, B. Ozdil+ and D. Pesen-Okvur*. Differentiation of normal and cancer cell adhesion on custom designed protein nanopatterns. Nano letters (2015) (+ eş katkı)
- T. Oruc, B. Ozdil, Sevgi Onal and D. Pesen Okvur*. CAPE Inhibits Breast Cancer Cell Invasion in 3 Dimensional Controlled *in vitro* Microenvironments (2015) Journal of Cancer yayımına gönderildi
- U. Horzum, B. Ozdil and D. Pesen-Okvur*. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. MethodsX 1 (2014) 56-59

- B. Ozdil, S. Onal, T. Oruc and D. Pesen-Okvur*. Fabrication of 3D Controlled in vitro Microenvironments. MethodsX 1 (2014) 60-66
- U. Horzum, B. Ozdil and D. Pesen Okvur*. Micrometer Scale Spacing between Fibronectin Nanodots Regulate Cell Morphology and Focal Adhesions. Materials Research Express 1 (2014) 025402.

ARAŞTIRMA DENEYİMİ

Bilimsel Araştırma Projesi (2016-2017)

-Ege Üniversitesi tarafından fon sağlanan 'Fare Embriyonik Kök Hücre, Akciğer Kanseri Ve Somatik Fibroblast Hücre Kültürü Hatlarında Mtor, Map-kinaz Sinyal Yolakları İle Otofaji Ve Epitelyal Mezenkimal Geçişin (emt) Karşılaştırmalı Moleküler Analizi' isimli projede lisansüstü araştırmacı

Yürütücü: Uzman Dr. Fatih Oltulu

Ege Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Enstitü Destekli Araştırma Projesi (Eylül 2014-Ekim 2015)

-İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü tarafından fon sağlanan 'Meme kanseri hücrelerinin ardışık intravazyon ve ekstrasvazyonunu tespit eden çipüzeri labaratuvar' isimli projede lisansüstü araştırmacı

Danışman: Doçent Dr. Devrim Pesen Okvur

CivM Lab, İzmirYüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

Devlet Destekli Araştırma Projesi (Eylül 2014-Ekim 2015)

-Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından açılan Teşhis ve tedavi amaçlı, hedefe yönlendirilebilen mikro/nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi (1003) çağrısıyla desteklenen projede lisansüstü araştırmacı ve danışman Danışman: Doçent Dr. Devrim Pesen Okvur CivM Lab, İzmirYüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye (TÜBİTAK tarafından destekli)

Devlet Destekli Araştırma Projesi (Haziran 2013-Ağustos 2014)

-Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından COST Bioinspired Nanoteknolojileri projesi kapsamında desteklenen 'Nanometre Ölçeğinde Yağışma: Göğüs Kanseri Hücreleri ve Normal Epitel Hücreler' başlıklı projede lisansüstü araştırmacı Tez başlığı 'Fibronectin arka planı üzerinde nanometre

ölçeğinde laminin desenleri üzerinde hücre yapışması: Meme kanseri hücreleri ve normal meme epitel hücrelerinin karşılaştırılması'

Yürütücü Danışman: Doçent Dr. Devrim Pesen Okvur CivMs Lab, İzmirYüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

Devlet Destekli Lisans Araştırma Projesi (Ocak-Haziran 2013)

-Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından açılan 2209 Üniversite Öğrencileri Yurtiçi/Yurtdışı Araştırma Projeleri Destekleme programı desteklenen '3 Boyutlu Kontrollü Mikroçevrede Meme Kanseri Hücre Göçünün Kafeik Asit Fenetil Esteri Etkisiyle Değişimi' başlıklı projede lisans araştırmacı (TÜBİTAK-BİDEB tarafından desteklenmiştir)

Lisans dereceli Yürütücü: Tugce Oruc Danışman: Doçent Dr. Devrim Pesen Okvur Sanayi Ortağı: DUAG (Doğal Ürünler Araştırma Geliştirme)

Bitirme Projesi (2012-2013 Bahar)

3 boyutlu CivMs (Kontrollü in vitro Mikroçevrelerde) makrofajlar ile göğüs kanseri hücrelerinin etkileşimlerinin incelenmesi Danışman: Doçent Dr. Devrim Pesen Okvur CivM Lab, İzmirYüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye (Marie Curie IRG tarafından desteklenmiştir)

Erasmus Programı Destekli Yaz Stajı (Haziran-Eylül 2012)

-ADHD endotipinde sinir sistemi bazlı olarak steroid sülfetaz (sts) enziminin potansiyel düzenleyici etkisini inceleme projesinde araştırmacı stajyer Danışman: Dr. William Davies

-ZNF8044 geninin hafıza üzerindeki muhtemel rolünün davranışsal analizi ile incelenmesi konusunda araştırmacı stajyer Danışman: Dr. Trevor Humby Cardiff Üniversitesi, Department of Psychology and Medicine Research Group of Behavioral Neuroscience

Lisans Araştırma Projesi (2011 Yaz-2012 Bahar)

-Yumuşak litografi yöntemi ile 3 boyutlu kontrollü in vitro mikroçevreler (Controlled in vitro microenvironments CivM) üretimi

-Meme kanseri hücrelerinin 3 boyutlu CivM içindeki göçünün incelenmesi

Danışman: Doçent Dr. Devrim Pesen Okvur

Uygulamalı Kuantum Araştırma Merkezi ve CivM laboratuvarı, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

Lisans Araştırma Projesi (2010 Yaz-2011 Bahar)

-Beta vulgaris subsp. Maritima bitkisinin abiyotik direnç mekanizmalarını incelemek, manganez tolerans genlerini belirlemek ve karakterize etmek adlı projede lisans araştırmacı Danışman: Doçent Dr. H. Çağlar KARAKAYA

Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir

DİLLER

Türkçe (Anadil), İngilizce (Akıcı), Japonca (Başlangıç seviyesi), Almanca (Başlangıç seviyesi)

PROGRAM KULLANIMI

Microsoft Office (profesyonel), Image J (profesyonel), Adobe Illustrator CS2 (orta derece), Adobe Photoshop CS2 (orta derece), EndNote (profesyonel), C programlama (başlangıç seviyesi), Bioinformatik araçları (orta derece)

LABORATUAR TEKNİKLERİ

Hayvan (fare) Modeli

Damızlık kurulumu, Diseksiyon, Koşullandırma, Obje tanımlama (alışma ve edinim)

Histolojik Teknikler

Parafin gömme ve Elektron mikroskopi için takip, Kesit alma, Histolojik boyamalar

Hücre Biyolojisi

3 Boyutlu hücre kültürü, Biyogüvenlik seviye 1 ve 2 hücre kültürü

Moleküler Biyoloji

Spektrofotometrik ölçümler, PZR (polimeraz zincir reaksiyonu), RNA izolasyonu, Gerçek zamanlı PZR, Agaroz jel elektroforez, TA klonlama, Bakteriyel transformasyon Plasmid izolasyonu, Restriksiyon analizi, Bakteriyel hücre kültürü, Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu

Biyokimya

SDS-PAGE(Poly-akrilamid Jel Elektroforezi), Protein Saflaştırma (Afinite Kromotografi), Protein tespiti (ELISA), Protein izolasyonu, Spotlama-gen ifadelenmesinin belirlenmesi

Litografi

Elektron demeti litografisi (EDL ile protein desenlemesi), Foto-litografi (SU-8 ile UV litografi, PDMS kalıp oluşturulması), Temiz oda kullanımı

SUNUMLAR, KURSLAR VE TOPLANTILAR

- ‘UFUK 2020’de TÜRKİYE’ projesi tarafından düzenlenen ‘Ufuk 2020 Fikri Mülkiyet Hakları Eğitimi’ katılım sertifikası Yaşar Üniversitesi, İzmir, Türkiye (07.07.2017)
- EMBO Courses & Workshops tarafından düzenlenen 'Advances in stem cells and regenerative medicine' isimli kongrede ' What is The Power of Compositional Concentration of Matrix on The Mouse Embryonic Stem Cells?' başlıklı poster sunumu **Berrin Özdil**, Günnur Güler, Eda Açıkgöz, Duygu Çalık Kocatürk, Hüseyin Aktuğ Heidelberg, Almanya (23-26 Mayıs 2017)
- EMBO Courses & Workshops tarafından düzenlenen 'Advances in stem cells and regenerative medicine' isimli kongrede 'Radiosensitivity of Glioblastoma Multiforme Cell Line in Cell Signalling Aspects' başlıklı poster sunumu Duygu Çalık Kocatürk, **Berrin Özdil**, Yasemin Adalı, Sinan Hoca, Serra Kamer, Gülperi Öktem, Çevik Gürel, Ayşegül Uysal, Hüseyin Aktuğ Heidelberg, Almanya (23-26 Mayıs 2017)
- Ege Üniveristesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası kursu (80 saatlik) Sertifika Numarası 2017/044, İzmir, Türkiye (20-31 Mart 2017)
- Türkiye Bilimler Akademisi tarafından gerçekleştirilen 'TÜBA 3. Uluslararası Kök Hücre Kursu: Hematolojik Onkolojide İnovatif Hücresel Tedaviler' kursu katılım, Antalya, Türkiye (19-22 Mayıs 2017)
- Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı ve Biyoetik Eğitim ve Uygulama ve Araştırma Merkezi (BIYOMER) tarafından gerçekleştirilen 'I. Kök Hücre ve Biyoetik Sempozyumu' katılım, Muğla, Türkiye (13 Mayıs 2016)

- THED tarafından düzenlenen'XIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi' düzenleme kurulu üyesi ve 'Fare Embriyonik Kök Hücre, Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve Fibroblast Hücre Hattında; VEGF ve NFkB Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırmalı Analizi' isimli poster sunumu **Berrin Özdil**, Çevik Gürel, Kubilay Doğan Kılıç, Eda Açıkgöz, Hüseyin Aktuğ İzmir, Türkiye (30 Nisan-03 Mayıs 2016)
- Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD tarafından düzenlenen 'gamet biyolojisi makale kalübü 14. Toplantısı' na katılım (21 Kasım 2015)
- iBG-İzmir Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması'na 'Normal ve kanserli hücre yapışmasının özel tasarımı protein nanodesenleri üzerinde ayırt edilmesi' projesi ile katılım, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye (9-10 Eylül 2015)
- II. Fiji—ImageJ ye giriş kursunda öğretici, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye (23 Mayıs 2014)
- I. Fiji-ImageJ ye giriş kursunda asistan, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye (2 Mayıs 2014)
- II. Laboratuvar Güvenliği kursunda katılımcı, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye (24 Şubat2014).
- ASCB (Amerikan Hücre Biyolojisi Derneği) yıllık toplantısı dahilinde 'Differential Changes in Cell Shape on Nanopatterned Surfaces for Normal and Cancer Cells' başlıklı poster sunumu **Berrin Özdil**, Utku Horzum ve Devrim Pesen Okvur, New Orleans, LA, ABD, Aralık 2013
- XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi dahilinde 'EBF aracılı kanser hücresi göçü: Kemotaksis, Haptotaksis veya makrofajlarla doğrudan temas mı?' başlıklı poster sunumu Sevgi Önal, **Berrin Özdil**, Tuğçe Oruç and Devrim Pesen Okvur, Kaya Otel veKongre Merkezi, İzmir, Türkiye (3-6 Eylül 2013)
- XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi dahilinde '3 boyutlu kontrollü mikroçevrede meme kanseri hücre göçünün Kafeik Asit Fenetil Esteri ile değişimi' başlıklı poster sunumu Tuğçe Oruç, **Berrin Özdil**, Sevgi Önal and Devrim Pesen Okvur, Kaya Otel ve Kongre Merkezi, İzmir, Türkiye (3-6 Eylül 2013)
- Sağlıkta Inovasyon Üniversiteden Sanayiye Kongresi dahilinde 'Microfluidic Based LAB-ON-CHIPS that Mimic the *in vivo* Conditions of Metastasis'başlıklı

poster sunumu **Berrin Özdil**, Tuğce Oruç, Sevgi Önal ve Devrim Pesen Okvur, 9 Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye (12-14 Mayıs 2013)

- Yoğun Madde Fiziği Toplantısı dahilinde ‘Optimization of UV Lithography of SU-8 for Fabrication of 3D Microenvironments’ başlıklı poster sunumu **Berrin Özdil**, Tugce Oruç, Devrim Pesen Okvur, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye (6 Nisan 2012)
- UKAM Temiz Oda Uygulamalı Kursunda asistan, Uygulamalı Kuantum Araştırma Merkezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (29-30 Ocak 2013)
- Uluslararası katılımlı İzmir I. Otizm Kongresinde katılımcı, Çeşme Altinyunus Resort Hotel, İzmir, Türkiye (25-28 Kasım 2012)
- TÜBA II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumunda katılımcı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye (24-25 Haziran 2011)
- 37. Ulusal Hematoloji Kongresinde katılımcı, Ankara, Türkiye (19-21 Ekim 2011)
- Hematolojik Hastalıklara Moleküler Yaklaşımlar Sempozyumunda katılımcı, Ege Sağlık Anemon Otel, İzmir, Türkiye (12 Mart 2011)

REFERANSLAR

Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ofis

Telefonu: 0 232 390 4091 E-posta: huseyin.aktug@ege.edu.tr

Dr William Davies

Cardiff Üniversitesi Psikoloji Bölümü Davranışsal Sinirbilim Grubu Ofis Telefonu:

+44(0)29 208 70152 E-posta: DaviesW4@cardiff.ac.uk