



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İNSAN GÖBEK KORDONU STROMASINDA TELOSİT BENZERİ HÜCRELERİN TANIMLANMASI

Ezel ERKAN

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

**ANKARA
2025**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN GÖBEK KORDONU STROMASINDA
TELOSİT BENZERİ HÜCRELERİN TANIMLANMASI**

Ezel ERKAN

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
TYL-2024-3343 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2025**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İnsan Göbek Kordonu Stromasında Telosit Benzeri Hücrelerin Tanımlanması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ezel ERKAN

Tarih: 28.05.2025

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalında

Ezel ERKAN tarafından hazırlanan

“İnsan Göbek Kordonu Stromasında Telosit Benzeri Hücrelerin Tanımlanması” adlı

tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak

OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.05.2025

İmza

Prof. Dr. Alp CAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Sevda Fatma MÜFTÜOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Deniz BİLLUR

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Figen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Müdürü

ÖZET

İnsan Göbek Kordonu Stromasında Telosit Benzeri Hücrelerin Tanımlanması

Bu çalışmada, insan göbek kordonu stromasında, mezenkimal stroma hücreleri (MSH) dışında, daha önce farklı organlarda tanımlanmış interstisiyel hücre türü olan telositlerin varlığı araştırılmıştır. Telositler, uzun ve ince uzantılarıyla, hücreler arası iletişim ve doku organizasyonunda rol oynadığı düşünülen hücrelerdir. Göbek kordonu stromasında bu hücrelerin varlığının saptanması, hem kök hücre nişinin daha iyi anlaşılmasına hem de yenileyici tıpta potansiyel hedeflerin tanımlanmasına olanak sağlayabilir. Bu bağlamda; telosit benzeri hücreler, daha önceki çalışmalarda tanımlanmış özgün moleküler belirteçler ve iyi tanımlanmış MSH belirteçleriyle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Araştırmada, sağlıklı sezaryen doğumlardan elde edilen 16 göbek kordonu örneği kullanılmış; doku kesitleri rutin histolojik boyamaların yanı sıra, moleküler işaretlenerek süper çözünürlüklü konfokal mikroskobu, ince kesitler geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Göbek kordonu örneklerinin hücre kültürleri yapılmış; akım sitometri deneyleri gerçekleştirilmiş, ayrıca hücreler moleküler işaretlenerek süper çözünürlüklü konfokal mikroskobunda ve taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelenmiştir. Rutin histolojik incelemeler sonucu elde edilen bulgular; ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin özellikle yüzeyel intervasküler stromada (İVS) ceplerin etrafında ve perivasküler stromada (PVS) yoğunlaştığını göstermiştir. İnce kesitler TEM’de incelendiğinde yoğun kollajen sentezleyen daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücrelerinin yanı sıra çok ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler izlenmiştir. Hücre kültürü işlemleri sonrasında iki farklı hücre popülasyonunun büyüme dinamiklerinin de birbirlerinden farklı olduğu ve özellikle SEM’de yapılan gözlemlerle hücrelerin birbirleriyle ve kendi aralarında temas edebildiği bulunmuştur. İnce uzantılı telosit benzeri hücreleri floresan ile aktive edilmiş hücre ayrıştırma (FACS) yöntemi ile ayrıştırarak alt kültürlerini yapmak amacıyla literatürde telosit belirteçleri olarak yer alan CD34, PDGFR- α ve c-Kit işaretlemeleri akım sitometri deneylerinde tek ve ikili olarak kullanılmış; fakat anlamlı sayıda pozitif hücre elde edilememiştir. Göbek kordonu kesitlerinin ve kültür hücrelerinin süper çözünürlüklü konfokal mikroskobu gözlemlerinde ise hücreler güçlü vimentin ve F-aktin pozitif izlenirken farklı yoğunluklarda α -SMA (α -düz kas aktini), α -aktinin ve sitokeratin pozitif izlenmiştir. MSH belirteçleri hem daha geniş ve küçük sitoplazmalı hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde pozitif bulunmuştur. Telosit hücre belirteçlerinden CD34 göbek kordonu kesitlerinde oldukça zayıf pozitiflik gösterirken kültür hücrelerinde negatif bulunmuştur. PDGFR- α (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü- α) kesitlerde özellikle yüzeyel İVS’deki ceplerin etrafındaki ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde ve kültürdeki ince ve uzun sitoplazmalı hücrelerin de uzantılarında pozitif izlenirken; c-Kit ise hücre zarı ve sitoplazmada noktasal pozitif izlenmiştir. Son olarak caveolin-1 daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücrelerinde ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde farklı yoğunluklarda ifadeye sahip bulunmuştur ve pozitifliğinin de Golgi aygıtı ve endoplazma retikulumu (ER) ilişkili olduğu izlenmiştir. Ayrıca sonuçlar qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular, insan göbek kordonu stromasında telosit benzeri hücrelerin ilk kez tanımlanmasıyla literatüre bir katkı sunmakta ve kök hücre mikronişinin hücre çeşitliliğine ışık tutmaktadır. Aynı zamanda, MSH’ne eşlik eden yeni bir hücre tipinin varlığı, mikroçevrenin potansiyel biyolojik rollerini yeniden değerlendirme gerekliliğini gündeme getirmektedir.

Anahtar Sözcükler: İnterstisiyel hücre, göbek kordonu stroması, mezenkimal stroma hücresi, telosit

SUMMARY

Identification of Telocyte-Like Cells in the Stroma of the Human Umbilical Cord

In this study, the presence of telocytes –an interstitial cell type previously identified in various organs– was investigated in the stroma of the human umbilical cord, alongside mesenchymal stromal cells (MSCs). Telocytes are characterized by their long and slender extensions and are thought to play a role in intercellular communication and tissue organization. Identifying the presence of these cells in umbilical cord stroma could contribute to a better understanding of the stem cell niche and aid in the identification of potential targets in regenerative medicine. In this context, telocyte-like cells were analyzed in comparison with unique molecular markers identified in previous studies and well-established MSC markers. In this study, 16 umbilical cord samples obtained from healthy cesarean deliveries were used. Tissue sections were examined through routine histological staining, as well as with molecular markers using super-resolution confocal microscopy and ultrathin sections with transmission electron microscopy (TEM). Cell cultures were established from the umbilical cord samples; flow cytometry analyses were conducted, and molecularly labeled cells were further examined under super-resolution confocal and scanning electron microscopy (SEM). The findings of routine histologic examinations showed that telocyte-like cells with thin and long extensions were concentrated around stromal clefts in the superficial intervacular stroma (IVS) and in the perivascular stroma (PVS). When thin and long sections were examined in TEM, stromal cells with larger and smaller cytoplasm synthesizing dense collagen as well as telocyte-like cells with very thin and long extensions were found. Following cell culture, differences in the growth dynamics of these two populations were observed. SEM analysis indicated that these cells were capable of forming contacts with each other and within their own populations. To isolate and subculture fine-extended telocyte-like cells using fluorescence activated cell sorting (FACS), single and double staining for telocyte markers described in the literature –CD34, PDGFR- α , and c-Kit– was performed in flow cytometry, however, a significant number of positive cells could not be obtained. In super-resolution confocal microscopy observations of both cryosections and cultured cells, strong positivity for vimentin and F-actin was noted, along with varying intensity levels of α -SMA (α -smooth muscle actin), α -actinin, and cytokeratin. MSC markers were positive in both stromal cells with larger and small cytoplasm and telocyte-like cells with thin and long extensions. CD34, a telocyte cell marker, was weakly positive in umbilical cord cryosections and negative in cultured cells. PDGFR- α (Platelet Derived Growth Factor Receptor- α) was positive in cryosections, especially in telocyte-like cells with thin and long extensions around the stromal clefts in the superficial IVS and in the extensions of the cells with thin and long extensions in culture, while c-Kit exhibited punctate positivity in the cell membrane and cytoplasm. Finally, caveolin-1 was found to be expressed at different intensities in stromal cells with larger and smaller cytoplasm and in telocyte-like cells with thin extensions, and its positivity was associated with the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum (ER). Furthermore, the results were validated by qRT-PCR. As a result of the findings, the study makes a unique contribution to the literature in terms of the first identification of telocyte-like cells in human umbilical cord stroma and sheds light on the cell diversity of stem cell niches. At the same time, the presence of a new cell type accompanying MSC raises the need to re-evaluate the potential biological roles of the microenvironment.

Keywords: Interstitial cell, mesenchymal stem cell, telocyte, umbilical cord stroma

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
Özet	iii
Summary	iv
İçindekiler	v
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Göbek Kordonu	1
1.1.1 Göbek Kordonu Mikroanatomisi ve Histolojisi	2
1.1.2 Göbek Kordonunun Embriyolojik Gelişimi	7
1.1.3 Göbek Kordonu Stromasının Yapısı ve Biyobelirteçleri	9
1.2 Telositler	17
1.2.1 Telositlerin Tarihçesi	18
1.2.2 Telositlerin Morfolojik Özellikleri	20
1.2.3 Telositlerin Biyobelirteçleri	27
1.2.4 Telositlerin Mikroçevredeki İşlevleri	32
1.2.5 Telositlerin Doku Dağılımları	37
1.2.5.1 Placenta Telositleri	40
2. GEREÇ VE YÖNTEM	43
2.1 Göbek Kordonlarının Toplanması, Fikse Edilmesi ve Kesitlerin Alınması	43
2.2 Stereomikroskopi ve Işık Mikroskopi	44
2.2.1 Hematoksilin-Eozin Boyaması	45
2.2.2 Mallory Azan Boyaması	45
2.2.3 Masson Trikrom Boyaması	46
2.2.4 Periyodik Asit-Schiff Boyaması	46
2.3 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM)	47
2.4 iGK-MSH Kültürü	49
2.4.1 iGK-MSH Eksplant Kültürünün Yapılması, Pasajlanması ve Dondurulması	49
2.4.2 iGK-MSH Enzimatik Kültürü	51
2.4.3 İVS ve SAS'dan Eksplant Hücre Kültürü	53
2.4.4 iGK-MSH'nin Calcein AM ile İşaretlenmesi ve Görüntülenmesi	54
2.4.5 iGK-MSH'nin İmmüno Floresan İşaretleme İçin Fiksasyonu	55
2.4.6 iGK-MSH'de Telositlere Özgü Belirteçler Kullanılarak Akım Sitometri Analizlerinin Yapılması	56
2.4.6.1 Akım Sitometri Örneklerinin Konfokal Mikroskopta İncelenmesi	60
2.5 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)	61
2.6 Antikorlar, İmmüno Floresan İşaretleme ve Süper Çözünürlüklü Konfokal Mikroskopi	62
2.6.1 Göbek Kordonu ve Pozitif Kontrol Doku Kesitlerinde İmmüno Floresan İşaretleme	64
2.6.2 Cam Lamellerdeki Göbek Kordonu Hücrelerinde İmmüno Floresan İşaretleme	66

2.7 qRT-PCR	67
3. BULGULAR	72
3.1 Stereomikroskopi ve Işıık Mikroskopi Sonuçları	72
3.2 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Sonuçları	76
3.3 iGK-MSH Kültürü Sonuçları	81
3.4 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Sonuçları	86
3.5 Akım Sitometri Sonuçları	87
3.6 Akım Sitometri rneklerinin Konfokal Mikroskopi Sonuçları	89
3.7 İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları	91
3.7.1 Doku Kesitlerinde İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları	91
3.7.2 Kültür Hücrelerinde İmmünfloresan İşaretleme Sonuçları	102
3.8 qRT-PCR Sonuçları	106
4. TARTIşMA	109
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR	122
EKLER	143
Ek-1. Etik Kurul Kararı	143
Ek-2. Bilgilendirilmiş Onam Formu	144
ZGEMİř	146

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans çalışmasında insan göbek kordonu stroma hücrelerinin heterojen özelliklerini ayrıntılarıyla ele almayı ve literatürde daha önce göbek kordonunda gösterilmemiş “telosit” benzeri hücrelerin varlığını bir dizi mikroskopi ve hücre kültürü tekniği kullanarak göstermeyi amaçladık.

Yüksek lisans eğitimime başlarken bölümümü bu kadar seveceğimi, eğitimimi bu denli uzatacağımı hiç düşünmemiştim. Büyüdüğüm, çok şey öğrendiğim, akademik olarak kendime çok şey kattığım dört yılın sonuna geldiğime hâlâ inanamıyorum.

Dört yılda sadece akademik olarak değil sosyal olarak da hayatıma pek çok şey katan sevgili danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Alp CAN’a sonsuz teşekkür ederim. Bir öğrencinin ondan öğrenebileceği şeylerin sonsuz olduğuna inanıyorum; eğitim sürecimde bana ışık tuttuğu, yolumu aydınlattığı, her zaman yanımda olduğu ve en karamsar hissettiğim günlerde bir baba şefkatiyle elimi tuttuğu için ona minnettarım.

Onun ekibinde yer almak, laboratuvar toplantılarında farklı projelerle akademik yolculuğuma birikimler eklemek en büyük şansımdı. Ekip çalışmasının ne olduğunu gördüğüm ekibimde çok şey öğrendiğim, desteğini hiç esirgemeyen Doç. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN’a da en içten dileklerimi sunuyorum. Artık bir aile olduğumuza inandığım, sadece bir bilimsel ekip değil de aynı zamanda abi, abla edindiğim, hayatımda onlarla çalışmanın konforunu nerede olursam olayım hep arayacağıma inandığım Uzm. Dr. Bilge SERDAROĞLU, Dr. İbrahim ALPTEKİN, Dr. Elif ÖZTÜRK ve Dr. Nursena SATICI’ya teşekkürlerimi iletiyorum.

Akademisyen eğitiminde deneyimleriyle ve donanımlarıyla bize her zaman örnek olan değerli hocalarımız Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Belgin CAN’a, Prof. Dr. Esra ERDEMLİ’ye, Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU’na, Prof. Dr. Oya EVİRGİN’e, Prof. Dr. Sevim AYDIN’a, Prof. Dr. Deniz BİLLUR’a, Prof. Dr. Özgür ÇINAR’a da teşekkür ederim. Onlarla çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. İrem İNANÇ, Dr. Rukiye KAYA, Uzm. Dr. Ayşe Hande YOZGAT, Uzm. Dr. Fatma MERT, Uzm. Dr. Ekin BAYSAL, Dr. Bahar ŞAHİN CANSOY, Dr. İrem Saadet ODABAŞ, Dr. İrem ÖNEN ERTEKİN, Dr. Atakan SAĞLAM, Dr. Durul Şeyma ŞEN, Doktora öğrencisi Gamze DOĞAN’a; bölümümüz personeli Serap BATI, Abdülkerim DİLBAZ, Remzi ATA, Erdoğan ÇALIŞKAN, Seyfettin ÜLGER ve Sonay YETER’e destekleri için teşekkür ederim. Çalışmamıza destek veren Ankara Üniversitesi Kadın Doğum Anabilim Dalı hocalarından Şerife Esra

ÇETİNKAYA'ya, Ankara Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğretim Üyesi Mohammadreza DASTOURİ'ye, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğretim Üyesi Mesut AKYOL'a yardımları ve emekleri için teşekkürlerimi iletiyorum.

Yüksek lisans sürecimde kayıt günümüzün aynı olmasından başlayarak son günümüze kadar hep yan yana olduğum, sınav süreçlerimizden deney sonuçlarımıza kadar her anıma tanık olduğumuz ve bir kız kardeş edindiğime inandığım Elmas Yaren SUIÇMEZ'e teşekkürlerimi iletiyorum.

Tez çalışmamı TYL-2024-3343 numaralı projeyle destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, çalışanlarına ve Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim basamaklarını çıkamamda bana ve nice Türk gencine paha biçilemez fırsatlar sunan, tam bağımsızlığımızın kahramanları Mustafa Kemal Atatürk'e, silah arkadaşlarına ve kahraman Türk kadınlarına şükran ve minnetlerimi sunuyorum.

Son olarak hayatımın her sürecinde desteklerini her an hissettiğim, beni bir an olsun yalnız bırakmayan, her zaman benim için orada olduklarını bildiğim canım annem Elvan ERKAN'a ve biricik babam Umur ERKAN'a sonsuz teşekkürler.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AP	Alkalın Fosfataz
AMP	Amfoterisin
$\pm$	Artı Eksi
BDMA	Benzil Dimetilamin
β	Beta
K	Bin
ICLC	Cajal Benzeri İnterstisyel Hücreler
CD	Cluster of Differentiation (Farklılaşma Kümesi)
Ct	Cycle Treshold (Eşik Döngüsü)
Ç	Çekirdek
Δ	Delta
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DBP	Dibütil Ftalat
DIC	Diferansiyel İnterferans Kontrast
DMSO	Dimetilsülfoksit
DDSA	Dodesen-1-İlsüksinik Anhidrit
DMEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
D-PBS	Dulbecco's PBS
SMA	Düz Kas Aktini
DKH	Düz Kas Hücreleri
EV	Ekstraselüler Vezikül
ER	Endoplazma Retikulumu
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
SSEA	Evreye Özgü Embriyonik Antijen
f	Fare
FBS	Fetal Sığır Serumı
F-aktin	Filamentöz Aktin
FACS	Floresan ile Aktive Edilmiş Hücre Ayırıştırma
FITC	Fluorescein İzotiyosiyanat
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PMT	Foton çoklayıcı Tüp
RGS5	G Protein Sinyalleşmesinin Düzenleyicisi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
R	Geri Primer

GAG	Glikoaminoglikan
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GA	Glutaraldehit
iGK-EH	Göbek Kordonu Yüzey Epiteli Hücreleri
g	Gram
HMDS	Hekzametildisilazan
HE	Hematoksilin-Eozin
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HCl	Hidroklorik Asit
F	İleri Primer
İF	İmmünofloresan
i	İnsan
iGK-MSH	İnsan Göbek Kordonu Mezenkimal Stroma Hücreleri
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	İnterlökin
ICC	İnterstisyel Cajal Hücreleri
İVS	İntervasküler Stroma
Ca⁺²	Kalsiyum
qRT-PCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CO₂	Karbondioksit
keV	Kilo Elektron Volt
kDa	Kilodalton
L-15	Leibovitz-15
L	Litre
log	Logaritma
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
Maks	Maksimum
MA	Mallory Azan
MACS	Manyetik Aktive Hücre Ayırıştırma
MT	Masson Trikróm
MB	Megabayt
g	Merkezkaç Kuvveti
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MSH	Mezenkimal Stroma Hücreleri
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

μM	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Min	Minimum
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NGS	Normal Keçi Serumu
N	Normalite
NG	Nöral/Glial
#	Numara
OCT	Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü
OsO₄	Osmiyum Tetraoksit
n	Örneklem Büyüklüğü
PFA	Paraformaldehit
P	Pasaj
PS	Penisilin-Streptomisin
PVS	Perivasküler Stroma
PAS	Periyodik Asit-Schiff
KAl(SO₄)₂	Potasyum Şap
RNaz	Ribonükleaz
RNA	Ribonükleik Asit
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
BSA	Sığır Serum Albumin
Cy	Siyanin
NaOH	Sodyum Hidroksit
SS	Standart Sapma
SAS	Subamniyotik Stroma
aq	Sulu Çözelti
cDNA	Tamamlayıcı DNA
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGF	Transformasyon Büyüme Faktörü
PDGFR	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
UV	Ultraviyole
3B	Üç Boyutlu

VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
vd.	Ve Diğerleri
ver.	Versiyon
V	Volt
vWF	Von Willebrand Faktörü
~	Yaklaşık
GFP	Yeşil Floresan Proteini
%	Yüzde
T	Zaman



ŞEKİLLER

Şekil 1.1:	Göbek kordonu enine kesitinin genel yapısı.	2
Şekil 1.2:	Göbek kordonu stromasından ayrıştırılan hücrelerin farklı morfolojik özellikleri.	7
Şekil 1.3:	Göbek kordonunun embriyolojik gelişimi.	9
Şekil 1.4:	Göbek kordonu biyobelirteçlerinin göbek kordonu kesitlerindeki ve kültür iGK-MSH'deki immünfloresan işaretleme farklılıkları.	14
Şekil 1.5:	Göbek kordonu biyobelirteçlerinin ifadelerinin <i>in situ</i> ve <i>in vitro</i> kültür ortamlarında karşılaştırılması.	16
Şekil 1.6:	Telositin temel yapı özellikleri.	23
Şekil 1.7:	Metilen mavisi boyanmış kesitlerde telosit görünümü.	23
Şekil 1.8:	İnsan dermisinden alınan kesitlerde telositlerin görüntüsü.	25
Şekil 1.9:	Telositleri tanımlamak için kullanılan belirteçlerin tek ve ikili immünfloresan işaretlemeleri.	31
Şekil 1.10:	Telositlerin etkileşime girebileceği hücreler, bu etkileşimde rol oynayan hücresel ürünler ve katkı sundukları biyolojik süreçler.	34
Şekil 1.11:	Telositlerin komşu hücre ve dokularla etkileşimi.	36
Şekil 1.12:	Plasenta koryon villusunun koryon bölgesinde mezenkim dokusu içinde telositler.	41
Şekil 2.1:	Çalışmada kullanılan gereç ve yöntemlerin şematik özeti.	43
Şekil 2.2:	Işık mikroskopi.	47
Şekil 2.3:	Geçirimli elektron mikroskopi.	49
Şekil 2.4:	Eksplant iGK-MSH kültürü.	51
Şekil 2.5:	Enzimatik iGK-MSH kültürü.	52
Şekil 2.6:	Göbek kordonundan İVS ve SAS hücre kültürü.	54
Şekil 2.7:	iGK-MSH'nin hücre kayıt cihazında (JuLI®) görüntülenmesi.	55
Şekil 2.8:	Akım sitometri deneyleri.	60
Şekil 2.9:	Taramalı elektron mikroskopi.	62
Şekil 2.10:	Süper çözünürlüklü konfokal mikroskopi.	64
Şekil 2.11:	qRT-PCR deneylerinde kullanılan örnekler.	68
Şekil 3.1:	Stereomikroskopi ve ışık mikroskopi gözlemleri.	73
Şekil 3.2:	HE boyalı kesitlerde telosit benzeri hücre gözlemleri.	74
Şekil 3.3:	Toluidin mavisi boyalı kesitlerde telosit benzeri hücre gözlemleri.	76
Şekil 3.4:	Göbek kordonu stroma hücrelerinin düşük büyütme (x2-4K) TEM gözlemleri.	77
Şekil 3.5:	Göbek kordonu stroma hücrelerinin yüksek büyütme (x4-12K) TEM gözlemleri.	78

Şekil 3.6:	İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin TEM gözlemleri.	79
Şekil 3.7:	TEM gözlemlerinde izlenen iki farklı hücre tipinde hücre uzunluğu/kalınlığı ölçümleri.	80
Şekil 3.8:	İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin yüksek büyütme (x4-12K) TEM gözlemleri.	81
Şekil 3.9:	P ₀ ve P ₁ iGK-MSH kültürü gözlemleri.	82
Şekil 3.10:	Akım sitometri deneyleri öncesinde P ₂ iGK-MSH kültürü gözlemleri.	84
Şekil 3.11:	Enzimatik iGK-MSH kültürü gözlemleri.	85
Şekil 3.12:	SAS ve İVS'nin ayrı eksplant iGK-MSH kültürü gözlemleri.	85
Şekil 3.13:	iGK-MSH'nin 72 saatlik canlı kayıt gözlemleri.	86
Şekil 3.14:	Göbek kordonu stroma hücrelerinin SEM gözlemleri.	87
Şekil 3.15:	Akım sitometri deney sonuçları.	88
Şekil 3.16:	Akım sitometri örneklerinin konfokal mikroskopi gözlemleri.	90
Şekil 3.17:	Negatif kontrol immünfloresan işaretlemelerin konfokal mikroskopi gözlemleri.	91
Şekil 3.18:	Pozitif kontrol immünfloresan işaretlemelerin konfokal mikroskopi gözlemleri.	92
Şekil 3.19:	Göbek kordonu kesitlerinde hücre iskeleti proteinleri ve ekstraselüler matriks proteininin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	94
Şekil 3.20:	Göbek kordonu kesitlerinde F-aktin filamanlarının yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	95
Şekil 3.21:	Göbek kordonu kesitlerinde mezenkimal stroma hücresi belirteçlerinin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	96
Şekil 3.22:	Göbek kordonu kesitlerinde CD34'ün yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	97
Şekil 3.23:	Göbek kordonu kesitlerinde PDGFR- α 'nın yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	98
Şekil 3.24:	Göbek kordonu kesitlerinde c-Kit'in yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	99
Şekil 3.25:	Göbek kordonu kesitlerinde caveolin-1'in yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	100
Şekil 3.26:	Göbek kordonu kesitlerinde ikili işaretlemelerin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	101
Şekil 3.27:	Kültür hücrelerinde hücre iskeleti proteinleri ve ekstraselüler matriks proteininin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	103
Şekil 3.28:	Kültür hücrelerinde hücre yüzeyi molekülleri ve reseptör proteinlerin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	104
Şekil 3.29:	Kültür hücrelerinde ikili işaretlemelerin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri.	105

mikroskopi gözlemleri.

- Şekil 3.30:** qRT-PCR deneylerindeki hedef sekiz genin agaroz jel görüntüsü. 106
- Şekil 3.31:** qRT-PCR deneylerindeki hedef olan sekiz genin GAPDH'ye normalize edilmiş ifade düzeyleri. 108



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1:	Göbek kordonunda pozitif ve negatif ifadeli biyobelirteçler.	10
Çizelge 1.2:	İnterstisyel Cajal hücreleri, telositler ve fibroblastların morfolojik benzerlik ve farklılıkları.	21
Çizelge 1.3:	Telosit ve fibroblast hücrelerinin yapısal farklılıkları.	26
Çizelge 1.4:	Telositlerin doku dağılımları ve yerleşimlerinin araştırıldığı çalışmalar.	38
Çizelge 2.1:	İmmünofloresan işaretlemelerinde kullanılan birincil antikorlar, ikincil antikorlar ve boyalar.	63
Çizelge 2.2:	qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerler.	69
Çizelge 3.1:	RNA örneklerinin cDNA sentez reaksiyonu için miktar ölçümü sonuçları.	106
Çizelge 3.2:	qRT-PCR deneylerindeki hedef olan sekiz genin üç biyolojik tekrardaki hesaplanan $2^{(-\Delta Ct)}$ değerleri.	107

1. GİRİŞ

1.1 Göbek Kordonu

Göbek kordonu (*funiculus umbilicalis*), fetüsün gelişimi sırasında plasenta ile fetüs arasındaki yaşamsal bağlantıyı sağlayan bir yapıdır. Prenatal dönemde embriyo ve fetüsün gelişimini sağlar. Embriyolojik olarak embriyon dışı mezoderm kökenli olan bu yapı, gebeliğin erken dönemlerinden itibaren besin, oksijen ve atık maddelerin taşınmasında kritik bir rol oynar (Sadler, 2020). Ortalama 50-60 cm uzunluğunda ve yaklaşık 1-2 cm çapında olan göbek kordonu doğuma kadar işlevlerini sürdürür (Sánchez-Trujillo vd., 2022).

Göbek kordonu iki göbek kordonu arteri ve bir göbek kordonu veni barındırır. Bu damarlar onları destekleyen ve koruyan jelatinöz bir madde olan hyaluronik asit, su, kollajen ve mukopolisakkarit açısından oldukça zengin, Wharton jölesi adı verilen bir bağ dokusu ile çevrilidir (Chughtai vd., 2022; Jain vd., 2019; Makarchuk, 2023; Moore vd., 2020). 1656 yılında İngiliz anatomist Thomas Wharton (1614-1673) tarafından ilk kez tanımlanan bu bağ dokusu günümüzde göbek kordonu stroması olarak adlandırılır. Stroma, göbek kordonu arterlerini ve göbek kordonu venini mekanik baskıya ve sıkışmaya karşı koruyarak fetal gelişim için yaşamsal önem taşıyan kesintisiz kan akışını sağlamaktadır (Katsura vd., 2021; Trivedi vd., 2020).

Fizyolojik rollerinin yanı sıra, göbek kordonu yenileyici tıpta da büyük ilgi görmektedir; çünkü mezenkimal stroma hücreleri (MSH) açısından zengin bir kaynaktır. Bu hücreler, çeşitli hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahiptir ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Can vd., 2017). Göbek kordonundan bu hücrelerin toplanması ve kullanılması (Can ve Balci, 2011), hücre bazlı tedaviler ve doku mühendisliği alanlarında yeni imkanlar sunmaktadır (Li, 2024; Polchow vd., 2012).

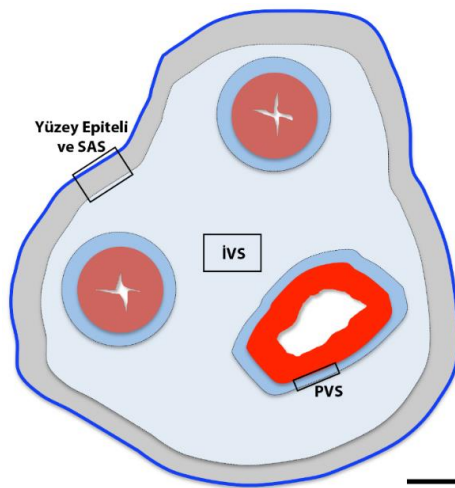
Göbek kordonunun yapısal ve işlevsel özellikleri, fetüsün sağlıklı gelişimi açısından kritik bir öneme sahiptir ve doğum öncesi izlemde detaylı şekilde incelenmesi gereken bir yapı olarak değerlendirilmektedir. Fetüsün gelişimini besin ve gaz değişimi yoluyla destekleyen yaşamsal bir yapı olmanın yanı sıra, tıbbi araştırmalar ve potansiyel tedaviler için değerli bir kök hücre kaynağıdır. Göbek kordonunun bütünlüğü ve işlevselliği, sağlıklı bir gebelik süreci için kritik öneme sahiptir. Devam eden araştırmalar, hem klinik hem de terapötik bağlamlarda göbek kordonunun kullanım alanlarını keşfetmeye ve bu konuda literatüre katkıya olanak sağlamaktadır.

1.1.1 Göbek Kordonu Mikroanatomisi ve Histolojisi

Göbek kordonu, gebelik döneminin sonunda genellikle 50-60 cm uzunluğuna ve 1-2 cm çapına ulaşır; ancak gebelik yaşı ve patolojik durumlar gibi faktörlere bağlı olarak bu değerler değişiklik gösterebilir (Sánchez-Trujillo vd., 2022). Yapısı, hamilelikte fetüsün pozisyon değişimlerini karşılayabilecek esneklik ve dayanıklılıktadır (Larsen, 2020).

Göbek kordonunu; göbek kordonu epiteli, stroma ve iki arter bir ven olmak üzere kan damarları olacak şekilde üç ana doku bileşeninden oluşur. Stroma ise subamniyotik stroma (SAS), intervasküler stroma (İVS) ve perivasküler stroma (PVS) olmak üzere üç ana histolojik bölgeye ayrılır (**Şekil 1.1**) (Can ve Balci, 2011). Göbek kordonu damarlarının yapısında tunika intima (endotel ve altındaki dar bağ dokusu) ve tunika media (vasküler düz kas hücrelerinin yoğun tabakaları) bulunur ancak belirgin bir tunika adventisya ve dış elastik lamina bulunmaz (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Corrao vd., 2013; Davies vd., 2017; Nanaev vd., 1997).

Göbek kordonu damarları, saat yönünün tersine spiral döngüler halinde düzenlenir (Erkan vd., 2024). Göbek kordonu arterleri, fetüsten plasentaya oksijenlenmemiş kan taşırken, göbek kordonu veni plasentadan fetüse oksijenlenmiş kan taşır. Bu düzenleme, besin ve atık değişimini sağlayarak fetal büyüme ve gelişimi destekler (Sánchez-Trujillo vd., 2022; Sherer vd., 2021). Göbek kordonu arterleri genellikle daha küçük çapa sahipken, göbek kordonu veni daha geniş çapa sahip olup göbek kordonunun merkezine daha yakın bir konumda bulunur (Bimpong vd., 2019). Stromanın temel fonksiyonu damar bütünlüğünü ve kan akışının düzenlenmesi ve damarsal stabiliteyi sağlamasıdır (Sarugaser vd., 2005).



Şekil 1.1: Göbek kordonu enine kesitinin genel yapısı. SAS: Subamniyotik stroma, İVS: Intervasküler stroma, PVS: Perivasküler stroma. Ölçüm çubuğu: 300 µm (Coskun ve Can, 2015).

Göbek kordonu epitel ile kaplıdır ve bu epitel kordon stromasını dış ortamdan koruyucu bir kılıf görevi görür. Göbek kordonu epitelinin tek katmanlı değil, belirgin çok katmanlı bir epitel ile örtülü olduğunu; bu epitelin benzersiz yapısal özelliklerini ve belirli proteinlerin bolluğunu 2024 yılında yaptığımız çalışmada ayrıntılı şekilde tanımladık (Erkan vd., 2024). İnsan göbek kordonu epiteli; iyi gelişmiş, kesintisiz bir bazal membran üzerinde tek, çift veya çok katmanlı hücrelerden oluşan sürekli bir tabaka halinde bulunur. Epitel hücreleri, tek sıradan 4–5 hücre sırasına kadar değişen bir tabakalanma sergileyerek gelişmiş bir bazal membran üzerinde konumlanır. Bu epitel hücreleri, kimyasal ve mekanik uyarılara yanıt vererek değişiklik gösterebilir ve fetüsün gelişimi sırasında amniyon sıvısıyla kordon kanı arasında aktif taşımayı kolaylaştırabilir (Erkan vd., 2024).

Bu tabakanın altında, glikozaminoglikanlar (GAG'lar), kollajen (tip I ve tip III ağırlıklı), hyaluronik asit ve stroma hücreleri açısından zengin olan embriyonik müköz bağ dokusu yapısında stroma bulunur (Sobolewski vd., 2002). Bu jelatinimsi madde; proteoglikanlar, GAG'lar ve mukopolisakkaritler açısından zengin bir hücreler arası maddeden oluşur. Bu benzersiz bileşim, yalnızca kordonun yapısal bütünlüğünü desteklemekle kalmaz, aynı zamanda göbek kordonu damarları içindeki kan akışını düzenlemede ve damar bütünlüğünün korunmasında da rol oynar (Damasceno ve Lima, 2013; Sarugaser vd., 2005; Sgambati vd., 2007; Stefańska vd., 2020). Mezoderm kökenli stroma; damarları sıkışmaya karşı yastıklama görevi görerek onların bütünlüğünü korur (Shivakumar vd., 2015). Özellikle de mekanik baskılara karşı damarları koruyarak fetüsün dolaşım sisteminin sürekliliğini sağlamada önemli rol oynar (Gil-Kulik vd., 2022; Sgambati vd., 2007).

Stroma insan göbek kordonu mezenkimal stroma hücreleri (iGK-MSH) açısından oldukça zengindir (Davies vd., 2017). Bu hücreler genellikle ökromatik çekirdeğe sahip, hücre uzantıları telositlere göre daha kısa ve kalın olan ve oldukça yoğun kollajen sentezi gerçekleştiren hücrelerdir. Bu hücreler ile çevredeki hücre dışı matriks arasındaki etkileşim; kan akışının düzenlenmesi ve besin değişimi, bağışıklık yanıtı açısından büyük önem taşır ve göbek kordonu ile fetüsün genel sağlığına katkıda bulunur (Sobolewski vd., 2002; Vanterpool vd., 2016). iGK-MSH yetişkin dokularından elde edilen (kemik iliği vb.) MSH'ne kıyasla daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptir ve pasajlama sürecinde yapıları daha uzun süre sabit kalmaktadır (Guenther vd., 2022). iGK-MSH; kondrositler, adipositler ve osteositler de dahil olmak üzere çeşitli hücre türlerine farklılaşabilirler (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Karahuseyinoglu vd., 2007). Bu kök hücrelerin iyileşmeyi teşvik

etme ve doku rejenerasyonunu destekleme yeteneği, göbek kordonu stromasının klinik uygulamalar açısından önemini daha da vurgulamaktadır (Weiss vd., 2006).

Stromada yer alan bu hücreler yoğun kollajen demetlerin arasında uzantıları olan, ancak birbirleriyle temas etmeyen miyo/fibroblast yapısındadır. Hücreler özellikle göbek kordonundaki damarlar çevresinde (PVS) çok daha yoğun bulunurken, yüzey epitelinin altındaki bölgelerde (SAS) daha seyrekler. Genel olarak hücre yoğunluğu her zaman SAS'da İVS ve PVS'ye göre daha düşüktür (Gauthier-Fisher vd., 2019). Stroma hücreleri fusiform veya yıldızlı şekle sahip olup, uzun hücreler arası bağlantı çıkıntıları içerir. Hücreler arası boşluklarda ise kollajen lif demetleri bulunur.

Göbek kordonu stromasındaki bu hücrelerin dokudan çıkartılarak kültür ortamında çoğaltılmasıyla günümüzün yenileyici tıpta en çok kullanılan allojenik MSH popülasyonları elde edilir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Göbek kordonunun enzimatik ya da mekanik olarak parçalanmasıyla eksplant hücre kültürü yöntemiyle izole edilmeleri mümkündür (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Coskun ve Can, 2015). Kültür ortamında lamellipod ve mikrospike yapılarıyla, sitoplazmada vezikül aktivitesi yoğun izlenen hücrelerdir. Bu hücreler MSH belirteçleri olan CD73, CD90 ve CD105 gibi belirteçleri ifade ederler (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Karahuseyinoglu vd., 2007). CD73 (ecto-5'-nucleotidase) hücrelerin adenosin metabolizmasında rol oynar, immünregülasyona katkı sağlar ve MSH'in yüzeyinde pozitif olarak ifade edilir. CD90 (Thy-1) gelişimsel süreçlerde, hücre-hücre etkileşiminde ve hücre farklılaşmasında rol oynayan bir yüzey glikoproteinidir. CD105 (endoglin) ise vasküler gelişim ve anjiyogenezde önemli bir rol oynayan yüzey glikoproteinidir. CD105, hem MSH'de hem de damar endotel hücrelerinde pozitif olarak ifade edilir. Yapılan bir çalışmada Blanco-Elices (2022) tüm stroma hücrelerinin CD73 için pozitif olduğunu; ancak CD105 için yalnızca düşük bir oranda pozitiflik gösterdiğini ve ifadeleri açısından bölgeler arasında anlamlı bir fark bulunmadığını tespit etmiştir (Blanco-Elices vd., 2022).

Göbek kordonu hücrelerinin izolasyonu ve sindirimine yönelik çeşitli protokollerde ortak nokta, kollajenaz içeren çözeltilerin kullanımıdır (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Tip I kollajenaz, stroma hücrelerinin izolasyonunda yaygın olarak tercih edilirken, hyaluronidaz ile birlikte kullanımı, matrikste bol bulunan hyaluronik asitin parçalanmasını kolaylaştırarak izolasyon süresini kısaltır. Ancak kollajenazın uygulama süresi kritiktir; özellikle kollajenaz ve hyaluronidaz kombinasyonu kullanıldığında, hücre zarının zarar görme riski bulunmaktadır. Bu durum, hücrelerin kültür kaplarına yapışmasını engelleyebilir ve hatta hücre hasara neden olabilir. Tip II kollajenaz, klostripain aktivitesi nedeniyle daha güçlü

bir etkiye sahiptir. Doku homojenizasyon süresi, kullanılan enzimlerin konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak 30 dakika ile 16 saat arasında değişir. Sindirilen dokunun 70-100 µm gözenekli filtrelerden süzülmesi önerilir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007).

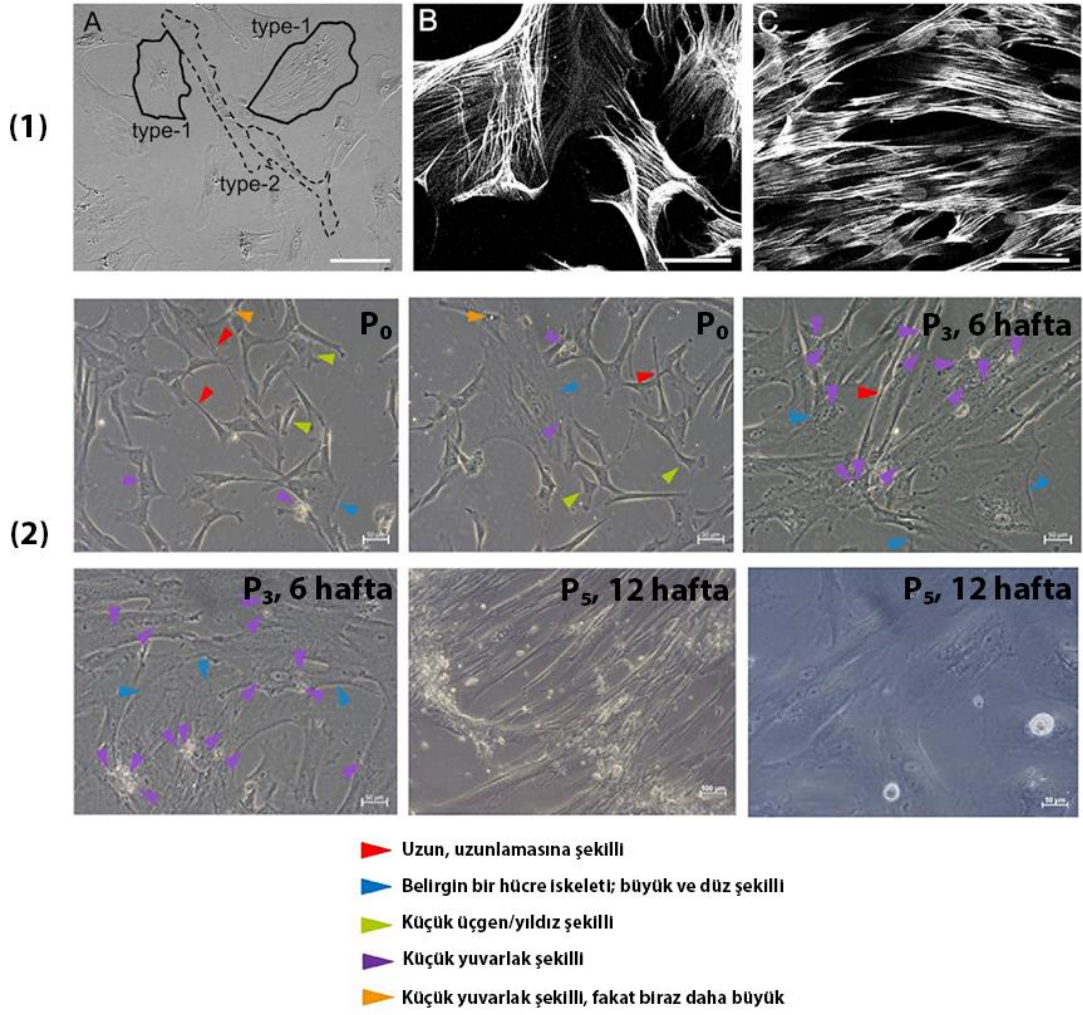
Araştırma ekibimizin 20 yılı aşkın süredir yapmış olduğu doku içi ve in vitro gözlemler burada bulunan hücrelerin gerek doku kompartmanlarına göre (stromanın farklı alanları) gerekse kültür koşullarındaki değişkenlere göre heterojen hücre popülasyonlarında oluştuğunu ortaya koymuştur (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Coskun ve Can, 2015; Karahuseyinoglu vd., 2007). Grubumuz tarafından heterojen hücre popülasyonu konusunda tip-1 ve tip-2 olmak üzere iki farklı miyofibroblast tanımlanmıştır (Coskun ve Can, 2015). Tip-1 hücreler genellikle geniş sitoplazma ve miyofibroblast özelliğinde gözlemlenirken tip-2 hücreler fibroblastoid fenotipte gözlemlenmiştir. Bu hücreler ince, uzun görümlü hücreler olarak gözlenmiş olup eksplant veya enzimatik yöntemle yapılan hücre ayırıştırma ve büyütme yaklaşımlarına göre farklı oranlarda ortaya çıkmaktadır. Enzimatik ayırıştırma ile elde edilen kültürlerde başlangıçta tip-1 ve tip-2 hücreleri birlikte gözlemlenirken, sonraki pasajlarda tip-1 hücreleri azalarak neredeyse tamamen kaybolmuştur. Eksplant kültürlerinde yalnızca tip-2 fibroblastoid hücreler bulunmuş ve tüm pasajlar boyunca fenotiplerini korumuştur. Tip-1 hücreleri miyofibroblast tipinde özellikler göstererek enzimatik olarak izole edilen erken kültürlerde baskınken, fibroblastoid hücreler eksplant kültürleme yöntemiyle sürekli olarak elde edilmiştir. iGK-MSH'in izolasyonu ve kültüre edilmesi, doğal halleriyle kıyaslandığında fenotipik bir değişim gerçekleşmiştir (Coskun ve Can, 2015). Karahuseyinoglu (2007) tip-1 hücreleri genişlemiş filopodyumlara sahip, aşırı ince ve stres lifleri açısından zengin hücreler; tip-2 hücreleri ise fusiform şekilde, uzun sitoplazmik uzantılara sahip olarak tanımlamıştır (Karahuseyinoglu vd., 2007). Tüm hücrelerin mezodermal kökenli hücre belirteci olan vimentin ifade ettiği, bir epitel hücresi belirteci olan sitokeratin ifadesinin ise yalnızca tip-1 hücrelerinde sınırlı olduğu görülmüştür. Bu durum, kültür ortamında gözlenen tip-1 hücrelerin göbek kordonu stromasındaki perivasküler hücrelere karşılık gelebileceğini düşündürmektedir (Karahuseyinoglu vd., 2007).

Başka bir çalışmada ise Can ve Balcı (2011) izolasyon ve kültür süreci sonrasında ilk günde iGK-MSH'nin, fibroblast benzeri morfoloji gösterdiği göstermiştir. Uzun süreli pasajlarda (5. pasaj ve sonrası) ise geniş sitoplazmaya sahip yapı korunmuştur (Can ve Balcı, 2011).

Guenther (2022) göbek kordonu hücrelerinin kültür koşullarında zaman içerisindeki morfolojik görünümünü karşılaştırmıştır (Guenther vd., 2022). Hücre kültüründe, eksplant kültür hücreleri; küçük üçgen/yıldız, büyük yassı hücre iskeletine sahip, uzun uzantılara

sahip, küçük yuvarlak ve çok küçük parlak hücreler gibi farklı yapılarda görülmüştür. Uzun süreli kültür sonrası ise; çok küçük hücreler çoğalmaya başlamış veya sferoidler oluşturmuş ya da tekil hücreler, çiftler veya hücre agregatları halinde kültür süpernatantlarında kalmıştır. İlk olarak eksplanttan hücre tomurcuklanması olduktan sonra farklı morfolojilere sahip hücreler gözlemlenmiştir; küçük üçgen/yıldız, büyük yassı hücre iskeletine sahip, uzun ve ince yapılı, küçük yuvarlak ve çok daha az sayıda küçük, parlak yuvarlak hücreler eksplant kültürde görülmüştür. Altı hafta sonra 3. pasajda ise hücre bileşiminde farklılıklar oluşmuştur. Büyük yassı veya uzun hücreler baskın hale gelmiştir. Küçük yuvarlak veya üçgen hücreler büyük ölçüde kaybolmuştur. Küçük parlak hücrelerin sayısı artmıştır ve büyük hücrelere yapışık görünmüşlerdir. Bazı büyük hücreler stres lifleri sergileyerek miyofibroblast benzeri bir morfoloji göstermektedir. On iki hafta sonraki uzun süreli kültür hücreleri, daha büyük yassı veya uzamış hücreler baskın hale geldikçe daha homojen bir popülasyon oluşturmuştur. Bu hücre popülasyonunda 5-7 µm çapındaki çok küçük hücreler hızla çoğalmış, 20-80 µm çapında sferoidler oluşturmuş ve tek hücreler, çift hücreler veya hücre agregatları olarak kültür süpernatantında kalmaya devam etmiştir. Bu kültür sonuçları, göbek kordonu dokusundan elde edilen hücrelerin hem morfolojik çeşitliliğini vurgulamaktadır (Guenther vd., 2022).

Göbek kordonu stromasından ayrıştırılan hücrelerin şekil özellikleri aşağıda özetlenmiştir (**Şekil 1.2**) (Coskun ve Can, 2015; Guenther vd., 2022).



Şekil 1.2: Göbek kordonu stromasından ayrıştırılan hücrelerin farklı morfolojik özellikleri. (1) Göbek kordonundan ayrıştırılan hücreler geniş ve yassı sitoplazmaya sahip miyofibroblast özelliğinde gözlemlenen tip-1 hücreler ve fibroblastoid yapıda tip-2 hücreler olarak isimlendirilmiştir. Ölçüm çubukları: 50 μ m (Coskun ve Can, 2015). (2) Guenther (2022) tarafından tanımlanan ve beş farklı morfolojide izlenen hücreler. Ölçüm çubukları: 100 μ m, alt orta 50 μ m (Guenther vd., 2022).

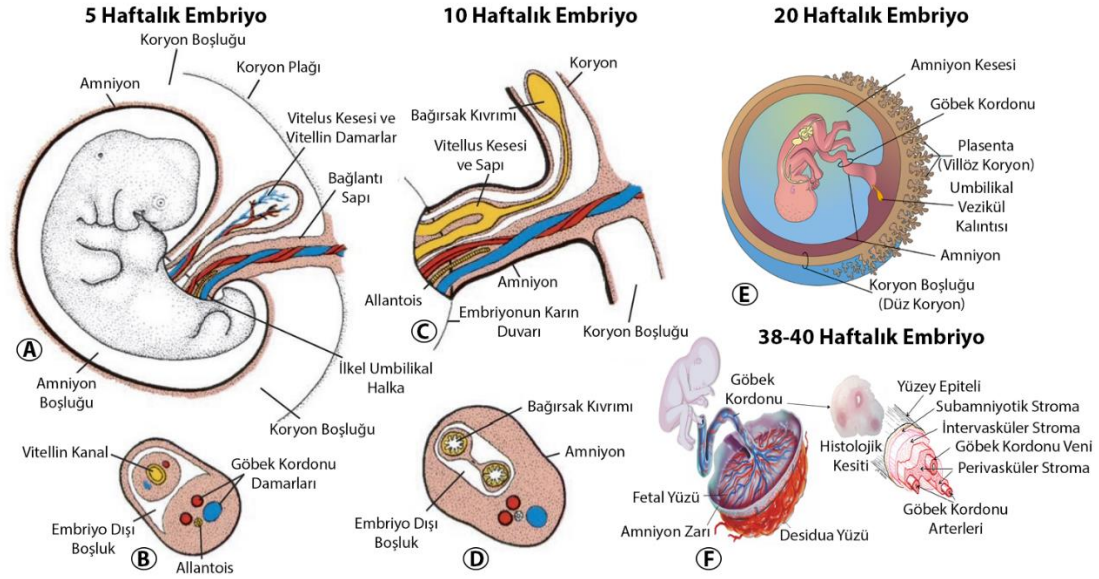
1.1.2 Göbek Kordonunun Embriyolojik Gelişimi

Göbek kordonu genel olarak bağlantı sapı, vitellin kanal (*ductus omphaloentericus*) ve allantoisi içeren karmaşık bir süreçle gelişir. Gebeliğin ilk beş haftasında vitellus kesesi sapı ve allantois kanallarının birleşmesiyle oluşur (Hagen-Ansert, 2023). Gebeliğin üçüncü haftasında allantois, vitellus kesesinden divertikül olarak gelişerek bağlantı sapına doğru uzanır (Pal vd., 2008). Gebeliğin dördüncü haftasında, embriyonun kraniokaudal kıvrımlanması ile bağlantı sapı uzar ve ilkel göbek kordonu şekillenir (Carlson, 2019). Amniyon, bağlantı sapı ve vitellus kesesinin çıktığı ilkel göbek halkası dışında embriyoyu

tamamen saracak şekilde genişler. Bu dönemde, endodermal arka bağırsağın bir uzantısı olan allantois oluşur ve bağlantı sapı içine doğru uzanır (Heil ve Bordoni, 2025). Dördüncü haftanın sonunda, vitellus kesesinin bir divertikülü olan allantois, göbek kordonunun gelişiminde kritik rol oynar; damarların oluşumuna katkıda bulunur (Pal vd., 2008). Allantoisin çevresinde gelişen damarlar farklılaşarak iki göbek kordonu arteri ve bir göbek kordonu veninden oluşan göbek kordonu damarlarını meydana getirir (Gupta vd., 2017).

Dördüncü ile sekizinci haftalar arasında, amniyon sıvısındaki artış bağlantı sapının uzamasına yol açar ve vitellus kesesi bağlantı sapı içinde sıkışarak vitellin kanalı oluşturur. Amniyon boşluğunun genişlemesi, amniyon ile koryonun temas etmesine ve bu iki katmanı örten ekstraembriyonik mezodermin kaynaşmasına neden olur. Bunun sonucunda göbek kordonu, bağlantı sapı ile vitellin kanalının amniyonla çevrili birleşik yapısı, amniyon sıvısı içinde serbest şekilde yüzer hale gelir (Heil ve Bordoni, 2025). Bu dönemde göbek kordonu; göbek kordonu arterleri, göbek kordonu veni, allantoisi ve vitellin damarlarını içerirken, gebeliğin ilerleyen aşamalarında vitellin damarları ve allantois geriler; göbek kordonu damarları ise besin alışverişini sağlayan ana yapılar olarak kalır (Moore vd., 2020).

Göbek kordonu stroması ise embriyo gelişiminin erken dönemlerinde, özellikle 13. gün civarında embriyon dışı mezoderm hücrelerinden ve bu hücrelerin salgıladığı hücre dışı matriksten gelişir ve gebelik süresince damarların açık kalmasını sağlar; koruyucu ortam olarak hizmet eder (Karahuseyinoglu vd., 2007). Embriyo amniyon kesesi tarafından çevrelendikten sonra kese göbek kordonu üzerine katlanır; zamanla göbek kordonunun tamamını örter ve ona sıkıca yapışır (Lockwood vd., 2022). Bağırsaklar, karın boşluğuna kıyasla daha hızlı büyüdüğü için yaklaşık yedinci haftada proksimal göbek kordonu içine fıtıklaşır ve bu durum yaklaşık onuncu haftaya kadar devam eder (Hagen-Ansert, 2023). Embriyonun büyümesiyle göbek kordonu da fizyolojik olarak uzamaya devam eder ve bu uzama, fetüsün hareketliliğini destekleyen esneklik ve işlevsel bütünlüğü sağlar (Donlon vd., 2002). Birinci trimesterin sonunda, göbek kordonu genellikle 50-60 cm uzunluğa ulaşarak tam işlevsel hale gelir ve anne ile fetüs arasında besin ve atık değişimini etkin bir şekilde sağlar (Donlon vd., 2002; Gupta vd., 2017). Ayrıca doğum zamanı geldiğinde vitellin kanalı ve allantois genellikle tamamen gerilemiştir (Heil ve Bordoni, 2025). Göbek kordonunun embriyolojik gelişimi aşağıda özetlenmiştir (**Şekil 1.3**) (Davies vd., 2017; Moore vd., 2020; Sadler, 2020).



Şekil 1.3: Göbek kordonunun embriyolojik gelişimi. Gebeliğin ilk haftalarında ilkel göbek kordonu yapısı oluşur ve bu dönemde göbek kordonunun genel yapısının enine kesitinde göbek kordonu arterleri, göbek kordonu veni, allantois ve vitellin kanal bulunur (A ve B). Onuncu haftaya kadar bağırsakların proksimal göbek kordonu içine fıtıklaşması gerçekleşir ve amniyon göbek kordonunu örter; bu dönemde göbek kordonunun genel yapısının enine kesitinde ise ilk haftalardaki yapılar ek olarak bağırsak kıvrımı ve dış tarafında da amniyon yapısı görülebilir (C ve D) (Sadler, 2020). Gebeliğin 20. haftasındaki embriyo; amniyon boşluğunun belirgin şekilde genişler, koryoamniyon zar oluşur ve vitellüs kesesi zamanla küçülerek kaybolur (E) (Moore vd., 2020). Gebeliğin son dönemindeki göbek kordonunun genel yapısı; plasantanın yüzeyindeki epitel kılıfından ve altındaki stromadan oluşan; amniyon zarı ve fetüs ile plasenta arasında besin alışverişini sağlayan göbek kordonu yapısı izlenir. Histolojik kesitinde vitellin kanal ve allantoisin tamamen gerilemiş olduğu görülebilir ve göbek kordonunun genel yapısı yüzey epitelinin altında yer alan SAS, İVS, PVS ve göbek kordonu arterleri ve göbek kordonu veninden oluşmaktadır (F) (Davies vd., 2017).

1.1.3 Göbek Kordonu Stromasının Yapısı ve Biyobelirteçleri

Göbek kordonu stroması, fetal gelişimi destekleyen önemli bir bağ dokusu bileşenidir ve hücre yapısı, hücresel farklılaşma potansiyeli ve hücre dışı bileşenleri açısından birçok biyobelirteç içerir. iGK-MSH, in vitro koşullarda immünmodülatör ve rejeneratif özelliklere sahip olduğu için, bu biyobelirteçler hem tanısal hem de terapötik amaçlarla önemlidir (Wang vd., 2004).

Göbek kordonu stroması ile ilişkili biyobelirteçler, MSH'nin kimliğini ve işlevselliğini tanımlayan gen ifadelerini ve bir dizi hücre/hücre dışı proteinleri içerir. Göbek

kordonuna ait biyobelirteçler Can ve Karahüseyinoğlu (2007) derlemesinde özetlenmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1: Göbek kordonunda pozitif ve negatif ifadeli biyobelirteçler (Can ve Karahuseyinoglu, 2007).

Biyobelirteç	+/-	Referans Çalışmalar
CD10 (nötral endopeptidaz)	+	(Lund vd., 2007; Weiss vd., 2006)
CD13 (aminopeptidaz N)	+	(Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD14 (lipopolisakkarit reseptörü)	-	(Karahuseyinoglu vd., 2007; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Weiss vd., 2006)
CD29 (integrin β 1)	+	(Fu vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Lu vd., 2006; Wang vd., 2004; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD31 (PECAM-1) (trombosit endotel hücre yapışma molekülü-1)	-	(Baksh vd., 2007; Kadivar vd., 2006; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD33 (sialik asit bağlayıcı immünglobulin ilişkili lektin)	-	(Weiss vd., 2006)
CD34 (sialik asit içeren müsin)	-	(Baksh vd., 2007; Conconi vd., 2006; Fu vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Karahuseyinoglu vd., 2007; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Wang vd., 2004; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD38 (ADP-ribozil siklaz 1)	-	(Conconi vd., 2006; Lu vd., 2006)
CD44 (HCAM) (homing ile ilişkili hücre adezyon molekülü) (hyaluronik asit reseptörü)	+	(Fu vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Karahuseyinoglu vd., 2007; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Wang vd., 2004; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD45 (tüm lökositlere özgü antijen)	-	(Baksh vd., 2007; Conconi vd., 2006; Fu vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Karahuseyinoglu vd., 2007; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Wang vd., 2004; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD49b (integrin α 2)	+	(Lupatov vd., 2006; Weiss vd., 2006)
CD49c (integrin α 4)	+	(Weiss vd., 2006)
CD49d (integrin α 3)	+	(Weiss vd., 2006)
CD49e	+	(Baksh vd., 2007; Weiss vd., 2006)
CD51 (integrin α 5)	+	(Fu vd., 2006; Wang vd., 2004; Weiss vd., 2006)
CD54 (ICAM-1) (hücreler arası adezyon molekülü-1)	-/+ ^a	(Conconi vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Lupatov vd., 2006)
CD56 (nöral hücre adezyon molekülü)	-	(Weiss vd., 2006)
CD73 (ekto-5'-nükleotidaz)	+	(Fu vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Karahuseyinoglu vd., 2007; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Sarugaser vd., 2005; Wang vd., 2004)
CD90 (Thy-1)	+	(Baksh vd., 2007; Conconi vd., 2006; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
CD105 (endoglin)	+	(Conconi vd., 2006; Fu vd., 2006; Kadivar vd., 2006; Karahuseyinoglu vd., 2007; Lu vd., 2006; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Wang vd., 2004; Weiss vd., 2006)

CD106 (VCAM-1) (vasküler hücre adezyon molekülü-1)	-/+ ^a	(Lu vd., 2006; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Wu vd., 2007)
CD117 (c-Kit)	-/+ ^a	(Baksh vd., 2007; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Mitchell vd., 2003; Sarugaser vd., 2005; Wu vd., 2007)
CD123 (interlökin-3 reseptörü)	-	(Sarugaser vd., 2005)
CD133 (prominin-1)	-	(Weiss vd., 2006)
CD146 (MELCAM) (melanom hücre adezyon molekülü)	+	(Baksh vd., 2007)
CD166 (ALCAM) (aktive olmuş lenfosit hücre adezyon molekülü)	+	(Kadivar vd., 2006; Lu vd., 2006)
CD235 α (glikoforin A)	-	(Sarugaser vd., 2005)
HLA-1	+	(Conconi vd., 2006; Weiss vd., 2006)
HLA-DR (MHC sınıf II)	-	(Kadner vd., 2004; Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Weiss vd., 2006; Wu vd., 2007)
HLA-DP (MHC sınıf II)	-	(Lund vd., 2007; Sarugaser vd., 2005)
HLA-DQ (MHC sınıf II)	-	(Lund vd., 2007; Schoenberg ve Moore, 1958)
HLA-A, B, C (MHC sınıf I)	+	(Lu vd., 2006; Lund vd., 2007; Lupatov vd., 2006; Sarugaser vd., 2005; Wu vd., 2007)
HLA-G (MHC sınıf I)	-	(Sarugaser vd., 2005)
STRO-1	-	(Baksh vd., 2007; Sarugaser vd., 2005)
OCT-4 (oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü)	-/+	(Sarugaser vd., 2005; Weiss vd., 2006)
Nanog	+	(Carlin vd., 2006; Weiss vd., 2006)
SSEA-4 (evreye özgü embriyonik antijen-4)	-	(Sarugaser vd., 2005)
Sox-2 (SRY-box-2)	+	(Carlin vd., 2006; Weiss vd., 2006)

^a: Referanslar arasında çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Kısaltmalar; HLA: İnsan lökosit antijeni; MHC: Majör histokompatibilite kompleksi.

iGK-MSH; CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD166 gibi belirteçleri ifade ederken (Dominici vd., 2006), CD34 ve CD45 gibi hematopoietik belirteçler açısından negatiftir (Arufe vd., 2011; Chon vd., 2013). CD14, CD19, HLA-DR belirteçleri de negatiftir (Baksh vd., 2004). Bu belirteçler, MSH'in göbek kordonu dokusundan ayrıştırılması açısından önemlidir. Ayrıca, OCT3/4 ve SSEA-4 gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadelerinin, bu hücrelerin pluripotent özelliklerini desteklemektedir (Arufe vd., 2011). PVS hücreleri ise CD146, NG-2 (Nöral/Glial Antijen-2) ve PDGFR- β biyobelirteçlerini ifade eder (Crisan vd., 2009; Crisan vd., 2008).

Stromanın ekstraselüler matriks bileşimi, göbek kordonu stromasının bir diğer kritik yönüdür. Bu matriks; kollajen, hyaluronik asit, dekorin, versikan, GAG'lar ve proteoglikanlar olmak üzere ekstraselüler matriks bileşenlerini içerir ve bu bileşenler, göbek kordonu stromasının benzersiz mekanik özelliklerine ve biyolojik işlevlerine katkı sağlayabilecek özelliktedir (Jurewicz vd., 2012). Bu bileşenlerin varlığı, sadece yapısal bir bütünlük sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre davranışları; özellikle de hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını etkiler. Örneğin, ekstraselüler matriks bileşenlerinin dinamikleri; göbek

kordonundaki vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşmasını düzenlemekte ve hücreyel sinyalizasyon ile ekstraselüler matriks kompozisyonu arasındaki etkileşimi sağlamaktadır (Nandadasa vd., 2015).

Diğer bir taraftan stroma kollajen tip I, III, IV ve VI içerir ve bu sayede mekanik desteğin yanı sıra hücre adezyonunu düzenler. İVS'de kalın demetler halinde kollajen lifleri oldukça fazlayken elastik lifler göbek kordonunda bulunmaz. Kollajenin kimyasal veya organik çözücülere karşı son derece düşük çözünürlüğe sahip olması GAG'lar ve proteoglikanlarla güçlü iyonik bağlar oluşturduğunu ve bu sayede stromaya yüksek derecede mekanik dayanıklılık kazandırdığını göstermektedir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Kollajen liflerinin bölgesel dağılımı ilk kez Nanaev (1997) tarafından tanımlanmıştır (Nanaev vd., 1997). Subamniyotik ve intervasküler bölgelerde, damar duvarlarında kollajen tip I, III ve VI'nın bulunduğu gösterilmiştir (Nanaev vd., 1997).

Göbek kordonu hücrelerinin kollajen profilleri ilerleyen yıllarda pek çok çalışmada ayrıntılandırılmıştır. Tip IV kollajen, hem göbek epitelinin bazal membranında hem de SAS hücrelerinin dış laminasında tespit edilirken, tip VII kollajen sadece son dönem kordon epitelinin bazal kısmında sınırlı olarak bulunur. Özellikle tip I ve tip III kollajenlerin İVS'de ve arter duvarında en fazla bulunan formlar olduğu belirlenmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Blanco-Elices (2022) ise PVS'de tip III ve IV kollajen düzeylerinin göbek kordonunun diğer stromalarına göre en yüksek olduğunu raporlamıştır (Blanco-Elices vd., 2022).

Göbek kordonu stromasında belirli proteinlerin ve sinyal moleküllerinin varlığı da incelenmiştir. Göbek kordonu stroması, hücreyel büyüme ve farklılaşma süreçlerini düzenleyen çeşitli büyüme faktörlerini içerir. Örneğin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve transformasyon büyüme faktörü-beta (TGF- β) ifadesinin, iGK-MSH'nin farklılaşmasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Chon vd., 2013; Fernandez-Pernas vd., 2016; Fong vd., 2014). VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ise damar gelişimini destekler (Sarugaser vd., 2005). HGF (hepatosit büyüme faktörü) doku yenilenmesini ve immünmodülasyonu destekler (Weiss vd., 2006). Bu büyüme faktörleri, sadece hücrelerin yaşamını ve proliferasyonunu teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda farklılaşma potansiyellerini de etkiler (Fernandez-Pernas vd., 2016).

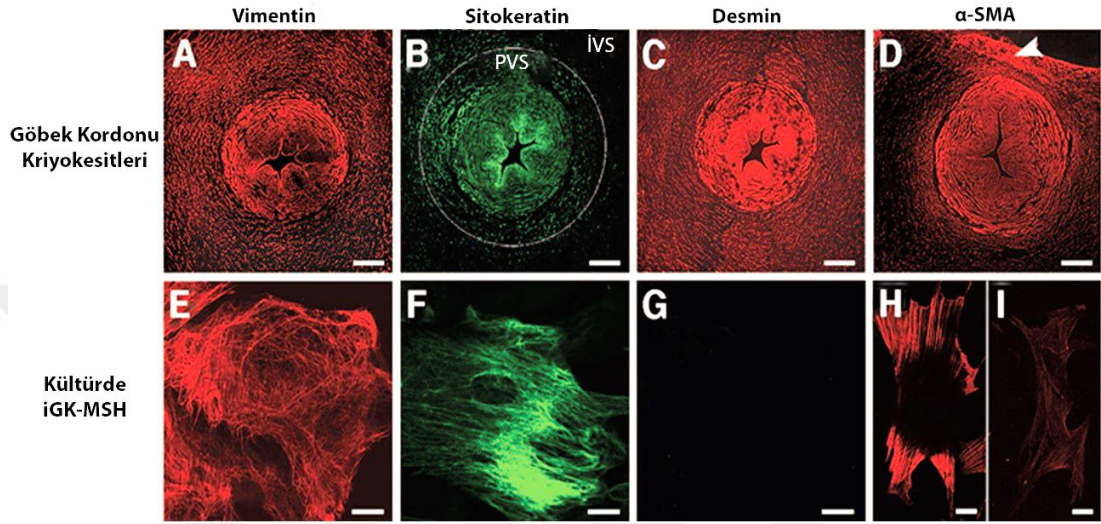
Ge (2024) insan göbek kordonu yüzey epitel hücrelerini (iGK-EH) ve iGK-MSH proteomiks düzeyinde inceleyerek terapötik potansiyellerinin karşılaştırılmayı amaçlamıştır (Ge vd., 2024). iGK-EH epitel hücrelerine özgü, kaldırım taşı benzeri bir morfolojiye sahipken, iGK-MSH iğsi bir görünüme sahiptir. iGK-EH epitel belirteçleri olan CD324,

CD326 taşıırken, iGK-MSH mezenkimal belirteçler olan CD90, CD73, CD105 ifade eder. iGK-MSH; hücre dışı matriks organizasyonu, kollajen lif organizasyonu, hücre yapışması ve anjiyogenez ile ilişkili proteinlerde zenginleşmiştir. iGK-EH ise keratinizasyon, hücre-hücre yapışması ve epidermis gelişimi ile ilişkili proteinleri daha fazla ifade eder. Her iki hücre tipi de anjiyojenik potansiyel ve antioksidan özelliklere sahiptir, ancak iGK-EH daha yüksek antioksidan kapasite gösterir (Ge vd., 2024).

Can ve Karahüseyinoğlu'nun (2007) yayınladıkları derlemede de ele alındığı üzere yapısal incelemeler, immünohistokimyasal analizler ve in vitro fonksiyonel araştırmaların, SAS, İVS ve PVS arasındaki hücre yoğunluğu ve özelliklerinde belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Bu durum, söz konusu bölgelerin farklı embriyolojik kaynaklardan türemiş olabileceği düşüncesini gündeme getirmektedir. Hücre yoğunluğu, SAS'da düşük düzeydeyken, PVS'de en yüksek düzeye ulaşır. Ayrıca, İVS hücrelerinin, PVS hücrelerine kıyasla daha uzun olduğu ve daha fazla sitoplazmik uzantıya sahip olduğu bildirilmiştir. İVS'de yer alan myofibroblast yapısındaki hücrelerin, çevreleyen damarların düz kas hücrelerinden türediği veya mevcut fibroblast popülasyonundan farklılaşmış olabileceği öne sürülmektedir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Ayrıca SAS, İVS ve ven ve arterlerin PVS bölgelerindeki hücrelerin fenotipik olarak birbirlerinden farklı olduğunun yanı sıra perivasküler hücrelerin proliferatif aktivitesinin daha fazla olduğu uzun zaman önce belirtilmiştir (Sarugaser vd., 2005).

Göbek kordonunda pozitif ifadeye veya negatif ifadeye sahip bu biyobelirteçlerin yanı sıra α -aktinin ve F-aktin (filamentöz aktin) ifadeleri de göbek kordonu için önem taşımaktadır. F-aktin hücre iskeletinin temel bileşenlerinden biri olan aktin proteinlerinin polimerize halidir. α -aktinin ise aktin filamanlarını çapraz bağlayan bir proteindir ve hücre iskeletinin organizasyonunda rol alır. α -aktinin, mezenkimal hücreler, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde pozitif olarak bulunur. İmmünöfloresan işaretlemelerde göbek kordonu stromasında ifadelenen vimentin, mezodermal kökenli hücrelerde bulunan; sitokeratinler ise ekto-/endodermal kökenli epitel hücrelerinde bulunan bir protein grubudur. Vimentin tüm İVS ve PVS'de eşit olarak dağılım gösterirken sitokeratin epitel hücrelerinde en güçlü boyanma, PVS hücrelerinde yoğun boyanma, İVS hücrelerinde ise çok az boyanma veya boyanmama sergilemiştir (Karahuseyinoglu vd., 2007). Miyojenik bir ara filaman proteini olan desmin ifadesi; vimentin ile benzerlik gösterirken; α -SMA özellikle PVS'de ve İVS'de daha fazla pozitif bulunmuştur. Kültürü yapılmış iGK-MSH'de vimentin ifadesi gösterilmiş; sitokeratin ifadesi ise yalnızca tip-1 hücrelerde bulunmuştur. Desmin ifadesi hücrelerin hiçbirinde görülmemiş; α -SMA ifadesi ise yalnızca erken pasajdaki kültür hücrelerinde

pozitif bulunmuştur, sonraki pasajlarda ise ifadesi gözlemlenememiştir (Karahuseyinoglu vd., 2007). Doku kesitlerindeki tüm stroma hücrelerinde yaygın desmin pozitifliğinin tersine kültür hücrelerinde ifade eksikliğinin muhtemelen izolasyon teknikleri ve/veya kültür koşulları nedeniyle desmin sentezinin azaldığını çağrıştırmaktadır (Şekil 1.4) (Karahuseyinoglu vd., 2007).



Şekil 1.4: Göbek kordonu biyobelirteçlerinin göbek kordonu kesitlerindeki ve kültür iGK-MSH'deki immünfloresan işaretleme farklılıkları. Ölçüm çubukları: 20 µm (Karahuseyinoglu vd., 2007).

Göbek kordonu stroma hücrelerinde orta düzeyde intrasitoplazmik glikojen, lipid damlacıkları ve prokollajen içeren salgı granülleri, dilate ER sarnıçlarıyla iyi gelişmiş bir ER'nin varlığı ve çok sayıda mitokondriyon ve iyi gelişmiş Golgi aygıtının varlığı dikkat çeker (Takechi vd., 1993). Kollajen sentezinde yer alan bir enzim olan prolil-4-hidroksilazın gösterilmesiyle göbek kordonu stroma hücrelerinin kollajen ve diğer matriks bileşenlerinin sentezinden birincil olarak sorumlu olduğu gösterilmiştir. Stroma hücrelerinin yüzeyleri esas olarak tip IV kollajen, laminin ve heparan sülfatlı proteoglikandan oluşan bir dış lamina ile kaplıdır. Laminin, ekstraselüler matriksin önemli bir bileşenidir ve hücrelerin yapışması, farklılaşması, göçü ve sinyal iletimi gibi birçok biyolojik süreçte kritik rol oynar. Laminin, hücrelerin bazal membranlarında ve epitel hücreleri çevresinde pozitifdir. Stroma hücrelerinde myositlere özgü hücre iskeleti filamanı olan desmin de bulunur ve bu da bu hücrelerin fibroblast veya düz kas hücresi yerine gerçek miyofibroblastlar olduğu fikrini desteklemiştir. Aktin, miyozin, desmin ve miyofibroblastların bir belirteci olan düz kas aktini gibi kontraktıl proteinler stroma hücrelerinde farklı şekilde ifade edilirler (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Yukarıdaki bulgulara bağlı olarak, bu hücrelerin hem lif sentezi

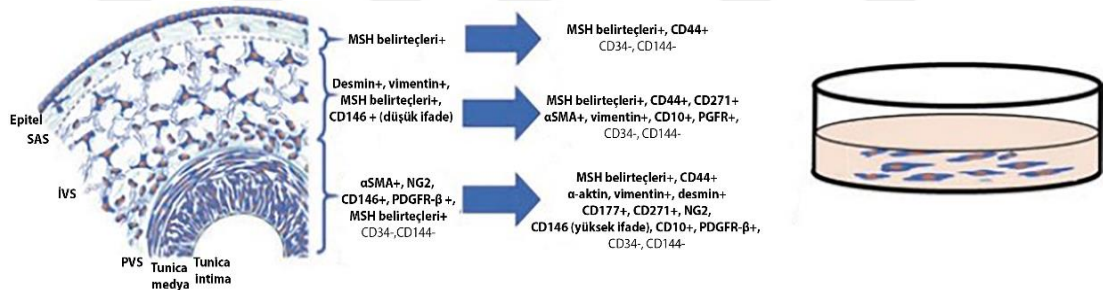
hem de organize hücre iletişimi ve kasılmasıyla ilgili özgün işlevler sergilediklerinden söz etmek mümkündür. Stroma hücreleri tarafından ifade edilen diğer bir ilginç ara filaman ise temel olarak endoderm ve ektoderm kaynaklı epitel hücrelerinde ifade edilen sitokeratindir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Nanaev (1997), stroma hücrelerinde belirgin bir sitokeratin ifadesi saptamazken, epitelde bu proteinin varlığını belirlemiştir (Nanaev vd., 1997). Buna karşın, Can ve Karahüseyinoğlu (2007) perivasküler bölgedeki hücrelerin sitokeratin filamentleri açısından güçlü bir pozitiflik gösterdiğini rapor etmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007).

Göbek kordonu damarlarının media tabakasında bulunan düz kas hücreleri ve stromada bulunan miyofibroblastlar da dahil olmak üzere damar duvarı boyunca uzanan birçok perivasküler hücre tipinin perisitlerle yakın ilişkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler, büyüyen ve olgunlaşan damar sistemi boyunca hücre fenotiplerinin sürekliliğini temsil edebilir. İmmünojenotipik olarak perisitler, damarların subendotel katmanlarındaki anatomik yerleşimleri ve CD146 (MCAM), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü- β (PDGR- β , CD140b), alkalik fosfataz (AP), G protein sinyalleşmesinin düzenleyicisi (RGS5), α -düz kas aktin (α -SMA), desmin ve CD271 gibi belirteçlerden en az birinin ifadesi ile tanımlanır. Yokluğu ise sırasıyla endotel ve hematopoietik belirteçler olan CD31, CD34 ve von Willebrand faktörü (VWF) ve CD144 veya CD45'tir. Adventisiyel hücreler ise CD34 pozitif; CD31, CD146 ve CD45 içerse negatif olarak tanımlanır (Corselli vd., 2012). PVS'den izole edilen hücreler; SAS, İVS ve epitelden arındırılarak kültüre alındığında, uzun sitoplazmik uzantılara sahip fibroblast benzeri bir görünüme sahip olup, 100–300 μ m'ye kadar büyürler (Gauthier-Fisher vd., 2019).

Perisitler vücutta venüller, kapillerler ve arterioller boyunca endotel hücrelerini saran kontraktıl hücreler olarak tanımlanmıştır. Perisitler göbek kordonunun PVS'sında yer alan hücrelerdir ve NG2, desmin, CD146, α -SMA ve PDGFR- β belirteçleri açısından pozitifler (Gauthier-Fisher vd., 2019). Endotel ve hematopoietik hücrelerin belirteçleri olan CD31, CD34, von Willebrand faktörü (vWF), CD144 ve CD45 perisitlerde bulunmaz. Perisitlerin sadece homeostaz düzenleyicileri olarak değil; aynı zamanda bulundukları dokuların onarımı için bir hücre kaynağı olarak da işlev gördükleri düşünülmektedir. İn vitro ortamda adventisya hücrelerinin perisit benzeri hücre fenotipi kazanabilmesiyle adventisyadaki hücrelerin perisit öncüllerinin kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. Adventisya hücreleri CD31, CD45 ve CD146 belirteçlerini ifade etmezler. CD146'nın İVS ve PVS arasındaki ifade farkı perivasküler hücrelerin endotel hücrelerine yakınlığına atfedilmiştir. Term göbek

kordonunda CD34 ve CD144 sadece endotel hücre katmanını işaretlemekte olup, PVS ve İVS bu belirteçler açısından negatiftir (Gauthier-Fisher vd., 2019).

Yayınlanmış hücre ayrıştırma protokolleri; epitel, İVS ve damarların dahil edilip edilmemesi, enzimatik sindirim veya eksplant kültür yöntemlerine göre değişmektedir. Schugar (2009) kollajenaz sindiriminin, MSH ile ilişkili belirteçleri (CD44, CD105, CD73, CD90) ifade eden izole edilmiş hücrelerin oranını artırdığını, ancak damar hücreleri ile ilişkili belirteçlerin (CD34, CD144 ve CD146) oranını azalttığını göstermiştir (Schugar vd., 2009). Bu immünofenotip farklılıkları, 1-3 hafta boyunca kültürde devam etmiş ve sadece kollajenaz ile izole edilen popülasyon, *in vitro* ortamda osteojenik ve kondrojenik olmak üzere farklı hatlara farklılaşma yeteneği göstermiştir (Schugar vd., 2009). Başka bir çalışmada ise hücreler üç farklı stroma bölgesinden izole edilmiştir. İVS hücreleri, CD29, CD44 ve CD73 ve CD24 ve CD108 gibi, MSH'ni ayırmaya yardımcı olan işaretleyicilerin artırılmış ifade düzeylerini göstermiştir. İlginç bir şekilde, bu çalışmada, tüm bölmelerden izole edilen hücrelerin %90'ından fazlası perisitle ilişkili CD146 işaretleyicisi ile pozitif ve İVS ve PVS'de artırılmış ifade düzeyleri izlenmiştir (Subramanian vd., 2015). Bu belirteçlerin *in situ* ve *in vitro* ifadelenecekleri aşağıda özetlenmiştir (**Şekil 1.5**) (Gauthier-Fisher vd., 2019).



Şekil 1.5: Göbek kordonu biyobelirteçlerinin ifadelerinin *in situ* ve *in vitro* kültür ortamlarında karşılaştırılması (Gauthier-Fisher vd., 2019).

Sonuç olarak, göbek kordonu stromasının biyobelirteçleri; hücreler, genetik imzalar, ekstraselüler matriks bileşenleri ve salgılanan faktörlerden oluşan geniş bir yelpazeyi kapsamakta olup, bu benzersiz dokunun işlevsel özelliklerini tanımlamaktadır. Göbek kordonu stromasının moleküler ve hücre biyolojisine yönelik devam eden araştırmalar, fetal gelişimi anlamamızı derinleştirmekle kalmayıp, aynı zamanda rejeneratif tıp alanında yenilikçi terapötik uygulamaların önünü açmaktadır. Göbek kordonu biyolojisinin karmaşıklıklarını çözmeye devam ettikçe, bu biyobelirteçlerin tanımlanması ve

karakterizasyonu hem klinik uygulamaları hem de bilimsel bilgiyi ilerletmede kilit rol oynayacaktır.

1.2 Telositler

Telositler, ilk kez 15 yıl önce keşfedilmiş, interstisyel dokuda bulunan ve tipik uzun, ince sitoplazmik uzantıları (telopodlar) ile çevre doku ve hücrelerle etkileşime giren bağ dokusu hücreler olarak tanımlanmıştır (Popescu ve Faussone-Pellegrini, 2010). Bu hücreler, “telopod”ları ile tanımlanır ve kök hücreler, bağışıklık hücreleri ve endotel hücreler de dahil olmak üzere komşu hücrelerle kapsamlı hücreler arası iletişim ve etkileşim sağlarlar (Gevaert vd., 2012; L. Li vd., 2014; Popescu ve Faussone-Pellegrini, 2010). Oluşan bu hücreler arası iletişim ağları sayesinde doku homeostazı, yenilenme ve yenileyici süreçlerde önemli roller üstlenirler (Cretoiu ve Popescu, 2014). Yapısal ve işlevsel özellikleri sayesinde telositlerin doku homeostazı, rejenerasyon ve hastalık süreçlerinde önemli bir düzenleyici unsur olduğu gösterilmiştir (Cretoiu vd., 2012).

"Telosit" terimi, Popescu ve Faussone-Pellegrini tarafından yapılan öncü çalışmada resmî olarak benimsenmiş ve bu hücreler, uzun ve ince sitoplazmik uzantılar (telopodlar) içeren özgün yapısal özellikleriyle tanımlanmıştır (Faussone Pellegrini ve Popescu, 2011; Huwait, 2020). Popescu ve ekibi tarafından ilk olarak tanımlanan telositler, fiziksel yapıları temel alınarak "telosit" olarak isimlendirilmiştir. Bu terim, Yunanca "telos" (amaç, son veya tamamlanma) kelimesinden türetilmiştir. En yalın tanımıyla, telositler "telopodlara sahip hücreler" olarak ifade edilmektedir (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Zamanla bu hücrelerin diğer interstisyel hücrelerden farklı özgün yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğu fark edilince Cajal hücreleri "telosit" adını almıştır (Huwait, 2020).

Telositlerin elektron mikroskopisi ile detaylandırılan morfolojik yapıları, telositlerin fibroblastlardan ve diğer mezenkimal hücrelerden farklı benzersiz özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Gherghiceanu ve Popescu, 2011). Fonksiyonel olarak; kök hücre nişi organizasyonuna katkıda bulunmaları, hücreler arası sinyalleşme süreçlerinde yer almaları ve doku rejenerasyonunu desteklemeleri nedeniyle telositler; kardiyak, pulmoner, gastrointestinal ve sinir sistemlerinde kritik roller oynayabilir (Manetti vd., 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalar, telositlerin patofizyolojik süreçlerde; özellikle inflamasyon, fibrozis ve kanser mikroçevresinin düzenlenmesinde önemli bir düzenleyici unsur olabileceğini ortaya koymuş, bu da onları potansiyel terapötik hedefler haline getirmiştir (Smythies, 2015). Bu hücrelerin sahip oldukları özellikler, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde önemli görevler almalarını sağlamakta olup, özellikle yenileyici tıp alanında

terapötik potansiyelleri üzerine daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir (Varga vd., 2019).

1.2.1 Telositlerin Tarihçesi

Telositlerin keşfi, hücre biyolojisi ve histolojinin gelişimiyle paralel olarak ilerleyen bir süreç olup, bilim dünyasında büyük ilgi uyandırmıştır. Bu hücrelerin keşfi, 21. yüzyılın başlarına dayanır ve araştırmacılar, bu hücrelerin benzersiz yapısal ve işlevsel özelliklerini fark etmeye başlamıştır. İlk olarak 2010 yılında tanımlanan telositler, morfolojik benzerlikleri ve histolojik yapıları nedeniyle başlangıçta “Cajal benzeri interstisyel hücreler” (intestinal Cajal-like cells) (ICLC) olarak adlandırılmıştır. Bu hücreler, ilk kez 1911 yılında memeli gastrointestinal sisteminde tanımlanan Cajal interstisyel hücreleriyle (intestinal Cajal cells) (ICC) benzer özellikler göstermektedir (Wang vd., 2016). İspanyol nöroanatomist Santiago Ramon y Cajal, (1852-1934) 19. yüzyılın sonunda gastrointestinal sistemde ve diğer memeli dokularda özel bir hücre tipi olan “nöral interstisyel hücre”yi metilen mavisi vital boyama ve/veya Golgi impregnasyon yöntemi kullanarak raporlamıştır. Bu hücrelerin, sinir uçları ile düz kas hücreleri arasında yer aldığı ve interstisyumda düz kas hücreleri ve sinir lifleriyle iç içe geçmiş şekilde bulunduğu belirtilmiştir (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Cajal, bu hücrelerin sitoplazmik süreçleri arasında bir akson yapısı ayırt edememiş olmasına rağmen, onları olası yardımcı nöronlar olarak değerlendirmiştir. Bu tür hücreler ilerleyen yıllarda genellikle interstisyel Cajal hücreleri (ICC) olarak adlandırılmıştır (Popescu, Ciontea, vd., 2005). Cajal benzeri interstisyel hücrelerin üreter, mesane, vas deferens, fallop tüpü, kan damarları, lenf damarları, pankreas, prostat gibi dokularda bulunduğu 2005 yılı öncesinde rapor edilmiştir. Taxi ve çalışma arkadaşları 1960’lı yıllarda geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanarak elde ettikleri ince yapı düzeyindeki kanıtlarla, interstisyel Cajal hücrelerinin (ICC) nöronlardan, Schwann hücrelerinden, düz kas hücrelerinden, fibroblastlardan ve makrofajlardan farklı, yeni bir hücre türü olduğunu ortaya koymuşlardır (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Ciontea (2005) gebe ve gebe olmayan kadınların miyometriyumlarında Cajal benzeri interstisyel hücrelerin varlığını c-Kit (CD117) pozitiflikleriyle göstermiş ve düz kas ve sinir hücreleriyle temas halinde olduğunu ve kılcal damarlarla bir ağ yapısı oluşturduğunu göstermişlerdir (Ciontea vd., 2005). Bu çalışmada bu hücreleri ayırt etmede bu hücrelerin interstisyumda bulunmasının, metilen mavisi ile vital boyanmanın ve çok sayıda monoliform uzun uzantıların önemli kriterler olduğunu vurgulamışlardır (Popescu, Andrei, vd., 2005).

Popescu (2005) bir dizi yöntem ve immün belirteç kullanarak insan tuba uterinasında bu hücrelerin varlığını ortaya koymuştur (Popescu, Ciontea, vd., 2005). Telositlerin diğer

organlardaki varlığı hakkında ise 2000’li yıllarda birçok makale yayınlanmıştır. Özellikle Popescu ve Cretiou tarafından bu hücreler pankreasta, meme bezinde ve miyokard interstisyumunda gösterilmiştir. Ayrıca, insan ve sıçan uterusunda da var oldukları bulunmuştur (Cretoiu vd., 2006).

Telositler 2010 yılında Faussone-Pellegrini ve Bani’nin yaptığı iki çalışmada yer bulmuştur (Bani vd., 2010; Faussone-Pellegrini ve Bani, 2010). Araştırmacılar kalpteki kardiyomiyositler ve telositler arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında yetişkin kalpte, kardiyomiyositlerle ve subepikardiyal kardiyojenik nişlerdeki kalp kök hücreleriyle yakın ilişki içinde bulunan bir stroma hücre popülasyonunun varlığını göstermiştir. Parankima hücrelerini saran uzun sitoplazmik uzantılara sahip bu hücreler için “telosit” terimini kullanmışlardır. Pellegrini çalışmasında stroma hücreleri arasında, daha önce Cajal benzeri interstisyel hücreler olarak tanımlanan ve uzun, ince uzantıları (telopod) nedeniyle son zamanlarda telositler olarak adlandırılan özel bir hücre popülasyonundan söz etmiştir (Bani vd., 2010; Faussone-Pellegrini ve Bani, 2010).

Sonraki yıllarda Gherghiceanu ve Popescu’nun insan meme bezlerinde Cajal benzeri interstisyel hücrelerin varlığını araştırmak amacıyla yaptığı çalışmada bu hücreleri tanımlayan birkaç standart oluşturmuşlardır. Hücre hacminin yaklaşık %2,5 kadarının kaveola yapısından, %10’unun mitokondriyon ve %2-3’ünün de ER, ara filaman ve mikrotübül yapısından oluştuğunu raporlamışlardır. Hücrelerin birbirlerine ve hedef hücrelere (sinir hücreleri, kılcallar, immünreaktif hücreler) “stromal sinaps” birimleriyle yakın temas kurduğunu görmüşlerdir. Hücrelerin iki veya daha fazla uzun ve monoliform (boncuk dizisi, dizi halinde) uzantılara sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin sitoplazmik uzantılarını kullanarak birbirleriyle temas halinde oldukları üç boyutlu bir ağ yapısını ortaya koymuşlardır (Gherghiceanu ve Popescu, 2005).

Telositlerin tanımlanması, özellikle CD34 belirteci kullanılarak yapılan immünohistokimyasal çalışmalar sayesinde mümkün olmuştur. Bu teknik, telositlerin diğer hücrelerden ayırt edilmesini sağlamış ve bu hücrelere yönelik bilimsel ilgiyi artırmıştır (Diaz-Flores, Gutierrez, Garcia, Gonzalez-Gomez, Carrasco, vd., 2020; Rosa vd., 2019). Bu yaklaşım, telositlerin farklı organlardaki dağılımını ve doku homeostazı ile rejenerasyon süreçlerindeki potansiyel rollerini araştırmaya yönelik çalışmaları teşvik etmiştir (Kondo ve Kaestner, 2019).

Telositler üzerine yapılan araştırmalar, bu hücrelerin patolojik durumlarla da ilişkili olabileceğini göstermektedir. Telosit fonksiyonlarındaki bozuklukların çeşitli hastalıklara yol açabileceği fikri, "telositopatiler" kavramının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Telositopatiler,

telosit popülasyonlarındaki işlevsel bozukluklarla tanımlanan hastalıkları ifade etmektedir. Bu yeni araştırma alanı, telositlerin hem normal koşullardaki hem de hastalık durumlarındaki önemini vurgulamakta ve rejeneratif tıpta potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilmelerini sağlamaktadır (Varga vd., 2019).

Sonuç olarak, telositlerin tarihi; başlangıçta ICLC olarak tanımlanmaları, "telosit" terimiyle kabul edilmeleri ve farklı dokulardaki çeşitli rollerinin keşfi ile şekillenmiştir. Araştırmalar, bu özgün interstisyel hücrelerin karmaşıklığını giderek telositlerin hücre biyolojisi ve yenileyici tıp alanlarında önemli bir araştırma odağı haline gelmesini sağlamaktadır.

1.2.2 Telositlerin Morfolojik Özellikleri

2005 yılında Popescu (Popescu, Ciontea, vd., 2005) ve ekibinin telositleri tuba uterinada tanımladığı çalışmada bu hücrelerin genel morfolojik görünümüne ilişkin sonuçlar da yer almıştır (Popescu, Ciontea, vd., 2005). Bunlardan ilki bu hücrelerin dokuda sadece stromada bulunuyor olması ve sinir demetleri, epitel hücreleri, düz kas hücreleri veya kılcal damarlar gibi hedefleriyle yakın temas halinde olmalarıdır. Sayıları 1'den 5'e kadar olabilecek fakat sıkça 2-3 sayıda gözlemlenen ve uzunlukları onlarca μm 'den yüzlerce μm 'ye uzayabilecek uzantılardan; sitoplazmik süreçlerin varlığından söz etmiştir. Telositlerin şekli değişkenlik gösterebilir; hücre gövdeleri fusiform, üçgen veya oval şekillerde bulunabilir ve telopodları aracılığıyla oluklu bağlantılar üzerinden birbirleriyle ağlar oluşturabilirler (Abd-Elhafeez ve Soliman, 2017; Luesma vd., 2021). Bu sitoplazmik uzantıların genellikle monoliform bir görünüm sergilediğini ortaya koymuştur. Bu uzantılarda mitokondriyon ve kalsiyum iyon kanallarını barındıran genişlemiş bölgelerin varlığından da söz etmiştir. Kesintili bazal lamina ve temas halinde oldukları hücrelerle oluklu bağlantı birimleri aracılığıyla etkileşimde oldukları bulunmuştur. Mitokondriyonların bu hücrelerin hacminin %5-10'unu, ER'nin %1-2'sini ve kaveola yapısının %2-4'ünü oluşturduğunu hesaplamışlardır. Hücre iskeleti elemanlarında ara ve ince filamanlara ve mikrotübüllere rastlanırken miyozin kalın filamanı rapor edilmemiştir (Popescu, Ciontea, vd., 2005).

Kostin ve Popescu (2009) miyokardiyumdaki interstisyel Cajal benzeri hücrelerin (telositlerin) ince yapısını tanımlamak için yaptığı çalışmada bu hücrelerin yapısal özelliklerini benzerlik ve farklılıkları açısından fibroblast ve interstisyel Cajal hücrelerle karşılaştırmıştır (**Çizelge 1.2**) (Kostin ve Popescu, 2009).

Çizelge 1.2: İnterstisyel Cajal hücreleri, telositler ve fibroblastların morfolojik benzerlik ve farklılıkları (Kostin ve Popescu, 2009).

		İnterstisyel Cajal Hücreleri	Telositler (İnterstisyel Cajal Benzeri Hücreler)	Fibroblastlar (in situ)
	Genel özellik	İğ biçiminde ve büyük boyutlu hücreler. Oval hücre yapısı, çekirdek ve geniş sitoplazma	Armut, iğ, üçgen veya yıldız hücre şekli; çekirdek ve az miktarda sitoplazma	Pleomorfik (fenotipik heterojenite) hücre gövdesi, çekirdek ve geniş sitoplazma
	Çekirdek (Kromatin)	Oval, ökromatin	Oval, heterokromatin veya ökromatin	Oval, çoğunlukla ökromatin
Organel	Mitokondriyon	Çok fazla, sitoplazmanın her yerine dağılmış	Hücre hacminin %5-10'unu kaplar; perinükleer sitoplazmada birkaç tane bulunur ve genellikle uzantıların genişlemelerinde yer alır.	Çok sayıda
	ER	Uzunlamasına yayılmış granülsüz ER ve birkaç tane granüllü ER sisternası	Granülsüz ER hücre hacminin <%1'ini oluşturur, granüllü ER (~%1-2) içerir. ER genellikle hücre uzantılarının genişlemelerinde yer alır.	Granülsüz ER yok, granüllü ER belirgin (hücre hacminin %8-12)
	Golgi aygıtı	Orta boyda	Küçük	Belirgin
Hücre Uzantıları	Sayı	>2	2-5	Genellikle 2
	Uzunluk	Değişken (µm)	Uzun (onlarca ila yüzlerce µm)	Kısa (µm)
	Kalınlık	Hücre gövdesinden başlangıçta kalın, ardından kademeli olarak incelme	Çok ince (~0.2–0.4 µm). Hücre gövdesinden başlayarak aniden incelme. Moniliform bir görünümle düzensiz çap: genişlemeler, ince dar segmentlerle, yer alır.	Kalın bir çıkışın ardından kademeli incelme
	Profil	İç içe geçen	Labirent	Üçgenimsi
	Dallanmalar	Birkaç	Çok sayıda	Belirlenmemiş
	Hücre iskeleti filamanları	Hücre iskeleti filamanları	Mikro ve ara filamanlar	Ara filamanlar
	Kaveola	Çok	Çok sayıda (~%2 sitoplazmik hacim)	Neredeyse yok
	Ca⁺² iyon kanalları	Keşfedilmemiş	Kaveola, ER ve	Keşfedilmemiş

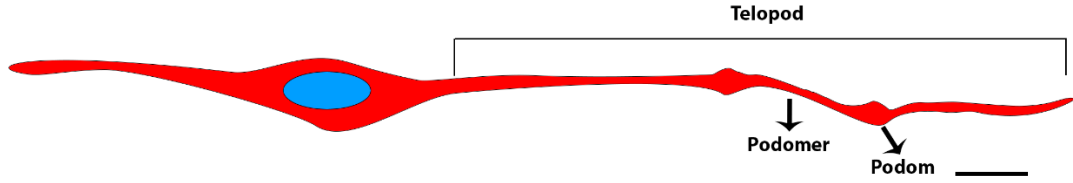
			mitokondriyonlardan oluşur. Uzantıların genişlemelerinde yer alır.	
	Mikroveziküller	Belirlenmemiş	Var	Belirlenmemiş
	Bazal lamina	Kesintili	Değişken; genellikle kesintili	Yok
	Özel belirteçler	c-Kit (CD34 ile eş yerleşim)	CD34 (c-Kit ile değişken eş yerleşim)	Özel bir belirteç yok (örneğin; vimentin pozitif)
	Hücre bağlantıları	Birbirleriyle ve/birlikte düz kas hücreleri ve sinir hücreleriyle arasında oluklu bağlantılar	Sıkça birbirleriyle ve düz kas hücreleriyle oluklu benzeri bağlantılar; sinir uçları ve kılcak damarlarla yakın bir komşuluk. Bağlayıcı hücreler ve immünreaktif hücrelerle 'stromal sinapslar'	Farklı hücrelerle yakın temasları yok

Telositler Cajal benzeri hücreler değildir; çünkü diğer tüm interstisyel hücrelerden, çok ince (ışık mikroskopunun çözünürlük sınırının altında), son derece uzun (onlarca-yüzlerce mikrometreye kadar) ve moniliform bir görünüme (birçok genişleme içerir) sahip olan, hücre gövdesi uzantıları telopodları ve kaveola yapıları içerirler (Gherghiceanu vd., 2010).

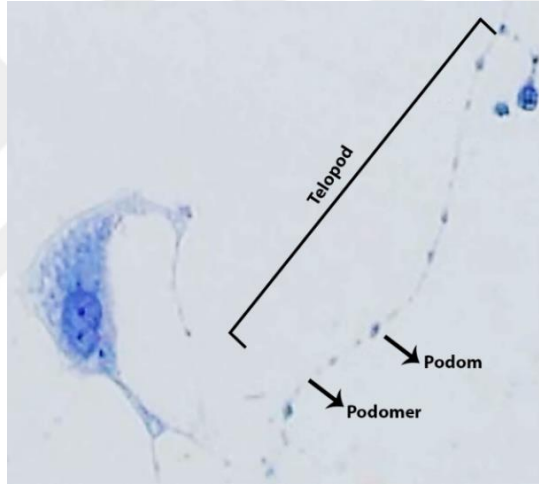
Günümüzde ise telositleri ayırt ederken kullanılan özgün morfolojik özellikler aşağıda özetlenmiştir.

Telositlerin morfolojik yapıları, bu hücrelerin işlevsel rollerini anlamada önemli bir temel oluşturur. En belirgin yapı özelliklerinden birisi uzun ve ince sitoplazmik uzantılar olan telopodların varlığıdır. Telopodlar, telositlerin temel yapısını yansıtır ve onların çevresindeki doku mikroçevresi ile olan etkileşimlerini belirler. Telopodlar, iki ana segmentten oluşur: genişlemiş bölümler (podomlar) ve ince segmentler (podomerler). Podomerlerin ortalama çapı $0,1 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (min: $0,003 \mu\text{m}$, maks: $0,24 \mu\text{m}$) olarak ölçülmüştür. Podomlar, telopodların şişkin kısımlarını temsil ederken, podomerler ise ince, silindirik uzantılardır (Manetti vd., 2014; Rosa vd., 2022). Telopodlar; mitokondriyon ve ER barındırır ve hücre zarı boyunca kaveola yapıları dikkati çekicidir. Sitoplazmanın ince parçaları podomere göre daha genişlemiş Ca^{+2} giriş-çıkış kanallarını içeren podomları içerir. Aynı zamanda mitokondriyon, granüllü ve granülsüz ER ve kavelolar içerir. Podom ve podomerlerin görünümü sayesinde telopodların kendilerine özgü “ipte boncuk görünümü” oluşur. Hücre uzantılarının kalınlığı ortalama $0,2 \mu\text{m}$ 'dir (min: $0,03 \mu\text{m}$; maks: $0,24 \mu\text{m}$) ve

üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturan labirent benzeri bir organizasyona sahiptir (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Yukarıda tanımlanan telosit görünümüne ait çizim aşağıda verilmiştir (**Şekil 1.6**). Xiangdong ve Cretoiu (2016) telositleri kesitlerde metilen mavisıyla göstermiş, podom ve podomerleri belirtmiştir (**Şekil 1.7**) (Xiangdong ve Cretoiu, 2016).



Şekil 1.6: Telositin temel yapı özellikleri. Telositlere özgü uzun ince telopod yapısı ve bu yapıdaki genişlemiş bölgeler (podom) ve ince bölümler (podomer) gösterilmiştir. Ölçüm çubuğu: 100 µm.



Şekil 1.7: Metilen mavis boyanmış kesitlerde telosit görünümü (Xiangdong ve Cretoiu, 2016).

Podom ve podomer yapısı telopodların moniliform bir görünüme sahip olmasına yol açar ve telositlerin ayırt edici özelliği haline gelir (Dawidowicz vd., 2015; Mazzoni vd., 2019). Telopodların uzunluğu birkaç yüz mikrometreye kadar ulaşabilir ve hücreler arası bağlantıların kurulmasında önemli rol oynar. Telopodlar kendi aralarında üç boyutlu bir ağ oluşturacak şekilde dallanarak, telositlerin çevredeki hücrelerle bağlantı kurmalarına ve hücreler arası iletişimi düzenlemelerine olanak tanır (Alunno vd., 2015). Telopodlar; telositlerin düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve bağışıklık hücre tipleri ile bağlantı kurmasını sağlar (Manetti vd., 2014). Bu yapısal özellik, telositlerin interstisyel hücrelerle olan etkileşimini ve doku içerisindeki rolünü anlamada önemlidir. Telopodlar, genellikle bir hücrede 1-5 adet bulunur. Bu sayı, hücrenin bulunduğu dokuya ve fonksiyonel ihtiyacına göre değişebilir (Xu vd., 2019). Bazı özel aksonlar hariç vücuttaki en uzun hücresel

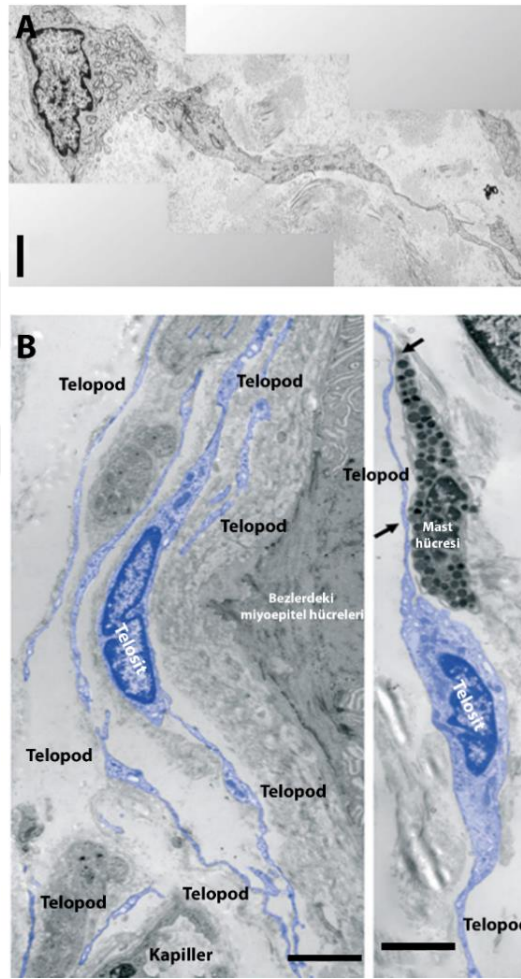
uzantılardır. Telopodlar, dendritik bir ağ şeklinde dallanarak, telositlerin komşu hücreler ile etkileşim kurlmalarına olanak tanır. Telopodların oluşturduğu bu üç boyutlu ağ, hem yapısal destek sağlar hem de hücrel sınıyalizasyonu düzenler. Telositlerin telopodlarındaki iki veya daha fazla kola dallanma özelliğı geniş bir hücrel ağ oluşumunu destekler ve üst üste gelme özellikleri, doku mikroçevresinde bir labirent yapısı oluşturarak, doku bütünlüğü ve fonksiyonel stabilite için önemli bir katkı sağlar (Alunno vd., 2015; Dawidowicz vd., 2015; Hussein ve Mokhtar, 2018). Bu dallanma, telositlerin çok sayıda hücre ile etkileşimde bulunmalarına, hücreler arası iletişimi artırarak yapısal bütünlüğü sağlamalarına ve hasar sonrası iyileşme süreçlerinde aktif rol almalarına imkan verir (Li vd., 2019; J. Liu vd., 2016; T. Liu vd., 2016).

Telositlerin hücre gövdesi genellikle küçük olup, oval veya üçgen şeklinde olabilir. Hücre gövdesi, telositin en küçük kısmıdır ve genellikle telopodların uzunluğu ile kıyaslandığında, bu küçük boyut telositlerin ayırt edici özelliklerinden biridir. Hücre gövdesinde yer alan çekirdek, telositlerin işlevsel durumunu yansıtan heterokromatik bir yapıya sahiptir. Çekirdek, hücre hacminin yaklaşık %25-30'luk bir bölümünü kaplar (Bani vd., 2010; Li vd., 2019; T. Liu vd., 2016). Mitokondriyonlar, hücre hacminin yaklaşık %2'sini oluşturur. Küçük Golgi aygıtı ve ER, hücre hacminin %1-2'sinden azdır. Bu organeller, telositlerin metabolik işlevlerini destekler ve onların hücrel sınıyalizasyon süreçlerine katılmalarını sağlar (Bani vd., 2010; Xu vd., 2019). Telositler çok sayıda ara filaman içerir. Hücre zarında kaveloa bulunur ve bazal lamina kesintilidir. Kaveloalar, hücre hacminin %2-3'ünü oluşturur. Telositlerin küçük hücre gövdesi, uzun telopodlarıyla karşılaştırıldığında, bu hücre türünün ayırt edici bir özelliğidir (Bani vd., 2010).

Dokulardaki telositleri gözlemlemek ve tanımlamak amacıyla bir takım boya türleri kullanılır. İlk çalışmalarda hücre kültürlerinde telositlerin varlığını doğrulamak için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri özgün olmayan metilen mavisi vital boyamasıdır. Bunun yanı sıra, zamanla telositlerin kristal viyole ve gümüş emdirme boylarına karşı belirgin afinite gösterdiği belirlenmiş, ancak bu boyama teknikleri nadiren tercih edilmiştir. Mitokondriye yüksek afinite gösteren Janus yeşili B ve MitoTracker green gibi vital boylar, telositlerin canlılığının değerlendirilmesi ve mitokondriyonlarının yanı sıra telopod yapılarının izlenmesi amacıyla uygulanmıştır (Xiangdong ve Cretoiu, 2016).

Telositler, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak görüntülenebilir ve bu sayede kendilerine özgü hücrel özellikleri ortaya konulabilir. Düşük büyütme TEM telositlerin diğer çevresel hücrelerden belirgin şekilde ayırt edilmesine izin vermez. Yüksek büyütme TEM ise ince yapı ayrıntılarını ortaya koyar, ancak gözlem alanını ciddi şekilde

sınırlandırarak tam bir telositin görüntü alanına sığmasını zorlaştırır. Bu nedenle, tam bir telositin ince yapı detaylarını elde etmek için bir dizi yüksek çözünürlüklü görüntünün birleştirilmesi gerekir. Yine de, telositlerin tanımlanması için en güvenilir yöntem hala TEM'dir. TEM görüntülerinde yapılan ölçümlere göre, hücre gövdesinin ortalama boyutları $9,39 \pm 3,26 \mu\text{m}$ olup, minimum $6,31 \mu\text{m}$, maksimum $16,42 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir (Popescu ve Faussone-Pellegrini, 2010). Telositlerin insan dermisindeki varlığının araştırıldığı çalışmalardan elde edilen TEM görüntüleri aşağıda verilmiştir (**Şekil 1.8**) (Bei, Wang, vd., 2015; Ceafalan vd., 2012).



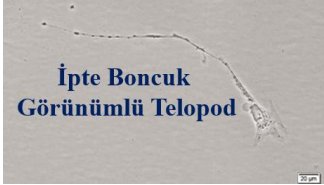
Şekil 1.8: İnsan dermisinden alınan kesitlerde telositlerin görüntüsü (Bei, Wang, vd., 2015) (A). Sitoplazma yapay renklendirilmiştir ve mast hücreleriyle ilişkisi gösterilmiştir (Ceafalan vd., 2012) (B). Ölçüm çubukları: $2 \mu\text{m}$.

TEM'e ek olarak, taramalı elektron mikroskobu (SEM) da telositleri incelemek için kullanılmaktadır (H. Li, S. Lu, vd., 2014). SEM, telopod ağlarının ve diğer hücrelerle olan etkileşimlerinin gözlemlenmesini sağlar (Hussein ve Mokhtar, 2018), telosit ağlarının üç

boyutlu mimarisini belirlemek ve ekstraselüler vezikülleri (EV'ler) analiz etmek için kullanılmıştır (D. Cretoiu, 2016; Cretoiu vd., 2014).

İnterstisiyel hücrelerin başında gelen fibroblastlar ile telositler arasında bir takım yapı ve işlev farkı bulunur. Bunlardan ilki fibroblastların çekirdekleri ökromatik; telositlerin çekirdeğinin ise heterokromatik olması; Golgi aygıtının fibroblastlarda belirgin ve gelişmiş olmasına karşın telositlerde küçük ve inaktif olmasıdır. Fibroblastlarda yoğun bir kollajen sentezi söz konusuyken telositlerin kollajen sentezlediğine ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Telositlerde kaveola (hücre zarı girintileri) gözlemlenirken fibroblastlar böyle bir yapıya sahip değildir. Mitokondriyonlar telositlerde hücre hacminin %2'sini oluştururken fibroblastlar için literatürde bu konuya ilişkin herhangi bir sayısal veri verilmemiştir. ER yoğun kollajen senteziyle ilişkilendirilerek fibroblastlarda hücre hacminin %5–12'sini oluştururken telositlerde ER, hücre hacminin %1-2'sinden azdır. Son olarak, telositlerin ince ve uzun görünümlü hücre uzantıları 200–1000 µm uzunluğundayken fibroblastlar telositlere göre daha kısa ve daha kalın uzantılara sahiptir ve filopodlarının uzunluğu genellikle 20–30 µm'dir (Kang vd., 2015; Wong vd., 2014). Aynı zamanda telositlerin fibroblast kültürleriyle zamana bağlı analizleri, telositlerin bazı ekstraselüler matriks proteinlerini fibroblastlardan üç kat fazla ifade gösterdiğini ortaya koymuştur. Telositler hızla uzantılarını yayarken, fibroblastlar uzantı oluşturma kapasitesi açısından düşük özellik sergilemektedir (Niculite vd., 2015). Telosit ve fibroblast hücrelerinin yapısal farklılıkları aşağıda verilmiştir (**Çizelge 1.3**) (Kang vd., 2015).

Çizelge 1.3: Telosit ve fibroblast hücrelerinin yapısal farklılıkları (Kang vd., 2015).

	Telosit	Fibroblast
		
	İpte Boncuk Görünümlü Telopod	Hücre Gövdesi
Çekirdek Tipi	Hetero/Ökromatik	Ökromatik
Golgi Aygıtı	Küçük	Gelişmiş
Mitokondriyon	Hücre hacminin %2'si	Değişken (Genellikle %10–20'si)
Endoplazma Retikulumu	Hücre hacminin %1–2'sinden az	Hücre hacminin %5–12'si
Hücre Uzantıları	200–1000 µm	Kısa ve kalın 20–30 µm (Wong vd., 2014)
Hücre Zarında Kaveola Yapısı	Var	Yok
Kollajen Sentezi	Bilinmiyor	Var

Sonuç olarak, telositlerin morfolojik özellikleri; uzun ve ince telopodlar ile küçük hücre gövdesi ve bu yapılar arasındaki etkileşimlerden oluşur. Telositler, bu morfolojik özellikleri sayesinde, hücreler arası iletişimi sağlar, doku onarımı ve yenilenmesinde rol oynar ve dokuların homeostazını korur. Telositlerin sahip olduğu bu yapılar ve bunlarla ilişkili işlevsel roller, çeşitli organlarda yaşamsal roller üstlenmelerini sağlar. Bu nedenle, telositlerin özelliklerinin anlaşılması, dokulardaki yapı ve işlev bütünlüğünün korunması için önemlidir (Manetti vd., 2013; Sanches vd., 2024) .

1.2.3 Telositlerin Biyobelirteçleri

Çeşitli dokularda tanımlanan telositler belirli immünofenotipik belirteçleri ile ayırt edilir. Aşağıda, telositlerle yaygın olarak ilişkilendirilen başlıca biyobelirteçler ele alınmıştır. Biyobelirteçler, bir hücrenin kimliğini ve işlevini belirlemeye yardımcı olan özgün proteinler veya moleküllerdir. Telositlerin biyobelirteçleri, diğer hücre tiplerinden ayırt edilmelerini sağlamak amacıyla yapılan immünohistokimyasal ve moleküler biyoloji çalışmalarıyla belirlenmiştir. Telositlerin biyolojik özelliklerini anlamak için immünofenotipleri ve biyobelirteçleri üzerine yapılan çalışmalar büyük önem taşır.

Telositlerle ilgili yapılan ilk yayınlarda araştırmacılar telositleri yapı ve şekilleriyle tanımlarken, daha sonraki çalışmalarda ikili ya da üçlü belirteçlerin pozitifliğini göstererek hücreleri dokuda göstermişlerdir. İlk olarak doku kesitlerinde gösterilen ve daha sonra dokuların enzimlerle sindirilmesi sonrasında kültürlerde de tanımlanıp izole edilmeye başlanan telositlerin FACS (floresan ile aktive edilmiş hücre ayırıştırma) ya da MACS (manyetik ile aktive edilmiş hücre ayırıştırma) yöntemi ile ayırıştırılması gerçekleştirilmiştir (Bojin vd., 2011; Li vd., 2016).

Telositlerin tanımlanmasında yapısal özellikler temel alınsa da, özgün immünohistokimyasal belirteçler de bu hücrelerin varlığını doğrulamak amacıyla kullanılır. Ancak, telosite özgü bir immünohistokimyasal belirteç henüz tespit edilememiştir. Farklı organlarda ve aynı organın çeşitli dokularında bulunan telositler, değişen protein profilleri sergiler (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan belirteçler CD34, PDGFR- α ve c-Kit'tir (Zani vd., 2018). Bu belirteçlerin ifadesi, telositlerin kendilerine özgü yapısal özellikleriyle bir araya geldiğinde, bu hücrelerin farklı dokularda tanımlanmasını kolaylaştırır.

Telositlerin en önemli biyobelirteçlerinden biri CD34'tür. CD34, hematopoetik kök hücrelerde, endotel öncüsü hücrelerde ve bazı fibroblast alt gruplarında da bulunan bir transmembran glikoproteindir. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerde ve bazı

endotel hücrelerinde pozitif olarak ifade edilir. Telositlerin CD34 pozitif olduğu immünohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiş ve bu özellikleri nedeniyle de MSH'den ayırt edilir (Nicolescu ve Popescu, 2012). Bu glikoprotein telositlerde bulunması, bu hücrelerin interstisyel ve vasküler mikroortamlardaki rollerine işaret etmektedir (Manetti vd., 2014). Yapılan çalışmalar, gastrointestinal sistemin mukoza ve submukozasında ve miyokardiyumda telositlerin CD34 ifade ettiğini göstermiştir (Z. Zhu vd., 2023). CD34 ifadesi, telositlerin interstisyel boşlukta yer alan diğer hücre tiplerinden ayırt edilmesini sağlamaktadır (Diaz-Flores, Gutierrez, Garcia, Gonzalez-Gomez, Carrasco, vd., 2020; Manetti vd., 2013; Manetti vd., 2014). Aynı zamanda telosit kültürünü sınırlayan bir diğer faktör, CD34 immün boyamanın pasaj sayısı ile azalması ve telositlerin yapısının zamanla değişmesidir. Bu nedenle, her yeni deney için birincil kültürlerin yeniden kurulması gerekmekte olup, bu da in vitro deneyleri kullanışsız hale getirir (Sanches vd., 2024). CD34 göbek kordonunda çoğunlukla damarların endotel hücrelerinde de ifade edilir. Eksplant veya enzimatik yöntemle ayrıştırılan hücrelerde yöntem fark etmeksizin iGK-MSH'de ifadesine rastlanmamıştır (Zhang vd., 2018).

Telositler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR- α ve PDGFR- β) bakımından zengindir. Hücresel büyüme ve gelişimle ilişkili sinyal yollarında görev alan bu reseptörler, telositlerin tanımlanmasında önemli belirteçlerdir. Bu reseptörler, fibroblastlar ve MSH gibi diğer hücrelerle olan ilişkilerinin anlaşılmasında önemlidir (Gherghiceanu ve Popescu, 2011). PDGFR sinyali, telositlerin stroma hücreleriyle etkileşimini düzenler ve doku homeostazına katkıda bulunur. PDGFR- β ; fibroblastlar, MSH, perisitler, endotel hücreleri ve miyofibroblastlarda pozitif olarak ifade gösterir. PDGFR- β ; doku iyileşmesi, fibrozis, anjiyogenez ve damar stabilizasyonu gibi süreçlerde önemli rol oynar. Göbek kordonundaki PDGFR yerleşimleri de özellikle damarların çevresindeki ifadelerini karşılaştırmak için araştırılmıştır (Fujii-Tezuka vd., 2021). PDGFR- α , hücre büyümesi ve gelişimi ile ilişkili hücresel sinyal yollarında görev alan önemli bir belirteçtir. Bağ dokusu fibroblastları, PDGFR- α 'yı ifade eden hücrelerin başında gelir. Bağ dokusunun yapısal ve onarıcı hücreleri olan fibroblastlar, doku iyileşmesi, fibrozis ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde PDGFR- α 'nın aktivasyonuna ihtiyaç duyar. PDGFR- α , aynı zamanda damar endoteli hücrelerinde de pozitiflik gösterir. Anjiyogenez sürecinde, yeni damar oluşumu ve damar stabilizasyonu için PDGFR- β ve PDGFR- α arasında etkileşimler önemlidir. Ayrıca MSH; PDGFR- α pozitif hücrelerdir ve kemik iliği, adipöz doku ve göbek kordonunda bulunur. PDGFR- α 'nın özellikle telositlerde ifade edilmesi, bu hücrelerin doku onarımı ve rejenerasyon süreçlerine katılımını da desteklemektedir (Xu vd., 2021). PDGFR- α ifade eden telositler, gastrointestinal sistemde ve kalp gibi çeşitli dokularda tanımlanmış olup,

özellikle doku onarımı ve rejenerasyon süreçlerinde önemli roller üstlendikleri gösterilmiştir (Aleksandrovych ve Gil, 2021; Bahar Halpern vd., 2020; Vannucchi vd., 2013). PDGFR- α ile CD34'ün ortak ifadesi, dokularda telositlerin tanımlanmasını daha da kolaylaştırmaktadır. Bu da telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmeye ve moleküler özelliklerini detaylandırmaya yardımcı olur (Xu vd., 2021).

Mezenkimal hücrelerin bir belirteci olan ara filaman proteini olan vimentin, telositlerde de güçlü şekilde ifade edilir. Vimentin pozitifliği, telositlerin mezenkimal stroma kökenli olduğunu gösterir ve dokunun yapısal bütünlüğünün korunmasına ve mekanik stabilitesinin sağlanmasına katkıda bulunur (Ahmed ve Hussein, 2023; Kondo ve Kaestner, 2019; Sanches vd., 2024; Varga vd., 2018). Mezenkimal hücrelerin belirteci olan bu ara filament proteini, CD34 ile birlikte telositlerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Caveolin-1 hücre zarında bulunan “kaveola” adı verilen küçük çukurcukların ana yapısal proteini olan bir hücre zarı proteindir. Adipositler, damarların iç yüzeyinde bulunan endotel hücreleri, kan damarlarındaki düz kas hücreleri, glomerüler filtrasyon ve böbrek tübüllerindeki hücreler caveolin-1 pozitif hücrelerdir. Örneğin; fare mesanesindeki endotel hücreleri, düz kas hücreleri, epitel hücreleri ve epitel altındaki bağ dokusu hücreleri gibi çeşitli hücre türlerinde ifade edilir. Hücrede sinyal iletiminde ve vezikül taşınımında rol oynayan bir protein olup, telositlerin özellikle telopodlarında yüksek oranda bulunur. Bu proteinin varlığı, telositlerin hücreler arası iletişimde rol oynadığını destekleyen önemli bulgudur (Smythies ve Edelstein, 2014). Ayrıca iGK-MSH de caveolin-1 ifade eder (Shu vd., 2024).

Bir başka telosit biyobelirteci olan c-Kit (CD117), bir tirozin kinaz reseptörü olup hematopoetik sistemde yer alan bazı kök hücrelerde ve mast hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir. Örneğin, kemik iliğinde c-Kit pozitifliği, özellikle hematopoetik kök hücrelerin ve öncü hücrelerin belirlenmesinde önemlidir. Miyokardiyumdaki yerleşik kardiyomiyosit öncüsü kök hücrelerin belirtecidir. Her telosit popülasyonu c-Kit ifade etmese de, özellikle gastrointestinal sistem, üreme sistemi ve fibrozis durumlarıyla ilişkili telosit gruplarında bu belirtecin varlığı gösterilmiştir (T. Liu vd., 2016; Othman vd., 2016). Telositlerde c-Kit'in varlığı, bu hücrelerin hücresel sinyalizasyonda ve diğer hücrelerle etkileşiminde rol oynadığını düşündürmektedir (Xu vd., 2021; Z. Zhu vd., 2023). iGK-MSH ve göbek kordonu damarlarının düz kas hücreleri de c-Kit ifade ederler (Montiel-Eulefi vd., 2009).

Düz kas hücrelerinin belirteci olan α -SMA (α -düz kas aktini), bazı durumlarda telositlerde de ifade edilir. Özellikle dokunun yeniden şekillenmesi ve fibrozis süreçleri ile ilişkili telositlerde α -SMA ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Sanches vd., 2024; Valente vd.,

2024). Ayrıca aktin filamanlarını çapraz bağlayan α -aktininin varlığı telopodlarda gösterilmiştir. F-aktin (filamentöz aktin), telositlerin uzun telopod yapılarında yoğun olarak bulunur ve bu uzantıların dinamik yapısını sağlar (Gherghiceanu ve Popescu, 2012).

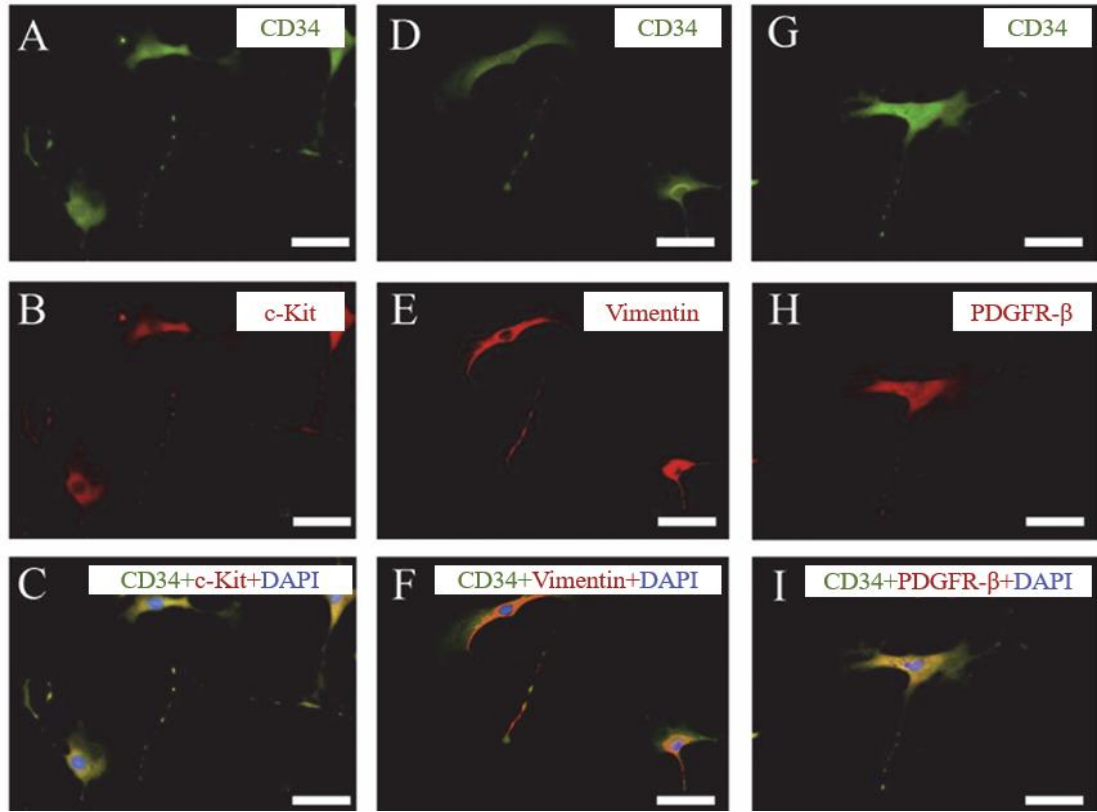
Son çalışmalar, özellikle miyometriyum gibi dokulardaki telositlerin T-tipi kalsiyum kanallarını ifade ettiğini göstermektedir. Bu durum, telositlerin kas kontraksiyonları ve hücrel sinyalizasyon gibi işlevlere sahip olabileceğini ortaya koymaktadır (Cretoiu vd., 2020; L. Zhu vd., 2023).

Telositler, bağışıklık sisteminin inflamatuvar yanıtlarını düzenleyen TGF- β , IL-6 ve IL-10 gibi sitokinleri salgılayabilirler (Zhang vd., 2020). TGF- β sinyal yollarında rol oynarlar ve doku rejenerasyonu sürecinde düzenleyici olarak işlev görürler (Zheng vd., 2018). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında telosit yoğunluğunda azalma olduğu bildirilmiş olup, bu durum telositlerin doku homeostazındaki rolünü desteklemektedir (Shoshkes-Carmel, 2024).

Bununla birlikte, CD34 yüzey proteini, kan ve lenf damarlarının immatür endotel hücrelerinde de bulunduğundan düşük büyütme görüntülemelerde CD34 ifadesine sahip lenfatik hücreler telosit olarak yanlış tanımlanabilir (Sanches vd., 2024). Bu sorunu aşmak için ikili immünfloresan boyamalar kullanılır. Ancak CD34'e ek olarak hangi belirtecin kullanılacağı konusunda araştırma grupları arasında farklılıklar vardır. Örneğin, CD31; telositleri diğer CD34 pozitif hücrelerden ayırmak için kullanılmıştır; çünkü telositler CD31 negatif, endotel hücreleri ise CD31 pozitifdir (Manetti vd., 2013). Öte yandan, telositler PDGFR- α pozitif olup, bu özellikleri onları insan gastrointestinal kanalındaki diğer CD34-pozitif hücrelerden ayırmada faydalı olmuştur (Vannucchi vd., 2013). Ancak PDGFR- α belirteci bazı fibroblast popülasyonlarıyla da ilişkilidir (Sanches vd., 2024). Telositlerin immünfloresan işaretlemeleri CD34/Vimentin, CD34/PDGFR- β ve CD34/PDGFR- α ortak pozitifliği sergiler. Ancak, endotel hücrelerinin de CD34 ve PDGFR- α pozitif olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, CD34 veya PDGFR- α immün boyamasının endotel hücrelere özgü bir belirteç (örneğin, CD31) ile kombinasyonu, telositlerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Bu hücreler CD34+/CD31- ve PDGFR- α +/CD31- boyamalarla da tanımlanabilir (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Fibroblastlarla karşılaştırıldıklarında; fibroblastlar yalnızca vimentin ve PDGFR- β pozitiflerdir. Öte yandan, hücre iskeleti ile ilişkili olan miyozin-14 ve periplakin proteinleri, fibroblastlara kıyasla telositlerde daha yüksek protein ifadesi göstermektedir (Y. Zheng, D. Cretoiu, G. Yan, S. M. Cretoiu, L. M. Popescu, ve X. Wang, 2014). Bu bulgular, fibroblastlarla karşılaştırıldığında telositlerin hücre iskeletini modüle

eden belirli proteinleri kodlayan genleri daha yüksek düzeylerde ifade ettiğini gösteren gen ifade verileriyle de örtüşmektedir (Zheng vd., 2013).

Telositler hem yapı hem de immüntiplendirme olarak perisitlerden farklıdır. Primer kültürdeki telositler CD34, α -SMA hafif pozitif iken, perisitler CD34 negatif, ancak α -SMA pozitifdir (Bei, Zhou, vd., 2015). Ayrıca, akım sitometri yöntemi, in vitro koşullarda telositlerin fenotipini belirlemek ve farklı telosit alt türlerini ayırt etmek için kullanılmaktadır. Birincil kültürdeki kardiyak telositlerin %64'ünün CD117/CD34 ortak pozitif olduğu saptanmış ve bu durum, kemik kaynaklı MSH, kardiyak fibroblastlar ve kardiyomiyositlerle kıyaslandığında önemli farklılık olarak belirlenmiştir (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Bei ve Zhou (2015) çalışmasında telositleri işaretlemek için kullandığı immünfloresan görüntüler aşağıda verilmiştir (**Şekil 1.9**) (Bei, Zhou, vd., 2015).



Şekil 1.9: Telositleri tanımlamak için kullanılan belirteçlerin tek ve ikili immünfloresan işaretlemeleri. Ölçüm çubuğu: 50 μ m (Bei, Zhou, vd., 2015).

Günümüzde yüksek verimli moleküler teknikler (örneğin, genomik, proteomik ve sekretomik analizler) aracılığıyla moleküler veriler de telositleri diğer hücrelerden ayırt etmek için tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (Sanches vd., 2024). Büyük ölçekli moleküler teknikler olan tek hücreli RNA sekanslaması son zamanlarda telosit işlevlerini

değerlendirmek için kullanılmaya başlanmıştır. Telositin alt popülasyonlarının varlığının değerlendirilmesi bu yöntemle mümkündür. Bu çalışmalar, telositlerin farklı dokulardaki dağılımını, diğer hücre türleriyle ilişkilerini ve olası rollerini anlamak açısından önemini korumaktadır (Sanches vd., 2024). Önceki çalışmalarda, proteom analizleri telositleri fibroblastlar ve mikrovasküler endotel hücreleriyle karşılaştırarak, hücre tipleri arasında büyük protein farklılıkları olduğunu göstermektedir (Sun vd., 2014; M. Zheng vd., 2014). İlginç bir şekilde, telositler hücre iskeleti ve hücre zarıyla ilgili daha fazla protein üretirken, fibroblastlar ise ekstraselüler matriks ile ilişkili daha fazla protein üretmektedir. Bu bulgular, telositlerin büyük miktarda ekstraselüler matriks proteini üretmemelerine rağmen, fibroblastlar gibi diğer stroma hücrelerinde üretimini teşvik edebileceğini göstermektedir. Örneğin; akciğerde transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir (Zheng vd., 2013). Bu analizle, telositlerde; fibroblastlar ve kök hücrelerle karşılaştırıldığında birçok genin farklı düzeyde ifade edildiği ortaya çıkmıştır. Telositler fibroblastlarla kıyaslandığında, hücresel sinyal iletimi, dokunun yeniden yapılanması ve anjiyogenez ile ilgili genleri daha yüksek düzeylerde ifade eder. Ayrıca telositlerde fibroblastlara kıyasla, MSH belirteçlerinden CD90 ifadesi daha yüksektir. Bu protein, çeşitli hücre tiplerinde hücre-hücre yapışması ve hücreler arası iletişim ile ilişkilidir (Sanches vd., 2024).

Sonuç olarak telositler, CD34, PDGFR- α , c-Kit, vimentin, nestin ve α -SMA gibi özgün biyobelirteçlerle tanımlanabilen hücrelerdir. Bu belirteçler, yalnızca telositlerin çeşitli dokulardaki varlığını doğrulamakla kalmayıp, aynı zamanda doku bütünlüğünün korunması, onarım süreçleri ve hücreler arası iletişim gibi işlevlerine ilişkin önemli bilgiler sunar. Telositlerin immünofenotipik profili, onların fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rollerini daha iyi anlamak için ileri araştırmalar gerektirmektedir. Telositlerin biyobelirteçleri ve immünofenotipik özellikleri üzerine yapılan araştırmalar, bu hücrelerin yenileyici tıp ve inflamatuvar hastalıklar açısından potansiyel rollerini anlamak için kritik öneme sahiptir.

1.2.4 Telositlerin Mikroçevredeki İşlevleri

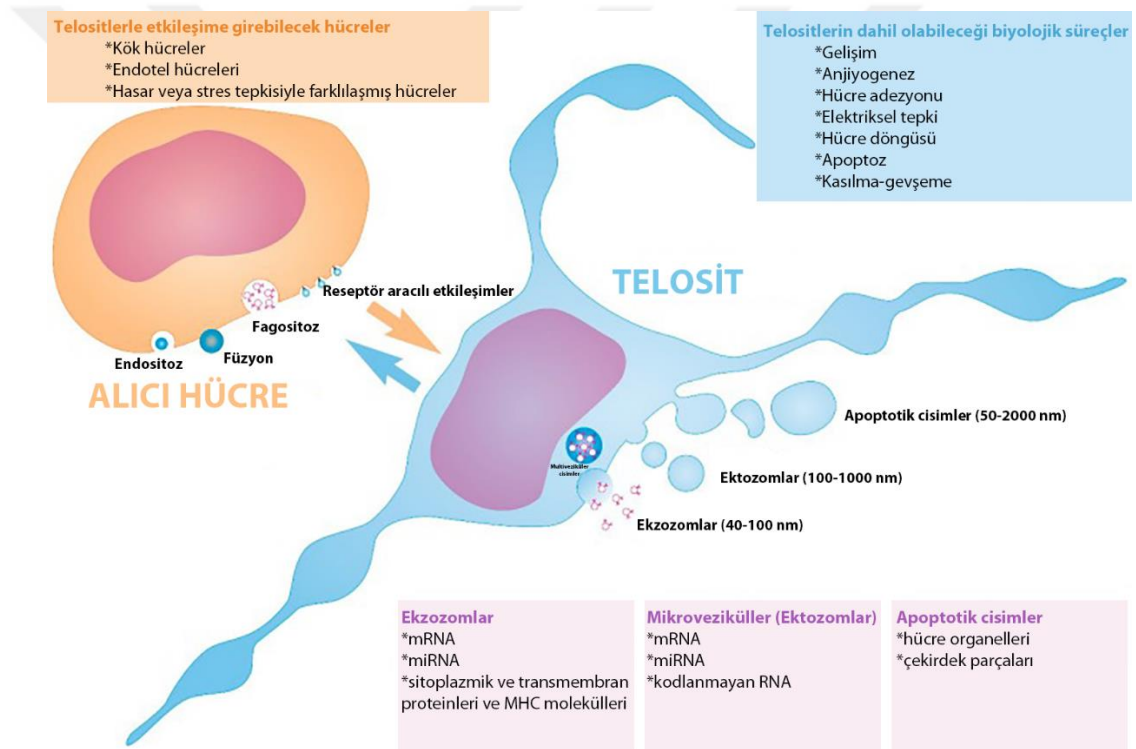
Telositler, hücre dışı matriks içinde konumlanan ve telopodlar aracılığıyla geniş bir hücreler arası iletişim ağı oluşturan interstisyel hücrelerdir (Popescu ve Faussone-Pellegrini, 2010). Bu hücrelerin yapısal ve işlevsel özellikleri, mikroçevrede kritik roller üstlenmelerine olanak tanır. Telositler, hücreler arası sinyal iletimi, doku homeostazının düzenlenmesi, kök hücre nişlerinin korunması ve immün yanıtın modülasyonu gibi bir dizi biyolojik süreçte görev almaktadır (Cismasiu ve Popescu, 2015; Rosa, Marini, vd., 2021; Rosa, Romano, vd., 2021).

Telosit terimi Pellegrini'nin 2010 yılında yayınladığı çalışmasında kullanılmaya başlandıktan sonra araştırmacılar bu hücrelerin gelişmekte olan kalbe yerleşerek kalbin morfogenezinde rol oynayıp oynamadığı araştırılmıştır. Çalışma, gelişmekte olan kalpte kardiyak telositlerin varlığını araştırmayı ve onların kalbin gelişimi sırasında miyokardın mimari organizasyonuna katkıda bulunan destekleyici hücreler olarak rolünü daha iyi anlamak için ipuçları sağlamayı amaçlamıştır. Büyüyen kardiyomiyositleri sıkıca saran geniş bir telopod ağı oluşturan bu hücreler ve in vitro ortamda kardiyomiyosit kümelerinin agregasyonuna katkıda bulunmuştur. Araştırmacılar, telositlerin, iskemi hasarından sonra miyokardın onarımını ve rejenerasyonunu artırmaya yönelik terapötik stratejilerin yeni ve olası bir hedefi olabileceğini öne sürmüştür (Fausone-Pellegrini ve Bani, 2010). Ayrıca, telopodlar sıklıkla miyokardiyal kapiller ve sinir uçları ile yakın ilişkiler kurar, bu da aralarında bir ilişkinin olduğunu gösterir. Endokardiyum, kan–kalp bariyeri veya daha doğru bir ifadeyle kan–miyokard bariyeri olarak kabul edilebileceğinden, telositlerin bu bariyeri oluşturmada önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Gherghiceanu vd., 2010).

Telositler ve telopodları; kardiyomiyositlere, kan damarlarına ve sinir uçlarına çok yakın yerleşimlerinden dolayı hücreler arası iletişimde rol oynarlar. Ayrıca, telopodlar daha geniş mesafelerde hücre iletişimini mümkün kıldıkları üç boyutlu bir ağ oluşturarak en az iki görev yerine getiriyor olabilir: küçük sinyal moleküllerinin parakrin ve/veya jukstakrin salgılanması ve mikroveziküllerin salınımı. Bu da komşu hücreler arasında önemli makromoleküllerin (örneğin, proteinler, ikinci haberciler veya RNA'lar) transferinde rol oynar. Telositlerin son derece uzun telopodları ve onları hücre dışı matrikse bağlayan tutunma plakları sayesinde, mekanoreseptör/transformasyon işlevi görmeleri beklenir (Kostin, 2010). Telositler, kardiyak yenilenmede kilit rol oynayan hücrelerdir. Bu işlev, telositlerin kemirgen ve insan kalplerinde subepikardiyal nişlerde varlığını gösteren çalışmalara dayanmaktadır (Gherghiceanu ve Popescu, 2010).

Öncü çalışmalardan sonra yapılan araştırmalar telositlerin mikroçevrelerdeki ve nişlerdeki işlevlerinin oldukça fazla olduğunu göstermiştir. Telositlerin temel işlevlerinden biri de hücreler arası sinyal iletimine katılımlarıdır. Bu hücreler; yakın çevredeki fibroblastlar, endotel hücreleri, kök hücreler, bağışıklık hücreleri ve düz kas hücreleri ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girerek çeşitli sinyal iletim mekanizmalarını düzenler (Cretoiu vd., 2020). Hücre dışı matriks içinde stratejik olarak konumlanmış olmaları, komşu hücrelerle geniş iletişim ağları kurmalarına olanak tanır. Telositler, EV'ler (ekzozomlar ve ektozomlar) salgılayarak sinyal molekülleri, büyüme faktörleri ve mikroRNA'lar taşırlar. EV'ler aracılığıyla sinyal molekülleri ve mikroRNA'lar ile yakındaki

hücrelerin davranışlarını etkileyebilirler (Cismasiu ve Popescu, 2015; Cretoiu ve Cretoiu, 2016; S. M. Cretoiu, 2016b). Bu parakrin sinyal iletim mekanizması, telositlerin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptoz süreçlerini düzenlemesini sağlar (Cismasiu ve Popescu, 2015). Aynı zamanda uzun telopodları sayesinde yakın hücrelerle doğrudan fiziksel temas kurabilir. Hücreler arası oluklu bağlantılar ve nanokanal benzeri yapılar aracılığıyla iyon ve küçük moleküllerin transferini sağlayarak, doku mikroçevresinde koordineli bir sinyal iletim ağı oluşturur (Klein vd., 2021). Geleneksel olarak telosit işlevlerini incelemek için kullanılan yöntemler arasında telositlerin diğer hücrelerle birlikte kültüre edilmesi, ex vivo analizlerin yapılması ve telositlerden elde edilen koşullandırılmış ortamın in vitro testlerde kullanılması yer almaktadır (Sanches vd., 2024). Telositlerin çevredeki hücrelerle iletişimi aşağıda verilmiştir (**Şekil 1.10**) (Cretoiu vd., 2016).



Şekil 1.10: Telositlerin etkileşime girebileceği hücreler, bu etkileşimde rol oynayan hücresel ürünler ve katkı sundukları biyolojik süreçler (Cretoiu vd., 2016).

Sinyal iletim özelliklerinin yanı sıra, telositlerin doku yapısının korunmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu hücreler, hücre dışı matriks organizasyonuna katkıda bulunarak fibroblastlar ve kök hücreler gibi diğer hücre türlerinin düzenlenmesini ve işlevlerini etkilemektedir (Cretoiu vd., 2020; Rosa, Marini, vd., 2021). Örneğin, kardiyak dokuda telositlerin kardiyomiyosit öncüllerine destek sağlayarak bu hücrelerin hayatta

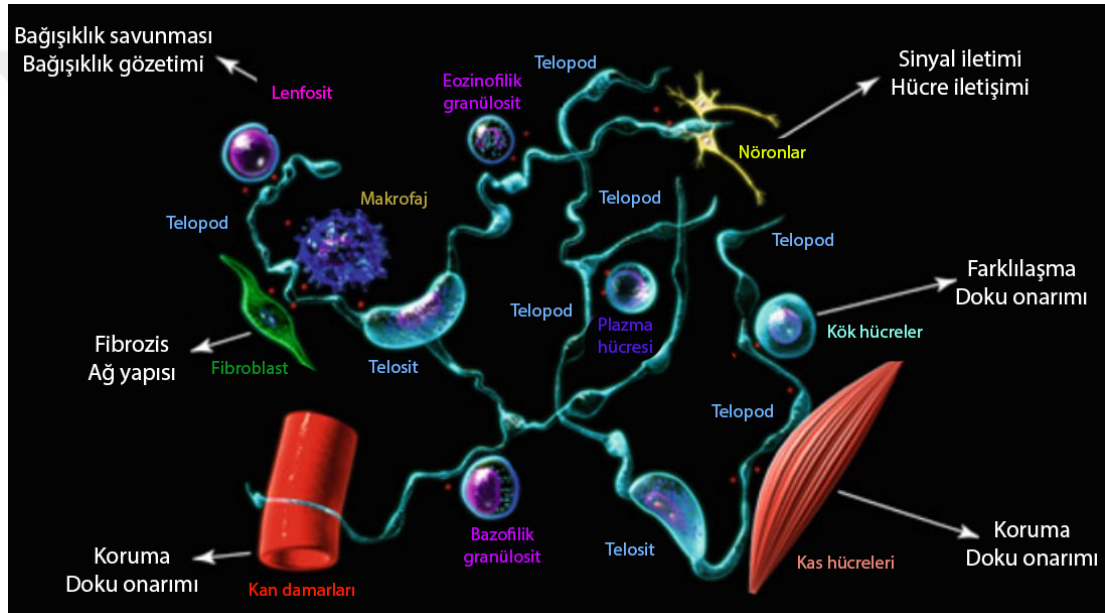
kalmasını ve farklılaşmasını teşvik eden bir niş oluşturduğu gösterilmiştir (Gherghiceanu ve Popescu, 2010; Popescu ve Faussone-Pellegrini, 2010; Popescu vd., 2010). Hücre dışı matriksin yenilenmesi için telositler, matriks metalloproteinazlar ve diğer enzimleri salgılayarak hücre dışı matriksin dinamik yapısını düzenler; bu da doku onarımı ve yeniden yapılanma süreçlerini destekler (Cretoiu vd., 2020). Aynı zamanda bağ dokusundaki fibroblastlar ve kök hücrelerle de etkileşim içindedirler. Telositler, fibroblastların etkinliğini düzenleyerek aşırı skar dokusu üretimini önleyebilir. Ayrıca kök hücre nişleri ile etkileşime girerek, bu hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyebilir (Manetti vd., 2014). Diğer taraftan hipoksik koşullarda, telositlerin endotel hücreleri ile etkileşime girerek anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir (Gherghiceanu ve Popescu, 2010). Bu durum, iskemik dokularda damar oluşumunu teşvik ederek rejenerasyonu hızlandırabilir (Gherghiceanu ve Popescu, 2010). Bu örnekler, telositlerin doku onarımı ve rejenerasyonunda oynadığı kritik rolü vurgulamaktadır.

Ayrıca araştırmalar telositlerin bulunduğu mikroçevrelerde doğrudan kollajen sentezlediğine dair kesin bir kanıt sunmamaktadır; ancak kollajen sentezini dolaylı olarak düzenleyebildiğine dair kanıtlar vardır. Telositler; telopodları aracılığıyla ve çeşitli büyüme faktörleri salgılayarak fibroblastların kollajen üretimini arttırabilirler ve hücre dışı matriksin homeostazını korumak için parakrin sinyaller gönderebilirler (Nicolite vd., 2015).

Telositlerin bağışıklık gözetimi ve immün yanıtta da rol oynadığı bilinmektedir. Bu hücreler, makrofajlar ve lenfositlerle iletişim kurarak proinflamatuvar veya antiinflamatuvar tepkileri yönlendirebilir. Özellikle, sitokinler ve kemokinler aracılığıyla bağışıklık hücrelerinin göçünü düzenleyebilir, immün yanıtı modüle edebilir ve doku homeostazına katkıda bulunabilirler (Alunno vd., 2015; Quay Mensah, 2023). Sistemik skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve diğer otoimmün bozukluklarda telosit kaybının hastalığın şiddetlenmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum, telositlerin immün toleransın korunmasındaki rolünü ortaya koymaktadır. Mikroçevredeki değişiklikleri, özellikle hormonal dalgalanmaları algılayabilmeleri, telositlerin farklı dokularda düzenleyici hücreler olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır (Othman vd., 2016).

Telositler, doku mikroçevresinin ihtiyaçlarına göre rollerini uyarlayabilirler. Çalışmalarda telositlerin kök hücreler ve öncü kök hücre nişindeki destekleyici bir interstisyel ağ oluşturduğu görülmüştür (Gherghiceanu ve Popescu, 2010). Örneğin, fibrozis veya sistemik skleroz gibi patolojik durumlarda telosit kaybı; doku rejenerasyonunun bozulması ve kök hücre nişlerinin işlevinin değişmesi ile ilişkilendirilmiştir (Manetti vd., 2014). Telositler; kök hücre nişlerinin mikroyapısını destekleyerek, bu hücrelerin

proliferasyon ve farklılaşmasını yönlendirmektedir. Özellikle sinir sistemi, kalp ve dolaşım sistemi ve üreme sisteminin organlarında telositlerin kök hücrelerle doğrudan etkileşim kurduğu ve bu hücrelerin sağkalımını artırdığı belirlenmiştir (Urban vd., 2016). Bu bulgular, telositlerin yalnızca normal fizyolojik süreçler için değil, aynı zamanda doku hasarı veya stres durumlarında doku bütünlüğünün korunmasında da kritik rol oynadığını göstermektedir. Özellikle kardiyak rejenerasyonda, telositlerin kök hücrelerin yaşam alanlarını düzenleyerek yeni hücre oluşumunu uyardığı gösterilmiştir. Bu durum, telositlerin rejeneratif tıpta potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır (Varga vd., 2019). Telositlerin iletişimde olduğu hücreler ve bu iletişimle görev aldıkları bazı biyolojik süreçler aşağıda verilmiştir (**Şekil 1.11**) (Xiangdong ve Cretoiu, 2016).



Şekil 1.11: Telositlerin komşu hücre ve dokularla etkileşimi (Xiangdong ve Cretoiu, 2016).

Telositlerin çeşitli hastalıkların patogeneze katıldığı ve "telositopatiler" olarak adlandırılan, telosit işlev bozukluğuyla ilişkili durumların tanımlandığı gösterilmiştir. Telositlerin patolojik süreçlerdeki rollerine ilişkin araştırmalar, bu hücrelerin kaybının doku rejenerasyonunu olumsuz etkilediğini ve bazı hastalıkların gelişiminde önemli faktör olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, telositler; hücre biyolojisi, patoloji ve yenileyici tıp alanlarında giderek daha fazla ilgi gören bir araştırma alanı haline gelmiştir (Varga vd., 2018; Varga vd., 2019).

Sonuç olarak, telositler mikroçevre içinde çok yönlü roller üstlenmekte olup, mikroçevrede hücreler arası iletişimi kolaylaştırma, doku bütünlüğünü koruma, bağışıklık yanıtlarını düzenleme ve kök hücre nişlerini destekleme gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerde

görev almaktadır. EV'ler aracılığıyla sinyal iletimi sağlamaları; fibroblastlar, endotel hücreleri ve kök hücrelerle doğrudan etkileşime girmeleri ve bağışıklık yanıtlarını modüle etmeleri, bu hücrelerin mikroçevredeki temel düzenleyici unsurlardan biri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu benzersiz özellikleri ve biyolojik plastisiteleri, telositleri hem normal koşullarda hem de çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli hücresel bileşenler hâline getirmektedir.

1.2.5 Telositlerin Doku Dağılımları

Telositlerin çeşitli dokularda tanımlanmaları, bu hücrelerin farklı fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli işlevlere sahip olduğunu göstermektedir. Yaygın bir dağılıma sahip olan telositler; kalp, akciğer, gastrointestinal sistem, üreme organları ve pek çok organın bağ dokusunda bulunur (Cretoiu ve Popescu, 2014; T. Liu vd., 2016; Sohn vd., 2024; Tang vd., 2022; Vannucchi vd., 2013; Wang, Song, vd., 2020; Wang, Xiao, vd., 2020).

Popescu (2005) (Popescu, Ciontea, vd., 2005) bir dizi yöntem ve immünbelirteç kullanarak insan tuba uterinasında bu hücrelerin varlığını ortaya koyduktan sonra ilerleyen yıllarda araştırmalar telositlerin farklı organlarda bulunduğunu gösterdikçe bu hücrelerin doku homeostazının korunmasında yaygın bir rol oynadıkları öne sürülür (Sanches vd., 2017; Zheng, Bai, vd., 2012a, 2012b; Y. Zheng, X. Chen, vd., 2014; Y. Zheng, D. Cretoiu, G. Yan, S. M. Cretoiu, L. M. Popescu, H. Fang, vd., 2014; Zheng, Zhu, vd., 2012). Örneğin, miyokarddaki telositler dokunun organizasyonunda görev alarak kardiyak öncü hücrelerin gelişimini ve sürdürülebilirliğini destekleyen "hemşire hücreler" (nurse cells) olarak işlev görmektedir (Bani vd., 2010; Zhou vd., 2014). Çalışmalar, telositlerin "hemşire hücreler" gibi davranarak kök hücre nişlerini desteklediğini ve hasarlı dokuların onarımı ile rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu öne sürmüştür (Varga vd., 2019; Yu vd., 2015). İnsan vücudunda telositlerin bulunduğu sistemler ve bu sistemlerdeki telositlerin işlevleri aşağıda ayrıntılandırılmıştır.

Telositler gastrointestinal sistemde ağırlıklı olarak submukozada yer almakta olup kan damarları, sinir lifleri ve gangliyonları çevreleyen bir ağ oluşturur. Bu stratejik konumlanma, onların düz kas hücreleri ve enterik nöronlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleriyle etkileşime girmesine olanak tanımakta ve böylece bağırsak motilitesinin ve homeostazının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Vannucchi vd., 2013).

Telositler kardiyovasküler sistemde, miyokardiyumda ve perikardiyal dokuda yer almakta olup kardiyomiyositler, fibroblastlar ve diğer interstisyel hücrelerle bağlantı kurarak kalbin yapısal bütünlüğünü ve işlevselliğini desteklemektedir (Zhou vd., 2014; Zhou vd.,

2015). Kardiyomiyositler ve diğer interstisyel hücrelerle bağlantılar kurarak vasküler ve immün sistemlerden gelen sinyallerin bütünleştiği bir ağı oluşturmasına katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu da telositlerin normal/hastalıklı durumlarda komşu hücrelere düzenleyici makromolekülleri (RNA'lar, proteinler veya mikroRNA'lar) taşıyan EV'ler göndererek hücreler arası parakrin/jukstakrin sinyalleşmede kritik rol üstlendiği görüşünün kuvvetlenmesine neden olmuştur (Fertig vd., 2014; Zhou vd., 2015). Kalpteki telositlerin varlığı; bu hücrelerin hasar sonrası kardiyak onarım süreçlerini destekleyebileceğini düşündürmektedir (Tang vd., 2022; Zhou vd., 2015). Ayrıca, kardiyovasküler sistemdeki telositler, endotel hücreleri ve perisitlerle etkileşim halinde olup damar duvarlarının bütünlüğünün korunmasında ve anjiyogenez süreçlerinde önemli roller üstlenmektedir (Manetti vd., 2014).

Telositler üreme sisteminde erkek ve dişi gonadlarda gözlenmiştir. Testiste, Leydig hücrelerinin çevresinde ve peritübüler dokuda ağlar oluşturarak lokal hormonal ortamın düzenlenmesi ve spermatogenezin desteklenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (Marini vd., 2018). Ovaryumda ise telositlerin kontraktıl mekanizmaların düzenlenmesinde yer aldığı ve hormonal değişimlere duyarlı sensör hücreler olarak işlev gördüğü öne sürülmektedir (Mazzoni vd., 2019).

Bununla birlikte, telositler deride dermis tabakasında tanımlanmış olup doku onarım süreçlerine katıldıkları düşünülmektedir (Ceafalan vd., 2012). Dermisteki telositler; fibroblastlar, mast hücreleri ve bağ dokusu elemanlarıyla etkileşim içinde bulunurlar (Manetti vd., 2013). Telositlerin azalmasının sistemik skleroz gibi fibrotik durumlarla ilişkisi gösterilmiş ve doku homeostazındaki önemleri vurgulanmıştır (Manetti vd., 2013; Manetti vd., 2014).

Bugüne telositlerin doku dağılımlarına ilişkin yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir (**Çizelge 1.4**) (Zhang vd., 2023).

Çizelge 1.4: Telositlerin doku dağılımları ve yerleşimlerinin araştırıldığı çalışmalar (Zhang vd., 2023).

Çalışmalar	Telositlerin Doku Dağılımları ve Yerleşimleri
(Irene Cantarero vd., 2011)	Kan damarlarının endotel yüzeyinde
(H. Li, H. Zhang, vd., 2014)	Kemik iliğinde küçük kan damarları ve/veya kılcıl damarların yakınında
(Cretoiu vd., 2012; Cretoiu vd., 2013)	Kolonda mukoza, submukoza, muskularis ve subepitel bölgelerinde
(Irene Cantarero vd., 2011)	Duodenum mukoza kriptlerinin hemen altındaki lamina propria
(Gherghiceanu vd., 2010; Gherghiceanu ve Popescu,	Endokardiyumda subendotel tabaka, endokard endoteli ile kardiyomiyosit demetleri arasında

2011, 2012)	
(Popescu vd., 2010)	Epikardiyumda subepikard alanı ve kardiyomiyositlerin yakın çevresinde
(Ciontea vd., 2005; Ullah vd., 2014)	Endometriyumda stromada; bazal ve fonksiyonel tabakalarda
(Chen vd., 2013; Rusu, Nicolescu, vd., 2012)	Özofagus mukozanın lamina propriasında, submukoza, kas tabakası ve adventisyada
(Bosco vd., 2013; Nicolescu, 2016; Padhi vd., 2013; Popescu, Hinescu, vd., 2005)	Ekzokrin pankreasta sekresyon yapan asiniler, ekzokrin epitel kanalları, sinirler ve damarlar yakınında
(Luesma vd., 2013)	Gözde limbus, sklera ve uveada
(S. M. Cretoiu, 2016a; Cretoiu vd., 2013; Popescu, Ciontea, vd., 2005)	Uterusta mukoza ve kas tabakasında, düz kas lifleri arasında
(Dawidowicz vd., 2015)	Fascia lata kollajen liflerin arasında
(Hinescu vd., 2007; Matyja vd., 2013; Pasternak vd., 2014)	Safra kesesinde muskularis propria ve safra kanallarında
(Gherghiceanu vd., 2010; Kostin, 2010; Mitrofanova vd., 2018; Popescu ve Faussone-Pellegrini, 2010)	Kalpde endokardiyum, epikardiyum, miyokardiyum ve sinoatriyal düğümde
(Yang vd., 2014)	Kalp kapakçıklarında
(Yang, Liu, vd., 2015)	İleumda lamina propriada
(Cretoiu vd., 2012)	Jejunumda epitel tabakasının altındaki lamina propriada ve muskularis mukozada
(L. Li vd., 2014; Qi vd., 2012; Zheng, Zhu, vd., 2012)	Böbrek korteksindeki tübüller ve damarlar çevresinde
(Xiao vd., 2013)	Karaciğerin Disse aralığında
(Popescu, Gherghiceanu, vd., 2011; Popescu, Manole, vd., 2011; Zheng vd., 2011)	Akciğerde bronşiooller, alveoler kanallar ve interstisyel alanlarda
(Mou vd., 2013; Popescu, Andrei, vd., 2005; Radu vd., 2005)	Meme bezinde epitel dışı bölgelerde
(Popescu vd., 2012)	Meninksler ve koroid pleksusda kök hücelere yakın bölgelerde
(Hinescu vd., 2008)	Mezenterde kılcal damarlar, sinir demetleri, adipositler ve diğer interstisyel hücreler arasında
(Alunno vd., 2015)	Minör tükürük bezlerinde salgı ve boşaltım kanalları içinde
(Bani vd., 2010; Faussone-Pellegrini ve Bani, 2010; Kostin, 2010; Kostin ve Popescu, 2009; Manole vd., 2011; Suci, Nicolescu, vd., 2010)	Miyokardiyumda insan kalp interstisyel hücrelerinin etrafında
(Horn vd., 2012)	Miyometriyumda interstisyumda
(Diaz-Flores vd., 2013)	Nöromusküler içciklerin iç ve dış kapsüllerinde
(Popescu, Hinescu, vd., 2005)	Pankreas ekzokrin bezlerinde
(Nicolescu vd., 2012)	Parotis bezlerinde çeşitli çaplarda kanalların çevresinde
(Bosco vd., 2015; Suci, vd., 2007; Suci, Popescu, vd., 2010)	Plasentada villus ve trofoblast bazal membranında
(Hinescu vd., 2011)	Parietal plevrada
(Corradi vd., 2013)	Prostat stromasında
(Gevaert vd., 2012)	Renal pelvis lamina propriasında
(Popescu, Manole, vd., 2011; Suci, vd., 2012)	İskelet kaslarında kas interstisyumunda

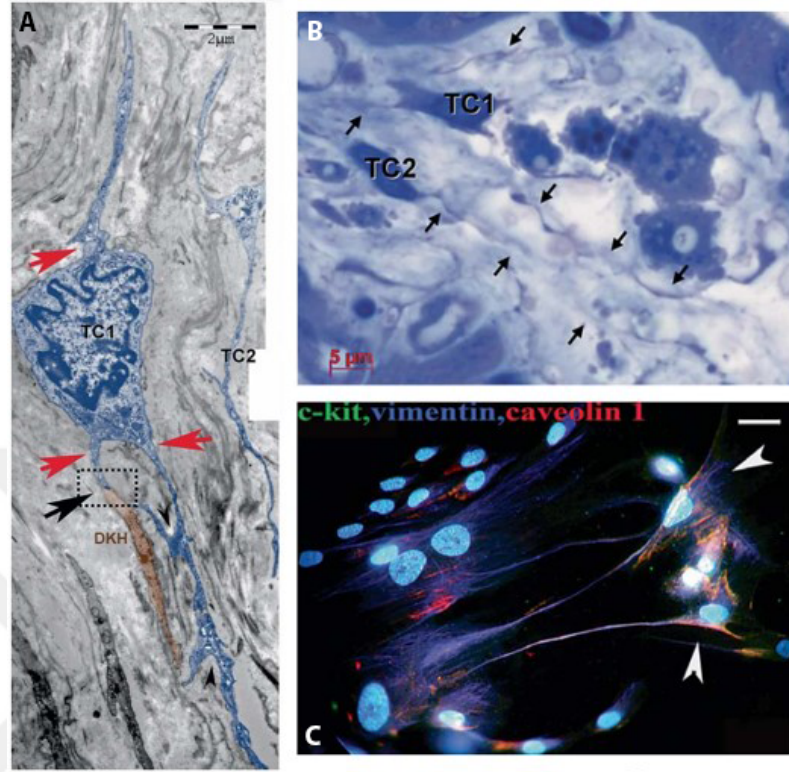
(Rusu, Mirancea, vd., 2012)	Deride dermis tabakasında
(Chang vd., 2015)	Dalakta kırmızı pulpada
(Rusu, Jianu, vd., 2012)	Trakea ve bronşlarda; trakea ve akciğer stromasında, düz kas lifleri arasında
(Yang, Ahmad, vd., 2015)	Testiste peritübüler hücrelerin dış tabakasında
(Rusu vd., 2016)	Trigeminal ganglionda nöron-glia ünitelerinin çevresinde
(Gil vd., 2009; Koleda vd., 2012; Zheng, Zhu, vd., 2012)	Üreterde lamina propriada
(Zheng, Zhu, vd., 2012)	Mesanede lamina propriada

1.2.5.1 Plasenta Telositleri

Suciu ve Popescu (2010) çalışmalarında telositlerin plasentadaki varlığı gösterilmiştir (Suciu, Popescu, vd., 2010). Bu çalışmada araştırmacılar, telositlerin plasenta stromasında uzun, ince telopod uzantıları sayesinde hücreler arası iletişimde önemli roller üstlendiğini ortaya koymuşlardır (Suciu, Popescu, vd., 2010). Bu öncü çalışma, daha sonraki araştırmalara temel oluşturmuş ve telositlerin plasenta işlevlerindeki rolünü anlamak için yeni araştırma alanlarının önünü açmıştır. Özellikle telositlerin vasküler tonusun düzenlenmesi, hücrel rejenerasyon ve plasentadaki stres yanıtları gibi süreçlerde aktif rol oynayabileceği hipotezi, bu keşiften sonra yoğun şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Telositlerin hücrel iletişim, doku homeostazi ve muhtemelen vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi önemli roller üstlendikleri çeşitli dokularda, özellikle de plasentada gözlemlenmiştir (Bosco ve Diaz, 2016; Janas vd., 2018).

Suciu (2010), plasenta villuslarının kor bölgesindeki mezenkim dokusunda telositlerin varlığını ilk kez göstermesinin yanı sıra, bu hücrelerin plasenta damarları, bağışıklık hücreleri ve stromal bileşenlerle etkileşim içinde olduğunu da ortaya koymuştur. Telositlerin özellikle koryon villuslarında, düz kas hücreleri ve stromal myofibroblastlar arasında konumlandığı ve plasenta mikroyapısının korunmasına katkı sağladığı belirlenmiştir (Bosco ve Diaz, 2016; Suciu, Popescu, vd., 2010). Bu konumları, hücreler arası sinyalleşmeyi kolaylaştırmalarına ve dokunun yapısal bütünlüğünü korumalarına olanak tanımaktadır. Plasenta telositleri de kök hücre benzeri özelliklerini gösteren ve yenileyici potansiyelleri olduğunu düşündürten CD34, c-Kit, caveolin-1 gibi belirteçleri ifade ederler (**Şekil 1.12**) (I. Cantarero vd., 2011; Janas vd., 2018; Suciu, Popescu, vd., 2010). Aynı zamanda bu telositlerin mezoderm kökenli olduğu, vimentin pozitif hücrelerin varlığıyla kanıtlanmıştır. Bu nedenle, telositlerin büyük olasılıkla sekonder ve tersiyer villuslarda bulunan mezenkimal hücrelerden farklılaşarak geliştiği öne sürülmüştür (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Ayrıca, geniş telopod uzantıları sayesinde endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere çevresindeki hücrelerle üç boyutlu bir ağ oluşturarak hücreler

arası etkileşimlerini artırır ve böylece vasküler ve immün yanıtları etkileyebilirler ve plasenta dolaşımının düzenlenmesine katkı sağlarlar (I. Cantarero vd., 2011).



Şekil 1.12: Plasenta koryon villusunun koryon bölgesinde mezenkim dokusu içinde telositler. TEM görüntüsünde telositlerin düz kas hücrelerine (DKH) komşu yerleşimi. (A) Toluidin mavisi ile boyanmış kesitlerde telositler ve telopodlar (oklar) (B). c-Kit, vimentin ve caveolin-1 ile immünfloresan işaretlenmiş telositler (C). Ölçüm çubukları: 2 µm (A), 5 µm (B ve C) (Suciu, Popescu, vd., 2010).

Araştırmalar, telositlerin besin taşınımı ve kan akışının düzenlenmesi gibi işlevlerde kritik rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Bu hücrelerin, plasenta damarlarının düz kas hücrelerinin kontraktilitesine katkıda bulunarak elektriksel uyarılar üreten ve vasküler tonusu düzenleyen “pacemaker hücreler” olarak işlev görebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, telositlerin hipoksik koşullar gibi çevresel faktörlere veya plasenta sağlığını etkileyen diğer stres faktörlerine yanıt olarak onarım ve rejenerasyon süreçlerine de dahil olabileceği belirtilmektedir (Nizyaeva vd., 2018).

Sonuç olarak, plasenta telositleri, interstisyel mikroçevrenin önemli bir bileşeni olup, hücreler arası iletişim, doku homeostazı ve vasküler düzenleme gibi birçok temel işlevde rol alarak koryon villusların yapısının kritik bir bileşeni olarak değerlendirilmektedir. Benzersiz özellikleri ve stratejik yerleşimleri, bu hücrelerin hem normal fizyolojide hem de plasenta

kaynaklı hastalıklar bağlamında çok yönlü roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Telositlerin işlevlerinin daha iyi anlaşılması, plasenta gelişimi ve hastalık mekanizmalarına yönelik yeni araştırma alanları sunmaktadır.

Özetle, telositler bazı organların stromasında tanımlanmış, ince uzun uzantılara (telopod) sahip, kendine özgü morfolojik ve işlevsel özellikler taşıyan hücrelerdir (Gherghiceanu ve Popescu, 2010). Telositlerin varlığı ve olası fonksiyonları **1.2.3** ve **1.2.4**'te detaylandırıldığı üzere, farklı organlardaki kök hücre nişlerinin bir parçası oldukları literatürde belirtilmiş olup kök hücrelerin aktivitesinin düzenlenmesi ve kök hücre nişinin şekillendirilmesinde rol oynadığı ve bu sayede doku yenilenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Gherghiceanu ve Popescu, 2010). Plasenta gibi fetal bir dokuda telositlerin varlığı gösterilmiş olmakla birlikte (Suciu, Popescu, vd., 2010); özgün yapısı, immünolojik avantajları ve allojenik kök hücre kaynağı olma potansiyeli nedeniyle klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilen fetal göbek kordonu stromasında bu hücrelerin varlığına dair literatürde herhangi bir doğrudan kanıt bulunmamaktadır.

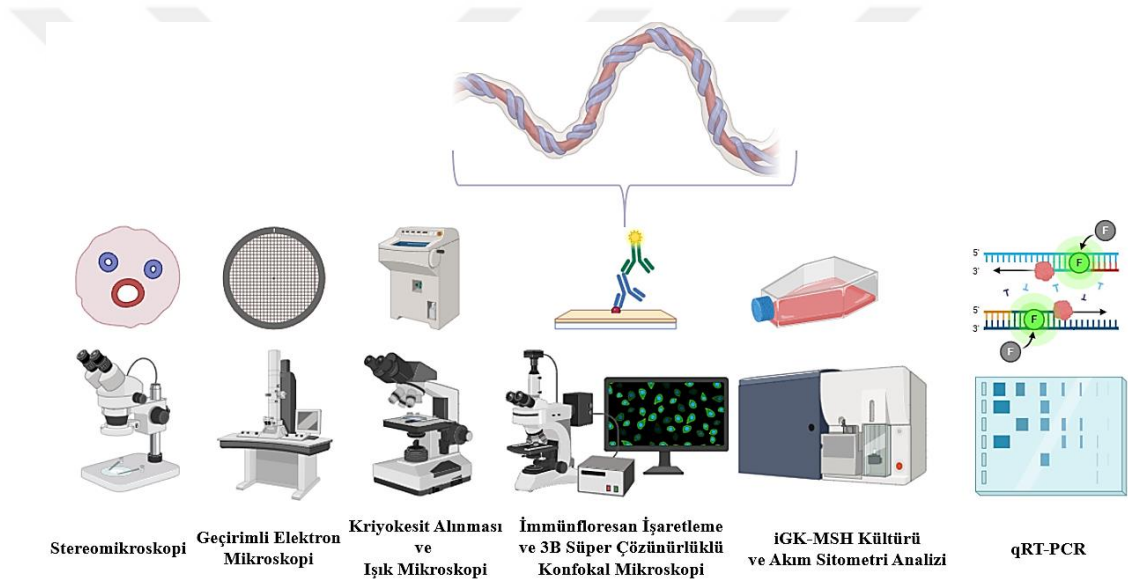
1.1.1'de bahsedildiği üzere yapılan çalışmalar, göbek kordonu stromasında ve kültür ortamında yer alan hücrelerin morfolojik ve fenotipik özelliklerine göre heterojen bir popülasyon oluşturduğunu göstermektedir. Araştırma grubumuz, bu hücreler arasında tip-1 ve tip-2 olmak üzere iki farklı hücre yapısı tanımlamıştır. Tip-1 hücreler geniş sitoplazmalı ve miyofibroblastik özellikte, tip-2 hücreler ise daha ince ve uzun görünümlü fibroblastoid fenotipte bulunmuştur (Coskun ve Can, 2015). Başka bir çalışmada da göbek kordonundan elde edilen hücrelerin kültürde farklı morfolojik yapılarda görüldüğü ve kültür süreci boyunca bu çeşitliliğin dinamik bir şekilde değiştiği izlenmiştir (Guenther vd., 2022).

Bu bağlamda, insan göbek kordonunda heterojen hücre popülasyonuna sahip stromanın yapısında yer alan, ince uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin var olduğu hipotezi benimsenmiştir. Bu hipotez doğrultusunda; söz konusu hücrelerin morfolojik, histolojik ve immünfloresan yöntemlerle tanımlanması, doku içindeki dağılım ve sıklıklarının belirlenmesi, ayrıca farklı stroma yapılarının içindeki konumlarının değerlendirilmesi ve bunun sonucunda da göbek kordonu stromasının hücre çeşitliliğine dair yeni verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, telosit benzeri hücrelerin göbek kordonu gibi fetal bir dokudaki varlığının ilk kez gösterilmesi, bu özel hücre tipinin gelişimsel süreçlerdeki rolüne ilişkin yeni araştırmalara zemin hazırlayabilecektir. Diğer bir taraftan çalışma, günümüzde yenileyici tıpta çok kullanılan iGK-MSH'nin gelişimi ve çevredeki diğer hücrelerle olan ilişkilerinin belirlenmesi açısından kök hücre ve yenileyici tıp alanına önemli bir katkı sağlama potansiyeli de taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 12 Ekim 2023 tarihinde İ09-598-23 karar numarası ile onaylanmış (**Ek-1**. Etik Kurul Kararı) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2024-3343 numarasıyla desteklenmiştir.

Göbek kordonu stromasında telosit benzeri hücrelerin tanımlanmasını amaçlayan çalışmamızda 16 adet göbek kordonu örneği kullanılmıştır. Aşağıdaki şekilde gösterildiği üzere kullanılan yöntemler göbek kordonu kesitleri ve izole edilmiş stroma hücrelerini kapsamakta ve eş zamanlı kullanılmış farklı teknikleri içermektedir (**Şekil 2.1**).



Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan gereç ve yöntemlerin şematik özeti. Göbek kordonu kesitleri ve izole edilmiş stroma hücrelerini kapsayan ve eş zamanlı kullanılmış farklı teknikler.

2.1 Göbek Kordonlarının Toplanması, Fikse Edilmesi ve Kesitlerin Alınması

Ankara Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda 16 bebeğin göbek kordonları, 38 haftalık (+/- 2 hafta) 20-35 yaş arası gebelerden onayları alınarak (**Ek-2**. Bilgilendirilmiş Onam Formu) sezaryen tekniğiyle komplikasyonsuz tekil doğumlarda plasentadan 20 cm uzakta, kordonun proksimal üçte birinden elde edildi (Coskun ve Can, 2015). Uzunluğu 12 cm olan kordonlar, doğumdan sonraki 4 saat içinde hacimce %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B, Almanya), %1 amfoterisin-B (Capricorn Scientific, AMP-B, Almanya) ve %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B, Almanya)

içeren taşıma solüsyonu Leibovitz-15 (Capricorn Scientific, L15-XA, Almanya) içinde laboratuvara taşındı ve aşağıdaki amaçlar için diseke edildi:

- i. Bir adet 2 cm'lik göbek kordonu doku parçası stereomikroskopik görüntüleme için kullanıldı.
- ii. Üç adet 1 cm'lik parça paraformaldehit (PFA) ile fikse edilip immünfloresan işaretleme ve rutin histolojik boyamaların yapıldığı ardışık dondurulmuş kesitler için kullanıldı.
- iii. İki adet 1 cm'lik parça glutaraldehit (GA) ile fikse edilip ardışık TEM analizi için hazırlandı.
- iv. İki adet 1 cm'lik parça qRT-PCR analizleri için Eppendorf tüp içinde -80 °C'de depolandı.
- v. Bir adet 5 cm'lik parça ise FACS işlemi ve SEM analizi için eksplant kültür amacıyla kullanıldı.

Bu amaçlar doğrultusunda kullanılan yöntemler aşağıda detaylandırılmıştır.

2.2 Stereomikroskopi ve Işık Mikroskopi

Stereomikroskopi incelemesi için doku blokları steril Dulbecco's PBS (D-PBS) (Capricorn Scientific, PBS-1A, Almanya) ile yıkandı ve ardından episkopik aydınlatmalı stereomikroskop altında (Nikon, Japonya) incelendi ve görüntü kaydı yapıldı. Bu inceleme, tüm örneklerin yüzey topoğrafyası ve makroskopik özellikleri, özellikle göbek damarları dikkate alınarak normal görünümüne sahip olduğunu doğrulamak amacıyla yapıldı.

Her kordondan yaklaşık 1 cm kalınlığında üç doku örneği alındı ve 4 °C'de 48 saat boyunca %3,5 (ağırlık/hacim) paraformaldehit (PFA) (EM Grade, 19200, Fransa) ile fikse edildi. Örnekler daha sonra PBS'de (Bioshop, PBS404.100, Kanada) iki kez yıkandı ve %0,01 PFA içeren 1,2 M süktroz (Sigma Aldrich, 7903, Almanya) çözeltisinde 3 gün boyunca bekletildi. Sonrasında Cryomatrix® (Fisher Scientific, 6769006, ABD) içinde -25 °C'de dondurulmuş bloklar hazırlandı. Dondurulmuş bloklar kriyomikrotom (Shandon, İngiltere) kullanılarak ortam ve örnek sıcaklıkları -25-26 °C'ye ayarlanarak 10-14 µm kalınlığında kesildi ve poli-L-lisin (Sigma Aldrich, P8920, Almanya) solüsyonuyla kaplanmış (distile su ile 1:10 oranında hazırlanan solüsyonda lamalar 20 dakika 37 °C inkübatörde bekletildi ve oda sıcaklığında kurutuldu) lamlara alındı. Dondurulmuş kesitler, standart hematoksin-eozin (HE), mallory azan (MA), masson trikrom (MT) ve periyodik asit-schiff (PAS) boyaları ile boyandı (**Şekil 2.2**). Kesitler daha sonra aydınlık alan

mikroskobu (AxioImager) (Zeiss, Almanya) kullanılarak $\times 2,5$, $\times 20$ ve $\times 40$ objektiflerle gözlemlendi ve görüntülendi. Tekil ve karo görüntü kümeleri AxioCam 503 renkli kamera ve hücre ölçümleri alınan görüntüler üzerinde Zen Blue (2.3 pro) yazılımı kullanılarak yapıldı. Alınan görüntüler Adobe Photoshop® (ver. 2022) programı kullanılarak yeniden yapılandırıldı

2.2.1 Hematoksilin-Eozin Boyaması

Boyanacak kriyokesitler öncelikle PBS'te yıkandıktan sonra 45 saniye hematoksilin boyasında (2 L distile su içerisine 200 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ bekletildi, kaynatıldı ve 100 mL %100 alkolün içine 10 g HTX (Sigma Aldrich, H-9627, Almanya) eklenerek ve suya alındı. Ocaktan alınan çözeltiye 5 g civa oksid (Merck, 21908-53-2, Almanya) eklendi. Soğuk su banyosunda karışım soğutuldu, üzerine 4 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklendi ve süzülerek şişeye alınıp batırıldı. Boya fazlalığı akana kadar musluk suyuna tutulan kriyokesitler 3 dakika da eozin boyasında (1 L distile su içerisinde 10 g Eosin Y (Isolab, 17372-87-1, Almanya) çözüldü ve üzerine 2 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklendikten sonra süzülerek hazırlandı) bekletildi. Ardından dehidrasyon işlemine geçildi. Bir dizi etanol (%75 ve %96) ile dehidrasyon işleminden sonra %100 alkolde 2 dakika ve ardından en az 30 dakika da ksilolde bekletildikten sonra Entellan® (Merck, 107961, Almanya) kullanılarak preparatlar 18x18 mm lamellerle kapatıldı ve gözleme hazır hale getirildi.

2.2.2 Mallory Azan Boyaması

Boyanacak kriyokesitler öncelikle PBS'ten geçirildikten sonra 1 saat 60 °C'de Azokarmin G (Sigma Aldrich, A1091, Almanya) solüsyonunda (250 mL suda 250 mg Azokarmin G karıştırıldıktan sonra üzerine 5 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklenerek hazırlandı) bekletildi. Soğumaya bırakılan kesitler distile su içeren şalede çalkalandı. Boya akıntısı bitene kadar %1 anilin alkole (100 mL %96'lık alkol içine 1 mL sıvı anilin eklenerek hazırlandı) batırıldı. %1 asetik alkole (100 mL %96'lık alkol içine 1 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklenerek hazırlandı) batırılıp çıkarılan kesitler disitile suya batırıldı ve sonrasında %5 fosfotungusitik asit (Sigma Aldrich, P4006, Almanya) solüsyonunda (100 mL distile suya 5 g fosfotungusitik asit eklenerek hazırlandı) 30 dakika bekletildi. Sonrasında Haunden Homes Blue solüsyonunda (%0,25 anilin mavisi (Sigma Aldrich, B8563, Almanya) ve %1 Orange G (Sigma Aldrich, 861286, Almanya) (0,5 g anilin blue ve 2 g Orange G 100 mL distile suda 170 °C'de ısıtılarak çözüldü ve üzerine 8 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklendi. Kullanmadan önce bu solüsyon distile su ile 2 kat sulandırıldı) yarım saat bekletilen kriyokesitler distile su ile yıkandı. Bir dizi etanol (%75 ve %96) ile dehidrasyon işleminden

sonra %100 alkolde 1 dakika bekletildi ve en az 30 dakika ksilolde bekletildikten sonra Entellan® kullanılarak 18x18 mm lamellerle kapatıldı ve gözleme hazır hale getirildi.

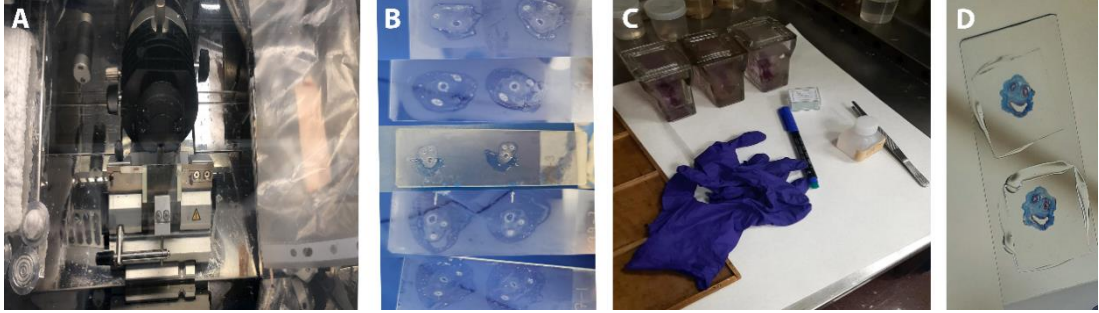
2.2.3 Masson Trikrom Boyaması

Boyanacak kriyokesitler öncelikle PBS'ten geçirildikten sonra 1 saat 56 °C etüvde Bouin solüsyonunda (75 mL pikrik asit, 25 mL formaldehit ve 5 mL %100'lük glasiyel asetik asit ile hazırlandı) bekletildi. Sarı renk akana kadar musluk suyunda yıkandı. Distile suya batırıldıktan sonra Weiger'in demirli hematoksinin solüsyonunda (100 mL %95 alkolün içerisine 1 g hematoksin eklendi. Aynı bir beherde 95 mL distile su içince 4 mL demir klorid (aq) (Merck, 7705-08-0, Almanya) çözeltisi ve 1 mL konsantre HCl eklendi ve bu iki solüsyon karıştırılarak hazırlandı) 10 dakika bekletildi. Boya akıncaya kadar musluk suyuna tutuldu. Sonrasında distile suda bekletildikten sonra lamalar Biebreich Scarlet Asit Fuksin (90 mL %1 Biebrich Scarlet (aq) (Sigma Aldrich, 4196-99-0, Almanya) solüsyonu, 10 mL %1 asit fuksin (aq) (Sigma Aldrich, 3244-88-0, Almanya), 1 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklendi) solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Lamalar distile suda bekletildikten sonra fosfomolibdik asit solüsyonunda (200 mL distile su içerisine 5 g fosfomolibdik asit (Sigma Aldrich, 51429-74-4, Almanya) eklenerek hazırlandı) 5 dakika bekletildi. Sonrasında anilin mavisi solüsyonunda (100 mL distile suya 2,5 g anilin mavisi (Sigma Aldrich, 28631-66-5, Almanya) eklendi, karıştırıldı ve üzerine de 2 mL %100'lük glasiyel asetik asit eklenerek hazırlandı) 5 dakika bekletildi. Kriyokesitler distile su ile yıkandı. Sonrasında asetik suda (100 mL distile su ile 1 mL %100'lük glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlandı) 3-5 dakika bekletilen kesitler %95 ve %100 alkolde ikişer dakika bekletildi. En az 30 dakika da ksilolde bekletildikten sonra Entellan® kullanılarak 18x18 mm lamellerle kapatıldı ve gözleme hazır hale getirildi.

2.2.4 Periyodik Asit-Schiff Boyaması

Periyodik asit solüsyonu için 1 g periyodik asit (Sigma Aldrich, 375810, Almanya) 200 mL distile suda çözüldü. Schiff solüsyonu için kaynayan 200 mL distile suya 1 g bazik fuksin (HiMedia, GRM 1089-1006, Hindistan) eklendi ve solüsyon karıştırılarak soğumaya bırakıldı. Solüsyonun sıcaklığı 50 °C'ye geldiğinde üzerine 2 g potasyum metabisülfid (JT Baker, 2960-01, ABD) eklendi ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan çözeltiye 2 mL HCl (Merck, 1.01834, Almanya) eklendi ve 2 g da aktif kömür eklenerek karıştırıldı. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak 1 gece +4 °C'de bekletildi. Ertesi gün kriyokesitler PBS'e batırıldıktan sonra 10 dakika periyodik asit solüsyonunun içine bırakıldı ve sonrasında 1-2 kez distile

sudan geçirildi. Sonrasında süzölmüş olan Schiff solüsyonunda 15 dakika bekletildikten sonra boya akıntısı geçene kadar distile suda çalkalandı. İkişer dakika sırasıyla %96 ve %100'lük alkollerde bekletilen kriyokesitler en az 30 dakika da ksilolde bekletildikten sonra Entellan® kullanılarak 18x18 mm lamellerle kapatıldı ve gözleme hazır hale getirildi.



Şekil 2.2: Işık mikroskopi. Gözlemler için kesitlerin alındığı kriyomikrotom (A) kullanılarak 10-14 µm göbek kordonu kriyokesitleri alındı (B). Hematoksilin-eozin boyaması sonrası kesitler ksilolde bekletildi (C). MA boyanmış göbek kordonu kesit örneği (D).

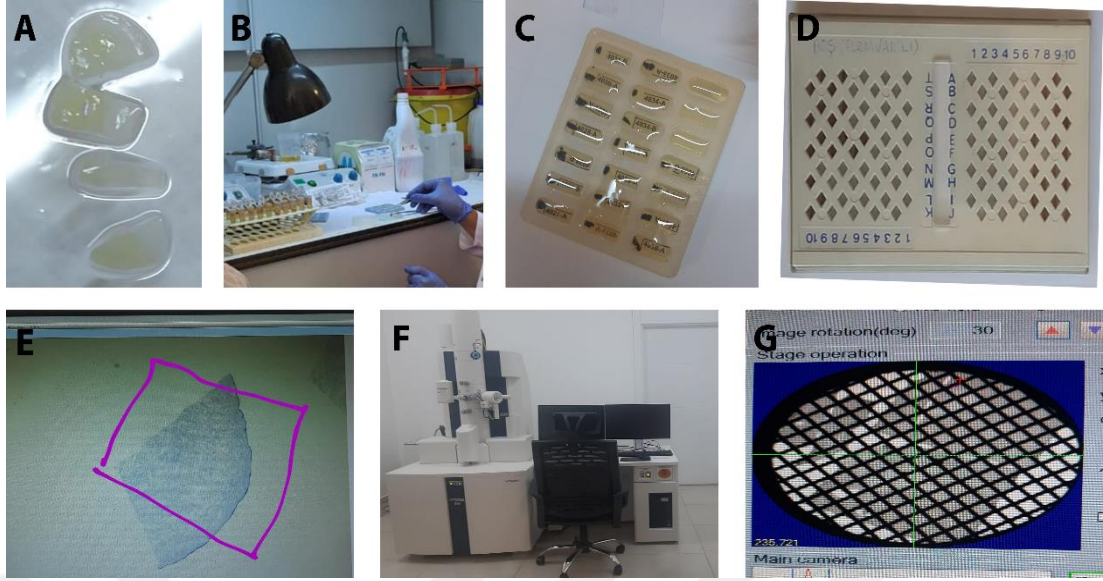
2.3 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobunda yapılacak gözlemler için, her kordon örneğinden (n=16) üç farklı stroma bölgesini (SAS, İVS, PVS) kapsayan üçer adet doku bloğu (her biri birkaç mm³ boyutunda) ve telositlerin bulunduğu pozitif kontrol doku örneği olarak bir adet sıçan bağırsağı örneği filtre edilmiş %2,5 GA (50 mL 0,2 M fosfat tamponu, 20 mL %70 paraformaldethit, 10 mL %25'lik GA (EM Sciences, 16400, İngiltere) ve 20 mL saf su kullanılarak hazırlandı) ile 2 saat fikse edilerek ilk tespit işlemi yapıldı. Daha sonra bloklar 0,1 M fosfat tamponu (1:1 distile su ile hazırlandı ve süzöldü.) ile üç kez on beşer dakika yıkandı ve ardından filtre edilmiş 0,1 M fosfat tamponunda %1 OsO₄ çözeltisi (1:1 0,2 M fosfat tamponu ve %2'lik OsO₄ (EM Sciences, 19110, İngiltere) ile hazırlandı) kullanılarak 2 saat rotorda karanlık ortamda postfikse edilerek ikinci tespiti uygulandı. Bloklar; 0,1 M fosfat tamponunda üç kez on beşer dakika yıkandıktan sonra filtre edilmiş %70 etanolde %0,05 uranil asetat ve %1 fosfotungusitik asit çözeltisinde (50 mL %70 etil alkol içerisine 250 mg uranil asetat (EM Sciences, 22400-1, İngiltere) ve 500 mg fosfotungusitik asit konarak hazırlandı) rotorda 1 saat karıştırıldı ve +4 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün her biri ikişer kez yirmişer dakika bir dizi etanol (%70, %96 ve %100) ile dehidrasyona alındı ve ardışık olarak propilen oksit (Merck, S36092, Almanya) içinde (20 dakika iki kez) ve araldit/propilen oksit (1:1) çözeltisi içinde 1 saat bekletildi. Ardından örnekler, araldit çözeltisine (10 mL araldit 600 S (Sigma Aldrich, 10951, Almanya), 10 mL dodesen-1-ilsüksinik anhidrit (DDSA) (Sigma Aldrich, 443271, Almanya), 0,3 mL benzil dimetilamin

(BDMA) (Sigma Aldrich, 185582, Almanya), 1,5 mL dibütil ftalat (DBF) (Sigma Aldrich, 524980, Almanya) karıştırılarak hazırlandı) geçirilerek rotorda oda sıcaklığında 1 saat ve 40 °C'de 1 saat ile karıştırıldı. Sonrasında içinde dokuların bulunduğu Eppendorf tüplere kapağı açık ve dik bir şekilde vakum işlemi uygulandı. Ardından, blok kabı içerisine konan dokuların üzerine araldit konarak gömülmesi sağlandı ve 70 °C'lik etüvde polimerizasyonu sağlandı. İşlem sonunda bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı.

Bloklardan ultramikrotom (Leica, Ultracut, R Almanya) ile cam veya elmas bıçaklar kullanılarak alınan 1 µm kalınlığındaki yarı ince kesitler toluidin mavisi-azur II (Sigma Aldrich, 89640, Almanya) ile boyandı. İnce kesit almak için blok yüzeyini seçmek üzere aydınlık alan mikroskobu ile incelendi. TEM gözlemi için ışık mikroskobu altında uygun alanlar işaretlendi ve ultraince kesitler bu alanlardan alındı. Ayrıca yarı ince kesitler süper çözünürlüklü konfokal mikroskobu (Zeiss, LSM880, Almanya) ile foton çoklayıcı tüp (PMT) dedektörü kullanılarak yüksek çözünürlüklü görüntüler kaydedildi. Bu mikroskoptaki incelemelerde ×40 objektifi ve 1.5-2.6 zoom faktörü kullanıldı.

İnce yapının gözlenmesi amacıyla alınan 50-70 nm kalınlığında ultraince kesitler 3 mm çapta 200 mesh'lik bakır gridlere alındı. Distile suyla 1-2 dakika yıkandı. Sonrasında 45 dakika %8'lik uranil asetat solüsyonu kullanılarak boyandı. Distile suyla 1-2 dakika ve 0,1 N NaOH ile yıkandı. İkinci boyama için %0,7 kurşun sitrat (Serva, 15158, Almanya)/%0,9 sodyum sitrat (Pol-Aura, 03.04.6132, Polonya) solüsyonunda 20 dakika bekletildi. Sonrasında 0,1 N NaOH ile ve sonrasında da distile su ile 1-2 dakika yıkandı. Hazırlanan gridler TEM'de (Hitachi, HT7800, Japonya) incelendi (**Şekil 2.3**). Tekil ve çoklu görüntüler 19 MB dijital kamera ile kaydedildi. Hücre ölçümleri alınan görüntüler üzerinde yapıldı. Alınan görüntüler Adobe Photoshop (ver. 2022) programı kullanılarak yeniden yapılandırıldı.



Şekil 2.3: Geçirimli elektron mikroskopisi. Göbek kordonunun üç farklı stroma bölgesinden (SAS, İVS, PVS) doku diseksiyonları yapıldı (A). Aralditte bekletilmiş ve vakumlanmış örnekler araldite gömüldü (B ve C). Bakır gride alınan kesitler grid kutusuna alındı (D). Yarı ince kesitlerden ışık mikroskopunda ultraince kesitler için uygun alanların seçildi (E). TEM (F). Ultraince kesitler TEM’de incelendi (G).

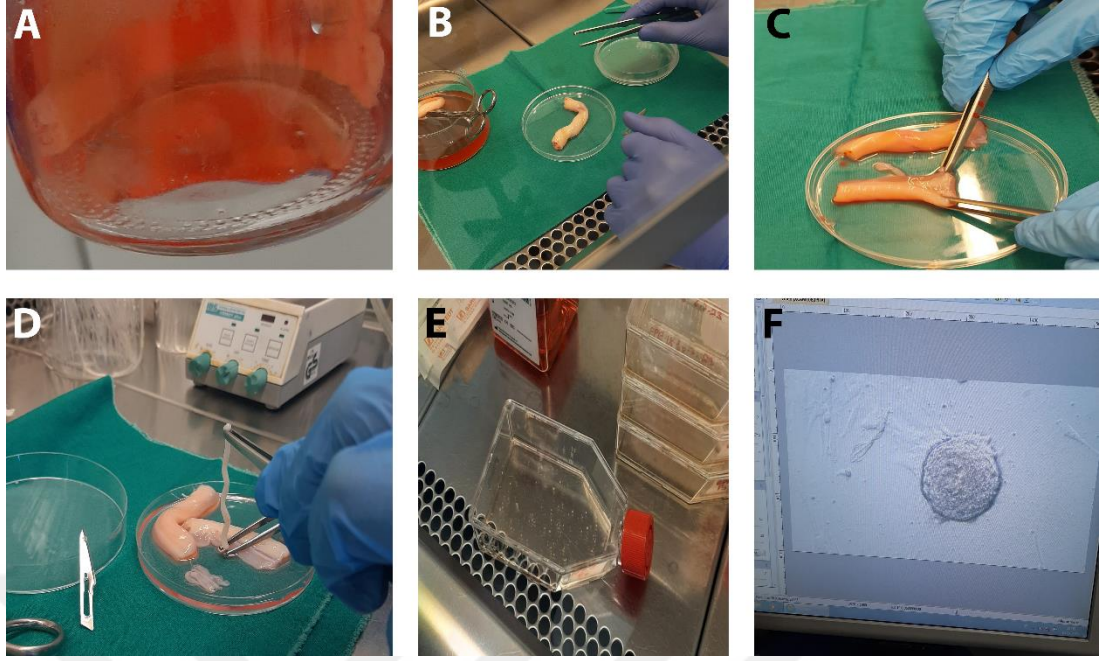
2.4 iGK-MSH Kültürü

iGK-MSH kültürüne ait deneylerin yapılmasındaki amaçlar öncelikle telosite özgü belirteçler kullanılarak kültür ortamında çoğaltılmış stroma hücrelerinin akım sitometri kullanarak miktarını saptadıktan sonra FACS cihazıyla izolasyonuydu. Ayrıca hem telosite hem de iGK-MSH’ne özgü bir dizi antikorun fikse edilmiş kültür hücrelerindeki ifadesini immünfloresan işaretleme yöntemi kullanarak incelemekti. Hücre ölçümleri kültür işlemleri sırasında alınan görüntülerde yapıldı.

2.4.1 iGK-MSH Eksplant Kültürünün Yapılması, Pasajlanması ve Dondurulması

Göbek kordonu doku parçaları örnekleri eksplant hücre kültürü işlemi için 5 cm uzunluğunda kesildikten sonra steril taşıma solüsyonu Leibovitz-15 ortamında diseke edildi. İki arteri ve veni laminar akışlı kabin altında steril cerrahi makas ve dişli penset seti kullanılarak ayrıştırıldı. Geriye kalan epiteli ve stromayı içeren doku parçası hacimce %20 fetal sıgır serumu (FBS) (Serena, S-FBSP-EU-025, Almanya) ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren 10 mL DMEM High Glucose (Capricorn Scientific, DMEM-HA, Almanya)

kültür mediyumunda (DMEM High Glucose bütün iGK-MSH kültürü deneylerinde kültür mediyumu olarak kullanıldı) 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisine alınarak makas yardımıyla 1-2 mm³'lük küçük parçalara kesildi. Ardından parçalanmış doku 200g'de 10 dakika santrifüj (Hettich, Universal 16, Singapur) edildi, üstteki süpernatant atıldı. Doku parçalarının olduğu çökelti üzerine her bir flask için 10 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve 75 cm²'lik flaslara (Sarstedt, 83.3911.002, Almanya) aktarıldı. Eksplant kültür flaskları 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo, MCO 18AC, Japonya) 18-20 gün çoğalmaya bırakıldı (**Şekil 2.4**). Doku parçalarının yapışıp yapışmadığı ve hücre çoğalmasının nasıl ilerlediği Hoffman modülasyon kontrast mikroskopunda (Olympus, Japonya) kontrol edildi. Flaskların kültür mediyumları yaklaşık 5 gün aralıklarla yenilendi. Hücreler %90 çoğalma yoğunluğuna ulaştığında flaslardaki kültür mediyumu aspire edildi, flasklar D-PBS ile yıkanıp aspire edildi. Üzerine 3 mL tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, TRY-3B, Almanya) eklenerek inkübatörde 8 dakika bekletildi. Yapışmış hücrelerin kalktığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra flaslara 6 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklendi ve bu sayede enzim inhibe edildi. Flaslardaki süspansiyon 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda süpernatant aspire edildikten sonra çökelti her bir flask için 20 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve 175 cm²'lik flaslara (Sarstedt, 83.3912.002, Almanya) aktarıldı. Hücrelerin çoğalma yoğunluğu birkaç gün arayla kontrol edildi ve kültür mediyumları yenilendi. Hücrelerin mikroskop altında %90 çoğalma yoğunluğuna ulaştıkları gözlemlendiğinde flaslardaki kültür mediyumu aspire edildi, flasklar D-PBS ile yıkanıp aspire edildi. Üzerine 6 mL tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 8 dakika bekletildi. Yapışmış hücrelerin kalktığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra flaslara 12 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklendi ve bu sayede enzim inhibe edildi. Flaslardaki süspansiyon 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda süpernatant aspire edildikten sonra çökelti her bir 175 cm² flask için 1620 µL %20 FBS içeren kültür mediyumu ile resüspande edildi. Süspansiyonlar kriyoviallere (Sarstedt, 72.379, Almanya) aktarıldıktan sonra üzerlerine 180 µL (hacimce %10 olacak şekilde) dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, D4540, Almanya) yavaş yavaş damlatılarak eklendi ve kriyovialler Mr. Frosty® (Nalgene, 5100-0036, ABD) içerisinde 1. pasajda dondurularak -80 °C'ye kaldırıldı. Birkaç gün sonra hücreleri ilerleyen deneyler için uzun zaman saklamak amacıyla -196 °C olan sıvı azot tankına yerleştirildi (Can & Balci, 2011).



Şekil 2.4: Eksplant iGK-MSH kültürü. Göbek kordonu parçası (5 cm) L-15 solüsyonu içerisinde laminar kabine alındı (A). Göbek kordonunun 5 cm'lik parçası eksplant kültür için ayrıldı (B). Ayrılan parça damarlarının çıkarılması için diseke edildi (C ve D). Flasklara eksplantlar ekildi (E). Eksplantlardan hücre çıkışı Hoffman modülasyon kontrast mikroskobunda gözlemlendi (F).

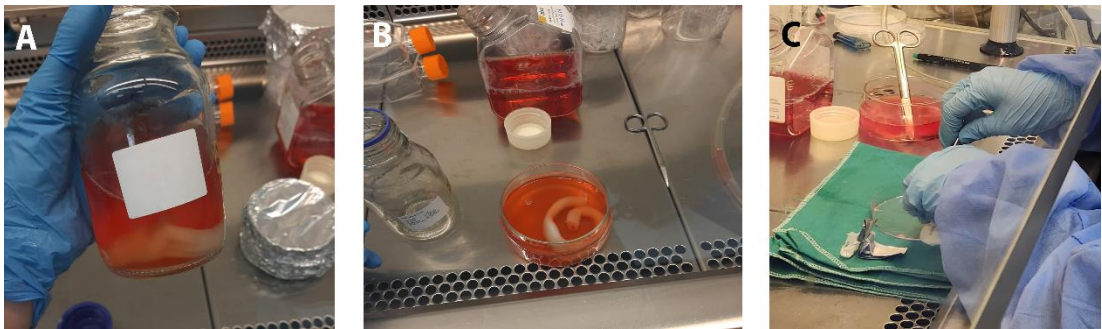
2.4.2 iGK-MSH Enzimatik Kültürü

Göbek kordonu stroma hücrelerinin immünfloresan işaretlenmeleriyle antikor ifadelerinin eksplant ve enzimatik kültüre göre değişip değişmediğini gözlemlemek amacıyla enzimatik hücre kültürü denendi. Göbek kordonu diseke edilmeden önce daha önce literatürde belirtilen (Can ve Karahuseyinoglu, 2007) (Coskun ve Can, 2015) hacimce yüzdeler kullanılarak 4 farklı enzim kullanılarak enzim karışımı hazırlandı: FBS içermeyen kültür mediyumunda 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisine toplam hacim 40 mL olacak şekilde hacimce %2'lik 800 µL dispaz (Sigma Aldrich, D4693, Almanya), hacimce %0,2'lik 80 µL kollajenaz tip-II (Sigma Aldrich, C6885, Almanya), hacimce %0,2'lik 80 µL hyaluronidaz (Sigma Aldrich, H3884, Almanya) ve hacimce %0,1'lik 40 µL kollajenaz tip-I (Sigma Aldrich, C0130, Almanya) eklenerek hazırlandı. Kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

Göbek kordonu örnekleri hücre kültürü işlemi için Leibovitz-15 ortamında diseke edildi. İki arteri ve veni laminar akışlı kabin altında steril makas ve dişli penset seti kullanılarak ayrıştırıldı. Geriye kalan doku parçası bistüri ve makas kullanılarak küçük parçalara ayrıştırıldı, önceden hazırlanan enzim karışımının içerisine alındı ve 37 °C'deki sıcak su banyosunda sallanarak sindirilmesi sağlandı. İki saat sonunda santrifüj tüpünün

içindeki doku parçaları ayrı bir santrifüj tüpüne alındıktan sonra süspansiyon 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Enzim karışımından oluşan süpernatant tüpe alındıktan sonra çökelti 10 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve 75 cm²'lik flaska aktarıldı. Enzim karışımı ve doku parçalarını içeren santrifüj tüpü yine aynı şekilde 37 °C'deki sıcak su banyosunda sallanarak bekletildi. Bir saat sonunda santrifüj tüpünün içindeki doku parçaları ayrı bir santrifüj tüpüne alındıktan sonra süspansiyon 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Enzim karışımından oluşan süpernatant doku parçalarının bulunduğu tüpe alındıktan sonra çökelti 10 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve 75 cm²'lik flaska aktarıldı. Bu iki flask 2. saat ve 3. saat olarak etiketlendikten sonra 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde yaklaşık 1 ay çoğalmaya bırakıldı. Hücre çoğalmasının nasıl ilerlediği Hoffman modülasyon kontrast mikroskopunda belli aralıklarla kontrol edildi.

Enzim karışımında bulunan hyaluronidazın hücre zarlarına zarar verebileceği düşünülerek diğer 3 farklı enzimle hazırlanan enzim karışımıyla protokol tekrarlandı. FBS içermeyen kültür mediyumunda 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisine toplam hacim 45 mL olacak şekilde hacimce %2'lik 900 µL dispaz, hacimce %0,2'lik 80 µL kollajenaz tip-II ve hacimce %0,1'lik 45 µL kollajenaz tip-I eklenerek hazırlandı. Kordon parçaları 37 °C'deki sıcak su banyosunda sallanarak sindirildi (**Şekil 2.5**). Dört saat sonunda santrifüj tüpünün içindeki doku parçaları ayrı bir santrifüj tüpüne alındı ve süspansiyon 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Enzim karışımından oluşan süpernatant doku parçalarının bulunduğu tüpe alındıktan sonra çökelti 10 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve 75 cm²'lik flaska aktarıldı. Flask 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde yaklaşık 1 ay çoğalmaya bırakıldı. Hücre çoğalması Hoffman modülasyon kontrast mikroskopunda belli aralıklarla kontrol edildi.



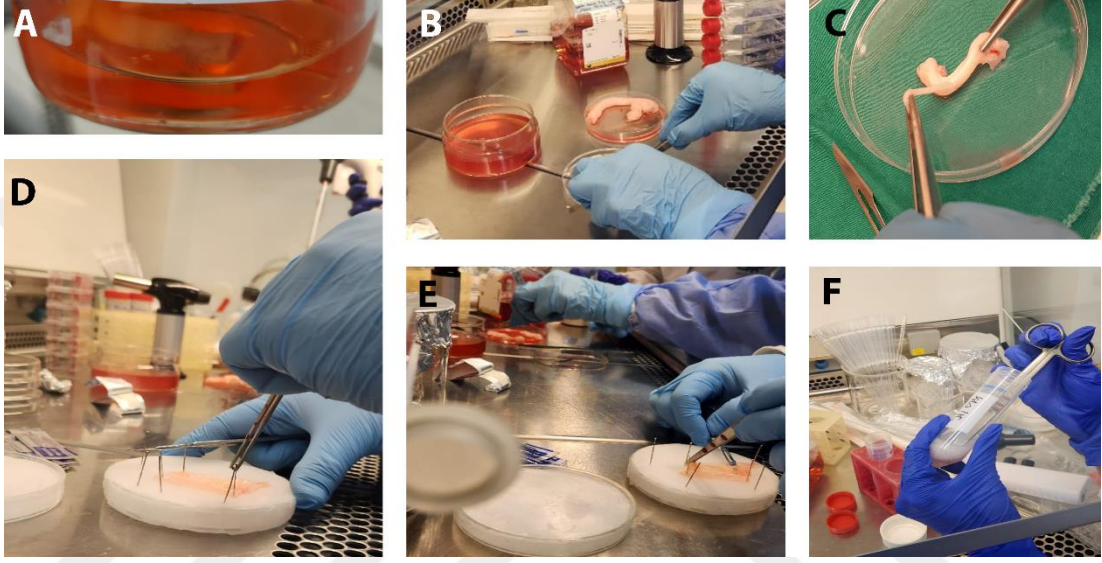
Şekil 2.5: Enzimatik iGK-MSH kültürü. Göbek kordonu L-15 solüsyonu içerisinde hücre kültürüne alındı (**A** ve **B**). Enzimatik kültür için göbek kordonunun damarları çıkarıldıktan sonra küçük parçalara diseke edildi (**C**).

2.4.3 İVS ve SAS'dan Eksplant Hücre Kültürü

Göbek kordonu stromasında bulunan ince uzun uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin göbek kordonundaki farklı stroma kültürlerinde miktarlarının değişip değişmeyeceğini gözlemlemek amacıyla iki farklı kültür denendi.

Göbek kordonu örneklerinin eksplant hücre kültürü işlemi için 5 cm kesildikten sonra steril taşıma solüsyonu Leibovitz-15 ortamında diseke edildi. İki arteri ve veni laminar akışlı kabin altında steril makas ve dişli penset seti kullanılarak ayrıştırıldı. Geriye kalan epitel ve altındaki stromadan oluşan parça önceden içinde parafin dondurulmuş ve ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılmış cam petri üzerine toplu iğnelerle sabitlendi. Dişli penset ve bistüri kullanılarak İVS kazındı; 10 mL kültür mediyumunda 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisine alınarak makas yardımıyla 1-2 mm³'lük küçük parçalara kesildi (**Şekil 2.6**). Geriye kalan epitel ve altındaki SAS ayrı bir 10 mL kültür mediyumunda 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisine alınarak makas yardımıyla 1-2 mm³'lük küçük parçalara kesildi. Bu işlemler üç farklı göbek kordonu örneği için tekrarlandı. İkişer İVS ve SAS doku parçasını içeren santrifüj tüpleri 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda üstteki süpernatant atıldı. Doku parçalarının olduğu çökelti üzerine her bir flask için dörder mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve 25 cm²'lik flasklara aktarıldı. Her bir santrifüj tüpü için üçer adet flask kullanıldı. Eksplant kültür flaskları 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde 18-20 gün çoğalmaya bırakıldı. Doku parçalarının yapışıp yapışmadığı ve hücre çoğalmasının nasıl ilerlediği Hoffman modülasyon kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Hücrelerin çoğalma yoğunluğu arttığında flasklardaki kültür mediyumu aspire edildi, flasklar D-PBS ile yıkanıp aspire edildi. Üzerine 2 mL tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 8 dakika bekletildi. Yapışmış hücrelerin kalktığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra flasklara 4 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklendi. Flasklardaki süspansiyon 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda süpernatant aspire edildikten sonra çökelti her bir flask için 10 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve her santrifüj tüpü 2 adet 75 cm²'lik flasklara aktarıldı. Hücrelerin çoğalma yoğunluğu birkaç gün arayla kontrol edildi ve kültür mediyumları yenilendi. Hücrelerin mikroskop altında çoğalma yoğunluğunun arttığı gözlemlendiğinde flasklardaki kültür mediyumu aspire edildi, flasklar D-PBS ile yıkanıp aspire edildi. Üzerine 4 mL tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 8 dakika bekletildi. Yapışmış hücrelerin kalktığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra flasklara 8 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklendi ve bu sayede enzim inhibe edildi. Flasklardaki süspansiyon 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda süpernatant aspire

edildikten sonra her 2 adet 75 cm²'lik flask 1 kriyovialde dondurulmak üzere hücre dondurma işlemine geçildi. Çöktülerin üzerine 1620 µL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi ve süspansiyonlar kriyoviallere aktarıldıktan sonra üzerlerine 180 µL (hacimce %10 olacak şekilde) DMSO yavaş yavaş damlatılarak eklendi ve kriyovialler Mr. Frosty® içerisinde 1. pasajda dondurularak -80 °C'ye kaldırıldı. Birkaç gün sonra hücreler ilerleyen deneyler için uzun zamanlı saklama amacıyla -196 °C olan sıvı azot tankına yerleştirildi (Can & Balci, 2011).



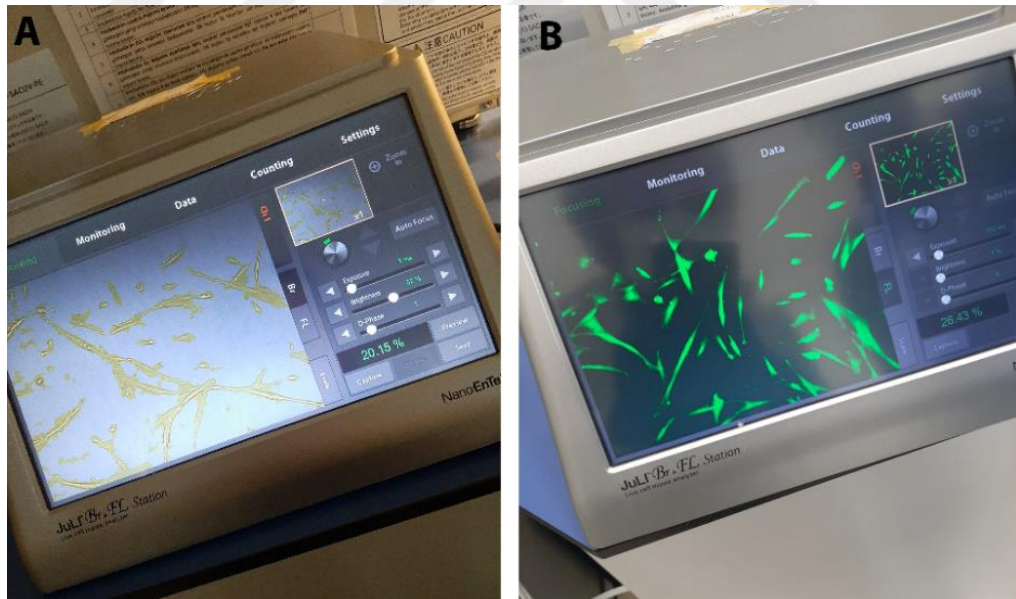
Şekil 2.6: Göbek kordonundan İVS ve SAS hücre kültürü. Göbek kordonu L-15 solüsyonu içerisinde hücre kültürüne alındı (A). Göbek kordonunun 5 cm'lik parçası İVS ve SAS hücre kültürü için ayrıldı (B). Göbek kordonu damarları çıkarıldı (C). Parça önceden içinde parafin dondurulmuş ve UV'lenmiş cam petri üzerine toplu iğnelerle sabitlendi (D). Dişli penset ve bistüri kullanılarak İVS kazındı (E). Parçalar kültür mediyumunda 50 mL'lik santrifüj tüpü içerisine alınarak cerrahi makas yardımıyla 1-2 mm³'lük küçük parçalara kesildi (F).

2.4.4 iGK-MSH'nin Calcein AM ile İşaretlenmesi ve Görüntülenmesi

Sıvı azottan alınan bir adet kontrol olgusu (1. pasaj) kriyovial -196 °C'deki sıvı azottan 37 °C'deki su banyosuna alındı ve 1-2 dakika beklendikten ve çözüldükten sonra 8 mL %10 FBS ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren kültür mediyumuna hafifçe damlatılarak alındı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda kültür mediyumu aspire edildi ve çökelti üzerine 45 mL %10 FBS ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi. Süspansiyondan 20 mL alınarak 75 cm²'lik 2 adet flaskta aktarıldı ve flasklar 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Yaklaşık 8-10 saat sonra hücrelerin yapışmasından sonraki çoğalmayı gözlemlemek amacıyla bir flask inkübatörde JuLI® canlı hücre kayıt cihazına (Nanogentek, JuLI Br&Fl Station FGSC, Kore)

alındı ve faz kontrast mikroskobunda çoğalma yoğunluğu görüntüleri çekildi ve 18 saatlik bir video kaydı alındı. Hücrelerin birbiriyle iletişimlerini gözlemlemek amacıyla tam olarak yapışıp çoğalma yoğunluklarının 2-3 gün sonra bir miktar daha artmasının ardından uzun ince hücrelerin olduğu alandan çoğalma yoğunluğunun tamamen arttığı 72 saatlik bir video kaydı alındı.

Hücreleri floresan işaretleyip görüntü almak adına 1,5 μM 'lık Calcein AM (Corning, 354216, İngiltere) solüsyonu hazırlandı. Stok Calcein AM çözeltisinden 18 μL alınarak 10 mL FBS içermeyen çözeltisi içerisine eklendi ve alüminyum folyoya sarılarak +4 °C'ye kaldırıldı. İkinci flaskta bulunan hücrelerin çoğalma yoğunluğu biraz daha arttıktan sonra flasktaki kültür mediyumu aspire edildi, flasklar 2 kez D-PBS ile yıkanıp aspire edildi. Sonrasında flaska 10 mL Calcein AM içeren FBS içermeyen çözeltisi eklendi ve 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde 100 dakika bekletildi. Süre sonunda kültür mediyumu aspire edildi ve 2 kez D-PBS ile yıkanıp aspire edildi. Flaska %20 FBS içeren kültür mediyumu eklendi ve inkübatördeki JuLI® cihazının yeşil floresan protein (GFP) modülü kullanılarak uzun ince hücrelerin floresan görüntüleri alındı (Şekil 2.7). Sonrasında flasklar 2.4.1'deki protokole uygun olarak hücre kaldırma ve dondurma işlemleriyle donduruldu ve sıvı azota kaldırıldı.



Şekil 2.7: iGK-MSH'nin hücre kayıt cihazında (JuLI®) görüntülenmesi. Faz kontrast (A) ve Calcein AM işaretlenerek görüntülendi (B).

2.4.5 iGK-MSH'nin İmmüno Floresan İşaretleme İçin Fiksasyonu

İki adet 24 kuyucuklu kültür kabı içerisine 48 adet poli-L-lizin kaplanmış cam lamel kondu ve UV ışığa maruz bırakıldı. Sonrasında sıvı azottan alınan bir adet kontrol olgusu (1.

pasaj) kriyovialı -196 °C'deki sıvı azottan 37 °C'deki su banyosuna alındı ve 1-2 dakika beklendikten ve çözündükten sonra 8 mL hacimce %10 FBS ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren kültür mediyumuna hafifçe damlatılarak alındı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda kültür mediyumu aspire edildi ve çökelti üzerine 48 mL %10 FBS ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi. Her bir kuyucuğa birer mL olacak şekilde hücrelerin ekimi sağlandı. Hücreler (2. pasaj) inkübatöre kaldırıldı ve 4 gün sonra kontrol edildi. Hücrelerin Hoffman modülasyon kontrast mikroskopunda %90 çoğalma yoğunluğuna ulaştıkları görüldüğünde cam lamellerin fiksasyonu yapıldı.

İlk olarak kültür mediyumu aspire edildi ve kuyucuklar ikişer kez D-PBS ile yıkandı. Üçüncü kez D-PBS konduktan sonra çeker ocağın altında işlemlere devam edildi. Her kuyucuktan D-PBS aspire edildikten sonra birer mL %3,5 PFA kuyucuklara kondu. Kültür kabının kapağı kapatıldı ve bir rocker üzerinde yavaşça 20-25 dakika sallandırıldı. Süre sonunda PFA aspire edildi ve ikişer kez PBS azide ile yıkandı. Üçüncü kez kuyucuklara birer mL PBS azide eklendi. Kuyucukların aralarındaki bölmelere distile su konarak nemli ortam korundu ve buharlaşma engellendi. Kültür kabının kapağı kapatıldıktan sonra selofan bant ile hava almayacak şekilde bantlanarak saklamak için +4 °C'ye kaldırıldı.

2.4.6 iGK-MSH'de Telositlere Özgü Belirteçler Kullanılarak Akım Sitometri Analizlerinin Yapılması

iGK-MSH'de telositlere özgü belirteçler kullanılarak bu hücre popülasyonunun yüzdesinin akım sitometriyle saptanması ve hücrelerin FACS işlemi ile ayrıştırılması amaçlandı. Akım sitometri deneyleri toplam 3 kez tekrarlandı. Bu üç deney şematik olarak özetlendi (**Şekil 2.8**). Kullanılan antikolar; kullanım kılavuzlarında yer alan akım sitometri için önerilen dilüsyonlara uygun dilüe edildi. Bütün deneylerde CD34 antikoru (Abcam, ab762, Birleşik Krallık) fare kaynaklı olduğu için ikincil antikoru olarak FITC GaM (Floresan izotiyosiyanat Goat-anti-Mouse) (Calbiochem, 401244, ABD) ve PDGFR- α (Abcam, ab203491, Birleşik Krallık) ve c-Kit (CD117) (Finetest, FNab01726, ABD) antikoları da tavşan kaynaklı olduğu için ikinci antikoları olarak Cy3 GaRb (Siyanin-3 Goat-anti-Rabbit) (Jackson ImmunoResearch, 11-165-045, Birleşik Krallık) kullanıldı. Birincil antikorlardan CD34 ve c-Kit (CD117) stoktan 1:500 dilüsyonlarda PDGFR- α ise stoktan 1:200 dilüsyonda hazırlanarak kullanıldı.

Bütün akım sitometri işlemleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı'ndan hizmet alımı ile yapıldı. Örnekler BD FACS Canto II (Becton Dickinson, ABD) cihazı ve FlowJo (Becton Dickinson, ABD) yazılımı kullanılarak analiz

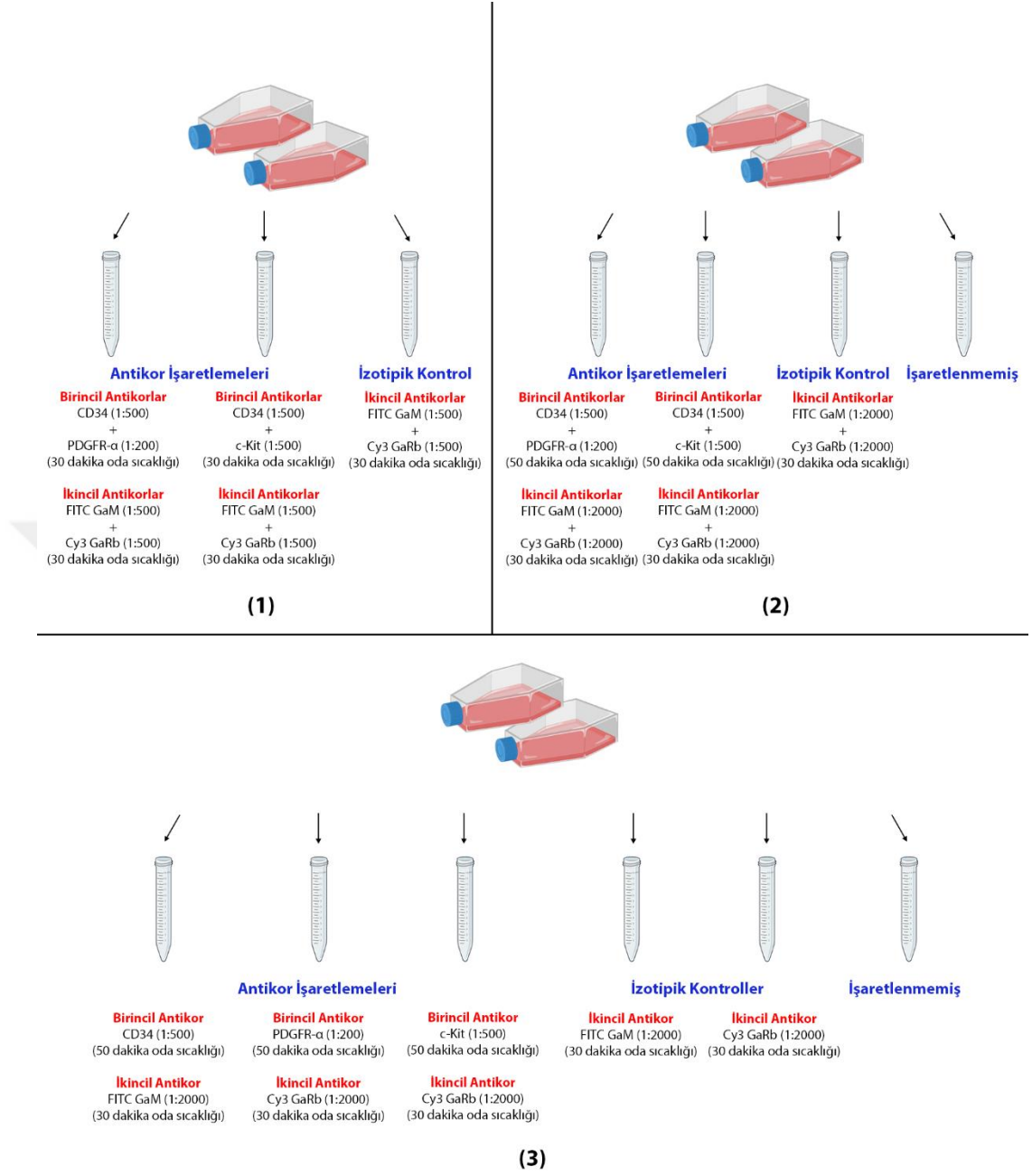
edildi. İlgili antikorların pozitiflik yüzdeleri izotipik kontrole (negatif kontrol) ve otofloresana göre belirlendi.

İlk akım sitometri deneyinde birincil antikorlar ikili analiz edildi. Öncelikle sıvı azottan alınan bir adet kontrol olgusu (1. pasaj) kriyovial -196 °C'deki sıvı azottan 37 °C'deki su banyosuna alındı ve 1-2 dakika beklendikten ve eridikten sonra 8 mL hacimce %10 FBS ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren kültür mediyumuna hafifçe damlatılarak alındı ve 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda kültür mediyumu aspire edildi ve çökelti üzerine 40 mL %20 FBS ve %1 PS, AMP ve L-Glutamin içeren kültür mediyumu eklenerek resüspande edildi. Süspansiyondan 20 mL alınarak 2 adet 175 cm² flaska ekildi. Hücreler %80 çoğalma yoğunluğuna ulaştığında flaskalar bir kez D-PBS ile yıkandı ve aspire edildikten sonra üzerine 6 mL Tryple (Gibco Thermo Scientific, 12604013, ABD) eklenip 37 °C'de 8 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerin kalktığı mikroskopta gözlemlendikten sonra enzim üzerine 12 mL %20 FBS içeren kültür mediyumu eklenerek inhibe edildi. Hücreler santrifüj tüplerine toplandıktan sonra 200g'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrasında kültür mediyumu aspire edildi ve üzerine 1 mL FBS içermeyen kültür mediyumu eklendi ve resüspande edildi. Hücre süspansiyonu birincil antikorların olduğu 15 mL'lik santrifüj tüplerine 400'er µL ve izotipik kontrolün yapılacağı santrifüj tüpüne ise 200 µL olacak şekilde paylaştırıldı ve her santrifüj tüpü toplam 500 µL olacak şekilde toplam hacimleri FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak tamamlandı. Akım sitometri işlemi için hücre süspansiyonunun üzerine birincil antikor uygulaması için ilk 15 mL'lik santrifüj tüpüne 1 µL CD34 ve 2,5 µL PDGFR-α; diğer 15 mL'lik santrifüj tüpüne ise 1 µL CD34 ve 1 µL c-Kit (CD117) birincil antikorları eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 200g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı ve çökelti 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak resüspande edildi. Süspansiyonların üzerine ikincil antikorlar; 1 µL FITC GaM ve 0,75 µL Cy3 GaRb eklendi. Üçüncü tüpteki izotipik kontrole ise yine bu iki ikincil antikor eklendikten sonra karanlıkta (alüminyum folyoya sarılarak) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Santrifüj tüplerine 5-10 dakikada bir hafifçe vurarak karışmasını sağlandı ve inkübasyon süresi boyunca laminar kabinin ve hücre kültürü laboratuvarının ışıkları kapalı tutuldu. Süre sonunda santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant aspire edildi ve 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak tekrar yıkandı. Tekrar santrifüj edildi ve çökelti üzerine 200 µL FBS içermeyen kültür mediyumu eklendikten sonra santrifüj tüpleri alüminyum folyoya sarılarak buz aküleriyle analiz için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı Temel Onkoloji Laboratuvarı'na götürüldü.

Akım sitometrinin ikinci deneyinde birincil antikorların inkübasyon süresi arttırıldı, ikincil antikor dilüsyonu 1/4 oranında seyreltilerek 1/2000 olacak şekilde yapıldı ve işaretlenmemiş (unstained) hücre süspansiyonu da analiz edildi. Hücreler ilk deneyde olduğu gibi Tryple kullanılarak kaldırıldıktan ve enzim inhibe edildikten sonraki 36 mL'lik hücre süspansiyonu 4 adet 15 mL'lik santrifüj tüpüne 2 tanesine on ikişer mL ve diğer 2 tanesine de altışar mL olacak şekilde bölüştürüldü. Santrifüj tüpleri 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda kültür mediyumları aspire edildi ve birincil antikorların olacağı (santrifüj öncesi 12 mL hücre süspansiyonu içeren) santrifüj tüplerine birincil antikor karışımları (500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanarak Eppendorf tüplerinde uygun dilüsyonlarında önceden hazırlandı ve doğrudan çökelti üzerine konarak resüspande edildi) eklendi. İlk santrifüj tüpüne 1 µL CD34 ve 2,5 µL PDGFR-α ve ikincisinde de 1 µL CD34 ve 1 µL c-Kit olacak şekilde çökelti 500 µL kültür mediyumu-antikor karışımı ile resüspande edildi. İşaretlenmemiş ve izotipik kontrol santrifüj tüplerine de 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu eklendi. Santrifüj tüpleri oda sıcaklığında 50 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 200g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. İşaretlenmemiş grup hariç diğer 3 santrifüj tüpündeki bütün çökelti üzerine ikincil antikor karışımları (500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanarak Eppendorf tüplerinde 1:2000 oranında önceden hazırlandı ve doğrudan çökelti üzerine konarak resüspande edildi) eklendi. İkincil antikor koktelleri 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumunda 0,250 µL FITC GaM ve 0,188 µL Cy3 GaRb antikorlarını içeriyordu. İşaretlenmemiş gruba ait santrifüj tüpündeki çökelti ise 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanarak resüspande edildi. Santrifüj tüpleri karanlıkta (alüminyum folyoya sarılarak) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, 5-10 dakika aralarla bir hafifçe vurarak karışmasını sağlandı ve inkübasyon süresi boyunca laminar kabinin ve hücre kültürü laboratuvarının ışıkları kapalı tutuldu. Santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant aspire edildi ve 100 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanarak tekrar yıkandı, süspansiyonun 10 µL'si lama yaymak için ayrıldı. Süspansiyonun üzerine 410 µL daha FBS içermeyen kültür mediyumu eklendi. Hücre süspansiyonu (500 µL) tekrar santrifüj edildi. Süpernatantlar aspire edildikten sonra çökelti üzerine 200 µL FBS içermeyen kültür mediyumu eklendikten sonra santrifüj tüpleri alüminyum folyoya sarılarak buz aküleriyle analiz için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı Temel Onkoloji Laboratuvarı'na götürüldü.

Son akım sitometri deneyinde ise kullanılan birincil antikorlar hücre süspansiyonlarında ikili değil tek tek analiz edildi. Hücreler önceki deneylerde olduğu gibi Tryple kullanılarak kaldırıldıktan ve enzim inhibe edildikten sonraki 36 mL'lik hücre süspansiyonu 6 adet 15 mL'lik santrifüj tüpüne her birine altışar mL olacak şekilde

bölüştürüldü. Santrifüj tüpleri 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda kültür mediyumları aspire edildi ve birincil antikorların olacağı 3 adet santrifüj tüpüne birincil antikor karışımları (500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak Eppendorf tüplerinde uygun dilüsyonlarda önceden hazırlandı ve doğrudan çözelti üzerine konarak resüspande edildi) eklendi. İlk santrifüj tüpüne içinde 1 µL CD34 antikoruna olan 500 µL kültür mediyumu-antikor karışımı, ikincisine içinde 2,5 µL PDGFR- α antikoruna olan 500 µL kültür mediyumu-antikor karışımı ile ve üçüncüsüne de içinde 1 µL c-Kit antikoruna olan 500 µL kültür mediyumu-antikor karışımı eklenerek çözeltiler resüspande edildi. İşaretlenmemiş ve izotipik kontrollerin olacağı santrifüj tüplerine de 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu eklendi. Santrifüj tüpleri oda sıcaklığında 50 dakika inkübe edildi. Süre sonunda santrifüj tüpleri 200g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları aspire edildi. İşaretlenmemiş grup hariç diğer 5 santrifüj tüpündeki bütün çökeltilerin üzerine ikincil antikor karışımları (500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak Eppendorf tüplerinde 1:2000 oranında önceden hazırlandı ve doğrudan çökelti üzerine konarak resüspande edildi) eklendi. CD34 birincil antikorunu içeren santrifüj tüpüne FITC GaM ikincil antikoruna, PDGFR- α ve c-Kit antikorlarını içeren santrifüj tüpüne Cy3 GaRb ikincil antikoruna, izotipik kontroller için bir çökeltinin üzerine FITC GaM ikincil antikoruna, diğer bir çökeltinin üzerine Cy3 GaRb ikincil antikoruna eklendi. Her bir ilgili santrifüj tüpü için ikincil antikor karışımları 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumunda 0,250 µL FITC GaM ve 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumunda 0,188 µL Cy3 GaRb antikorlarını içeriyordu. İşaretlenmemiş gruba ait olan santrifüj tüpündeki çökelti ise 500 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak resüspande edildi. Santrifüj tüpleri karanlıkta (alüminyum folyoya sarılarak) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Santrifüj tüpleri aralarda 5-10 dakikada bir hafifçe vurarak karışmasını sağlandı ve inkübasyon süresi boyunca laminar kabinin ve hücre kültürü laboratuvarının ışıkları kapalı tutuldu. Süre sonunda santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant aspire edildi ve 100 µL FBS içermeyen kültür mediyumu kullanılarak tekrar yıkandı, süspansiyonun 10 µL'si lama yaymak için ayrıldı. Süspansiyonun üzerine 410 µL daha FBS içermeyen kültür mediyumu eklendi. Hücre süspansiyonu (500 µL) tekrar santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildikten sonra çökeltilerin üzerine 200 µL FBS içermeyen kültür mediyumu eklendikten sonra santrifüj tüpleri alüminyum folyoya sarılarak buz aküleriyle analiz için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı Temel Onkoloji Laboratuvarı'na götürüldü.



Şekil 2.8: Akım sitometri deneyleri. Toplam üç kez tekrarlanan akım sitometri deneylerinin şematik gösterimi.

2.4.6.1 Akım Sitometri Örneklerinin Konfokal Mikroskopta İncelenmesi

Akım sitometride gözlemlenen örneklerin protein ifadesinin ayrıca süper çözünürlüklü konfokal mikroskobunda incelenmesi ve karşılaştırılması amaçlanarak yayma preparatlar hazırlandı.

İkinci ve üçüncü akım sitometri deneylerinde son santrifüjden önce her bir tüpteki işaretli ya da işaretsiz hücre süspansiyonlarından 10 µL ayrı bir Eppendorf tüpe alındı ve üzerine 90 µL %3,5 PFA çözeltisi eklenip resüspande edildi. Sonrasında 5-10 dakika oda sıcaklığında fiksasyonu için beklendikten sonra Eppendorf tüpler 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant çekildi ve çökelti üzerine 10 µL PBS ve 10 µL de Hoechst 33258 içeren kapatma mediyumu (5 mL gliserol (Sigma Aldrich, G5516, Almanya), 5 mL PBS, 250 mg azide (Sigma Aldrich, S8032, Almanya) ve 10 µL Hoechst stok ile hazırlandı) eklenerek resüspande edildi. Her bir Eppendorf tüpündeki 20 µL fikse edilmiş ve çekirdekleri işaretli hücre süspansiyonları lamalara alındıktan sonra 18x18 mm lamellerle kapatıldı, tırnak cilasıyla çerçevelendi ve süper çözünürlüklü konfokal mikroskopunda gözlemlemek amacıyla +4 °C'ye kaldırıldı.

2.5 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu için 2.4.5'te verildiği üzere hücreler 24 kuyucuklu kültür kabının 12 kuyucuğundaki yuvarlak cam lameller üzerinde çoğatıldı. Çoğalma yoğunlukları %90'a ulaştığında kültür mediyumu aspire edildi ve kuyucuklar 2 kez D-PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 200 µL %2,5 glutaraldehit solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında fikse edildiler. Süre sonunda 2 kez on beşer dakika 0,1 M Sorenson tamponunda yıkandı. Sonrasında OsO₄ stok çözeltisi (%1'lik OsO₄) ile 0,2 M Sorenson tamponu 1:1 oranında sulandırılarak filtre edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika post fiksasyon yapıldı. Sonrasında örnekler 2 kez on beşer dakika 0,1 M Sorenson tamponuyla yıkandı. Sırasıyla %30, %50, %75 ve %95 etanol serilerinde birer kez on beşer dakika bekletildi. En son 2 kez 15'er dakika %100 etanolde bekletildi. Sonrasında 12 cam lamelin 4 tanesi önce 1:1 saf etanol+hekzametildisilazan (HMDS) (Fluka Analytical, 52620, Almanya) karışımında 5 dakika tutuldu, daha sonra HMDS içinde kendiliğinden buharlaşana kadar 3-5 dakika bekletildi. Örnekler karbon kaplı (Carbon adhesive tabs; EM Sciences, 77825-12, İngiltere) alüminyum tutacalara (stab) (Aluminum mount; EM Sciences, 75191, İngiltere) yerleştirildi. Staba tutturulan örnekler Sputter Coater kaplama cihazında (EMITECH, K550X, İngiltere) önce 10 dakika vakum altında tutuldu ve daha sonra 15 nm kalınlığında (2 dakika 15 mA akım) altın-paladyum ile kaplandı (**Şekil 2.9**). Örnekler 15 keV'de, yüksek vakum modunda, sekonder elektron dedektörü kullanılarak taramalı elektron mikroskopunda (LEO 438 VP SEM, İngiltere) incelendi. Hücre ölçümleri alınan görüntüler üzerinde yapıldı. Tek (2 MB) ve birleştirilmiş dijital görüntüler, Adobe Photoshop (ver. 2022) yazılımının otomatikleştirme özelliği kullanılarak yapılandırıldı. Fikse edilmiş diğer cam lamellerin

bulunduğu kültür kabının kuyucuklarının aralarındaki bölmelere distile su konarak nemli ortamda bantlanarak +4 °C’de saklandı.



Şekil 2.9: Taramalı elektron mikroskopi. Örnekler karbon kaplı ve alüminyum tutacak (stab) ve cam lamellere tutturuldu (A ve B). Örnekler vakumla altın-paladyum ile kaplandı (C) ve taramalı elektron mikroskobunda incelendi (D).

2.6 Antikorlar, İmmüno Floresan İşaretleme ve Süper Çözünürlüklü Konfokal Mikroskopi

İmmüno Floresan işaretleme hem telositlere özgü hem de göbek kordonu stroma hücrelerine özgü bir dizi antikorun fikse edilmiş hücre kültürü hücrelerindeki ve göbek kordonu kesitlerindeki ifadesinin süper çözünürlüklü konfokal mikroskobunda incelenmesi amaçlandı. Hücre ölçümleri alınan görüntüler üzerinde yapıldı.

İmmüno Floresan çift etiketleme prosedürleri, %3,5 PFA ile fikse edilmiş dondurulmuş kesitler ve cam lamellerdeki hücreler üzerinde bir dizi birincil ve ikincil antikor (**Çizelge 2.1**) kullanılarak gerçekleştirildi. Çekirdek için Hoechst 33258 (1 mg/mL, 1:1 PBS/glisserol montaj ortamında) kullanıldı. Tüm antikorlar PBS'de belirtilen dilüsyon oranında seyreltildi ve aksi belirtilmedikçe nemli bir odacıkta inkübe edildi. İlk olarak, birincil antikorun bulunmadığı veya uygun doku ve/veya doku bileşeninin kullanıldığı pozitif ve negatif kontrol örnekleri test edildi. İmmüno Floresan işaretleme yapılırken bloklama çözeltisi (10 mL PBS içerisinde 0,2 g sığır serum albümin (BSA) (Bioshop, ALB001.50, Kanada) çözöldü. Bu solüsyondan 799 µL alındı, üzerine 200 µL normal keçi serumu (NGS) (Sigma Aldrich, G9023, Almanya) ve 1 µL Tween-20 (Biorad, 170-6531, Birleşik Arap Emirlikleri) eklenerek hazırlandı ve +4 °C'ye kaldırıldı) kullanıldı. On altı

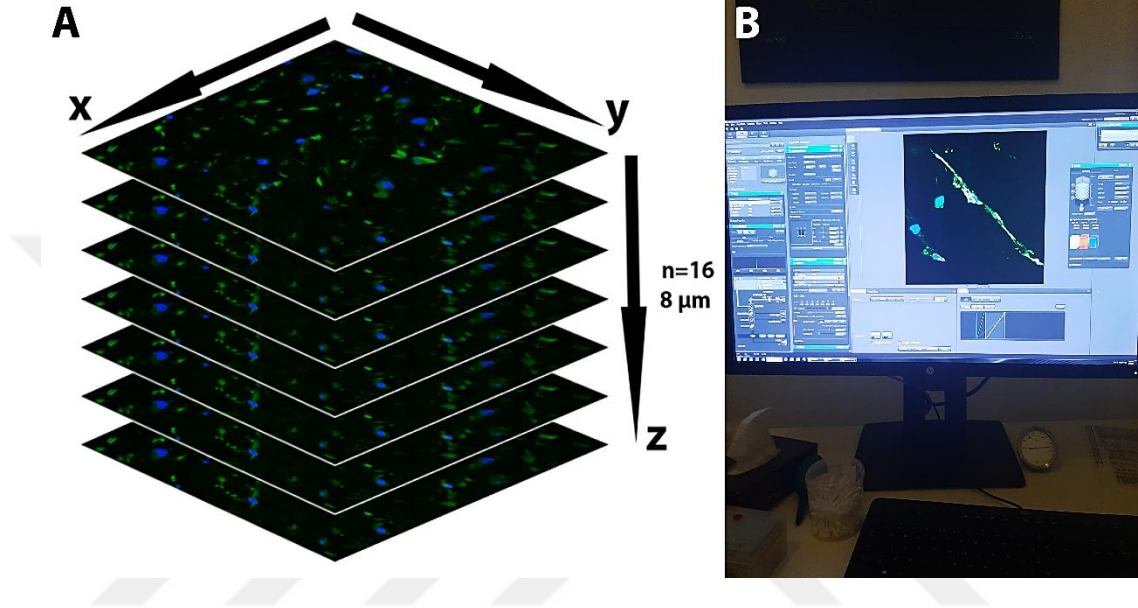
farklı göbek kordonunda, pozitif kontrol olarak kullanılan dokularda ve cam lamellerdeki hücrelerde uygulanan immüno Floresan işaretleme protokolleri 2.6.1 ve 2.6.2’de verilmiştir.

Floresan olarak etiketlenmiş örnekler, Zeiss LSM-880 konfokal sistemi kullanılarak incelendi ve kaydedildi. Floresan prob türlerine bağlı olarak birden fazla lazer hattı (405, 488, 533 ve 633 nm) kullanıldı. Her protein için lazer ve tarama parametreleri referans histogramına göre ayarlandı ve sabit tutuldu. Airyscan® dedektörü ile $\times 10$ (kuru) ve $\times 40$ (su immersion) objektiflerle 1.8-2.2 zoom faktörü kullanıldı. Z-ekseni görüntülerinin hacmi otomatik olarak hesaplandı ve tüm optik kesit kümesi için aynı şekilde hizalandı. Zen Desk yazılımının (ver. 2.3) 3B modülü, Z-ekseni görüntülerini analiz etmek için kullanıldı. On kesit, on altı farklı göbek kordonu örneğinden analiz edildi. Tüm kesitlerden temsilci alanların (3-6) koordinatları elektronik olarak kaydedildi ve ardından her alandan ondan altmışa kadar ardışık optik kesit (0.19-1 μm aralıklarla) bir araya getirilerek 12-15 μm kalınlığında 3B bileşik çift kanal görüntüleri oluşturuldu (Şekil 2.10). Alınan görüntüler Adobe Photoshop (ver. 2022) kullanılarak yapılandırıldı.

Çizelge 2.1: İmmüno Floresan işaretlemelelerinde kullanılan birincil antikorlar, ikincil antikorlar ve boyalar.

	Antikor	Kaynak	Marka	Katalog #	Dilüsyon	Hücre IF	Doku IF	Bloklama Çözültüsü?
Birincil Antikorlar	Anti- α -Aktinin	Fare	Sigma	A5044	1:100	+	-	Negatif
	Anti- α -SMA	Fare	Sigma	A5228	1:100	+	-	Negatif
	Anti-Caveolin-1	Tavşan	Finetest	FNab01313	1:100	+	+	Farksız
	Anti-CD34	Fare	Abcam	ab762	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-CD34	Fare	Beckton-Dickinson	550390	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-CD34	Tavşan	Thermo	PA585917	1:100 ve 1:500	+	+	Pozitif
	Anti-CD34	Tavşan	Abcam	ab81289	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-CD73	Fare	Abcam	ab54217	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-CD90	Fare	Abcam	ab225	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-CD105	Fare	Abcam	ab11414	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-c-Kit (CD117)	Tavşan	Finetest	FNab01726	1:100	+	+	Farksız
	Anti-Laminin	Fare	Sigma	L8271	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-Pansitokeratin	Fare	Sigma	C2562	1:100	+	+	Pozitif
	Anti-PDGFR- α	Tavşan	Abcam	ab203491	1:100	+	+	Farksız
	Anti-Vimentin	Fare	Finetest	FNab09410	1:100	-	+	Farksız
	Anti-Vimentin	Fare	Sigma	V6630	1:100	-	+	Farksız
İkincil Antikorlar	FITC GaM	Keçi	Calbiochem	401244	1:100	+	+	-
	Cy5 GaM	Keçi	Zymed Lab	81-6516	1:100	-	+	-
	FITC GaRb	Keçi	Abcam	ab6717	1:200	-	+	-

	Cy3 GaRb	Keçi	Jackson Imm.	11-165-045	1:100	+	+	-
Boyalar	FITC Phalloidin	<i>Amanita phalloides</i>	Sigma	P5282	1:10	+	+	Negatif
	633 Phalloidin	<i>Amanita phalloides</i>	Invitrogen	A22284	1:100	+	+	Negatif
	Hoechst 33258	-	Molecular Probes	33258	1:1000	+	+	-



Şekil 2.10: Süper çözünürlüklü konfokal mikroskopi. Z-ekseninde görüntü toplama özelliği kullanılarak her alandan ondan altmışa kadar ardışık optik kesit ($0.19\text{-}1\text{ }\mu\text{m}$ aralıklarla) bir araya getirilerek $12\text{-}15\text{ }\mu\text{m}$ kalınlığında 3B bileşik çift kanal görüntüleri oluşturuldu (A). IF işaretlenmiş göbek kordonu kesitlerinin süper çözünürlüklü konfokal mikroskobunda incelendi (B).

2.6.1 Göbek Kordonu ve Pozitif Kontrol Doku Kesitlerinde İmmüno Floresan İşaretleme

Pozitif kontrol kriyokesitleri olarak anti-laminin antikoruna fare böbreği, anti-sitokeratin antikoruna fare kılı derisi, anti-vimentin antikoruna fare bağırsağı, anti-CD34 ve anti-c-Kit (CD117) antikorları için fare kemik iliği, anti-caveolin-1 ve anti- α -SMA antikorları için fare mesanesi, anti-PDGFR- α ve anti- α -aktinin antikorları içinse fare dili kriyokesitleri kullanıldı. Bu dokuların fiksasyonu ve kesit alınması 2.2.'de verilen fiksasyon prosedürüne uygun yapıldı. Pek çok antikorun uygun boyanıp boyanmadığı göbek kordonunun kendisinde de kontrol edildi (internal kontrol).

2.2'de fiks edilip kriyomikrotomda kesilen 16 olgudan alınan göbek kordonu kriyokesiti ve pozitif kontrol dokuları kriyokesitlerinin etrafı antikor uygulamalarından önce

hidrofobik PapPEN® (Patolab, Türkiye) kullanılarak çerçevelendi. Kesitlerin üzerine önce PBS, sonra bloklama çözeltisi damlatıldı ve nemli bir ortamda +4 °C'de 1 saat bekletildi. Süre sonunda kesitlerin üzerindeki çözelti aspire edildi ve kesitlerin üzerine birincil antikorları kesit yüzeyini kaplayacak kadar kondu. Birincil antikorlar 37 °C'de inkübatörde (Biolab, Singapur) 3 saat inkübe edildi. Süre sonunda birincil antikorlar kesit yüzeyinden aspire edildikten sonra kesitler 3 kez 5'er dakika PBS'le yıkandı. İkincil antikorlar kesitlere damlatıldıktan sonra 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez 5'er dakika PBS'le yıkama yapıldı ve kesitlerin üstüne 20 µL Hoechst 33258 içeren kapatma mediyumları damlatıldı. Kesitler 18x18 mm lamellerle kapatıldı, tırnak cılasıyla çerçevelenerek konfokal mikroskobunda gözlemlemek amacıyla +4 °C'ye kaldırıldı.

Negatif antikor kontrollerinin yapılacağı göbek kordonu kriyokesitleri nemli ortamda bloklama çözeltisinde +4 °C'de 1 saat bekletildi. Bloklama çözeltisi çekilip kesitlere ikincil antikorlar damlatıldı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez 5'er dakika PBS'le yıkama yapıldı ve kesitlerin üstüne Hoechst içeren kapatma mediyumu konarak yukarıdaki prosedüre uygun kapatıldı.

İkili immünfloresan işaretlemeler için ise yukarıdaki antikor ve yıkama adımları aynen uygulandı. Bloklama çözeltisi, ilk birincil antikor uygulaması ve ikincil antikor uygulamasından sonraki yıkama işlemi ardından cam lamellerin üzerine ikinci birincil antikor damlatılarak yine 3 saat dakika inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez 5'er dakika PBS'le yıkama yapıldı ve kesitlerin üzerlerine uygun dilüsyonlarında ikinci ikincil antikorları damlatılarak 37 °C inkübatörde 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez 5'er dakika PBS'le yıkama yapıldı ve kesitlerin üstüne Hoechst içeren kapatma mediyumu konarak yukarıdaki prosedüre uygun kapatıldı.

İkili immünfloresan işaretlemelerin negatif kontrollerinin yapılacağı kriyokesitler nemli ortamda bloklama çözeltisinde +4 °C'de 1 saat bekletildi. Bloklama çözeltisi çekilip kesitlere ilk ikincil antikor damlatıldı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez 5'er dakika PBS'le yıkama yapıldı ve kesitlerin üzerlerine uygun dilüsyonlarında ikinci ikincil antikor damlatılarak 37 °C inkübatörde 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 3 kez beşer dakika PBS'le yıkama yapıldı ve kesitlerin üstüne Hoechst içeren kapatma mediyumu konarak yukarıdaki prosedüre uygun kapatıldı.

633 Phalloidin (F-actin) (1:100 PBS içinde dilüe edilerek) boyaması için kriyokesitlerin üzerine damlatılarak sadece 40 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi, ikişer kez 3 dakika PBS'le yıkandı ve yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı.

FITC Phalloidin (F-actin) boyaması için metanol çözeltisindeki ve %1 DMSO içeren 0,2 mg/mL FITC Phalloidin stok boyamasından 10 µL alındı. Boya kurutulduktan sonra (metanol içinde çözünmüş Phalloidin'den metanol uzaklaştırıldıktan sonra) üzerine 100 µL PBS eklenerek (1:10 PBS içinde dilüe edilerek) resüspansiyon yapıldı. Dört farklı göbek kordonu örneğinin üzerine damlatılarak 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi, 1 kez 2 dakika PBS'le yıkandı ve yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı.

2.6.2 Cam Lamellerdeki Göbek Kordonu Hücrelerinde İmmüno Floresan İşaretleme

Cam lamellerdeki hücreler 2.4.5'teki gibi kültüre ve fikse edildikten sonra faz kontrast mikroskopunda yüksek çoğalma yoğunluğuna sahip kültürler seçildi. Nemli ortam yaratılan bir cam veya plastik kapta parafilm kaplanmış yüzeye cam lameller koyuldu. Hücrelerin olduğu yüzeyin üzerine 30 µL bloklama çözeltisi damlatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığına bırakıldı. Süre sonunda cam lamellerin üzerindeki çözelti çekildi ve üzerlerine uygun dilüsyonlarında 30 µL birincil antikorlar damlatılarak 37 °C inkübatörde 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda cam lameller PBS solüsyonuna 3-5 kez batırılıp çıkarıldı. Cam lameller ilgili ikincil antikorları uygun dilüsyonlarında 30 µL olacak şekilde damlatılarak yine 37 °C inkübatörde 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda cam lameller PBS solüsyonuna 3-5 kez batırılıp çıkarıldı. Lamaların üzerine 10 µL Hoechst 33258 içeren kapatma mediyumları damlatıldı. Cam lameller üzerine kapatılarak penset yardımıyla hafifçe bastırılarak fazla solüsyon filtre kağıdıyla alındı. Cam lameller etraflarına önce dört damla sonra da tamamen tırnak cılasıyla çerçevelendi ve konfokal mikroskopunda gözlemlemek amacıyla +4 °C'ye kaldırıldı.

Negatif antikor kontrollerinin yapılacağı cam lameller nemli ortam yaratılan bir cam veya plastik kapta parafilm kaplanmış yüzeye kondu. Hücrelerin olduğu yüzeyin üzerine 30 µL bloklama çözeltisi damlatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığına bırakıldı. Süre sonunda cam lamellerin üzerindeki solüsyon çekildi ve üzerlerine uygun dilüsyonlarında 30 µL ikincil antikorlar damlatılarak 37 °C inkübatörde 90 dakika inkübe edildi ve 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarılarak yıkandıktan sonra yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı.

İkili immüno floresan işaretleme için ise yukarıdaki antikor ve yıkama adımları aynen uygulandı. Bloklama çözeltisi, ilk birincil antikor uygulaması ve ikincil antikor uygulamasından sonraki yıkama işlemi ardından cam lamellerin üzerine 30 µL diğer birincil antikor damlatılarak yine 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda cam lameller 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarılarak yıkandı ve üzerlerine uygun dilüsyonlarında 30 µL ikincil antikorları

damlatılarak 37 °C inkübatörde 90 dakika inkübe edildi ve 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarılarak yıkandıktan sonra yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı.

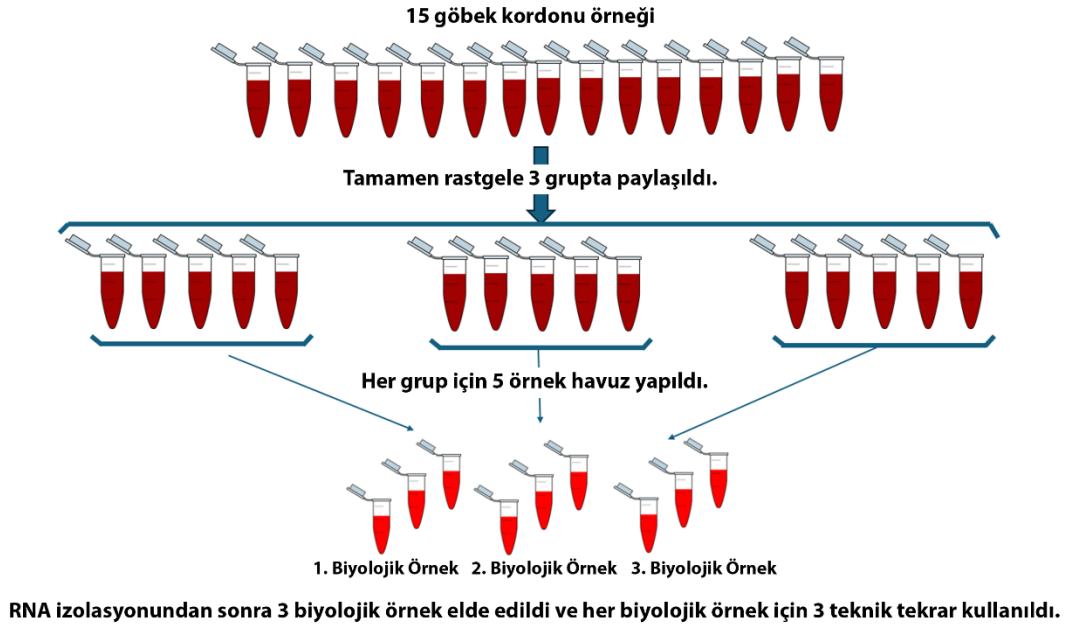
İkili immünfloresan işaretlemelerin negatif antikor kontrollerinin yapılacağı cam lameller nemli ortam yaratılan bir cam veya plastik kapta parafilm kaplanmış yüzeye koyuldu. Hücrelerin olduğu yüzeyin üzerine 30 µL bloklama çözeltisi damlatıldı ve 30 dakika oda sıcaklığına bırakıldı. Süre sonunda cam lamellerin üzerindeki solüsyon çekildi ve üzerlerine uygun dilüsyonlarında öncelikle ilk birincil antikorların ikincil antikoruna damlatılarak 37 °C inkübatörde 90 dakika inkübe edildi ve 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarılarak yıkandı. Sonrasında cam lamellerin üstüne ikinci birincil antikorların ikincil antikoruna damlatıldı ve 37 °C inkübatörde 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarılarak yıkandıktan sonra yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı.

633 Phalloidin (F-actin) boyaması için cam lameller üzerine boya damlatıldıktan sonra sadece 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi, 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarıldı ve yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı. Sadece bir birincil antikor, onun ikincil antikoruna ve phalloidin boyamasının kombine edilmesiyle ve sonrasında kapatma prosedürüne uygun kapatılmasıyla da preparatlar hazırlandı.

FITC Phalloidin (F-actin) boyaması için metanol çözeltisindeki ve %1 DMSO içeren 0,2 mg/mL FITC Phalloidin stok boyamasından 5 µL alındı. Boya kurutulduktan sonra üzerine 30 µL PBS eklenerek resüspanسیون yapıldı. Cam lamelin üzerine damlatılarak 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi, 3-5 kez PBS'e batırılıp çıkarıldı ve yukarıdaki kapatma prosedürüne uygun kapatıldı.

2.7 qRT-PCR

İki adet 1 cm'lik göbek kordonu parçası arterleri ve bir veni çıkarıldıktan sonra epitel, İVS ve SAS bölgelerini içerecek şekilde qRT-PCR analizleri için Eppendorf tüpleri içinde -80°C'ye kaldırıldı. qRT-PCR deneylerinde 15 göbek kordonu örneği kullanıldı ve çalışmanın başında rastgele olarak üç gruba ayrıldı. Her bir grup içerisindeki bireylere ait örnekler, eşit hacimlerde karıştırılarak birer havuz oluşturuldu. Bu yöntemle, her gruptan birer havuz olmak üzere toplamda üç biyolojik havuz örneği (n=3) elde edildi ve üç teknik tekrar kullanıldı. qRT-PCR analizleri, bu üç biyolojik örnek üzerinde yürütüldü. Her havuz, bağımsız bir biyolojik tekrar olarak değerlendirildi (**Şekil 2.11**).



Şekil 2.11: qRT-PCR deneylerinde kullanılan örnekler. 15 göbek kordonu örneği rastgele 3 gruba paylaştırıldıktan sonra her grup için beş örnek havuz yapıldı ve üç biyolojik örnek elde edildi. Her biyolojik örnek için ise üç teknik tekrar kullanıldı.

Deneylere başlarken yaklaşık 10-30 mg doku RNaz içermeyen Eppendorf tüpe alındı. Üzerine 1 mL Trizol eklendi ve sonikatör (DLAB, D-160, Çin) ucu %20-30 güçte 10-20 saniye üçer kez tüpe daldırıldı. Bu işlemler buz üzerinde yapıldı. Doku tamamen parçalanıp homojen bir çözelti elde edildiğinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Tüplere 200 µL kloroform eklendi ve iyice çalkalanıp 15 saniye vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 4 °C'de 12000g'de 15 dakika santrifüjlendi (Thermo Scientific, Servall Legend Micro 21R, ABD). Elde edilen çözeltide üst faz RNA, orta faz DNA ve alt faz protein ve organik atıklar içermekteydi. Üst faz (RNA) (yaklaşık 500 µL) başka bir Eppendorf tüpüne alındıktan sonra üzerine eşit hacimde soğuk saf izopropanol eklendi. Çözelti 20 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de 12000g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası dipteki beyaz RNA çökelti üzerine 1 mL %75 soğuk saf etanol eklendi ve kısa bir süreliğine vortekslendi. Çözelti 4 °C'de 7500g'de 5 dakika santrifüjlendi. Etanol dikkatlice döküldükten sonra çökelti ortam ısısında 5-10 dakika kurutuldu. Kuruyan çökelti 20-50 µL RNaz içermeyen su ile resüspande edildi. RNA örnekleri -80 °C'de uzun süreli saklandı.

Örneklerde RNA miktarı ölçümü ve kalite kontrolü için spektrofotometrik ölçüm cihazı NanoDrop® (BioSpec, NanoSpektrofotometre, ABD) kullanıldı. Cihazda RNA modu

seçildi ve boş okuma için 1-2 µL RNaz içermeyen su damlatıldı. Sonrasında 1-2 µL RNA örneği yüklendi ve ölçüm yapıldı. Ölçümler sonucunda konsantrasyon (ng/µL), A260/A280 oranı (~1,8-2,1 değeri RNA saflığı için uygun olarak belirlendi) ve A260/A230 oranı (>1,8 değeri organik kontaminasyon düşüklüğü açısından uygun olarak belirlendi) elde edildi.

Daha sonra cDNA sentezi için toplam RNA miktarının eşit olması gerekliliği göz önünde bulundurularak 1000 ng olacak şekilde her örnekten ne kadar alınacağı hesaplandı. cDNA sentezi için RNA şablonları ve Süper RT qPCR karışımı (Medchem, HY-K0510A, ABD) buz üzerinde çözündükten sonra nazıkçe ve karıştırdığından emin olana kadar karıştırıldı. Buz üzerindeki tüpe 5 µL Süper RT qPCR karışımı ve toplam RNA miktarının 1000 ng'ına denk gelecek kadar örnek eklendi. Tüm tüplerin son hacmi 20 µL olana kadar RNaz içermeyen su eklendi. Bileşenleri iyice karıştırıldıktan sonra kısa bir süre santrifüj ile tüp dibine çöktürüldü. Thermocycler cihazına (Biorad, CFX96 Real-Time System, Birleşik Arap Emirlikleri) tüpler yerleştirildikten sonra sırasıyla 25 °C'de 5 dakika, 55 °C'de 15 dakika ve 85 °C'de 2 dakika programıyla çalıştırıldı ve inkübe edildi. Sonrasında karışımın üzerine 80 µL RNaz içermeyen su eklenerek -20 °C'ye kaldırıldı.

qRT-PCR deneyleri için her örnek için toplam 10 µL'lik reaksiyon karışımı sırasıyla 5 µL EvaGreen Master Mix (Bio-Rad, SsoFast EvaGreen Supermix, Birleşik Arap Emirlikleri), 0,5 µL ileri (forward) (F) primer (10 µM), 0,5 µL geri (reverse) (R) primer (10 µM), 2 µL cDNA ve 2 µL RNaz içermeyen su konarak (üçlü teknik tekrarlar) hazırlandı. qRT-PCR deneylerinde analiz edilen her belirteç için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir (**Çizelge 2.2**). Ardından qRT-PCR deneyleri için termal döngü programında (Biorad, CFX96 Real-Time System, Birleşik Arap Emirlikleri) cihaz ayarları yapıldı: 95 °C'de 2 dakika 1 döngü ile DNA denatürasyonu, 95 °C'de 10-15 saniye denatürasyon, 58-60 °C'de 15-30 saniye 40 döngü ile primer bağlanması, 72 °C'de 20-30 saniye uzama ve sinyal toplama aşamaları gerçekleştirildi. Son olarak erime eğrisi analizi için 60 °C'den 95 °C'ye kadar (0,5 °C/saniye artış ile) 1 döngü gerçekleştirildi.

Çizelge 2.2: qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerler.

No	Gen		Primer Sekansları 5'→ 3'	Erime Sıcaklığı (°C)	Primer Uzunluğu (baz)
1	CD90 NM_001311160.2	F	TTCTCTCCTCCAGGAACACGAT	60,56	22
		R	CTGGTCACCTTCTGCCCTC	59,70	19
2	CD34 NM_001025109.2	F	AGTGTCTACTGCTGGTCTTGG	59,38	21
		R	TCCACCGTTTTCCGTGTAATAAG	59,00	23

3	CD105 NM_000118.4	F	CGGGTCTCAAGACCAGGAAG	59,75	20
		R	TCAATCCCTCAGAGGCTTCAC	59,44	21
4	CD73 NM_001204813.2	F	TGGCTCCTCTCAATCATGCC	59,82	20
		R	TGGATTCCATTGTTGCGTTCA	58,77	21
5	PDGFR-α NM_001347828.2	F	AAGAGATCATTGGAGGCCGTG	60,13	21
		R	ACAGCCTAAGACCAGGAACG	59,39	20
6	Vimentin NM_003380.5	F	GGACCAGCTAACCAACGACA	59,97	20
		R	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG	59,97	20
8	CD117 (c-Kit) NM_001093772.2	F	AACCAAGGCCGACAAAAGGA	60,11	20
		R	ACAGGTAGTCGAGCGTTTCC	59,76	20
9	Caveolin-1 NM_001172895.1	F	TTCCAACACGTAGCTGCCCT	61,76	20
		R	AACTGTGTGTCCCTTCTGGT	58,79	20
10	GAPDH NM_001289745.3	F	TGCACCACCAACTGCTTAG	57,98	19
		R	GATGCAGGGATGATGTTC	52,81	18

Daha sonra qRT-PCR ürününü değerlendirmek için agaroz jelde yürütme işlemi gerçekleştirildi. İlk olarak %2'lik jel için 2 g agaroz 100 mL Tris-asetat-EDTA tamponunda mikrodalga fırında tamamen eriyene kadar ısıtıldı. Hafifçe soğuduktan sonra üzerine 7 μ L Red Safe® (Intron Biotechnology, 21141, ABD) nükleik asit boyama çözeltisi eklendi ve çözelti kalıba döküldükten sonra tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığında 20-30 dakika donması ve katılaşması beklendi. Elektroforez için jel dökme işlemi sonunda tarak çıkarıldı, jel tanka yerleştirildi ve üzerine Tris-asetat-EDTA tamponu döküldü. Her ürün için 5 μ L qRT-PCR ürünü ve 1 μ L yükleme boyası (master mix içeriyorsa eklenmedi) karıştırıldı ve her bir kuyucuğa 3 μ L olacak şekilde DNA basamak örnekleri yüklendi. 150 V'da 30-45 dakika süresince bandın yeterince ayrılması gözlenene kadar elektroforez deneyi gerçekleştirildi. Son olarak örneklerin değerlendirilmesi amacıyla görüntüleme sistemi (Biorad, ChemiDoc MP Imaging System, Birleşik Arap Emirlikleri) kullanılarak jel görüntüsü alındı.

Son olarak 8 hedef genin (vimentin, CD34, c-Kit, PDGFR- α , caveolin-1, CD73, CD90 ve CD105) ifade düzeyleri değerlendirildi. İfade düzeylerini normalize ederken GAPDH (Gliseralehid 3-Fosfat Dehidrogenaz) referans (housekeeping) gen olarak kullanıldı. Üç biyolojik tekrar; üçer teknik tekrarlar kullanıldı. qRT-PCR reaksiyonları, her örnek için hedef ve referans genler açısından ayrı ayrı gerçekleştirildi. Her havuz örneğinde qRT-PCR cihazı tarafından belirlenen Ct (cycle threshold) (eşik döngüsü) değerleri kaydedildi. Kaydedilen Ct değeri, PCR amplifikasyon eğrisinin belirli bir eşiğe ulaştığı döngü sayısını ifade etti. Her havuz örneğinde, hedef genlerin Ct değerleri ile referans gen olan GAPDH'nin Ct değerleri belirlendi ve formüle göre Δ Ct hesaplandı (Δ Ct=Ct_{Hedef gen}-Ct_{GAPDH}). Bu işlem, her hedef genin ifade düzeyinin referans gene göre normalize edilmesini sağladı. Hesaplanan Δ Ct değerleri, her gen için 3 biyolojik tekrardan elde edilen

sonuçların ortalama $\pm$ standart sapma (SS) biçiminde gösterilmesiyle sunuldu. Hedef genlerin ifade düzeyleri $2^{(-\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık analizi yapılmadı ve veriler yalnızca tanımlayıcı istatistik kapsamında değerlendirildi. Y eksenı, genler arası geniş dinamikli ifade farklılıklarını görselleştirmek amacıyla logaritmik skala (*log scale*) olarak ayarlandı. Her gen için sütun grafikleri çizildi ve barlar ortalama $\Delta Ct \pm SS$ değerlerini temsil etti. Y eksenı ise *log* leęinde gösterildi. Bu sayede logaritmik bir sistemde genlerin ifade düzeyleri oranlanabildi.



3. BULGULAR

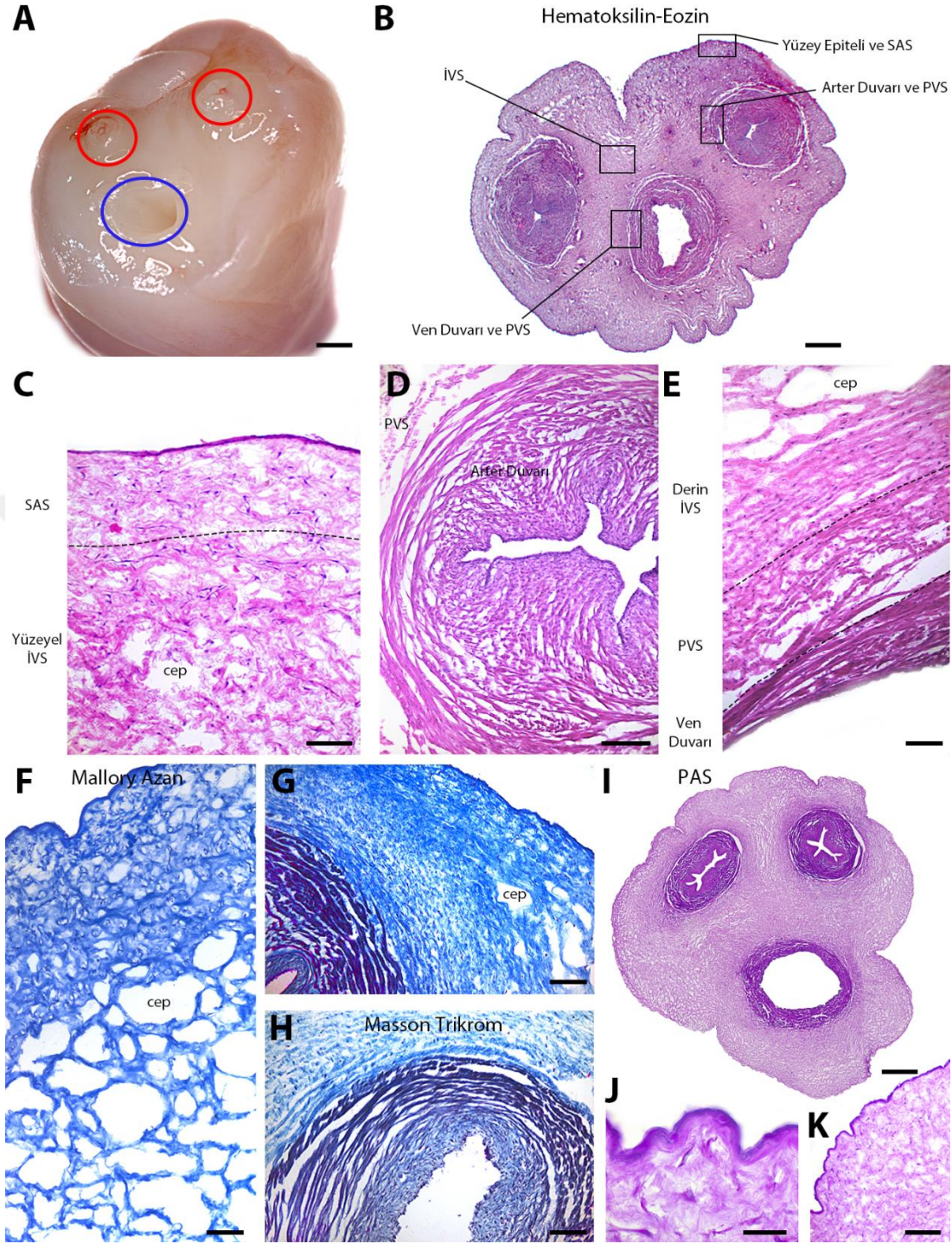
3.1 Stereomikroskopi ve Işık Mikroskopi Sonuçları

Çalışmada 16 farklı bireyden alınan göbek kordonu örneklerinin makroskobik özelliklerini değerlendirmek için gerçekleştirilen stereomikroskop incelemesi sonucunda kordon kesitlerinde herhangi bir yapısal anormallik saptanmadı. Kordonların enine kesitleri krem-beyaz parlak rengindeki stromasının içine gömülü iki arter ve bir ven yapısı ortaya koydu (**Şekil 3.1A**).

Düşük büyütme HE boyalı örneklerde göbek kordonunun yüzey epiteli ve farklı stroma bölgeleri tanımlandı (**Şekil 3.1B**). HE, MA, MT ve PAS boyalı kesitlerde yüzey epiteli ve altındaki SAS (**Şekil 3.1C, F, G ve J**), SAS'ın altında yer alan yüzeyel İVS ve stromadaki cepler izlendi (**Şekil 3.1C, F ve G**). İki arter ve bir ven kendine özgü intima ve media tabakalarıyla tanımlandı (**Şekil 3.1D, E, G, H ve I**). Damar duvarının etrafında adventisya tabakasına karşılık gelen PVS, derin İVS ve yüzeyel İVS izlendi (**Şekil 3.1D, E ve G**). PVS daha sık yerleşmiş stroma hücreleriyle diğer tabakalardan ayrıldı. Kollajen liflerin yoğunluğu MA ve MT boyamalarında mavi boyanmış izlendi (**Şekil 3.1F-H**). Damarların duvarındaki düz kas lifleri ise kırmızı-mor boyanmış izlendi (**Şekil 3.1F-H**). Bu boyamalar yüzeyel İVS'de stroma hücrelerinin arasında bulunan ve adeta kollajen demetleriyle çevrilmiş olan cepleri de ortaya koydu (**Şekil 3.1C ve E-G**).

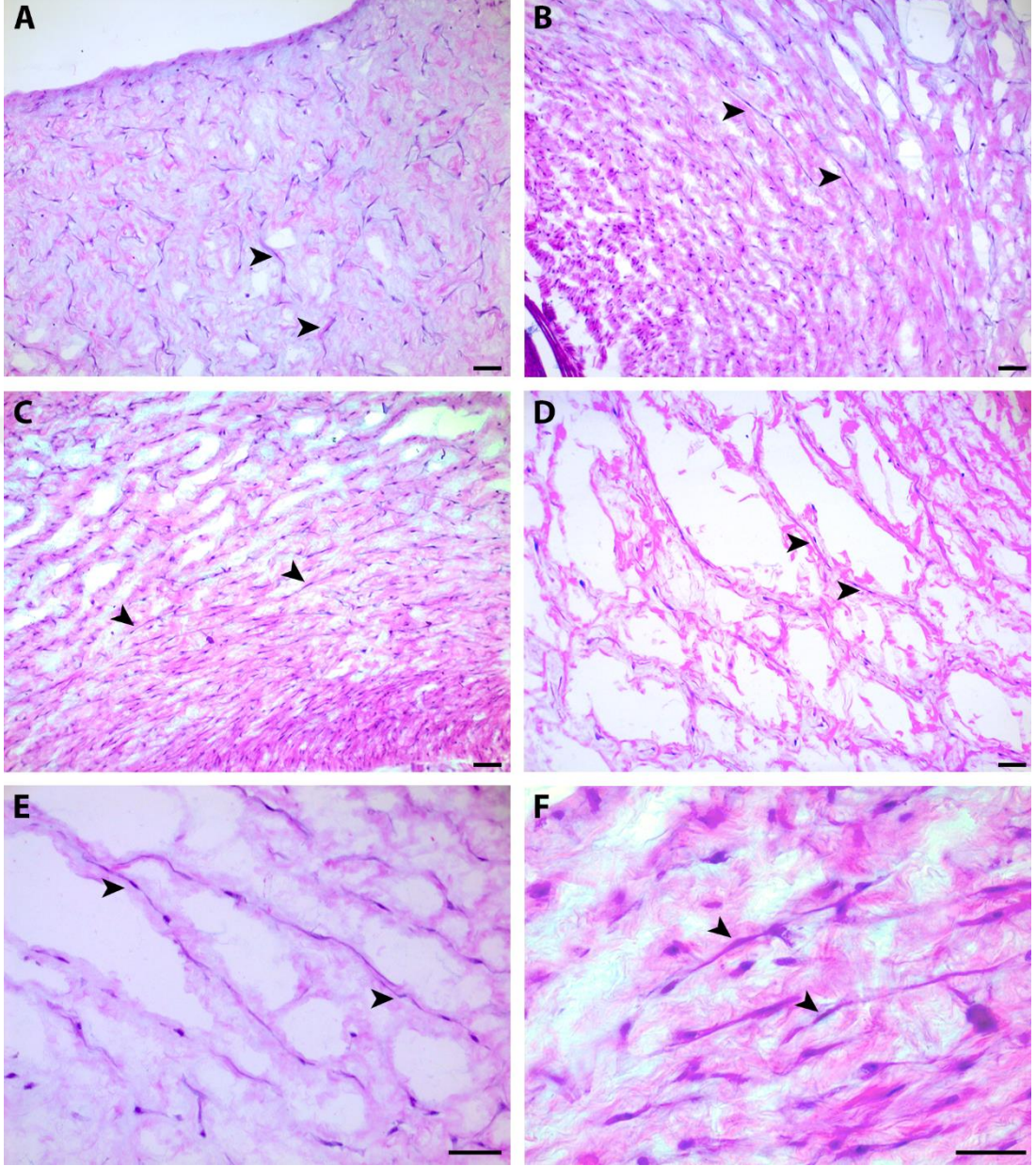
Stroma hücrelerinde glikojen birikiminin varlığını test etmek için PAS boyalı kesitler analiz edildi (**Şekil 3.1I-K**). Yüzey epitelinde ve stroma hücrelerinde PAS boyaması ve glikojen varlığı belirgin şekilde izlendi (**Şekil 3.1J ve K**).

HE boyalı kesitlerde yüksek büyütme ayrıntılı incelendiğinde yüzeyel İVS'deki ceplerin etrafını çevreleyecek şekilde dizilen (**Şekil 3.2A**), derin İVS'de ve PVS'de (**Şekil 3.2B ve C**) yer alan ince sitoplazmik uzantılara sahip telosit benzeri hücreler izlendi. Daha yüksek büyütme gözlemler stromadaki cepleri çevreleyen bu hücrelerin ince uzantılarıyla diğer stroma hücrelerinden ayırt edilebildiğini ortaya koydu (**Şekil 3.2D ve E**). İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin çekirdekleri küçük ve yassı şekildedeyken diğer stroma hücrelerinin çekirdekleri daha yuvarlak ve oval şekilli, sitoplazmaları ise daha küçük ve geniş olarak izlendi (**Şekil 3.2F**).



Şekil 3.1: Stereomikroskopi ve ışık mikroskopi gözlemleri. Göbek kordonunun enine kesiti İVS’de gömülü iki küçük çaplı arter (**kırmızı daireler**) ve bir venin (**mavi daire**) varlığını ortaya koydu (**A**). HE boyalı kesitler düşük büyütmede dıştan içe doku mimarisini gösterdi (**B**). Yüksek büyütmede HE boyalı kesitlerde yüzey epiteli, SAS ve yüzeyel İVS, cepler (**C**), arter duvarı, PVS (**D**), ven duvarı, PVS ve derin İVS (**E**) izlendi. MA (**F** ve **G**) ve MT (**H**) boyanmış kesitler göbek kordonundaki yoğun kollajen demetlerini ve arter ve ven duvarlarının yapısındaki düz kas liflerini ortaya koydu. PAS

boyalı kesitler (I-K), yoğun glikojen ve diğer polisakkaritleri içeren stroma hücrelerini gösterdi. Ölçüm çubukları: 1000 μm (A, B ve I), 200 μm (D-H ve K), 100 μm (C), 50 μm (J).

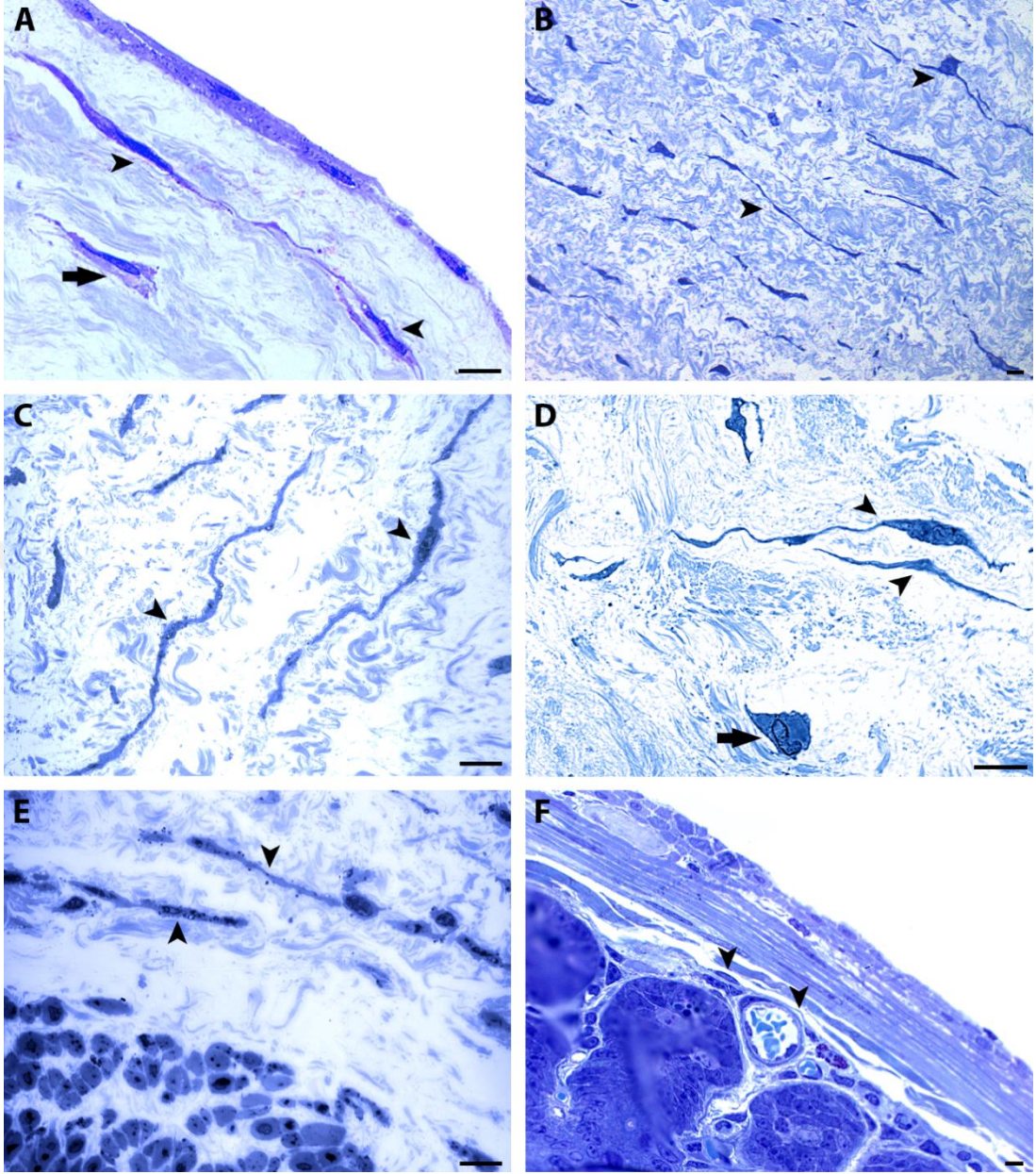


Şekil 3.2: HE boyalı kesitlerde telosit benzeri hücre gözlemleri. Düşük büyütme SAS'da (A) ve PVS'de (B ve C) ve yüksek büyütme de SAS'da yer alan ceplerin etrafını çevreleyen (D ve E) yassı çekirdeklere (F) ve ince uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin (ok başları) varlığını ortaya koydu. Ölçüm çubukları: 50 μm .

Işık mikroskopunda stroma hücrelerinin yüksek büyütmede ve yüksek çözünürlükteki görüntülerini elde etmek için toluidin mavisi boyanmış yarı ince kesitler

kullanıldı. SAS'da (**Şekil 3.3A**), yüzeyel İVS'de (**Şekil 3.3B**), derin İVS'de (**Şekil 3.3C ve D**) ve PVS'de (**Şekil 3.3E**) kollajen demetleri arasında yer alan ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler dikkati çekiciydi. Bu hücrelerin uzantıları hücreye mekik şeklini vermekte olup gövdesinden çıkan uzantılar çekirdeğin her iki yönüne doğru uzanmaktaydı. Yarı ince kesitler üzerinde yapılan uzunluk ölçümlerine göre hücrelerin ortalama uzunluklarının 92,46 μm (min: 48,93 μm ; maks: 120,08 μm ; SS: 27,54 μm) olduğu saptandı. Telosit benzeri hücrelerin aralarında daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip diğer stroma hücreleri de izlendi (**Şekil 3.3A ve D**). Telositlerin varlığı kontrol dokusu olarak sıçan bağırsağının submukoza tabakasında da izlendi (**Şekil 3.3F**). Sıçan bağırsağı yarı ince kesitlerinde yapılan uzunluk ölçümlerine göre hücrelerin ortalama uzunluklarının 124,6 μm (min: 110,72 μm ; maks: 140,25 μm ; SS: 14,85 μm) olduğu saptandı.



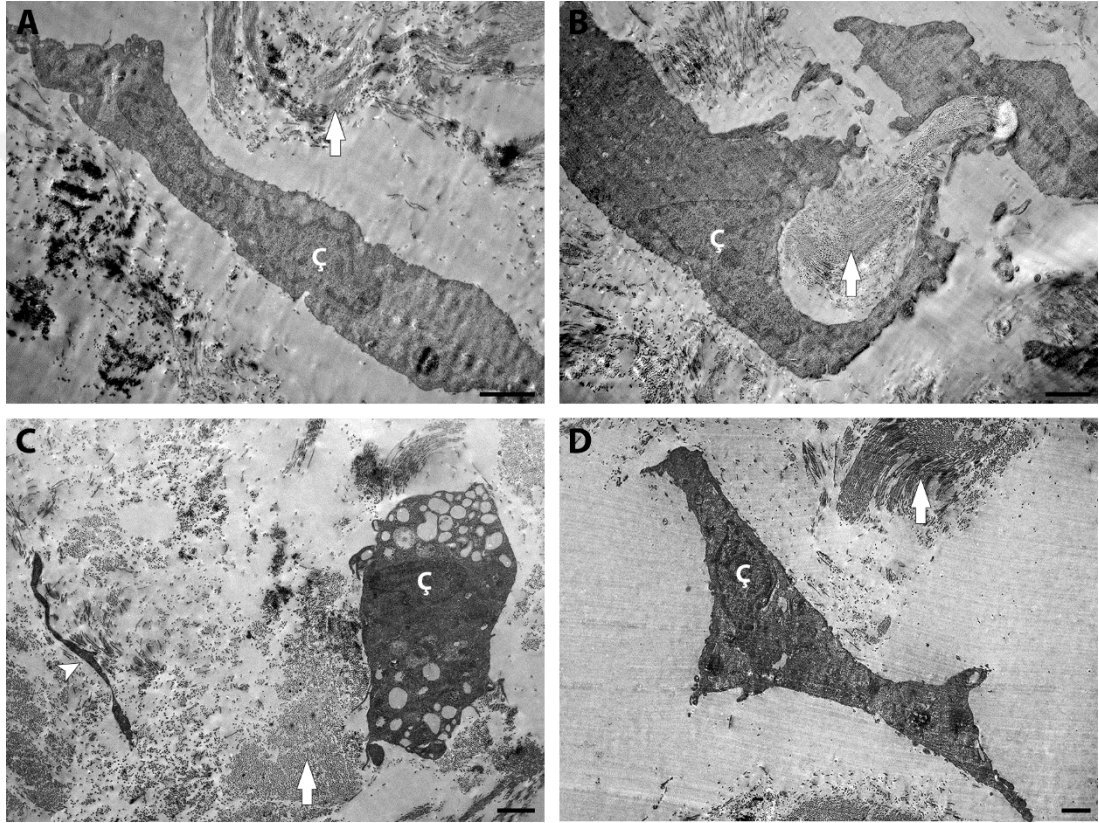


Şekil 3.3: Toluidin mavisi boyalı kesitlerde telosit benzeri hücre gözlemleri. SAS'da (A), yüzeysel İVS'de (B), derin İVS'de (C ve D) ve PVS'de (E) kollajen demetleri arasında yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler (**ok başları**) ve daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri (**oklar**) izlendi. Telositler bir kontrol amacıyla sıçan bağırsağının submukoza tabakasında da (**ok başları**) (F) izlendi. Ölçüm çubukları: 10 µm.

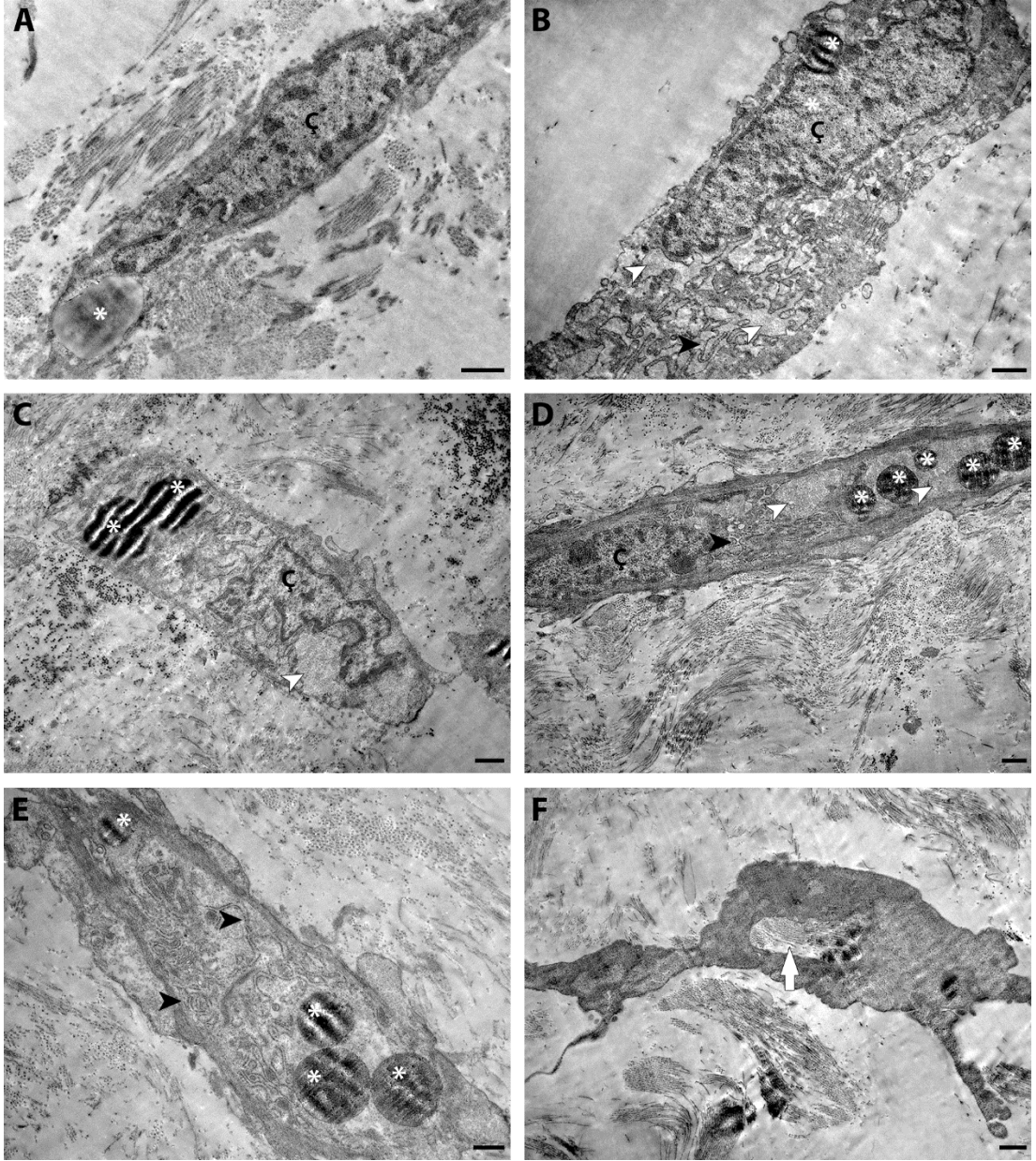
3.2 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Sonuçları

TEM gözlemlerinde ilk olarak stromada yoğun kollajen sentezleyen küçük ve geniş sitoplazmaya sahip hücreler ve stromadaki kollajen demetlerinin enine ve boyuna kesitleri izlendi (Şekil 3.4A-D). Kollajen demetlerinin arasında ince ve uzun sitoplazmalı telosit

benzeri hücreler de dikkati çekti (Şekil 3.4C). Küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin bazılarında farklı yoğunluklarda lipid içeriğini düşündüren inklüzyonlar izlendi (Şekil 3.5A-E). Hücrelerde zengin ER sarnıçları ve kollajen sentezinde görev alan genişlemiş ER sarnıçları izlendi (Şekil 3.5B-E). Göbek kordonunda makrofaj hücresi olmadığından hücre içinde kollajen demetlerinin ortadan kaldırılması amacıyla fagositoz görevinin stroma hücreleri tarafından gerçekleştirildiği dikkati çekiciydi (Şekil 3.5F). Dolayısıyla stromada azalan kollajen lif miktarına koşut olarak ekstraselüler sıvı matriksinden zengin bir stroma izlendi (Şekil 3.5F).



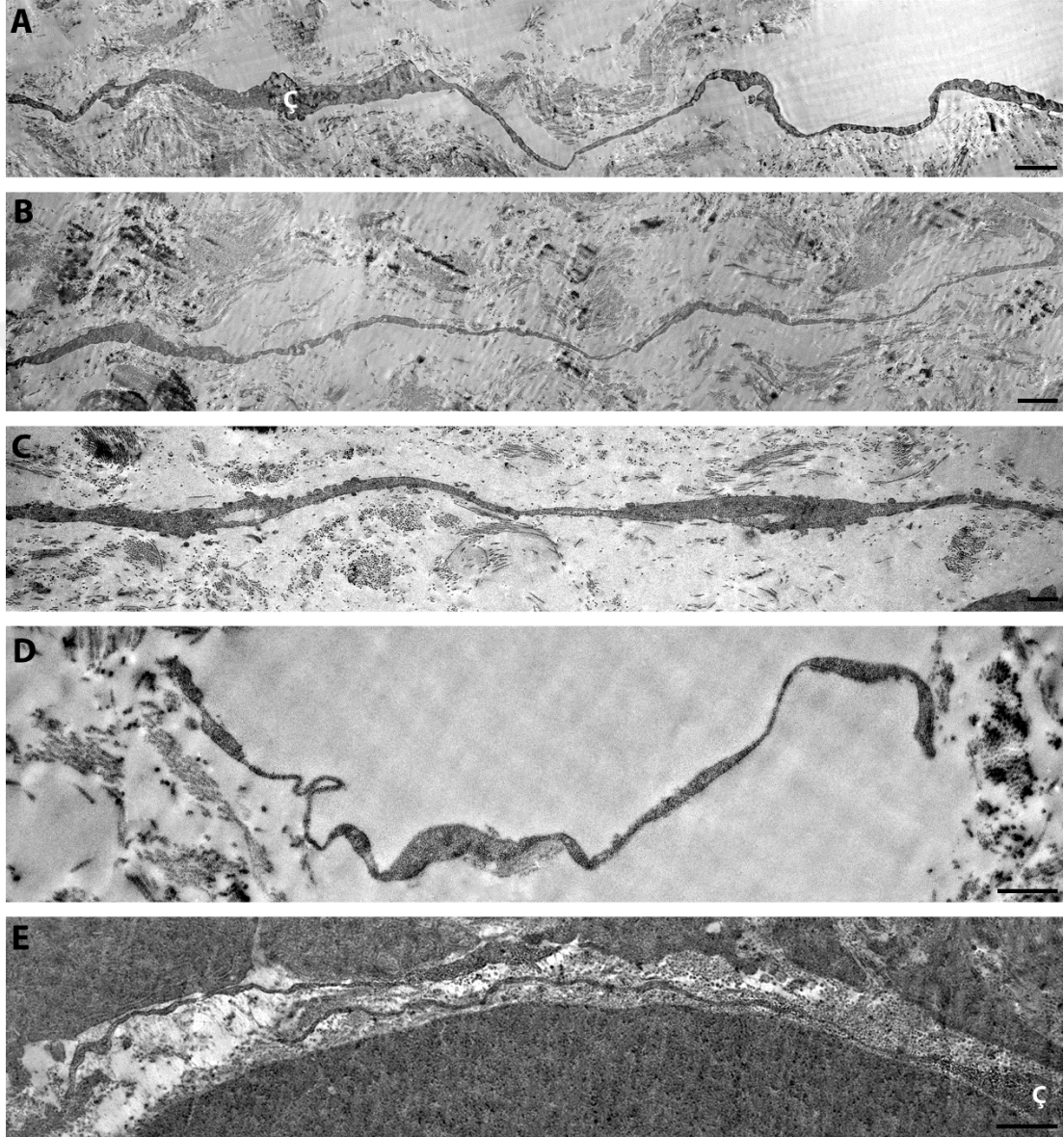
Şekil 3.4: Göbek kordonu stroma hücrelerinin düşük büyütme (x2-4K) TEM gözlemleri. Stromada yoğun kollajen sentezleyen hücreler, kollajen demetlerinin (**oklar**) enine ve boyuna kesitleri (**A-D**) ve ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler (**ok başı**) (**C**) izlendi. **Ç**: çekirdek. Ölçüm çubukları: 2 µm.



Şekil 3.5: Göbek kordonu stroma hücrelerinin yüksek büyütme (x4-12K) TEM gözlemleri. Stroma hücrelerinde farklı yoğunluklarda bulunan inklüzyonlar (*) (A-E) izlendi. Hücrelerdeki zengin ER sarnıçları (siyah ok başları) ve genişlemiş ER sarnıçları (beyaz ok başları) (B-E) izlendi. Kollajen demetlerinin stroma hücrelerine fagosite edildiği dikkati çekiciydi (beyaz ok) (F). Ç: çekirdek. Ölçüm çubukları: 1 µm.

Küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin yanı sıra stromada ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler izlendi (Şekil 3.6A-D). TEM’de telosit benzeri hücrelerin birleştirilmiş panoramik görüntülerinde çekirdeği de barındıran tam boya yakın hücrelerde (Şekil 3.6A ve E gibi) uzunluk ölçümleri yapıldı. Bazı hücrelerin ise tam boyu

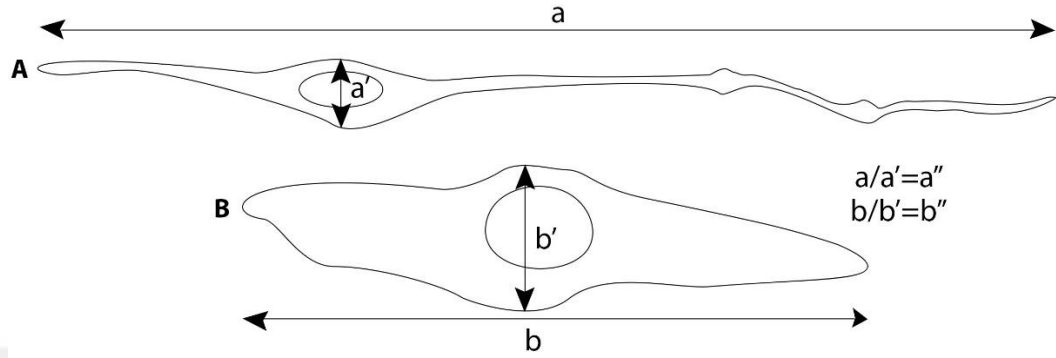
hakkında kesin bir kaniya varılamadı (Şekil 3.6B-D gibi). Kontrol dokusu olan sıçan bağırsağının ince kesitleri TEM’de incelendiğinde yarı ince kesitlerde olduğu gibi submukoza tabakasında telositler izlendi (Şekil 3.6E). Bu hücrelerde uzantıların en dar sitoplazma alanı 62 nm olarak ölçüldü.



Şekil 3.6: İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin TEM gözlemleri. Birleştirilmiş panoramik görüntüleri (A-D). Sıçan bağırsağı submukozasında yer alan telositin panoramik görüntüsü (E). Ç: çekirdek. Ölçüm çubukları: 3 µm (A ve B), 1 µm (C-E).

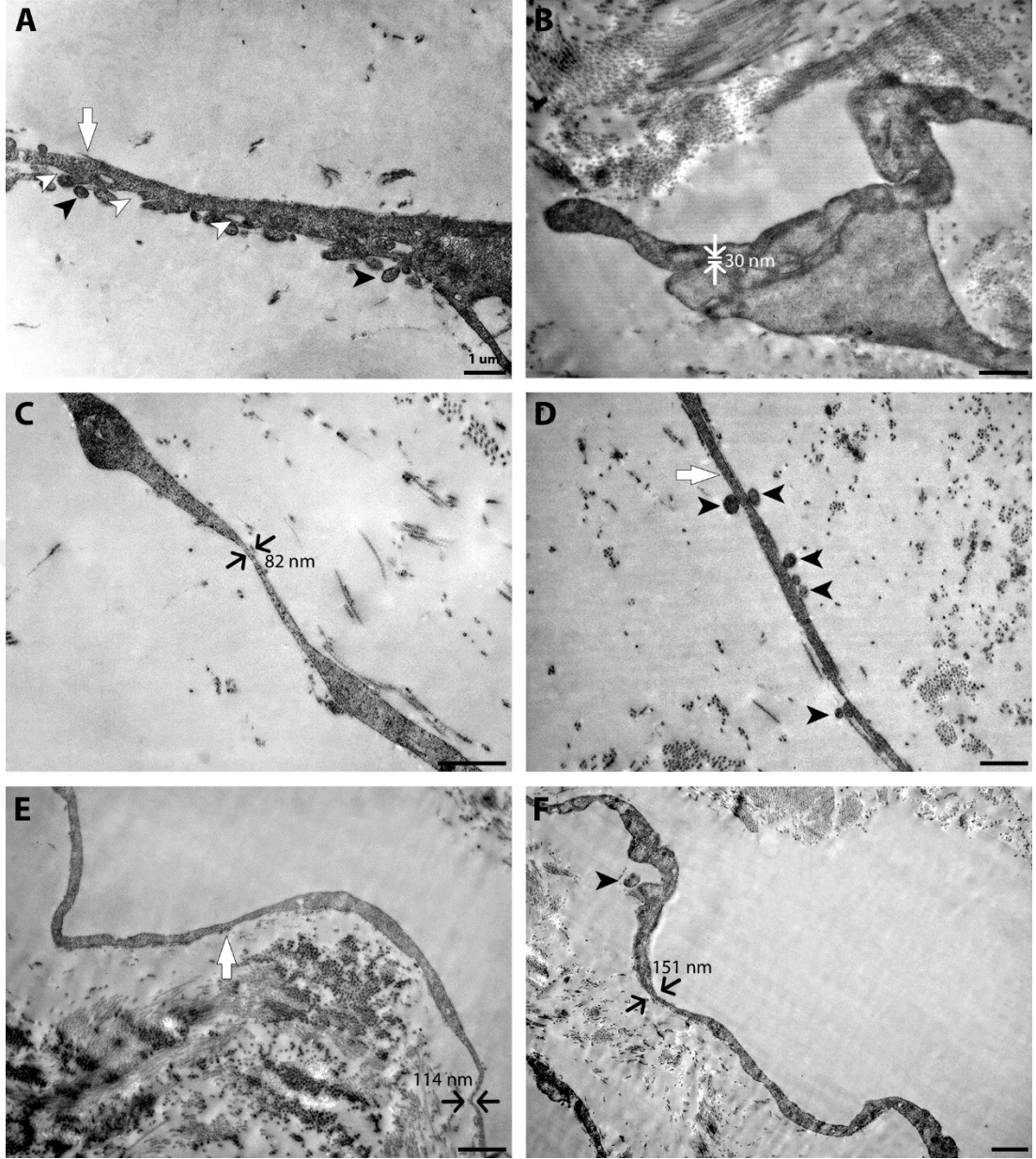
TEM gözlemleri sonucunda daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerinin arasındaki en önemli farkın hücre uzunluğunun hücre kalınlığına oranı olduğu izlendi. Yapılan ölçümler

sonucunda ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin uzunluk/kalınlık oranının 32,38 (min: 21,68; maks: 51,86; SS: 10,83) olduğu saptandı (**Şekil 3.7A**). Daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde ise bu oranın 3,60 (min: 1,96; maks: 5,43; SS: 0,94) olduğu saptandı (**Şekil 3.7B**).



Şekil 3.7: TEM gözlemlerinde izlenen iki farklı hücre tipinde hücre uzunluğu/kalınlığı ölçümleri. İnce uzantılı telosit benzeri hücreler (**A**) ve daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip hücrelerde (**B**) hücre uzunluğu/kalınlığı saptandı.

Stromada yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler daha yüksek büyütmelerde incelendiğinde kaveola yapıları (**Şekil 3.8A**), kesintili eksternal lamina (**Şekil 3.8A, D ve E**) ve yer yer EV'ler (**Şekil 3.8A, D ve F**) izlendi. İki hücre arasında fiziksel etkileşimlerin olduğu izlendi. İnterselüler mesafenin yaklaşık 30 nm'ye kadar indiği ölçüldü (**Şekil 3.8B**). Hücre uzantılarının en dar sitoplazma alanı 143,72 nm (min: 71,8 nm; maks: 220,82 nm; SS: 54,5 nm) olduğu saptandı. Bazı ölçüm örnekleri 82 nm, 114 nm ve 151 nm olarak gösterildi (**Şekil 3.8C, E ve F**).

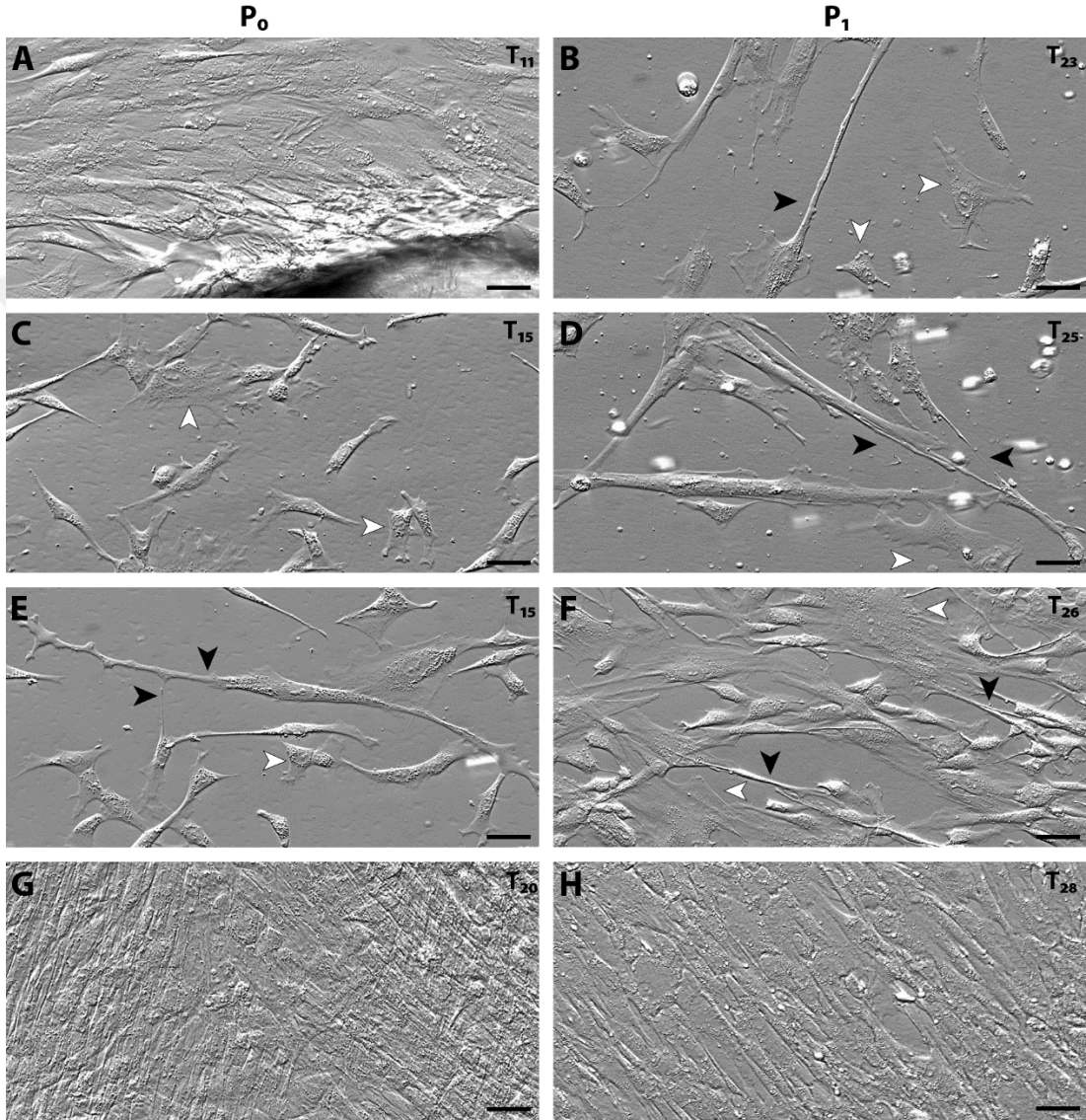


Şekil 3.8: İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin yüksek büyütme (x4-12K) TEM gözlemleri. Kaveola yapıları (beyaz ok başları) (A), kesintili eksternal lamina (beyaz ok) (A, D ve E) ve EV'ler (siyah ok başları) (A, D ve F) izlendi. Bu örneklerde interselüler mesafe ölçümü 30 nm (B); bazı hücrelerde uzantıların en inceldiği yerlerden genişlik ölçümleri sırasıyla 82 nm, 114 nm ve 151 nm (C, E ve F) olarak ölçüldü. Ölçüm çubukları: 1 µm.

3.3 iGK-MSH Kültürü Sonuçları

iGK-MSH kültüründe (P_0) eksplantlardan hücre çıkışının yaklaşık 5-6. günlerde başladığı, 10-11. günde yoğunlaştığı izlendi (Şekil 3.9A). Hücre yoğunluğunun arttığı zaman diliminde (13-15. günler) küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri ve ince ve

uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerden oluşan heterojen hücre popülasyonu dikkati çekiciydi (Şekil 3.9C ve E). Hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında (18. gün) (Şekil 3.9G) P₁'e geçildi ve 28. gününde hücre yoğunluğu %90'ın üzerinde gözlemlendi (Şekil 3.9H). Bu pasaj süresince de geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin yanı sıra ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler varlıklarını sürdürdü (Şekil 3.9B-F).

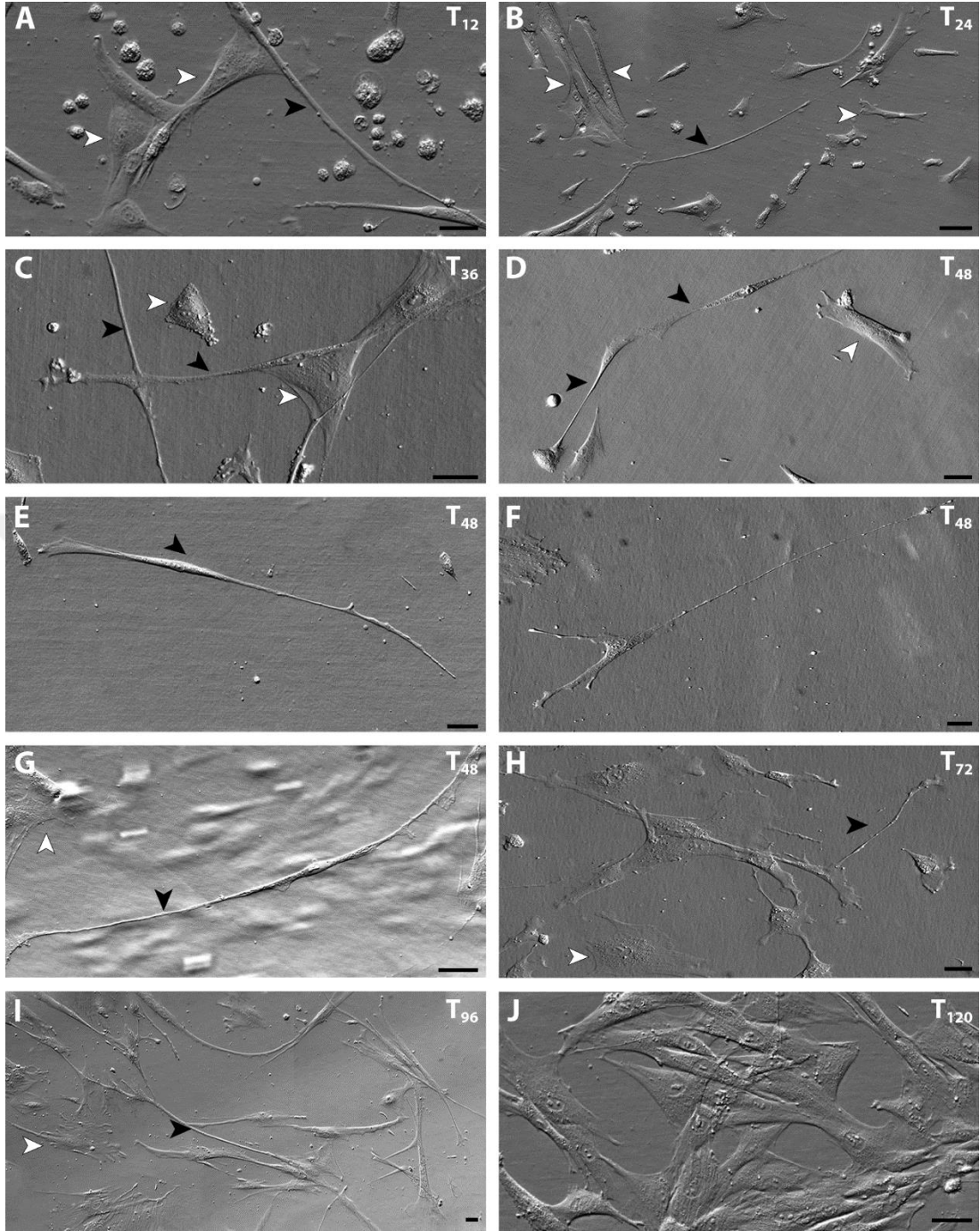


Şekil 3.9: P₀ ve P₁ iGK-MSH kültürü gözlemleri. P₀ (A, C, E ve G) ve P₁'de (B, D, F ve H) çoğalma yoğunluğunun artışı süresince küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri (**beyaz ok başları**) ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler (**siyah ok başları**) izlendi. T: zaman (gün). Ölçüm çubukları: 20 µm.

Akım sitometri deneyleri için dondurulmuş olan iGK-MSH çözöldükten sonra (P₂) 5 gün kültüre edildi. Hücre yapışmasının başladığı 12. saatten 96. saate kadar (Şekil 3.10A-I)

heterojen hücre popülasyonları izlendi. Bu hücre popülasyonunda mekik biçimli, ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler izlendi (**Şekil 3.10A-I**). Kùltüre hâkim olan geniş sitoplazmalı stroma hücreleri ile telosit benzeri hücrelerin yer yer birbirleriyle temas ettiğı de dikkati çekiciydi. Birleştirilmiş görüntüler üzerinde yapılan uzunluk ölçümlerinde telosit benzeri hücre boylarının ortalama uzunluklarının 604,69 μm (min: 276,27 μm ; maks: 1380 μm ; SS: 339,7 μm) olduğı saptandı. 120. saatte hücreler yaklaşık %80 çoğalma yoğunluğına ulaştı (**Şekil 3.10J**) ve ardından akım sitometri ile hücre oranlarının tespiti işlemleri gerçekleştirildi.

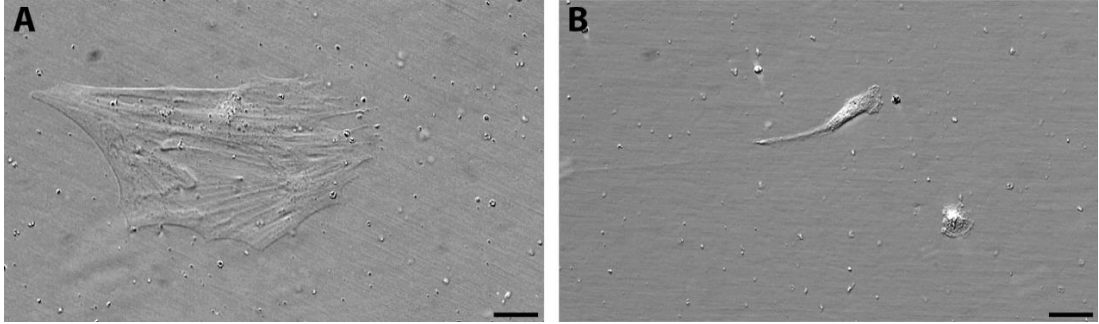




Şekil 3.10: Akım sitometri deneyleri öncesinde P2 iGK-MSH kültürü gözlemleri. İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücreleri (**siyah ok başları**) (A-I) ve daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip ve uzun uzantıları olmayan stroma hücrelerinden (**beyaz ok başları**) (A-D ve G-I) oluşan heterojen hücre popülasyonu izlendi. 5. gün sonunda çoğalma yoğunluğu yaklaşık %80'e ulaştı (**J**). **T:** zaman (saat). Ölçüm çubukları: 50 μ m (A-I), 20 μ m (J).

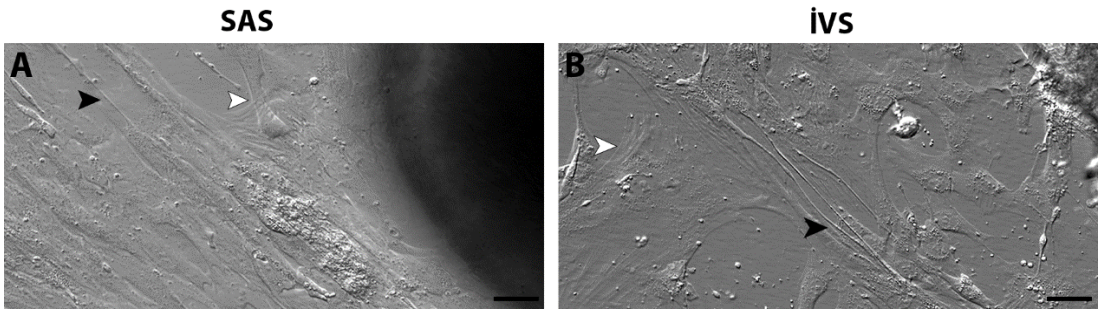
Göbek kordonu stroma hücrelerinin biyobelirteç ifadelerinin eksplant ve enzimatik kültüre göre değişip değişmediğini gözlemlemek amacıyla yapılan enzimatik hücre kültürü

deneylerinde çoğalma yoğunluğunda başarıya ulaşamadı. Haftalar süren kültür sonunda flasklarda sadece 3-4 stroma hücrelerine rastlandı (**Şekil 3.11A ve B**).



Şekil 3.11: Enzimatik iGK-MSH kültürü gözlemleri. Uzun süreli kültür sonunda çoğalma gerçekleşmedi ve ancak birkaç hücre izlendi (**A ve B**). Ölçüm çubukları: 20 µm.

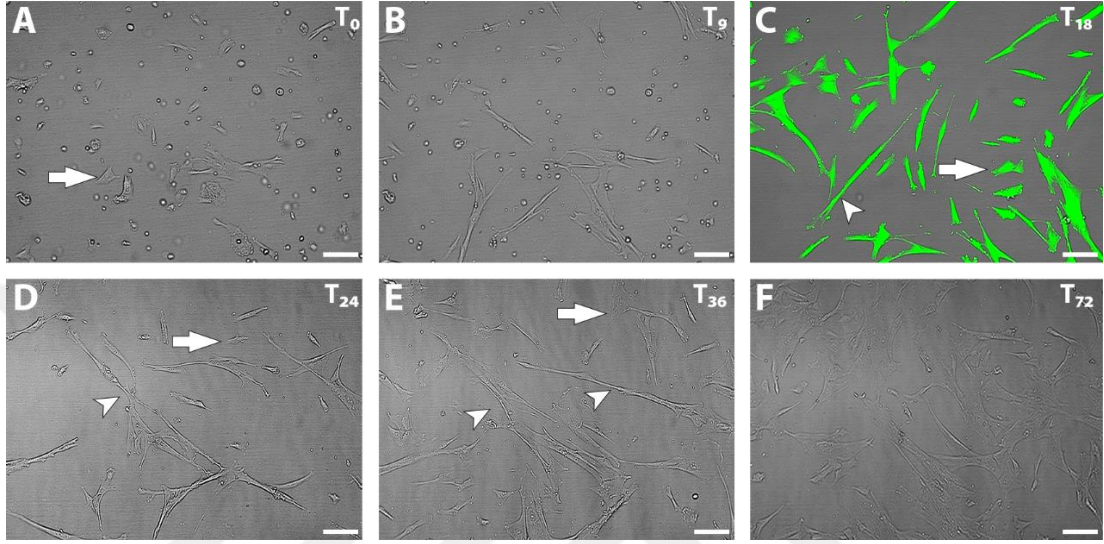
Göbek kordonu stromasında bulunan telosit benzeri hücrelerin göbek kordonunun farklı bölgelerinden alınan doku parçalarının kültürlerinde miktarlarının değişip değişmediğini gözlemlemek amacıyla SAS ve İVS'nin ayrı eksplant kültürleri gerçekleştirildi. Her iki stroma kültüründe de eksplanttan hücre çıkışı süreçlerinde hem küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler izlendi (**Şekil 3.12A ve B**). Sonuç olarak her iki kaynaktan elde edilen kültürlerin arasında telosit benzeri hücre lehine bir farkın olmadığı saptandı.



Şekil 3.12: SAS ve İVS'nin ayrı eksplant iGK-MSH kültürü gözlemleri. SAS (**A**) ve İVS (**B**) eksplantlarından hücre çıkışı süreçlerinde küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri (**beyaz ok başlı**) ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler (**siyah ok başlı**) izlendi. Ölçüm çubukları: 20 µm.

Son olarak, iGK-MSH kültüründe dondurma-çözme sonrası hücre yapışmasının gözlemlenmesi başlangıç anı (T_0) olarak kabul edildi ve çoğalma yoğunluğunun %80'e kadar ulaştığı 72 saatlik canlı kayıt alındı (**Şekil 3.13A-F**). Ayrıca kültür sürecinin 18. saatinde

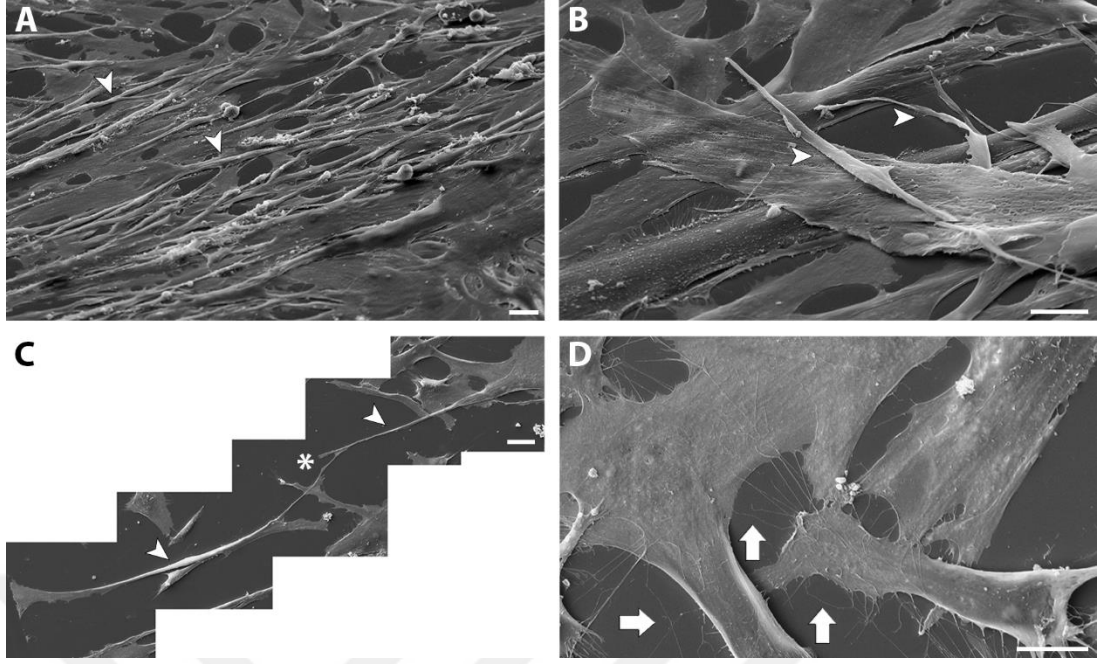
Calcein AM işaretli iGK-MSH faz kontrast+floresan kanallarda izlendi (**Şekil 3.13C**). Önceki hücre kültürü gözlemlerimizle uyumlu olarak, dondurma-çözme sonrası hücrelerin ilk 18 saatte (**Şekil 3.13A-C**) fenotipik olarak daha küçük ve geniş sitoplazmalı stroma hücreleri ile ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler olmak üzere iki yöne ayrıldığı ve bu fenotipleri 72 saate kadar koruduğu izlendi (**Şekil 3.13D-F**).



Şekil 3.13: iGK-MSH'nin 72 saatlik canlı kayıt gözlemleri. Dondurma-çözme sonrası hücre yapışması anından çoğalma yoğunluğunun %80'e kadar ulaştığı 72 saatlik canlı kayıt alındı (**A-F**). 18. saatte Calcein AM işaretli iGK-MSH faz kontrast+floresan kanallarda izlendi (**C**). İlk 18 saatte daha küçük ve geniş sitoplazmalı stroma hücreleri (**oklar**) ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerden (**ok başları**) oluşan heterojen hücre popülasyonu izlendi (**A-C**). Hücrelerin fenotiplerini 72 saate kadar koruduğu izlendi (**D-F**). **T**: zaman (saat). Ölçüm çubukları: 100 µm.

3.4 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Sonuçları

Çoğalma yoğunluğunun >%80 olduğu SEM örneklerinde ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler izlendi (**Şekil 3.14A**). İlginç biçimde, bu hücreler daha geniş sitoplazmaya sahip olan stroma hücrelerine yukarıdan temas ediyor şekilde bulundu (**Şekil 3.14A ve B**). Telosit benzeri hücrelerin birbirleriyle de temas ettiği izlendi (**Şekil 3.14C**). Geniş sitoplazmaya sahip hücrelerinin ise yoğun biçimde yan yana, uç uca ve özellikle ince nano uzantılar (~200 nm kalınlığında) yoluyla birbirleriyle temas halinde oldukları dikkati çekiciydi (**Şekil 3.14D**).

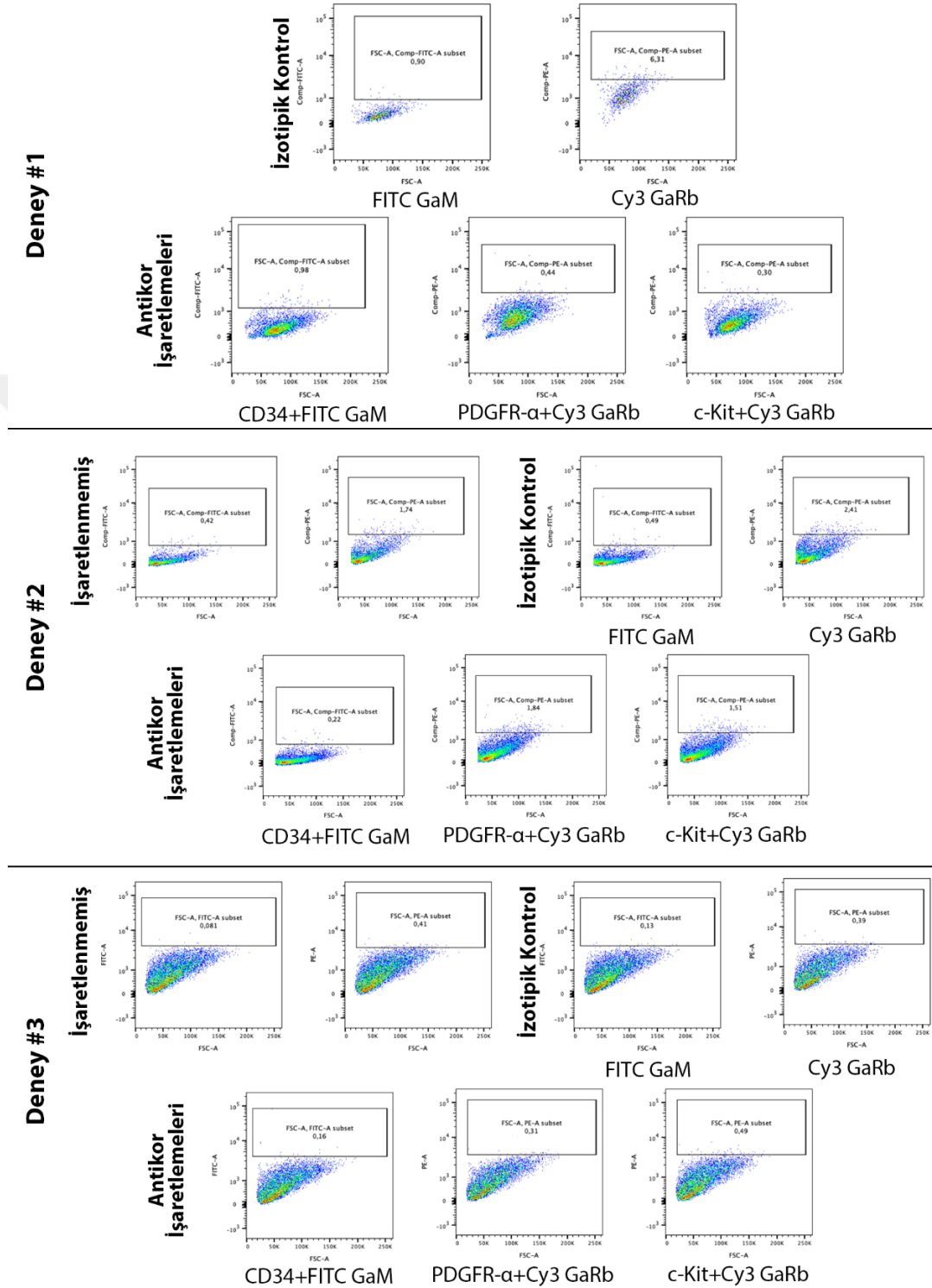


Şekil 3.14: Göbek kordonu stroma hücrelerinin SEM gözlemleri. İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin (**ok başları**) çoğalma yoğunluğunun $>80\%$ olduğu bölgede (**A**), geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleriyle yakın temasta (**A ve B**) ve birbirleriyle temasta (*) (**C**) olduğu izlendi. Geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin nano uzantılar yoluyla birbirleriyle teması (**oklar**) (**D**) dikkati çekti. Ölçüm çubukları: 20 μm .

3.5 Akım Sitometri Sonuçları

Akım sitometri deneylerinin amacı hücre kültürü süresince gözlenmiş telosit benzeri hücreleri FACS ile ayırtmak ve bu hücrelerin alt kültürünü yapmaktır. Bu yüzden akım sitometri deneyleri fikse edilmemiş canlı iGK-MSH’de gerçekleştirildi. Akım sitometrinin ilk deneyinde pozitif olmayan hücre popülasyonuna [izotipik kontrol (FITC+Cy3)] göre kapılar belirlendi. Bu kapılar CD34+PDGFR- α ve CD34+c-Kit ikili antikor işaretlemeleri örneklerine uygulandığında izotipik kontrollere göre anlamlı sayıda hücrenin izole edilmediği saptandı (**Şekil 3.15**). İkinci akım sitometri deneyinde ise işaretlenmemiş örneğin otofloresanına ve pozitif olmayan hücre popülasyonuna [izotipik kontrol (FITC+Cy3)] göre kapılar belirlendi. Bu kapılar CD34+PDGFR- α ve CD34+c-Kit ikili antikor işaretlemeleri örneklerine uygulandığında izotipik kontrollere göre anlamlı sayıda hücrenin izole edilmediği saptandı (**Şekil 3.15**). Üçüncü akım sitometri deneyinde ise işaretlenmemiş örneğin otofloresanına ve pozitif olmayan hücre popülasyonlarına [izotipik kontroller (FITC) ve (Cy3)] göre kapılar belirlendi. Bu kapılar CD34, PDGFR- α ve c-Kit tekli antikor işaretlemeleri örneklerine uygulandığında ilk iki deneyde olduğu gibi izotipik kontrollere

göre anlamlı sayıda hücrenin izole edilmediği saptandı (Şekil 3.15). Anlamlı sayıda hücre elde edilemediği için FACS deneyleri gerçekleştirilemedi ve alt kültür deneyleri yapılamadı.

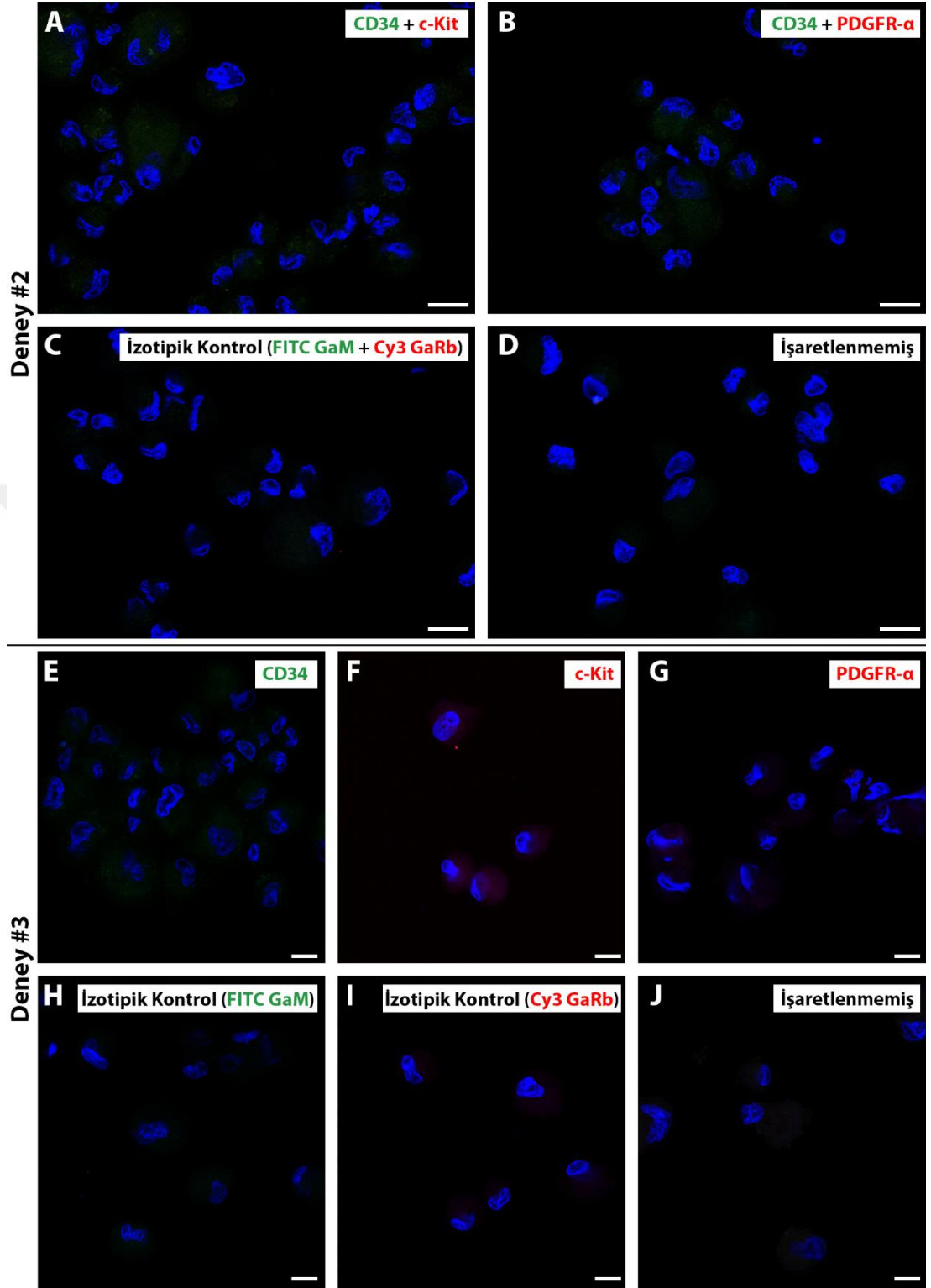


Şekil 3.15: Akım sitometri deney sonuçları. Toplam üç kez tekrarlanan akım sitometri deneylerinin işaretlenmemiş, izotipik kontrol, ikili ve tekli antikor işaretlemeleri örneklerindeki sonuçları. Her üç

deneyde de antikor işaretlemeleri örneklerinde anlamlı sayıda hücrenin izole edilmediği saptandı ve FACS deneyleri gerçekleştirilemedi.

3.6 Akım Sitometri Örneklerinin Konfokal Mikroskopi Sonuçları

Akım sitometrinin ikinci (**Şekil 3.16A-D**) ve üçüncü (**Şekil 3.16E-J**) deneyindeki örneklerden yayma preparatlar hazırlanarak konfokal mikroskopta incelendi ve antikor pozitifliklerinin akım sitometri sonuçlarıyla karşılaştırılması amaçlandı. İkinci akım sitometri deneyindeki ikili antikor işaretlemeleri CD34/c-Kit (**Şekil 3.16A**) ve CD34/PDGFR- α (**Şekil 3.16B**), izotipik kontrol (FITC GaM+Cy3 GaRb) (**Şekil 3.16C**) ve işaretlenmemiş (**Şekil 3.16D**) örneklerinin hepsi FITC ve Cy3 kanallarının her ikisi için de negatif izlendi. Akım sitometri sonuçlarıyla çelişebilecek herhangi bir farkın olmadığı saptandı. Üçüncü akım sitometri deneyindeki tekli antikor işaretlemeleri CD34 (**Şekil 3.16E**), c-Kit (**Şekil 3.16F**) ve PDGFR- α (**Şekil 3.16G**), izotipik kontrol (FITC GaM) (**Şekil 3.16H**) ve izotipik kontrol (Cy3 GaRb) (**Şekil 3.16I**) ve işaretlenmemiş (**Şekil 3.16J**) örneklerinin hepsi FITC ve Cy3 kanallarının her ikisi için de negatif izlendi. Akım sitometri sonuçlarıyla çelişebilecek herhangi bir farkın olmadığı saptandı.

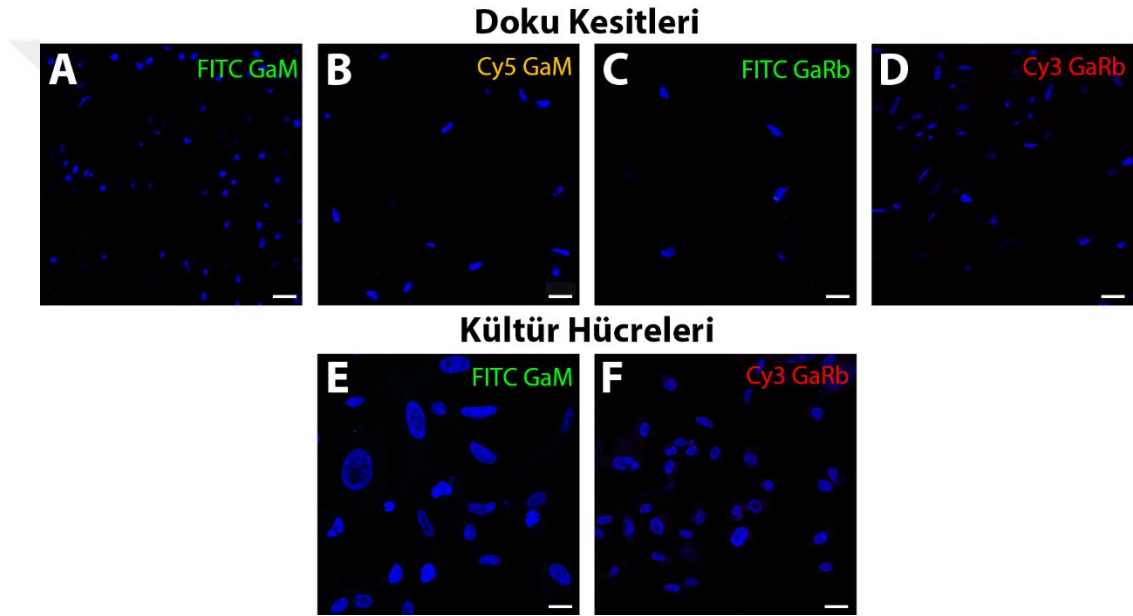


Şekil 3.16: Akım sitometri örneklerinin konfokal mikroskopi gözlemleri. İkinci akım sitometri deneyindeki örneklerin yaymaları (A-D): CD34/c-Kit (A), CD34/PDGFR- α (B), izotipik kontrol (FITC GaM+Cy3 GaRb) (C) ve işaretlenmemiş (D) örnekler negatif izlendi. Üçüncü akım sitometri deneyindeki örneklerin yaymaları (E-J): CD34 (E), c-Kit (F), PDGFR- α (G), izotipik kontrol (FITC

GaM) (**H**), izotipik kontrol (Cy3 GaRb) (**I**) ve işaretlenmemiş (**J**) örnekler negatif izlendi. Kırmızı: Cy3, Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 µm.

3.7 İmmüno Floresan İşaretleme Sonuçları

İmmüno Floresan işaretleme için öncelikle negatif kontrol gözlemleri yapıldı. Göbek kordonu doku kesitlerinde yapılan negatif kontrol immüno Floresan işaretleme sonuçlarında FITC GaM (**Şekil 3.17A**), Cy5 GaM (**Şekil 3.17B**), FITC GaRb (**Şekil 3.17C**) ve Cy3 GaRb (**Şekil 3.17D**) tamamen negatif izlendi. Kültür hücrelerinde yapılan negatif kontrol immüno Floresan işaretleme sonuçlarında ise FITC GaM (**Şekil 3.17E**) ve Cy3 GaRb (**Şekil 3.17F**) tamamen negatif izlendi.

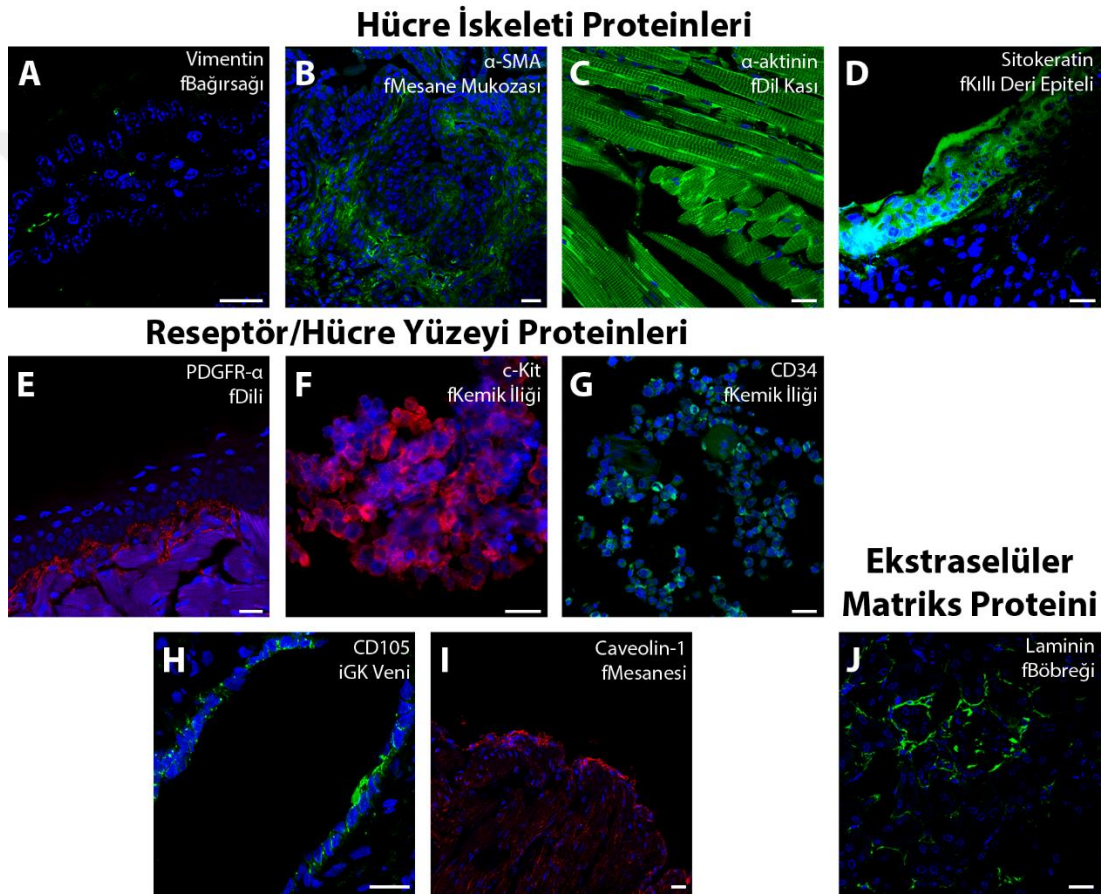


Şekil 3.17: Negatif kontrol immüno Floresan işaretleme sonuçlarının konfokal mikroskopi gözlemleri. Doku kesitlerinde yapılan negatif kontrollerde FITC GaM (**A**), Cy5 GaM (**B**), FITC GaRb (**C**) ve Cy3 GaRb (**D**) tamamen negatif bulundu. Kültür hücrelerinde ise FITC GaM (**E**) ve Cy3 GaRb (**F**) tamamen negatif izlendi. Kırmızı: Cy3, Yeşil: FITC, Sarı: Cy5, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 µm.

3.7.1 Doku Kesitlerinde İmmüno Floresan İşaretleme Sonuçları

Kullanılan antikorların özgünlüğünü ve çalıştığını test etmek için yapılan pozitif kontrollerde hücre iskeleti proteinleri; vimentin fare bağırsağının bağ dokusundaki mezenkimal hücrelerde (**Şekil 3.18A**), α -SMA fare mesanesindeki düz kas tabakasında yer alan kas hücrelerinde (**Şekil 3.18B**), α -aktinin fare dilindeki çizgili kasların Z çizgisinde (**Şekil 3.18C**) ve sitokeratin fare kılıklı deri epitelinde (**Şekil 3.18D**); reseptör ve hücre yüzeyi

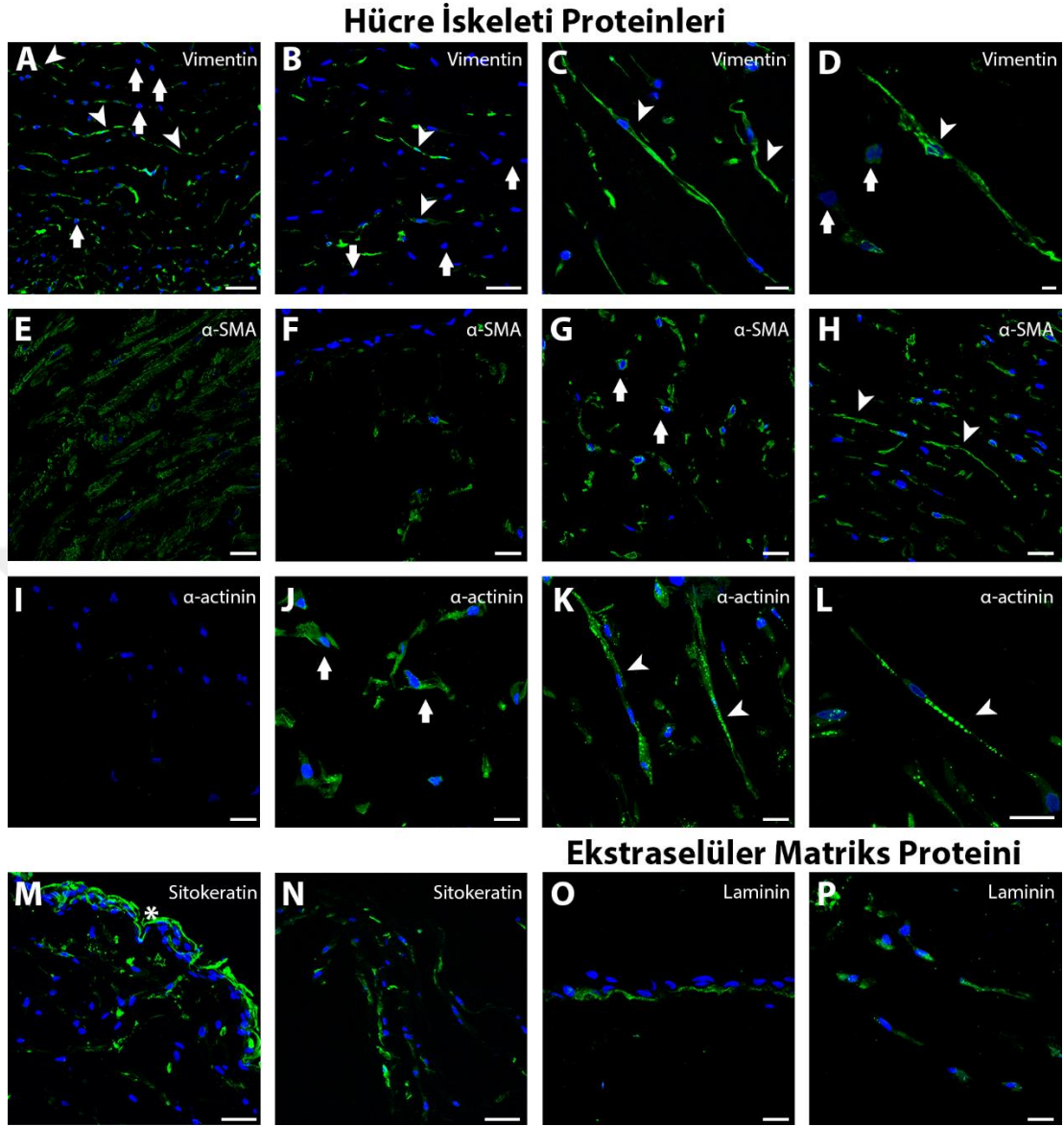
molekülleri; PDGFR- α fare dilinin epitel altı bağ dokusu boyunca (Şekil 3.18E), c-Kit fare kemik iliğinin hematopoetik kök hücrelerinde (Şekil 3.18F), CD34 fare kemik iliğinin hematopoetik kök hücreleri ve mast hücrelerinde (Şekil 3.18G), CD105 insan göbek kordonu veninin endotel hücrelerinde (Şekil 3.18H) ve caveolin-1 fare mesanesinin epitelinde ve altındaki bağ dokusunda (Şekil 3.18I); ekstraselüler matriks proteini olan laminin ise fare böbreğindeki tübüllerin bazal membranında (Şekil 3.18J) yerleşimin ve miktarın biyolojik yapıyla uyumlu olduğu izlendi; bu da söz konusu antikorların boyama prosedürümüzle çalıştığını gösterdi.



Şekil 3.18: Pozitif kontrol immünfloresan işaretlemelerin konfokal mikroskopi gözlemleri. Kullanılan antikorların özgünlüğünü ve çalıştığını test etmek için yapılan pozitif kontrollerde vimentin fare bağırsağının bağ dokusundaki mezenkimal hücrelerde (A), α -SMA fare mesanesindeki düz kas tabakasında yer alan kas hücrelerinde (B), α -aktinin fare dilindeki çizgili kasların Z çizgisinde (C), sitokeratin fare kıllı deri epitelinde (D), PDGFR- α fare dilinin epitel altı bağ dokusu boyunca (E), c-Kit fare kemik iliğinin hematopoetik kök hücrelerinde (F), CD34 fare kemik iliğinin hematopoetik kök hücreleri ve mast hücrelerinde (G), CD105 insan göbek kordonu veninin endotel hücrelerinde (H), caveolin-1 fare mesanesinin epitelinde ve altındaki bağ dokusunda (I) ve laminin ise fare

böbreğindeki tübüllerin bazal membranında **(J)** yerleşimin ve miktarın biyolojik yapıyla uyumlu olduğu izlendi; bu da söz konusu antikorların boyama prosedürümüzle çalıştığını gösterdi. **i:** İnsan, **f:** Fare. Kırmızı: Cy3, Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 µm.

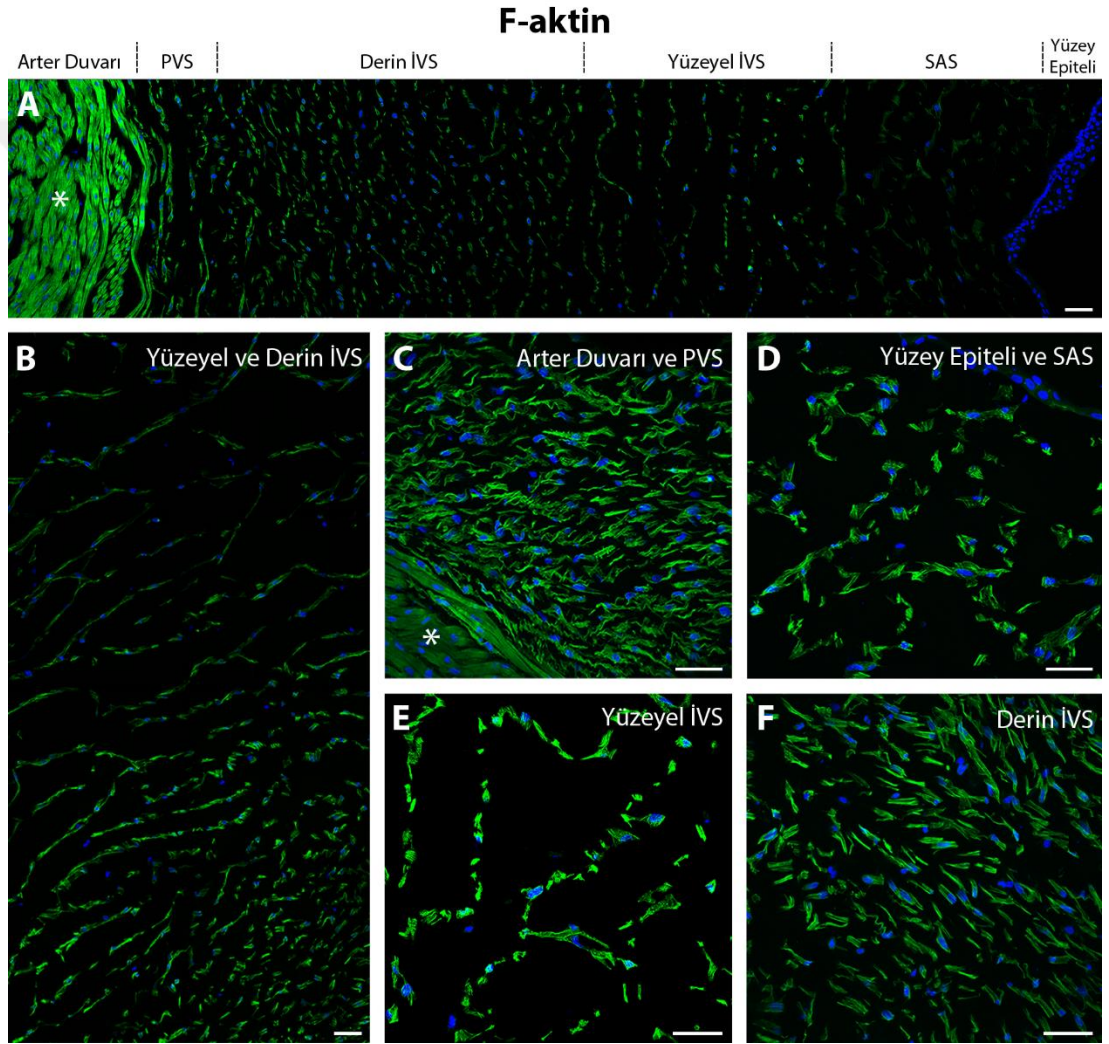
Göbek kordonu kesitlerinde hücre iskeleti proteinleri ve ekstraselüler matriks proteininin yerleşimi ve dağılımını gözlemlemek amacıyla yapılan immünfloresan işaretlemelerde ilk olarak İVS'den alınan vimentin pozitif üç boyutlu birleştirilmiş (15-19 optik kesit=7 µm kalınlık) görüntülerde stromadaki hücrelerin farklı düzeylerde vimentin pozitif olduğu dikkati çekiciydi (**Şekil 3.19A-D**). Yaklaşık 0,2 mm² İVS alanında uzun sitoplazmik uzantıları, yassı ve/veya küçük çekirdekleri olan telosit benzeri stroma hücreleri kuvvetli vimentin pozitif iken daha yuvarlak ve oval şekilli çekirdeklere sahip stroma hücrelerinin zayıf vimentin pozitif oldukları izlendi (**Şekil 3.19A ve B**). Daha yüksek büyütmelerde ise ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin güçlü vimentin pozitif olduğu izlendi (**Şekil 3.19C ve D**). Düz kas hücrelerinin belirteci olan α-SMA ise internal kontrol olarak arter duvarının kas tabakasında pozitif (**Şekil 3.19E**), yüzey epitelinde ise negatif (**Şekil 3.19F**) izlendi. SAS'da (**Şekil 3.19F**) ve İVS'de hem ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde hem de daha geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde pozitif olduğu izlendi (**Şekil 3.19G ve H**). Aktin bağlayıcı protein olan α-aktinin ise internal kontrol olarak arter duvarının kas tabakasında negatiflik sergiledi (**Şekil 3.19I**). α-aktinin İVS'de geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde pozitif izlendi (**Şekil 3.19J**). İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerde güçlü ve noktasal pozitiflik izlendi (**Şekil 3.19K ve L**). Ayrıca yüzey epiteli, SAS ve İVS'den alınan temsili alanlarda sitokeratin filamanlarının hücre içi dağılımları izlendi (**Şekil 3.19M ve N**). Buna göre yüzey epitelinin özellikle en üst tabakasındaki yassı hücreler kuvvetli pozitifken SAS'da yer alan stroma hücrelerinde zayıf pozitiflik ve yer yer negatif boyanmalar dikkati çekti (**Şekil 3.19M**). Benzer şekilde İVS'den alınan kesitlerde bazı hücreler sitokeratin pozitif izlenirken çoğu hücre de negatif izlendi (**Şekil 3.19N**). Ekstraselüler matriks proteini olan laminin ise internal kontrol olarak yüzey epitelinin alt tabakasındaki hücrelerde sürekli bir kılıf olarak izlendi (**Şekil 3.19O**). İVS'deki hücrelerde ise pozitif olduğu dikkati çekti (**Şekil 3.19P**).



Şekil 3.19: Göbek kordonu kesitlerinde hücre iskeleti proteinleri ve ekstraselüler matriks proteininin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. İVS’de yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin (**ok başları**) güçlü ve geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin (**oklar**) zayıf vimentin pozitivitesi (A-D) izlendi. α -SMA arter duvarının kas tabakasında pozitif (E), yüzey epitelinde negatif (F), SAS’da (F) ve İVS’de hem ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde (**ok başları**) hem de daha geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde (**oklar**) pozitif (G ve H) izlendi. α -aktinin arter duvarının kas tabakasında negatif (I), İVS’de geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde (**oklar**) pozitif izlendi (J). İnce uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerde (**ok başları**) güçlü ve noktasal pozitiflik izlendi (K ve L). Yüzey epitelinde güçlü sitokeratin pozitifliği (M) izlenirken SAS’da (M) ve İVS’de stroma hücrelerinin bazıları zayıf pozitif bazıları ise tamamen negatif (N) izlendi. Laminin yüzey epitelinin en alt tabakasında (O) ve İVS’deki

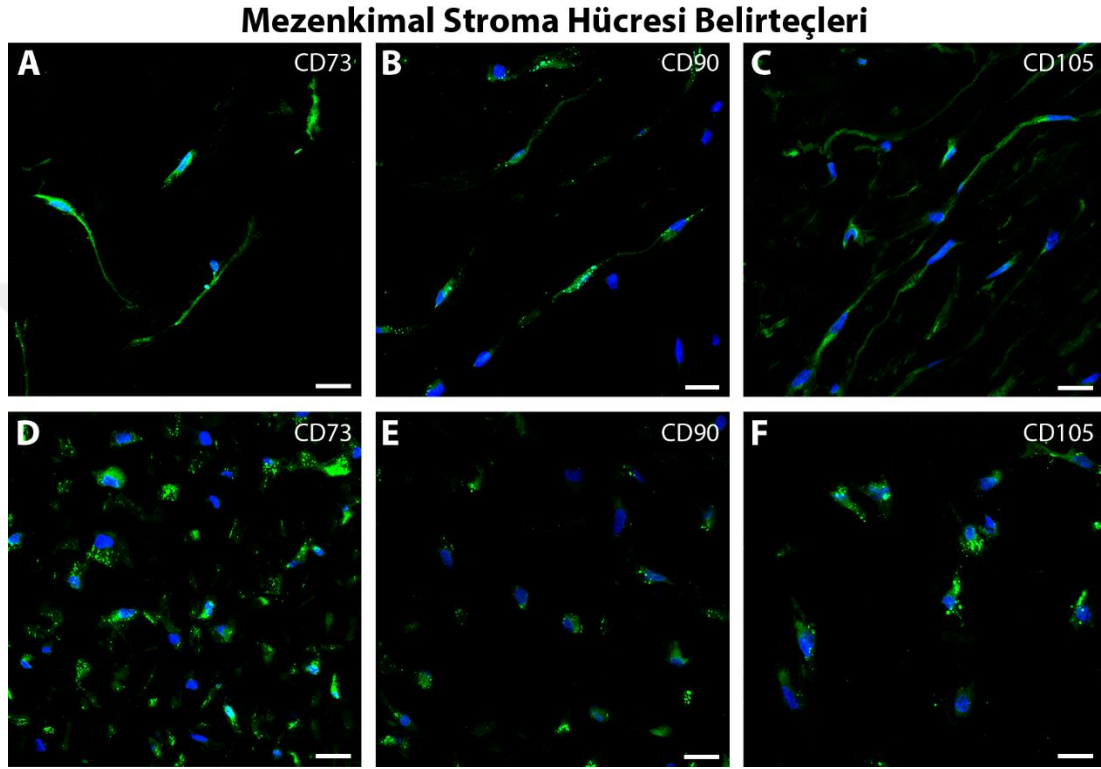
stroma hücrelerinde (**P**) pozitif izlendi. Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 50 μm (**A-B, D** ve **M-N**), 20 μm (**C, E-L** ve **O-P**).

Hücre içinde yaygın bulunan F-aktin filamanları gerek arter duvarı (**Şekil 3.20A** ve **C**) gerekse tüm stroma hücrelerinde kuvvetli pozitif olarak izlendi (**Şekil 3.20A-E**). Hücre şeklinin ve birim alandaki hücre yoğunluğunun anlaşılmasına yardımcı olan F-aktin işaretlemesi PVS'de (**Şekil 3.20A** ve **C**) sık yerleşimli ve geniş sitoplazmalı hücrelerde yer alırken İVS ve SAS'da daha ince uzantıları olan telosit benzeri stroma hücrelerinin yapısında bulunuyordu (**Şekil 3.20B** ve **D-F**).



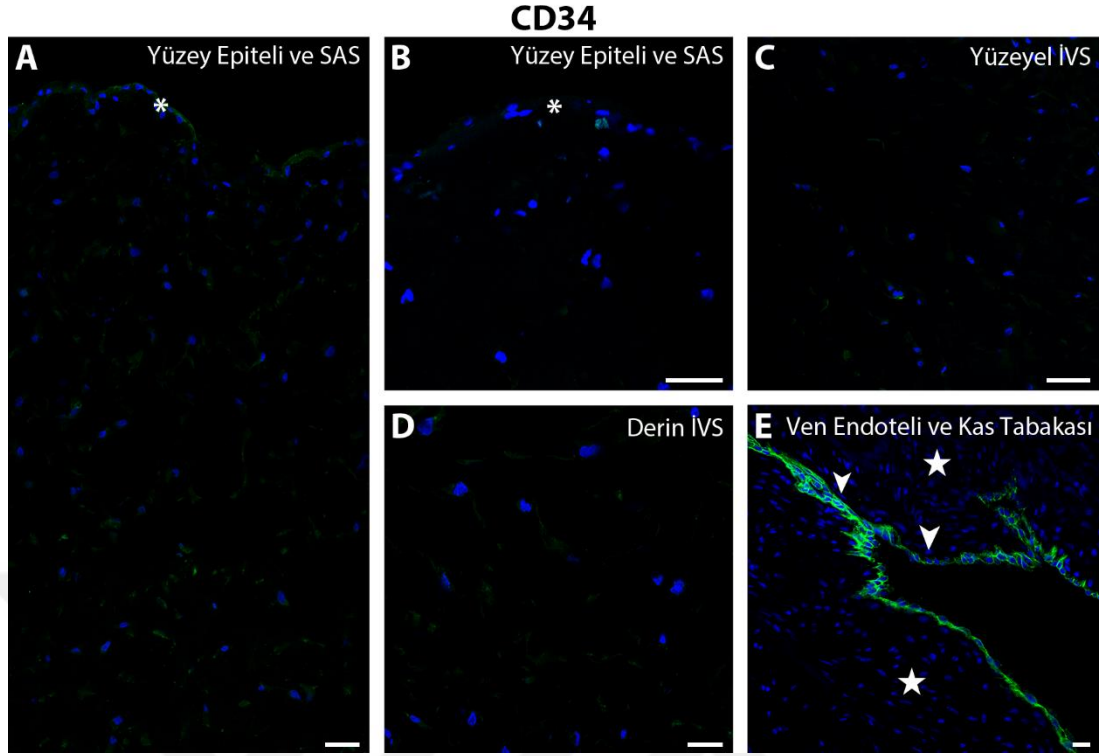
Şekil 3.20: Göbek kordonu kesitlerinde F-aktin filamanlarının yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. F-aktin filamanları arter duvarında (*) (**A** ve **C**) ve tüm stroma hücrelerinde (**A-F**) pozitif izlendi. PVS'de (**A** ve **C**) sık yerleşimli ve geniş sitoplazmalı hücrelerde yer alırken yüzeyel İVS, derin İVS ve SAS'da daha ince uzantıları olan telosit benzeri stroma hücrelerinde (**B** ve **D-F**) pozitif izlendi. Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 50 μm .

Hücre yüzeyi molekülleri ve MSH belirteçlerinin (CD73, CD90 ve CD105) göbek kordonu kesitlerindeki immünfloresan ifadeleri incelendiğinde stromadaki ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri (Şekil 3.21A-C) ve daha geniş sitoplazmalı stroma hücreleri (Şekil 3.21D-E) özellikle CD73 ve CD105 açısından kuvvetli pozitif, CD90 açısından ise daha seyrek noktasal pozitif bulundu.



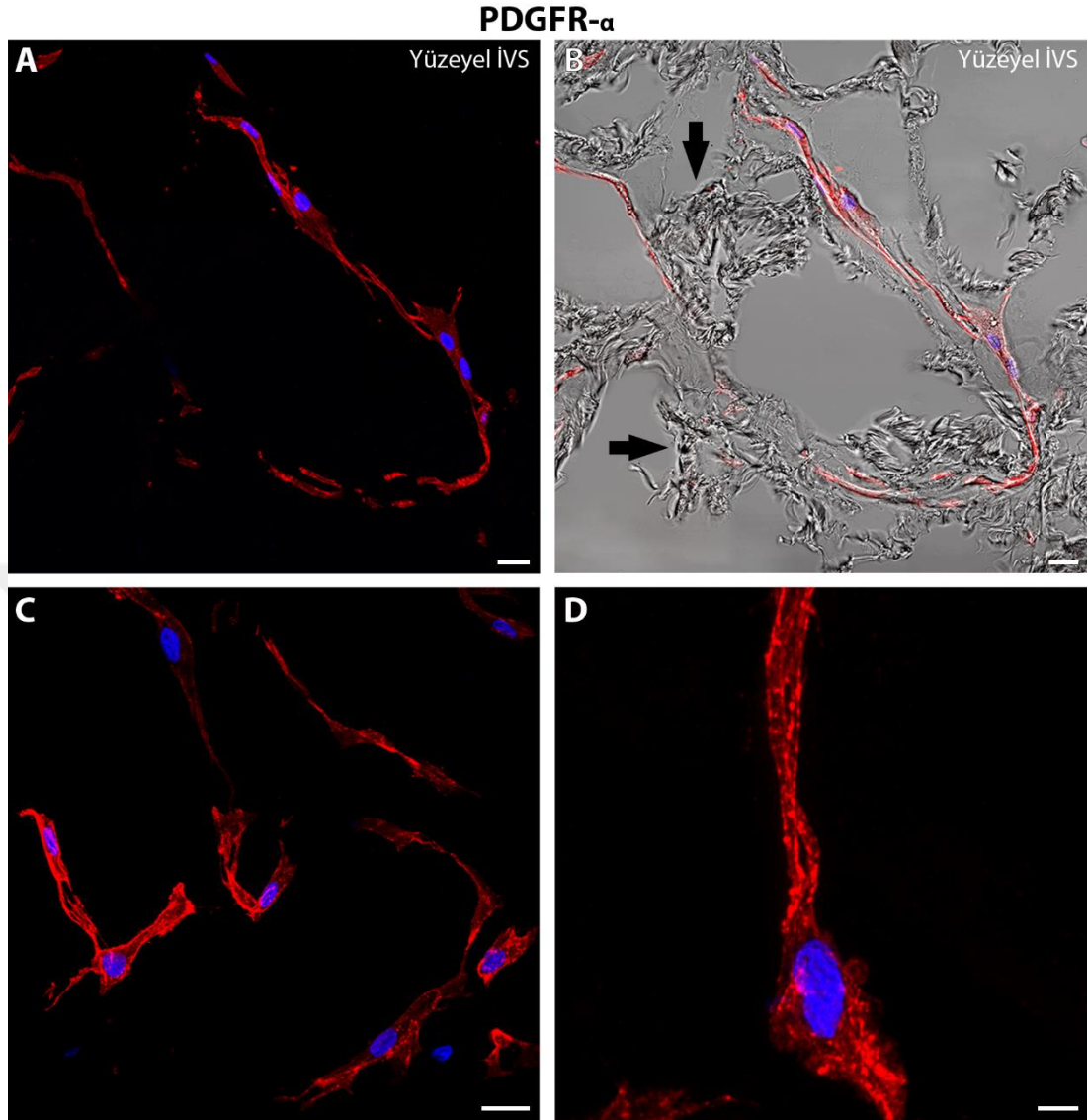
Şekil 3.21: Göbek kordonu kesitlerinde mezenkimal stroma hücresi belirteçlerinin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. Stromada bulunan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin (A-C) ve daha geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin (D-E) CD73 ve CD105 belirteçlerini kuvvetli pozitif ifade ettiği izlenirken, CD90’ı daha seyrek ve noktasal pozitif ifade ettiği izlendi. Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 µm.

Bazı mezenkimal hücrelerin, özellikle de telositlerin, tanımlanmasında sıklıkla kullanılan bir hücre yüzeyi glikoproteini CD34’ün göbek kordonu kesitlerindeki ifadesi incelendiğinde farklı antikorlarla (fare, tavşan) elde edilen sonuçlara göre CD34 yüzey epiteline (Şekil 3.22A ve B) ve stromanın tamamında zayıf pozitif (Şekil 3.22A-D) olarak bulundu. İnternal kontrol olarak göbek kordonu veninin damar duvarı tamamen negatif, endoteli ise güçlü pozitif izlendi (Şekil 3.22E).



Şekil 3.22: Göbek kordonu kesitlerinde CD34'ün yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopik gözlemleri. Yüzey epitelinde (*) (A ve B) ve stromanın tamamında zayıf pozitiflik (A-D); göbek kordonu veninin damar duvarında (★) negatiflik ve ven endotelinde ise güçlü pozitiflik (ok başları) izlendi (E). Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 50 µm (A-C) ve 20 µm (D ve E).

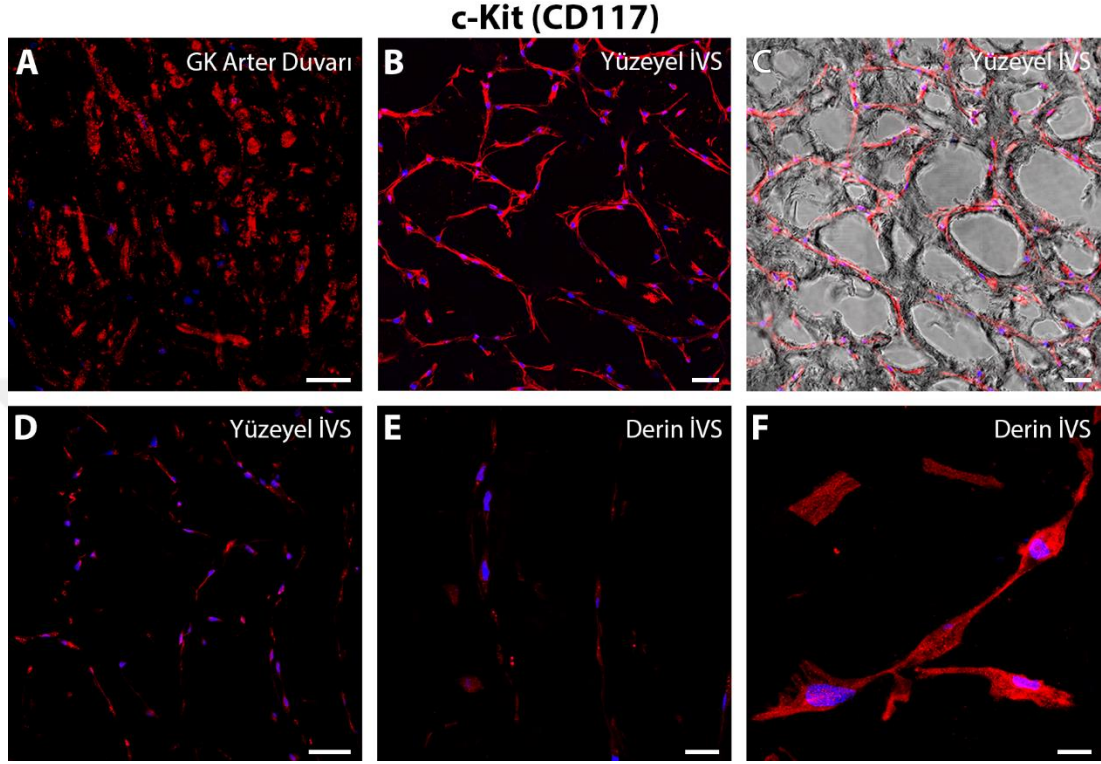
Hücre yüzeyinde bulunan trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü olan ve telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan belirteçlerden PDGFR- α göbek kordonu kesitlerinde stromada yer alan tüm hücrelerin hücre zarında ve sitoplazmasında kuvvetli pozitif bulundu (Şekil 3.23A-D). Yüzeyel İVS'de bulunan cepleri çevreleyecek şekilde dizilmiş olan ve kollajen demetlerin arasında yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde bulunduğu izlendi (Şekil 3.23A ve B). Bunun yanı sıra stromanın diğer bölgelerinde yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler de pozitif izlendi (Şekil 3.23C ve D).



Şekil 3.23: Göbek kordonu kesitlerinde PDGFR- α 'nın yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. Yüzeyel İVS'deki cepleri çevreleyecek şekilde dizilmiş olan ve kollajen demetlerin (**oklar**) arasında [**A** ve **B** (DIC görüntüleme)] ve stromanın diğer bölgelerinde yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin hücre zarında ve sitoplazmasında pozitiflik izlendi (**C** ve **D**). Kırmızı: Cy3, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 μ m (**A-C**) ve 5 μ m (**D**).

Hücre yüzeyinde bulunan reseptör kinaz proteini olan ve telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan belirteçlerden c-Kit göbek kordonu kesitlerinde internal kontrol olarak arter duvarında test edildi ve düz kas hücreleri kuvvetli pozitif bulundu (**Şekil 3.24A**). Ardından yüzeyel İVS'de cepleri saran ve kollajen demetlerin arasında yer alan ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler pozitif bulundu (**Şekil 3.24B** ve **C**). Hem yüzeyel hem de derin İVS'de çok ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri

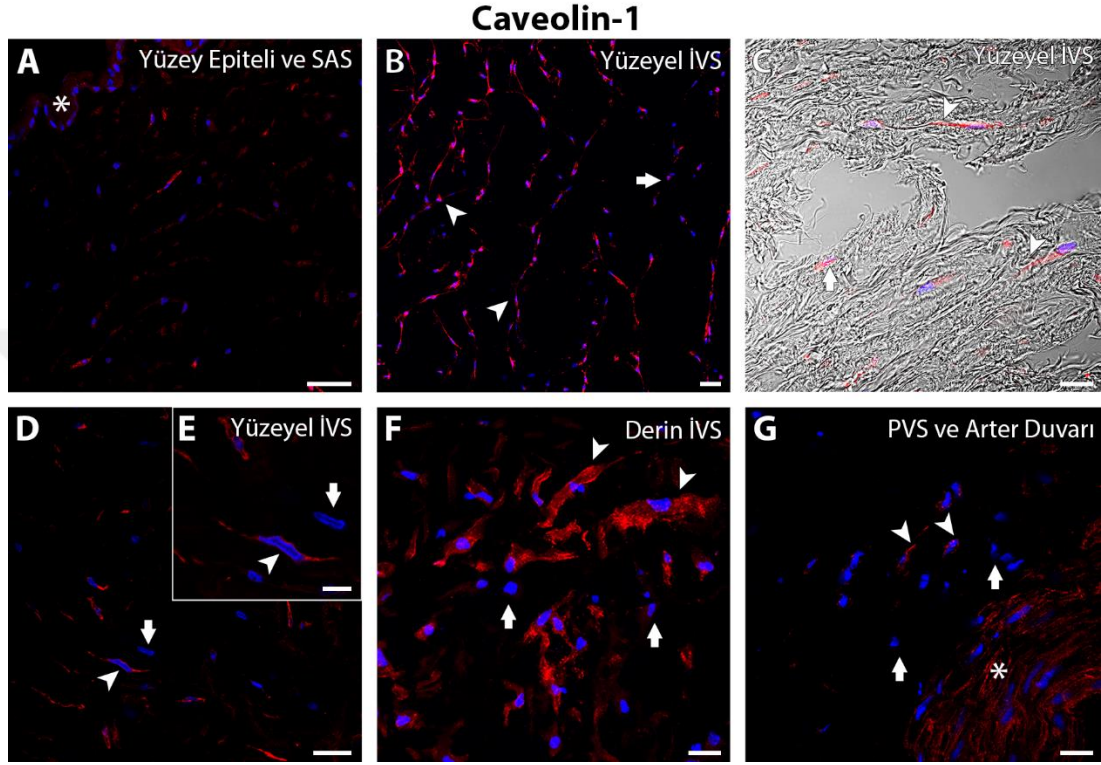
hücrelerde c-Kit pozitifliği daha büyük büyütmelemlerde gösterildi (Şekil 3.24D ve E). Pozitif boyanmanın hem hücre zarında hem de sitoplazmada noktasal olarak yayıldığı izlendi (Şekil 3.24F).



Şekil 3.24: Göbek kordonu kesitlerinde c-Kit’in yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. Arter duvarında düz kas hücreleri kuvvetli pozitif izlendi (A). Yüzeyel İVS’de cepleri saran ve kollajen demetlerin arasında yer alan ince uzantılara sahip telosit benzeri hücreler pozitif bulundu [B ve C (DIC görüntüleme)]. Yüksek büyütmelemlerde hem yüzeyel hem de derin İVS’de çok ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde c-Kit pozitifliği izlendi (D ve E). c-Kit pozitifliğinin hem hücre zarında hem de sitoplazmada noktasal olarak yayıldığı dikkati çekiciydi (F). Kırmızı: Cy3, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 50 µm (B-D), 20 µm (A ve E) ve 5 µm (F).

Son olarak bir hücre zarında ve sitoplazmada bulunan paketleme proteini olan ve telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için sıklıkla kullanılan belirteçlerden birisi olan caveolin-1 yüzey epiteli hücrelerinde çok zayıf noktasal pozitiflik gösterdi (Şekil 3.25A). SAS’da bazı hücrelerde kuvvetli bazı hücrelerde zayıf ve bazı hücrelerde de tamamen negatif izlendi (Şekil 3.25A). Yüzeyel İVS’de ise ceplerin etrafını çevreleyen kollajen demetlerinin arasında yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin birçoğunda kuvvetli pozitiflik izlendi (Şekil 3.25B ve C). Bu pozitifliklerin bazılarının geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin zarında yoğunlaştığı; aralarındaki bazı hücrelerin ise

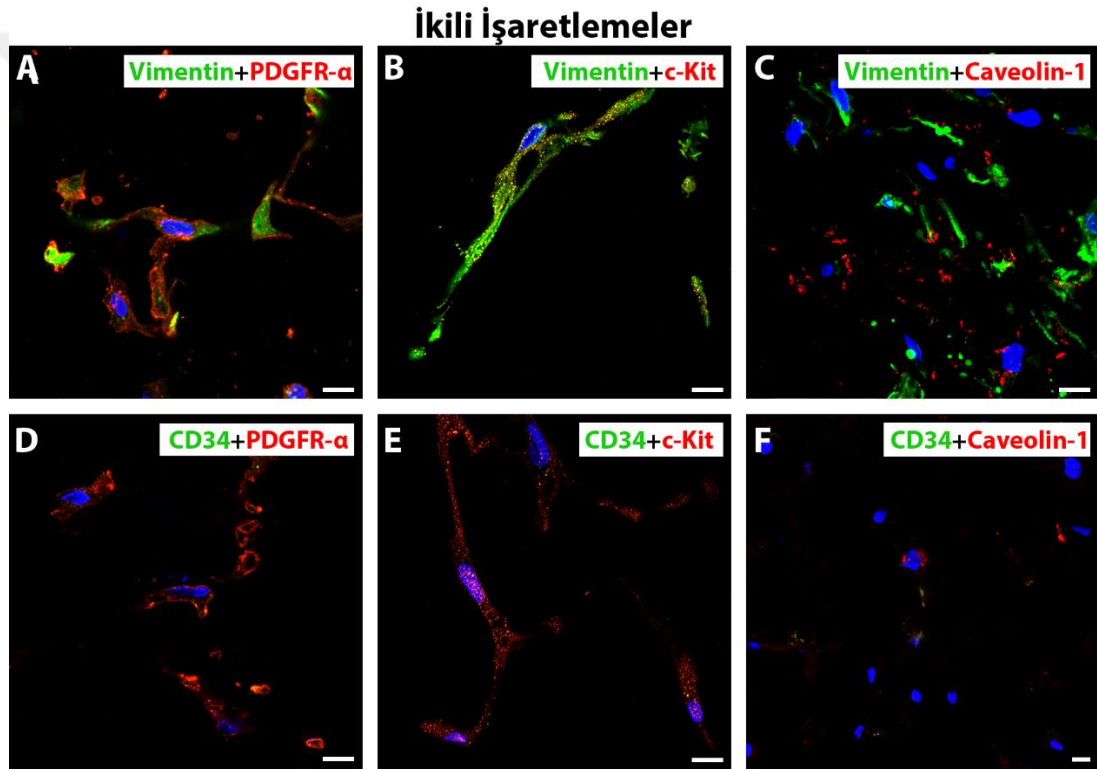
tamamen negatif olduğu izlendi (Şekil 3.25B-E). Derin İVS'de geniş sitoplazmalı hücrelerin büyük bölümünde pozitiflik; bazılarında ise negatiflik izlendi (Şekil 3.25F). İnternal kontrol olarak arter duvarındaki düz kas hücrelerinde kuvvetli pozitifite izlenmesinin yanı sıra PVS'de bazı hücrelerde pozitiflik izlenirken, çoğu hücre negatif bulundu (Şekil 3.25G).



Şekil 3.25: Göbek kordonu kesitlerinde caveolin-1'in yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopik gözlemleri. Yüzey epiteli hücrelerinde çok zayıf noktasal pozitiflik (*) izlendi (A). SAS'da kuvvetli pozitif, zayıf pozitif ve tamamen negatif hücreler dikkati çekiciydi (A). Yüzeyel İVS'de ise ceplerin etrafını çevreleyen kollajen demetlerinin arasında yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin birçoğunda kuvvetli pozitiflik izlendi [B ve C (DIC görüntüleme)]. Bazı geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin zarında yoğunlaşan pozitiflik (ok başları); ve bazı hücrelerde de tamamen negatiflik (oklar) izlendi (B-E). Derin İVS'de ise geniş sitoplazmalı hücrelerin bazılarında pozitiflik (ok başları); bazılarında ise negatiflik izlendi (oklar) (F). Arter duvarındaki düz kas hücrelerinde kuvvetli pozitifite görülmesinin (*) yanı sıra PVS'de bazı hücreler pozitifken (ok başları), bazı hücreler de negatif bulundu (oklar) (G). Kırmızı: Cy3, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 50 µm (A ve B), 20 µm (C, D, F ve G) ve 10 µm (E).

Son olarak telosit benzeri hücreleri diğer hücrelerden ayırt etmek amacıyla literatürde yer alan ikili immünfloresan işaretlemeler yapıldı (Şekil 3.26). Ara filaman proteini olan vimentin bütün hücrelerde güçlü pozitif izlenirken (Şekil 3.26A-C) PDGFR-α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin hücre zarında ve sitoplazmasında, ince ve uzun

sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin ise uzantılarında pozitif izlendi (**Şekil 3.26A**). c-Kit ise ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin zarında ve sitoplazmasında noktasal pozitif olarak izlendi (**Şekil 3.26B**). Caveolin-1 geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin hücre zarında ve bazı hücrelerde de perinükleer sitoplazmada pozitif bulundu (**Şekil 3.26C**). CD34 ikili boyamalarında ise CD34 bütün hücrelerde negatif bulundu (**Şekil 3.26D-F**). PDGFR- α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin hücre zarında (**Şekil 3.26D**); c-Kit de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin zarında ve sitoplazmasında noktasal pozitif bulundu (**Şekil 3.26E**). Son olarak CD34/caveolin-1 ikili boyamasında caveolin-1 geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında pozitif izlendi (**Şekil 3.26F**).



Şekil 3.26: Göbek kordonu kesitlerinde ikili işaretlemelerin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. Vimentin bütün hücrelerde güçlü pozitif (**A-C**); PDGFR- α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin hücre zarında ve sitoplazmasında, ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin ise uzantılarında pozitif (**A**); c-Kit ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin zarında ve sitoplazmasında noktasal pozitif (**B**); caveolin-1 ise geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin hücre zarında ve bazılarının da perinükleer sitoplazmasında pozitif izlendi (**C**). CD34 ikili boyamalarında ise CD34 bütün hücrelerde negatif (**D-F**); PDGFR- α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin hücre zarında pozitif (**D**); c-Kit ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin zarında ve sitoplazmasında noktasal pozitif (**E**),

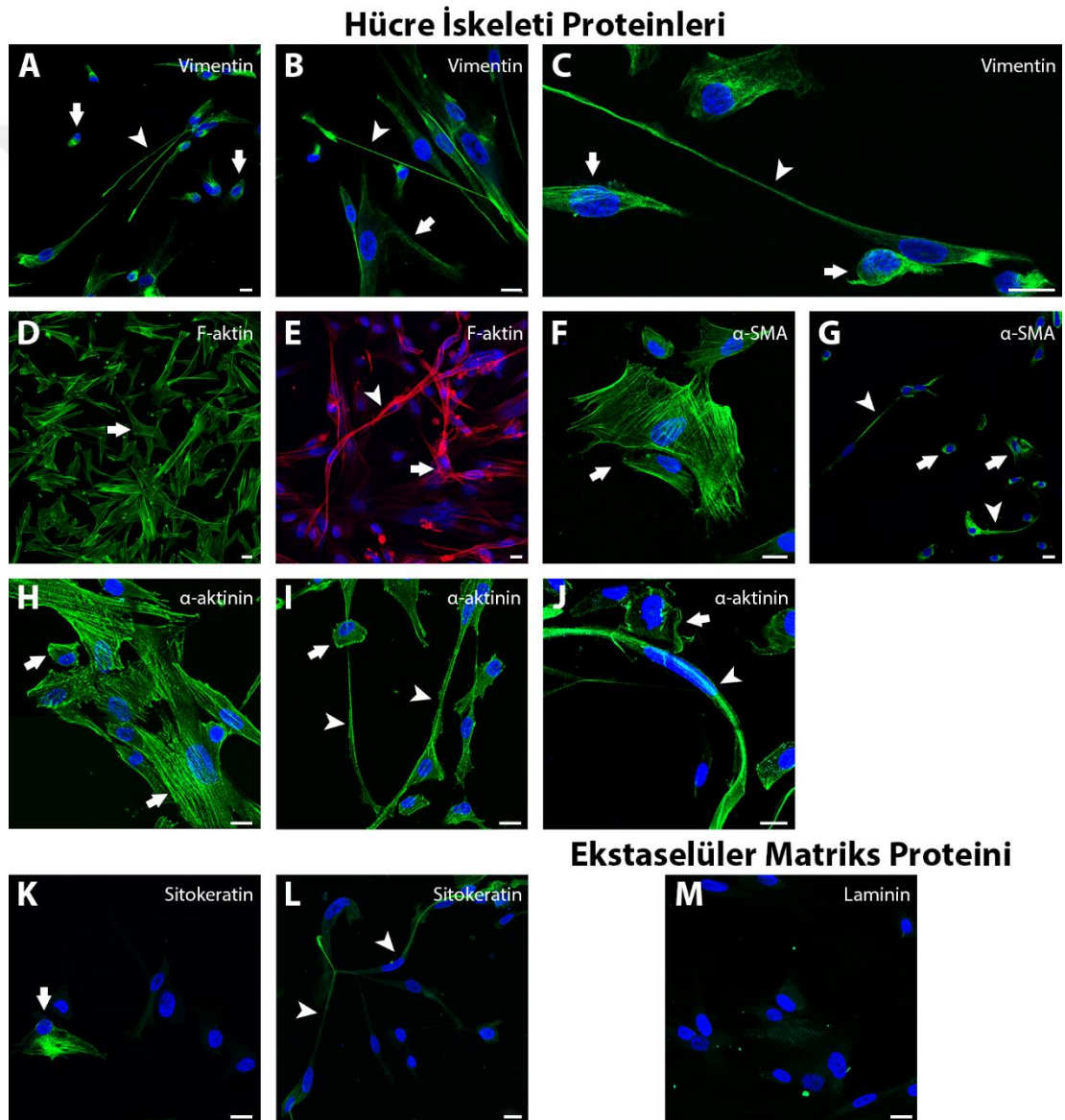
caveolin-1 geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında pozitif bulundu (F). Kırmızı: Cy3, Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 µm.

3.7.2 Kültür Hücrelerinde İmmüno Floresan İşaretleme Sonuçları

iGK-MSH (P₂) fikse edildikten sonra immüno floresan işaretleme yapıldı. Hücre iskeleti proteinlerinden ve mezenkimal kök hücrelerin en önemli belirteçlerinden vimentin hem küçük ve geniş sitoplazmalı hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde kuvvetli filamentöz pozitif izlendi (Şekil 3.27A-C). F-aktin filamanları ise hem birim alandaki hücre yoğunluğunun anlaşılmasına yardımcı oldu (Şekil 3.27D) hem de küçük ve geniş sitoplazma hücrelerinde ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde filamentöz yapıda izlendi (Şekil 3.27E). α-SMA ise iki hücrede de kuvvetli pozitif izlendi; daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde daha güçlü filamentöz bir pozitiflik gösterirken (Şekil 3.27F) ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde daha az filamentöz pozitiflik gösterdi (Şekil 3.27G). Aktin bağlayıcı protein α-aktinin ise hem daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde hem hücre zarında hem de sitoplazmada kuvvetli filamentöz pozitif izlendi; fokal adezyon bölgelerinde ve hücrelerin nanouzantılarında da pozitif bulundu (Şekil 3.27H-J). Sitokeratin filamanlarının dağılımı incelendiğinde ise daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin bazılarının sitoplazması ve hücre zarı filamentöz pozitif izlenirken bazıları da negatif izlendi (Şekil 3.27K). İnce uzun uzantılı telosit benzeri hücrelerin bazılarında özellikle uzun uzantılarında pozitiflik izlenirken bazıları da negatif izlendi (Şekil 3.27L). Ekstraselüler matriks proteini olan laminin ise negatif izlendi (Şekil 3.27M).

Hücre yüzeyi molekülleri ve MSH belirteçlerinin (CD73, CD90 ve CD105) kültür hücrelerindeki immüno floresan ifadeleri incelendiğinde özellikle CD73 ve CD90 açısından hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli noktasal pozitif, CD105 açısından da daha seyrek noktasal pozitif bulundu (Şekil 3.28A-C). Hücre yüzeyi glikoproteini CD34 ise bütün hücrelerde negatif izlendi (Şekil 3.28D). Hücre zarında ve sitoplazmada bulunan paketleme proteini caveolin-1 hem daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde kuvvetli pozitif bulundu (Şekil 3.28E). Daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücrelerinin sitoplazmasında ve hücre zarında noktasal pozitiflik izlenirken (Şekil 3.28F) ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde kuvvetli noktasal pozitifliğin yanı sıra özellikle perinükleer sitoplazma pozitif izlendi (Şekil 3.28G). Aynı zamanda caveolin-1 ifadesinin neredeyse her hücrede Golgi aygıtı ve ER ile ilişkili pozitifliğe sahip olduğu da dikkati çekiciydi (Şekil 3.28E-G). Hücre

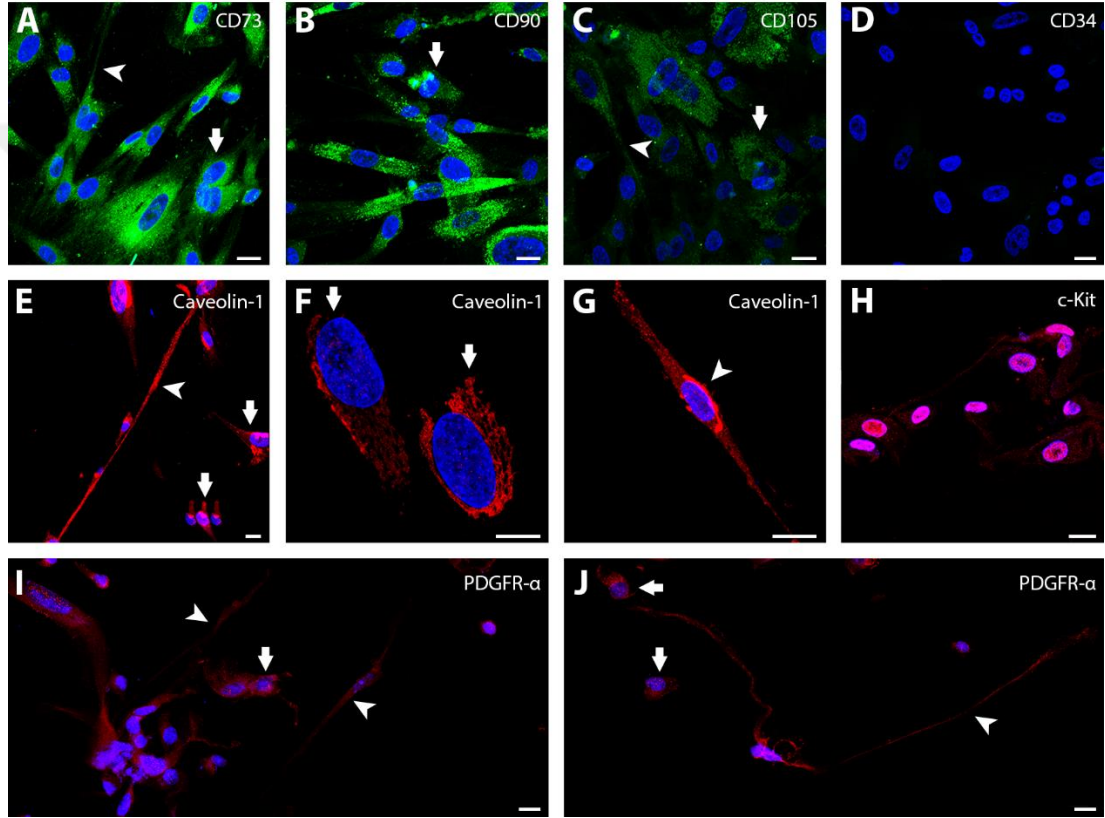
yüzeyinde bulunan reseptör kinaz proteini c-Kit ise çekirdekte de yerleşimli bulunduğundan yanlış boyanmış izlendi (Şekil 3.28H). Telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan belirteçlerden PDGFR- α hem daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde pozitif bulundu (Şekil 3.28I). Daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin özellikle sitoplazmasında noktasal pozitiflik izlenirken ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin de uzun uzantılarının kuvvetli pozitif olduğu dikkati çekiciydi (Şekil 3.28J).



Şekil 3.27: Kültür hücrelerinde hücre iskeleti proteinleri ve ekstraselüler matriks proteininin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. Vimentin bütün hücrelerde güçlü

filamentöz pozitif izlendi (A-C). F-aktin'in bütün hücrelerdeki kuvvetli pozitifliği dikkati çekiciydi (D ve E). α -SMA daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde daha güçlü filamentöz bir pozitiflik (F); ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde daha az filamentöz pozitiflik gösterdi (G). α -aktininin tüm kültür hücrelerinin hem hücre zarında hem de sitoplazmasında güçlü filamentöz pozitif izlendi (H-J). Sitokeratin bazı hücrelerde filamentöz güçlü pozitiflik gösterirken bazılarında ise negatif olduğu dikkati çekiciydi (K ve L). Laminin hücrelerde negatif izlendi (M). Daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücreleri (oklar) ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler (ok başları) gösterildi. Kırmızı: Cy5, Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 μ m.

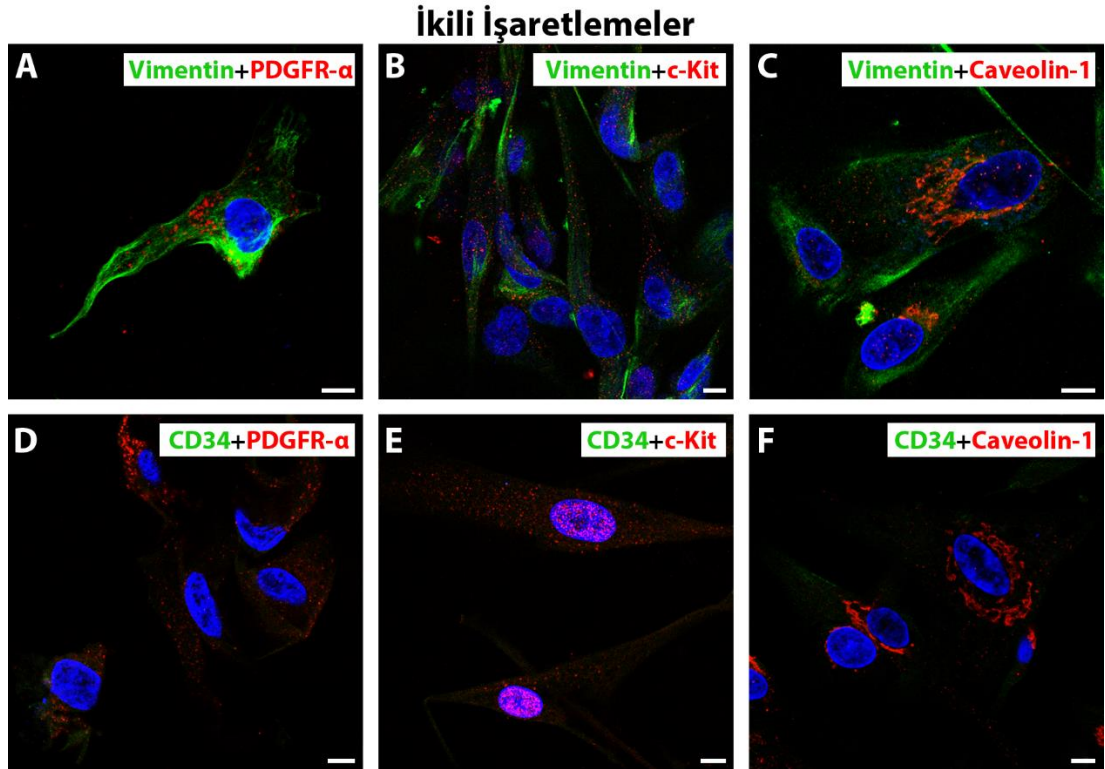
Hücre Yüzeyi Molekülleri ve Reseptör Proteinler



Şekil 3.28: Kültür hücrelerinde hücre yüzeyi molekülleri ve reseptör proteinlerin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopik gözlemleri. CD73 ve CD90 hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli noktasal pozitif, CD105 de daha seyrek noktasal pozitif bulundu (A-C). CD34 bütün hücrelerde negatif izlendi (D). Caveolin-1 hem daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde Golgi aygıtı ve endoplazma retikulumu ilişkili pozitif bulundu (E). Daha geniş ve küçük sitoplazmalı hücrelerde noktasal pozitiflik izlenirken (F) ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde bu noktasal pozitifliğin yanı sıra güçlü perinükleer pozitiflik izlendi (G). Çekirdekte de pozitif bulunan c-Kit'in yanlış boyadığı izlendi (H). PDGFR- α hem daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücrelerinde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde noktasal pozitif bulundu (I). İnce uzantılı telosit benzeri hücrelerin uzantılarının

pozitif olduğu dikkati çekiciydi (**J**). Daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücreleri (**oklar**) ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler (**ok başları**) gösterildi. Kırmızı: Cy3, Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 20 μ m.

Son olarak telosit benzeri hücreleri diğer hücrelerden ayırt etmek için kültür hücrelerine literatürde yer alan ikili immünfloresan işaretlemeler yapıldı (**Şekil 3.29**). Vimentin bütün hücrelerde güçlü pozitif izlenirken (**Şekil 3.29A-C**) PDGFR- α hücrelerin özellikle sitoplazmasında noktasal pozitif izlendi (**Şekil 3.29A**). c-Kit ise hem daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin sitoplazmasında noktasal pozitif olarak bulundu (**Şekil 3.29B**). Caveolin-1 geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında pozitif bulundu (**Şekil 3.29C**). CD34 ikili boyamalarında ise CD34 bütün hücrelerde negatif bulundu (**Şekil 3.29D-F**). PDGFR- α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin sitoplazmasında güçlü noktasal pozitif izlendi (**Şekil 3.29D**). c-Kit yanlış boyanmış bulundu (**Şekil 3.29E**). Caveolin-1 ise geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında güçlü pozitif izlendi (**Şekil 3.29F**).



Şekil 3.29: Kültür hücrelerinde ikili işaretlemelerin yerleşimi ve dağılımının konfokal mikroskopi gözlemleri. Vimentin bütün hücrelerde güçlü pozitif (**A-C**); PDGFR- α hücrelerin sitoplazmasında noktasal pozitif (**A**); c-Kit hem daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin sitoplazmasında noktasal pozitif (**B**); caveolin-1 geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında pozitif bulundu (**C**). CD34 ikili boyamalarında ise CD34 bütün hücrelerde negatif bulundu (**D-F**). PDGFR- α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin sitoplazmasında güçlü noktasal pozitif izlendi (**D**). c-Kit yanlış boyanmış bulundu (**E**). Caveolin-1 ise geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında güçlü pozitif izlendi (**F**).

sitoplazmalı stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında pozitif (C) izlendi. CD34 ikili boyamalarında ise CD34 bütün hücrelerde negatif (D-F); PDGFR- α geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin sitoplazmasında güçlü noktasal pozitif (D); c-Kit yanlış boyanmış (E), caveolin-1 geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin perinükleer sitoplazmasında güçlü pozitif (F) bulundu. Kırmızı: Cy3, Yeşil: FITC, Mavi: Hoechst. Ölçüm çubukları: 10 μ m.

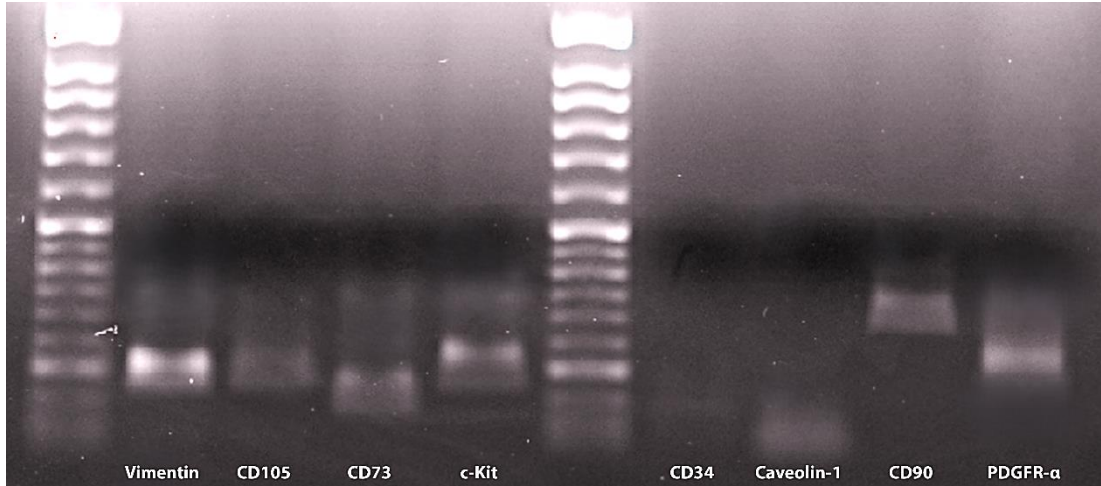
3.8 qRT-PCR Sonuçları

15 örnekten yapılan RNA örnekleri havuzunun 3 biyolojik tekrarının spektrofotometrik cihazdaki miktar ölçüm sonuçları elde edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1: RNA örneklerinin cDNA sentez reaksiyonu için miktar ölçümü sonuçları.

Örnek #	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/ μ L)	Kit Karışımı (μ L)	1000 ng'a Denk Gelen Örnek Miktarı (μ L)	RNaz İçermeyen Su (μ L)	Toplam
Toplam Göbek Kordonu Örneği-1	263,37	5,00	3,80	11,20	20,00
Toplam Göbek Kordonu Örneği-2	319,45	5,00	3,13	11,87	20,00
Toplam Göbek Kordonu Örneği-3	363,44	5,00	2,75	12,25	20,00

qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülemesi yapıldığında sekiz hedef genin hepsinde bant izlendi. Bant kalınlıklarının gen ifade düzeylerine göre farklılık göstermesi sonucu CD34'ün diğer genlere göre daha az ifadeye sahip olduğu görüldü. (Şekil 3.30).

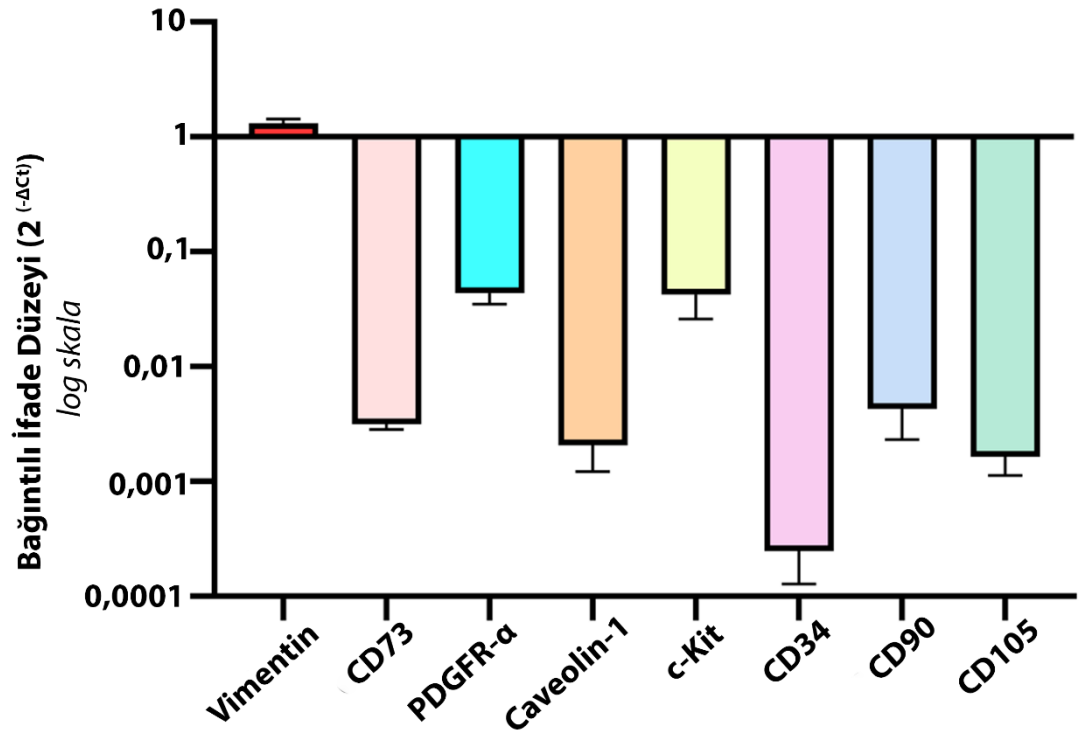


Şekil 3.30: qRT-PCR deneylerindeki hedef sekiz genin agaroz jel görüntüsü. Hedef genlerin hepsinde bant izlendi ve bant kalınlıklarının ifade düzeylerine göre değişkenlik gösterdiği görüldü.

Agaroz jel görüntüleme sonuçlardan emin olmak için qRT-PCR sonuçlarının tanımlayıcı analizlerle sunulmasına karar verildi. Hedef genler için qRT-PCR deneylerinde elde edilen Ct değerleri GAPDH geninden elde edilen Ct değerlerine göre normalize edildi ve tüm genler için $2^{(-\Delta Ct)}$ değerleri hesaplandı (**Çizelge 3.2**). Ayrıca her bir grup için standart sapma değerleri de hesaplandı; biyolojik tekrarlar arasında standart sapmanın genelde düşük olduğu ve örnekler arasında tutarlılık olduğu görüldü. Bu sekiz hedef genin birbirlerine göre ifade miktarını kıyaslamak amacıyla sadece tanımlayıcı olarak analizler yapıldı ve genler arası geniş dinamikli ifade farklılıklarını görselleştirmek amacıyla grafikteki y eksenini logaritmik skala (*log scale*) olarak ayarlandı (**Şekil 3.31**). Logaritmik sistemde genlerin ifade düzeyleri karşılaştırıldıklarında vimentinin diğer yedi hedef gene göre çok daha fazla ifade edildiği; PDGFR- α ve c-Kit'in ifade düzeyinin CD73, CD90, CD105 ve caveolin-1 ifade düzeylerinden fazla olduğu ve CD34'ün ise diğer bütün genlerle kıyaslandığında oldukça az ifade edildiği görüldü.

Çizelge 3.2: qRT-PCR deneylerindeki hedef olan sekiz genin üç biyolojik tekrardaki hesaplanan $2^{(-\Delta Ct)}$ değerleri.

Örnek #	Vimentin	CD73	PDGFR- α	Caveolin-1	c-Kit	CD34	CD90	CD105
Toplam Göbek Kordonu Örneği-1	1,1858	0,00352	0,04489	0,00195	0,03446	0,00021	0,00494	0,00194
Toplam Göbek Kordonu Örneği-2	1,4438	0,00294	0,05115	0,00296	0,06093	0,00038	0,00208	0,00192
Toplam Göbek Kordonu Örneği-3	1,30003	0,00301	0,03417	0,00128	0,03125	0,00015	0,0058	0,00105
Ortalama	1,30988	0,00316	0,04340	0,00206	0,04221	0,00025	0,00427	0,00164
Standart Sapma	0,12928	0,00032	0,00859	0,00085	0,01629	0,00012	0,00195	0,00051



Şekil 3.31: qRT-PCR deneylerindeki hedef olan sekiz genin GAPDH'ye normalize edilmiş ifade düzeyleri. Üç biyolojik tekrarın (n=3) ortalama $\Delta C_t \pm SS$ değeri olarak gösterilmiştir. Y-ekseninde gen ifade düzeylerindeki farkların daha iyi görselleştirilebilmesi için logaritmik ölçek kullanılmıştır.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada ilk gözlemlerde tespit ettiğimiz telosit benzeri hücrelerin ileri tanımlanmasıyla fötal bir doku olan göbek kordonu stromasının temel yapısını aydınlatmaya katkı sağlamayı amaçladık. Morfolojik olarak telosite benzer hücrelerin dağılımını ve sıklığını belirlemeyi ve moleküler olarak bu hücreleri tanımlamayı hedefledik. Önceki çalışmalarda bir fötal kaynaklı doku olan plasentada telositlerin varlığının gösterilmiş olmasını göz önünde bulundurarak (Suciu, Popescu, vd., 2010) diğer bir fötal doku olan göbek kordonunda varlıklarının ilk kez gösteriliyor olması temel amacımızdı. Çalışmamızda göbek kordonu stromasındaki hücrelerin heterojenitesi ve daha önce de tanımlanmış farklı tiplerdeki stroma hücrelerinin varlığı göz önünde bulundurulduğunda telosit benzeri hücrelerin bu stromada yer alıyor olabileceği ihtimalini değerlendirdik. Şu ana kadar elde ettiğimiz sonuçlar gözlemlediğimiz hücrelerin telositlerle ortak birçok fenotipik ve morfolojik özelliğe sahip olduğunu kanıtladı.

Normal gebelik sonrası elde edilen 16 farklı göbek kordonu örneğinde telosit benzeri olarak tanımladığımız hücreler, stromada yaygın olarak bulundu ve bu hücrelerin tipik, uzun, ince, moniliform uzantıları, hem ışık mikroskobu hem de elektron mikroskobu ile tespit saptandı. İlk olarak ışık mikroskopi düzeyinde geniş ve kalın kesitlerde yapılan gözlemlerde HE incelemeleri sonucunda çok ince uzantılara sahip hücrelerin göbek kordonu stromasında yaygın bulunan kollajen demetleri arasında ve özellikle PVS'de ve yüzeyel İVS'de yer alan ceplerin etrafını çevreliyor şekilde bulunduğu izlendi. Bu daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinden farklı olduklarını ortaya koyan ilk gözlem ve bu ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin stromadaki cepleri sınırlıyor ve dolayısıyla yapımına katılıyor olabileceğini düşündürdü. Ancak interstisyel alanlarda bulunan fibroblastlar temel olarak kollajen ve hücre dışı matriks üretiminden sorumluyken telositler üç boyutlu ağlar oluşturarak hücreler arası iletişimde daha fazla rol oynadığından (Bei, Zhou, vd., 2015) göbek kordonu stromasındaki miyofibroblastlar tarafından üretilen kollajenlerin etrafını çevreleyerek hücre iletişimde rol aldıkları düşünüldü. Önceki çalışmalarda İVS hücrelerinin, PVS hücrelerine kıyasla daha uzun ve daha fazla sitoplazmik uzantıya sahip olduğu bildirilmiştir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). HE gözlemlerimizde İVS'de olduğu kadar PVS'de de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri bulmuş olmamız literatürden farklılık gösterdi. Diğer taraftan hücrelerin PVS'de daha yoğun, SAS'da ise daha seyrek olduğunu diğer çalışmalarla uyumluydu (Gauthier-Fisher vd., 2019). MT ve MA

boyamalarını kullanarak göbek kordonunun kollajen açısından oldukça zengin bir doku olduğunu gösterdik. PAS boyanmış kesitler yoğun glikojen ve diğer polisakkarit birikiminin daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip hücrelerde ve yüzey epitelinde yoğunlaştığını gösterdi. Toluidin mavisi boyanmış yarı ince kesitlerde ise ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin kollajen demetlerinin arasında yerleşmiş olduğu doğrulandı. Bu gözlemler sonucunda ince sitoplazmalı ve uzantılı telosit benzeri hücrelerin mekik şeklinde olduğu ve ince uzantılarının hücre çekirdeğinden iki yana doğru uzandığı literatürle uyumlu bulundu (Kostin ve Popescu, 2009). Daha önce bağırsak duvarının submukozasında tanımlanmış olan telositlerin (Shoshkes-Carmel, 2024; Vannucchi vd., 2013) şekillerine uygun olarak bağırsak yarı ince kesitlerinde de telositler izlendi. Sonuç olarak geniş ve kalın kesitlerde yapılan histolojik incelemelerde telosit benzeri hücrelerin ince uzantılara ve dar sitoplazmaya sahip olduğu ve genellikle göbek kordonu stromasında yer alan kollajen demetlerinin arasında yerleşmiş olduğu görüldü.

Sonrasında, telosit benzeri hücrelerin ince yapılarını tanımlamak amacıyla kullanılan ve en güvenilir yöntem olan TEM'den yararlandık (Popescu ve Fausson-Pellegrini, 2010). Öncelikle yüksek büyütme TEM incelemeleri kullanarak ince yapı ayrıntılarını ortaya koymayı amaçladık ve ince sitoplazmalı ve uzantılı telosit benzeri hücrelerin tam boya yakın gözlemi için de bu yüksek büyütme gözlemlerimizde elde ettiğimiz görüntülerin birleştirilmiş panoramik mikrograflarını kullandık. TEM incelemeleri bize daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin farklarını açıkça ortaya koydu. İlk olarak stromada yer alan ve yoğun kollajen sentezleyen daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri ve bu hücrelerin sentezledikleri kollajen demetlerinin enine ve boyuna kesitleri açıkça görüldü. Bu hücrelerin sentezledikleri kollajen demetleriyle ilişkileri açıkça izlendi ve kollajen senteziyle ilişkili zengin ER sarnıçları bulundu. Daha önce literatürde fibroblastlar için hücre gövdesinin %5-12'sini ER'lerin oluşturduğu bilgisi yoğun kollajen sentezinin olduğu göbek kordonu stromasındaki küçük ve geniş sitoplazmalı hücredeki gözlemlerimizle doğrulandı (Kang vd., 2015). Bu hücrelerde farklı yoğunluklarda ve çoğunlukla periyodik çizgilenmelere sahip inklüzyonların lipid taneciği olduğu izlenirken ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde bu inklüzyonlar hiç izlenmedi. Birleştirilmiş panoramik görüntülerde daha önce literatürde tanımlanmış telosit morfolojisine uygun olarak mekik biçimli ve çok ince uzantılar izlenebildi. Toluidin mavisi boyanmış yarı ince kesitlerde olduğu gibi telositler için pozitif olduğunu bildiğimiz bağırsak dokusunun submukozasında telositler incelenebildi ve morfolojisinin göbek kordonu stromasındaki ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelere benzerliği dikkati çekiciydi. Ayrıca göbek kordonunun farklı stroma bölgelerindeki

yüksek büyütmelelerde yer alan telositlere özgü kaveola yapıları ve kesintili bazal lamina literatürle uyumluydu (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). TEM gözlemleri ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin hücre uzunluğu/kalınlığı oranının daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip hücrelerinkinin 9 katı olduğunu ortaya koydu. Bu da göbek kordonu stromasında yer alan hücrelerin heterojen popülasyonlardan oluştuğunu doğruladı. Diğer taraftan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin sitoplazma uzantıları en ince bölgesinde ölçüldüğünde ortalama 0,143 μm olarak bulundu ve bu da literatürde uzantıların kalınlığı için belirtilen 0,2 μm değeriyle uyumluydu (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Son olarak ince ve uzun sitoplazmalı hücrelerin yüksek büyütmeleli TEM gözlemlerinde uzantılarda EV'lerin varlığı izlendi. Bu da literatürde yer alan telositlerin komşu hücrelere düzenleyici makromolekülleri taşıyan EV'ler göndererek hücreler arası parakrin/jukstakrin sinyalleşmede kritik rol üstlendiği görüşünü doğruladı (Cismasiu ve Popescu, 2015; Cretoiu ve Popescu, 2014; Fertig vd., 2014). Bu gözlem sonucunda ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin hem birbirleriyle hem de daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip diğer stroma hücreleriyle iletişimde oldukları öngörüsüyle uyumluydu. TEM gözlemlerinde bu hücrelerin kollajen sentezlediğine ilişkin herhangi bir kanıt elde edilemedi; bu da bu hücrelerin daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip hücrelerin sentezlediği kollajen demetleri arasına yerleşmiş olduğunu veya stroma hücrelerinin kollajen sentezledikten sonra ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücre morfolojisi sergilediğini düşündürdü. Daha önce literatürde tıpkı göbek kordonu gibi kollajen açısından zengin bir yapı olan dermis tabakasında telositlerin kollajen demetlerinin etrafında yerleştiği gösterildiğinden elde ettiğimiz sonuçlar telosit benzeri hücrelerin yerleşimi açısından önceki çalışmalarla da uyumluydu (Ceafalan vd., 2012). Ayrıca çalışmalar telositlerin kollajen demetlerinin sentez verimliliğini arttırmada önemli bir role sahip olduklarını belirttiğinden (Chen vd., 2021); kollajen demetleri ile yakın ilişkiler içerisinde bulunan ince uzantılarının hücre dışı matriks sentez döngüsünde etkin rol oynayabileceği de özellikle kollajen açısından oldukça zengin olan göbek kordonu stroması için düşünülebilir.

TEM gözlemleri sonrasında göbek kordonunda hücre kültürü işlemleri gerçekleştirildi. Bu hücre kültürü işlemleri sonucunda önceki gözlemlerimizle uyumlu olarak küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler olmak üzere iki farklı hücre popülasyonu izlendi. Daha önceki çalışmalar göbek kordonu kültür hücrelerinin heterojen yapısına değinmiştir (Ranjbaran vd., 2018). Bu çalışmalar homojen bir iGK-MSH popülasyonu elde etmek için en uygun yöntemin henüz belirlenmediğini ve iGK-MSH'nin tek katman oluşturarak kültürde hızla çoğaldığını, ilerleyen pasajlarda da morfolojik olarak değişkenlik gösterdiklerini vurgulamıştır (Batsali

vd., 2013). Literatürde göbek kordonu stromasının heterojenliğiyle ilgili yapılan çalışmalar arasında Coşkun ve Can'ın (2015) geniş sitoplazmalı, geniş filopodyumlara sahip miyofibroblast özelliğinde tip-1 ve daha ince ve uzun görünümlü fibroblastoid fenotipe sahip tip-2 olmak üzere iki farklı hücre çeşidi tanımladığı çalışma da bulunmaktadır (Coskun ve Can, 2015). Elde ettiğimiz bulgulara dayanarak tanımladığımız iki farklı hücre popülasyonu bu çalışmayla benzerlikler taşımaktadır. Çalışmamızdaki gözlemlerimiz sonucunda tarafımızca izlenen iki farklı hücre popülasyonunun birbirlerinden farklı büyüme dinamiklerine sahip oldukları ve genellikle ince sitoplazmalı ve uzun telosit benzeri hücrelerin kültür kaplarına yapışma ve çoğalma sürecinde daha erken davrandıkları bulundu. Başka bir çalışmada Guenther (2022), kültür süresince hücrelerin görünümünü karşılaştırmış; göbek kordonu hücrelerinin morfolojik açıdan zengin ve değişken bir yapı sergilediğini ortaya koymuştur (Guenther vd., 2022). Eksplant kültürün başında küçük üçgen veya yıldız hücreler, büyük yassı hücreler, ince uzun uzantılı hücreler, küçük yuvarlak hücreler ve parlak hücreler olmak üzere beş farklı morfolojide hücre tipi tanımlanmıştır. Zamanla, kültürde büyük yassı ve ince ve uzun sitoplazmalı hücreler baskın hale gelirken küçük hücrelerin oranı azalmıştır. Uzun süreli kültürlerde büyük hücrelerden oluşan daha homojen bir popülasyon oluşmuştur (Guenther vd., 2022). Çalışmamızda da kültür sürecinde izlenen farklı yapısal özelliklere sahip hücrelerden oluşan heterojen popülasyon ve farklı çoğalma dinamikleri bu gözlemlerle benzerlikler taşımaktadır. Diğer taraftan kültür deneylerinde ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin yapısı ve şekli incelendiğinde TEM ve rutin histolojik gözlemlerde olduğu gibi hücreler dar sitoplazmalı, oldukça ince ve uzun uzantılı olarak ve mekik şekilli izlendi. Telositlere özgü olduğu öne sürülen yer yer genişlemiş sitoplazma bölümleri olan podomlar ve ince segmentler olan podomerler bizim ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri kültür hücrelerinde de izlendi (Manetti vd., 2014; Rosa vd., 2022). Bu hücrelerin ortalama uzunluklarının 604,69 µm olduğu ölçüldü ve bu da daha önce literatürde belirtilen hücre uzantıları için 200–1000 µm değeriyle uyumluydu (Kang vd., 2015). Küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin telosit benzeri hücrelere göre daha kısa ve kalın uzantıları olan filopodialarının uzunluğu literatürle uyumlu olarak genellikle 20–30 µm idi (Wong vd., 2014).

TEM'e ek olarak SEM de telositleri incelemek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (H. Li, S. Lu, vd., 2014). Literatür SEM'in, telositlerin ince uzantılarının ve diğer hücrelerle olan etkileşimlerinin gözlemlenmesine olanak kıldığını (Hussein ve Mokhtar, 2018), telosit ağlarının dokunun üç boyutlu mimarisini belirlemekte kullanıldığını (D. Cretoiu, 2016; Cretoiu vd., 2014) belirtmektedir. Literatürde yer alan bilgilere uyumlu olarak cam lameller üzerinde kültüre ettiğimiz göbek kordonu kültür hücrelerini SEM'de incelediğimizde ince

uzantılara sahip telosit benzeri hücrelerin daha geniş sitoplazmaya sahip olan stroma hücrelerine ve birbirlerine temas ettiğini, iletişim halinde olduklarını gözlemledik.

Bazı çalışmalarda telositler FACS yöntemi ile ayrıştırılabilmektedir (Bojin vd., 2011; Li vd., 2016). Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz akım sitometri deneylerindeki esas amaç ikili işaretlemeler kullanarak telosit olduğunu düşündüğümüz hücreleri FACS ile ayırtmak ve bu hücrelerin alt kültürünü yapmaktır; bu yüzden akım sitometri deneylerinde fikse edilmemiş canlı iGK-MSH kullandık. Literatürde yer alan bilgiler telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan belirteçlerin CD34, PDGFR- α ve c-Kit olduğunu vurgular (Zani vd., 2018). Ancak akım sitometri deneylerimizde hem CD34/PDGFR- α ve CD34/c-Kit ikili işaretlemelerde hem de CD34, PDGFR- α ve c-Kit tekli antikor işaretlemelerinde anlamlı sayıda hücre edemediğimiz için telosit olduğunu düşündüğümüz hücreleri göbek kordonundaki diğer stroma hücrelerinden ayırtamadık ve alt kültürlerini de yapamadık. Anlamlı sayıda işaretli hücre elde edilememiş olması konfokal mikroskopta incelenen yayma preparatlar ile de doğrulandı. Bunun sonucunda akım sitometri deneylerinde elde edilen bulguların farklı dokulardaki telositlerin aynı belirteçleri ifade etmiyor veya ancak fikse edildiğinde aynı belirteçleri ifade ediyor olmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir.

Çalışmada rutin histolojik boyamalar, elektron mikroskobu, akım sitometri ve kültür gözlemleri sonucunda elde edilen sonuçların; göbek kordonu kesitlerinde ve kültür hücrelerindeki immünfloresan işaretlemelerle doğrulanması amaçlandı. İlk olarak ara filaman proteini olan vimentin ifadesi incelendi ve hem ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin sitoplazmasında hem de daha küçük ve geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinde vimentin pozitif izlendi. Vimentin; fibroblastlar, endotel hücreleri ve doku makrofajları dahil olmak üzere hemen hemen her bağ dokusu hücresinde bulunduğundan ayırt edici değildir. Literatürde yer alan bilgilerle uyumlu olarak çalışmamızda da güçlü vimentin pozitifliğini gösterdiğimiz telosit benzeri hücrelerin mezenkimal stroma kökenli olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Ahmed ve Hussein, 2023; Kondo ve Kaestner, 2019; Sanches vd., 2024; Varga vd., 2018). Daha önceki bulgular göbek kordonundaki hücrelerin hem in situ hem de in vitro vimentin pozitifliğini gösterdiğinden sonuçlarımız literatürle uyumludur (Gauthier-Fisher vd., 2019). Aynı zamanda yassı ve/veya küçük çekirdekleri olan telosit benzeri stroma hücreleri kuvvetli vimentin pozitif iken daha yuvarlak ve oval şekilli çekirdeklere sahip stroma hücrelerinin zayıf vimentin pozitif oldukları izlendiğinden bu ifade farkının iki hücre tipinin özellikle yapısını ayırt etmede kullanılabileceği sonucuna varılabilir.

Hücre iskeletinin temel bileşenlerinden biri ve aktin proteinlerinin filamentöz hali olan F-aktin göbek kordonu kesitlerinde yaptığımız gözlemlerde hücre şekilleri ve yoğunluklarını anlamamıza yardımcı oldu. İncelemelerimiz sonucunda F-aktin işaretlemesi PVS’de sık yerleşimli ve geniş sitoplazmalı hücrelerde yer alırken İVS ve SAS’da daha ince uzantıları olan telosit benzeri stroma hücrelerinin yapısında izlendi. Kültür hücrelerinde ise hem de geniş sitoplazmalı hücrelerde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde filamentöz yapıda izlendi. Yapılan çalışmalarda F-aktin fibroblastlarda da belirgindir ve hücre gövdesinde stres lifleri oluşturduğu görülmüştür (Collin vd., 2012). Telositlerinse ince ve uzun telopod yapılarında ise yoğun bulunur ve uzantıların dinamik yapısını sağlar (Gherghiceanu ve Popescu, 2012). Vimentin işaretlemelerimizde olduğu gibi F-aktin işaretlemesi de hücre şekillerini ortaya koymaya yardımcı olmuş ve her iki hücre tipinde de pozitifliği literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Aktin bağlayıcı protein olan α -aktinin ise göbek kordonu kesitlerinde İVS’deki geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinde pozitif; kültür hücrelerinde ise hem hücre zarı hem de sitoplazmada güçlü ve filamentöz olarak izlendi. Doku kesitlerindeyse ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin noktasal pozitif olduğu dikkati çekiciydi. Kültür hücrelerinde de bu tip hücrelerin ince uzantıları pozitif izlendi. Çalışmamızda literatürde α -aktininin telositleri tanımlamada ayırt edici bir belirteç olmadığı bilgisiyle ilişkilendirebilecek; hem ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde hem de geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde pozitif sonuçlar elde edildi.

Düz kas hücrelerinin belirteci olan α -SMA ifadesi göbek kordonu kesitlerinde SAS’da ve İVS’de hem ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde hem de daha geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde; kültür hücrelerinde ise her iki tip hücrede, ancak geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde daha güçlü filamentöz pozitifliğe sahip olarak bulundu. Literatürde yer alan bilgilere göre özellikle miyofibroblast fenotipine dönüşmüş olan fibroblastlar güçlü α -SMA ifadesi gösterirken (Hinz, 2007); özellikle düz kaslarla ilişkili alanlarda yer alan bazı telosit alt popülasyonları α -SMA pozitif olsa da bu ifade telositlerin çoğunda yoktur (Liu vd., 2019; Rosa vd., 2019; Rusu, Manoiu, vd., 2018). Aynı zamanda göbek kordonu stromasında uzun sitoplazma uzantılarına sahip fibroblast benzeri ve α -SMA pozitif perisit hücreleri de tanımlanmıştır (Bei, Wang, vd., 2015; Gauthier-Fisher vd., 2019). Diğer fetal bir doku örneği olan plasentada ise telosit hücrelerinin α -SMA pozitif olduğu ve kasılma özelliklerine sahip olabileceği öne sürülmüştür. Ancak bu ifade hücre boyunca homojen dağılım göstermiş ve düz kas hücrelerine özgü stres lifleri bulunamadığından telositlerle arasındaki fark ortaya konmuştur

(Suciu, Popescu, vd., 2010). Elde edilen bütün bu sonuçlar telositleri miyofibroblastlarla karşılaştırmak için yapılacak çalışmalar için ek bulgular sunabilir ve önem taşıyabilir. Literatürde yer alan bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda gözlemlediğimiz α -SMA pozitif telosit benzeri hücrelerin perisit olabileceği veya daha önce TEM sonuçlarında da bahsedildiği gibi miyofibroblast tipteki stroma hücrelerinin sonradan ince uzun telosit benzeri bir fenotipe dönüştüğü ve α -SMA pozitifliklerini korudukları düşünülebilir.

Çalışmamızda incelediğimiz diğer bir belirteç hücre iskeleti proteini olan ve epitel hücrelerine özgü sitokeratindi ve göbek kordonu kesitlerinde internal kontrol olarak yüzey epitelinde pozitifken SAS'da yer alan stroma hücrelerinde zayıf pozitiflik ve çoğunlukla negatif boyanma dikkati çekti. Daha önceki çalışmalar da sitokeratin ifadesinin hücreler arasında değişkenlik gösterdiğinden söz ettiğinden sitokeratin sonuçlarımız literatürle uyumluydu (Garzón vd., 2014). Göbek kordonu stromasının heterojenliğinden bahseden önceki çalışmalarda sitokeratin ifadesinin geniş sitoplazmalı ve miyofibroblast özelliğindeki tip-1 hücreleriyle sınırlı olduğu ve sonuçlarımızla uyumlu olarak bazı hücrelerde çok az boyanma bazılarında ise tamamen negatiflik olduğu izlenmiştir (Karahuseyinoglu vd., 2007). Kültür hücrelerinde yaptığımız incelemelerde ise daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin bazılarının sitoplazması ve hücre zarı filamentöz pozitif izlenirken bazıları da negatif izlendi. İnce uzun uzantılı telosit benzeri hücrelerin bazılarında özellikle uzun uzantılarında pozitiflik izlenirken bazıları da negatif izlendi. Kültür hücrelerinde sitokeratin pozitif olan hücrelerin eksplant kültür yönteminde dokunun yüzey epitelinden gelen hücreler olabileceği düşünülebilir. Literatürde yer alan çalışmalarda telositlerin epitel kökenli olmadığı için sitokeratin ifadesine bakılmamış olsa da çalışmamızda telosit benzeri hücrelerin bazılarının özellikle uzantılarında zayıf pozitiflik izlenebildi.

Bir ekstraselüler matriks proteini olan laminin ise gözlemlerimizde İVS'deki stroma hücrelerinde pozitif, kültür hücrelerinde ise negatif bulundu. Literatürde yer alan çalışmalar telositlerin ekstraselüler matriks üretiminde fibroblastlar kadar aktif rol oynamadığından lamininini sınırlı ve zayıf düzeyde ifade ettiğini belirtmektedir (Maxia vd., 2018; Suciu vd., 2012). Fibroblastlar ise bağ dokusunun temel ekstraselüler matriks üretiminden sorumlu hücreleridir ve laminin ifadesi fibroblastlarda oldukça belirgin ve güçlüdür (Theocharis vd., 2016). Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde yer alan bu bilgileri karşılayabilmeye yeterli olmamıştır; özellikle de kültür deneylerinde laminin ifadesi saptanamadığından ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde ve daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücrelerinde ifade farklılıkları bulunamamıştır.

iGK-MSH; CD73, CD90 ve CD105 mezenkimal hücre belirteçlerini ifade eden hücrelerdir (Dominici vd., 2006; Ranjbaran vd., 2018). Hem in situ hem de in vitro koşullarda bu hücrelerin CD73, CD90 ve CD105 ifadeleri gösterilmiştir (Gauthier-Fisher vd., 2019). Gözlemlerimiz sonucunda göbek kordonu kesitlerindeki ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri ve daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücreleri özellikle CD73 ve CD105 açısından kuvvetli pozitif, CD90 açısından da daha seyrek noktasal pozitif bulundu. Kültür hücrelerinde ise özellikle CD73 ve CD90 açısından hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli noktasal pozitiflik, CD105 açısından ise daha seyrek noktasal pozitiflik bulundu. Kesitlerdeki ve kültür hücrelerindeki bu ifade farklılıkları hücrelerin in vitro ortamda farklı ifade profilleri sergiliyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. Literatürde yer alan bir çalışmaya göre göbek kordonundaki tüm stroma hücrelerinin CD73 için pozitif olduğunu; ancak CD105 için yalnızca düşük bir oranda pozitiflikten söz edilebilir (Blanco-Elices vd., 2022). Literatürde telositlerin CD73 ifadesiyle ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Plasentada telositlerin tanımlandığı çalışmada ve telosit alt kültürlerini inceleyen başka çalışmalarda kültürlenmiş telositlerin CD90'ı ifade etmediği bulunmuştur (Sanches vd., 2020; Suci, Popescu, vd., 2010). Başka bir çalışmada ise telositlerin fibroblastlardan daha fazla CD90 ifadesine sahip olduğu belirtilmiştir (Sanches vd., 2024). Sonuçlarımızda kültür hücrelerinde ince ve uzun sitoplazmalı veya geniş sitoplazmalı hücreler fenotipik olarak tam ayırt edilememiş olsa da CD90'ın bütün hücreler tarafından ifade edildiği izlenmiştir. Literatürde yer alan bazı çalışmalar telositlerin CD105 ifadesine sahip olduğunu söylerken (Bojin vd., 2011; Dobra vd., 2018; Rusu, Mogoanta, vd., 2018); negatifliğinden söz eden çalışmalar da bulunmaktadır (Sukhacheva vd., 2021). Özellikle göbek kordonu kesitlerinde ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin güçlü noktasal CD105 pozitif olduğunu ortaya koyabildiğimiz göz önünde bulundurulduğunda sonuçlarımızın telositlerin CD105 pozitif olduğu çalışmalarla uyumlu olduğu söylenebilir. Telositlerin mezenkimal kökenli olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu hücrelerin MSH belirteçlerini ifade etmesi anlamlı ve tutarlıdır (Ahmed ve Hussein, 2023; Kondo ve Kaestner, 2019; Sanches vd., 2024; Varga vd., 2018).

Literatürde yer alan bilgilere göre telositlerin tanımlanması ve diğer interstisyel hücrelerden ayırt edilmesi özellikle CD34 belirtecini kullandığı immünohistokimyasal çalışmalar sayesinde mümkün olmuştur (Diaz-Flores, Gutierrez, Garcia, Gonzalez-Gomez, Carrasco, vd., 2020; Rosa vd., 2019). Birçok dokuda CD34 pozitif telositler tanımlanmıştır (Diaz-Flores, Gutierrez, Garcia, Gonzalez-Gomez, Diaz-Flores, vd., 2020; Diaz-Flores vd., 2014; Zhou vd., 2010). Diğer bir fetal doku olan plasentada telositlerin %70 oranında CD34 ifadesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Suci, Popescu, vd., 2010). Buna karşın göbek

kordonu stromasındaki hücreler CD34 negatiftir (Can ve Karahuseyinoglu, 2007; Ranjbaran vd., 2018); ancak bazı doku tiplerindeki fibroblastlarda (örn. dermal fibroblastlar) zayıf CD34 pozitifliği gözlemlenebilir (Driskell vd., 2013). Telosit benzeri hücreleri tanımlamak amacıyla göbek kordonu kesitlerinde yaptığımız immünfloresan işaretlemelerde oldukça zayıf CD34 ifadesi izlendi ve bu ifadenin genellikle ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde olduğu görüldü. Kültür hücrelerinde ise akım sitometri sonuçlarıyla uyumlu olarak CD34 ifadesi bulamadık. Literatürde CD34 ifadesinin pasaj sayısı ile azaldığı ve telosit yapısının zamanla değiştiği bildirilmiştir (Sanches vd., 2024). Bu açıdan kesitlerde bulduğumuz zayıf pozitifliği kültür hücrelerinde bulamamış olabiliriz. Elde ettiğimiz sonuçlarla telositleri ayırt etmek amacıyla hücrelerde CD34 ifadesinin göbek kordonu için kullanılabilecek bir yöntem olamayacağı sonucuna vardık. Akım sitometri sonuçlarımızda olduğu gibi bu durum daha önce literatürde de söz edildiği üzere farklı dokulardaki telositlerin aynı belirteçleri ifade etmiyor olduğu anlamına gelebilir (Xiangdong ve Cretoiu, 2016). Literatürde telositlerin prenatal ve postnatal farklılıkları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Çalışmalar erken embriyo aşamalarında telositlerin CD34 ifade etmediğini ve daha çok MSH ve fibroblast benzeri hücre profilinde olduğunu ifade ederken postnatal dönemde CD34 pozitif bir fenotipe sahip olduklarını önermektedir (Fausson-Pellegrini ve Bani, 2010). Göbek kordonu kesitlerinde ve kültür hücrelerinde bulduğumuz CD34 negatifliği göbek kordonunun fetal bir doku olmasından dolayı telositleri tanımlamak için yetersiz kalmış olabilir.

Telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırt etmek amacıyla kullanılan diğer bir belirteç de PDGFR- α 'dır (Zani vd., 2018). Yapılan çalışmalar telositlerin doku homeostazı ve hasara yanıt süreçlerinde önemli rol oynayan PDGFR- α ifade ettiğini göstermektedir (Marini vd., 2017; Pawlicki vd., 2019; Rusu vd., 2017; Vannucchi vd., 2013; Xu vd., 2019). Telositlerdeki bu ifadenin stroma mikroçevresindeki diğer hücrelerle etkileşimi açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (Vannucchi vd., 2013; Xu vd., 2021). Ancak fibroblastlar da PDGFR- α pozitif olabilir (Ivey vd., 2019; Sanches vd., 2024). Kültür hücrelerinin PDGFR- α gözlemlerinde elde ettiğimiz sonuç literatürde yer alan bu bilgileri destekleyecek nitelikte olup hem daha geniş ve küçük sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinde hem de ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde pozitif bulundu. Sonuçlarımız boyalı kesitlerdeki aydınlık alan gözlemlerimizle uyumlu olarak yüzeyel İVS'deki cepleri çevreleyecek şekilde dizilmiş olan ve kollajen demetlerin arasında yer alan ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde PDGFR- α pozitifliği izlendi. Bu hücrelerin özellikle uzantılarının kuvvetli pozitif olduğu dikkati çekiciydi.

Daha önce yapılan çalışmalarda fibroblastların c-Kit (CD117) negatif; telositlerin ise pozitif olduğu belirtilmiş ve telositleri diğer interstisyel hücrelerden ayırmada Cajal benzeri interstisyel hücreleri tanımlama sürecinden başlayarak c-Kit ifadesinin de önemli olduğu vurgulanmıştır (Abd-Elhafeez ve Soliman, 2017; Ciontea vd., 2005; Kostin ve Popescu, 2009; Pawlicki vd., 2019; Soliman, 2024). Diğer bir fetal doku olan plasentadaki telositlerin de c-Kit ifade ettiği gösterilmiş ve özellikle trofoblast hücrelerinde ve kan damarları etrafında ince uzantılara sahip hücrelerde c-Kit pozitif izlenmiştir (Suciu, Popescu, vd., 2010). Literatürde göbek kordonunda iGK-MSH'de c-Kit ifadesine dair pozitifliğini ve negatifliğini gösteren değişken sonuçlar bulunmuştur (Can ve Karahuseyinoglu, 2007). Elde ettiğimiz sonuçlarda internal kontrol ve literatürle uyumlu olarak arter duvarındaki düz kas hücreleri pozitif bulundu (Montiel-Eulefi vd., 2009). Aynı zamanda hem yüzeyel İVS'de kollajen demetlerin arasında hem de derin İVS'de çok ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin zarında ve sitoplazmasında güçlü c-Kit pozitifliği izlendi. Elde edilen bu sonuçlar literatürde telositlerin diğer hücrelerden ayırt edici olarak c-Kit ifadesine sahip olduğunu doğrular nitelikteydi.

Literatürde yer alan bilgiler hücrede sinyal iletiminde ve vezikül taşınımında rol oynayan bir protein olan ve fibroblastlarda hücre iskeleti düzenlenmesinde görev alan caveolin-1'in telositlerin telopodlarında yüksek oranda bulunduğunu ve bu sayede telositlerin hücreler arası iletişimde rol oynadığını destekler niteliktedir (Smythies ve Edelstein, 2014). Fetal doku olan plasentada telositleri tanımlamak amacıyla yapılan çalışmada telositlerin caveolin-1 ifadesine sahip olduğu bulunmuştur (Suciu, Popescu, vd., 2010). iGK-MSH'de de caveolin-1 ifadesi gösterilmiştir (Shu vd., 2024). Çalışmamızda göbek kordonu kesitlerinde bu proteininin yerleşimi ve dağılımını incelediğimizde diğer pek çok belirtecin immünfloresan gözlemlerinde olduğu gibi yüzeyel İVS'de yer alan cepleri çevreleyen ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerin birçoğunda kuvvetli pozitiflik bulurken derin İVS'de ve PVS'de yer alan geniş sitoplazmalı stroma hücrelerinin bazılarının zarında yoğunlaşan pozitiflik bazılarında ise tamamen negatiflik bulduk. Kültür hücrelerinde yaptığımız gözlemler sonucunda ise caveolin-1'in neredeyse her hücrede Golgi aygıtı ve ER ile uyumlu pozitifliğe sahip olduğu izlendi. Daha geniş ve küçük sitoplazmalı stroma hücrelerinin sitoplazmasında ve hücre zarında noktasal pozitiflik izlenirken ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerde kuvvetli noktasal pozitifliğin yanı sıra özellikle perinükleer sitoplazma pozitif izlendi. Caveolin-1 ifadesi bize hem iGK-MSH hem de telosit benzeri hücrelerde ifadeye sahip olduğundan bu hücreleri tanımlamada ayırt edici olmadığını; ancak her iki hücrede perinükleer sitoplazmada Golgi aygıtı ve ER uyumlu

pozitifliğinin yanı sıra telosit benzeri hücrelerin ince uzantılarında da noktasal pozitiflik gösterdiğinden bu iki farklı hücre tipindeki yerleşiminin farklılık gösterdiği söylenebilir.

Son olarak bu çalışmada telosit benzeri hücrelerin ayırt edilmesine yönelik olarak, literatürde yaygın şekilde kullanılan ikili immünfloresan işaretleme yöntemleri uygulandı ve telositlerin tanımlanmasında sıklıkla başvuruluan vimentin, çalışmamızda tüm hücrelerde güçlü pozitiflik gösterdi. Ancak bu belirteç, fibroblastlar da dahil olmak üzere birçok mezenkimal hücrede pozitif olduğundan, telositlerin ayırt edilmesinde tek başına yeterli değildi. Bu nedenle literatürde CD34, PDGFR- α , c-Kit, caveolin-1 gibi ek belirteçler ile kombinasyonlar tercih edilmiştir (Bei, Zhou, vd., 2015; Rosa vd., 2020). Çalışmamızda ise CD34'ün kullanıldığı bütün ikili işaretlemelerde CD34 tüm hücrelerde negatif bulunmuş olup, bu durum telositlerin CD34 kullanılarak tanımlanmasında uygun bulunmamıştır. Çalışmamızda CD34'ün negatif saptanmış olması, telositlerin klasik immünofenotipinden sapış veya önceki sonuçlarımızda da değindiğimiz gibi küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücrelerinin sonradan ince uzun bir yapı kazanabildiği ihtimalini de düşündürmektedir. Sonuç olarak, çalışmamızda kullanılan ikili immünfloresan işaretleme yöntemleri telosit benzeri hücrelerin tanımlanmasında değerli bilgiler sunmuş, ancak bazı belirteçlerin özgüllüğü konusunda literatürde belirtilen uyarılarla da örtüştüğü görülmüştür. Bu bağlamda, telositlerin daha güvenilir şekilde tanımlanabilmesi için çoklu belirteç kombinasyonları ve ileri görüntüleme yöntemleriyle desteklenen analizlerin gerekliliği bir kez daha ortaya konmuştur. Genel olarak elde ettiğimiz hem tekli hem de ikili immünfloresan işaretleme sonuçları doku kesitlerinde ve in vitro kültür hücrelerinde büyük ölçüde örtüşmekteydi. Kültür hücrelerinde ifade eksikliğinin izolasyon teknikleri ve/veya kültür koşullarından kaynaklanıyor olabileceği söylenebilir (Karahuseyinoglu vd., 2007). Elde edilebilecek çelişkili bulgular ise benzer hücre popülasyonlarında zaman içinde gerçekleşebilecek fenotip değişimleri, farklı hücre alt popülasyonlarının incelenmiş olması ya da kullanılan tekniklerdeki farklılıklarla açıklanabilir (Suciu, Popescu, vd., 2010).

Çalışmada verilerimizi doğrulamak amacıyla yaptığımız qRT-PCR ölçümlerinde vimentinin diğer 7 hedef gene göre çok daha fazla ifade edildiği görüldü ve bu da göbek kordonu stromasında yer alan tüm hücrelerin mezoderm kaynaklı olduğunu ve göbek kordonu kesitlerindeki ve kültür hücrelerindeki kuvvetli vimentin ifadesini doğruladı. qRT-PCR ölçümlerinde PDGFR- α ve c-Kit'in ifade düzeyinin CD73, CD90, CD105 ve caveolin-1 ifade düzeylerinden fazla olduğu görüldü. Bu sonuçlar, özellikle immünfloresan sonuçlarımızda bazı hücrelerde daha yüksek, bazı hücrelerin ise daha düşük düzeydeki caveolin-1 ifade etmesiyle doğru orantılıydı ve hücreden hücreye ifadesinin farklılık

gösterdiğini doğruladı. CD34'ün ise qRT-PCR deneylerinde immünfloresan gözlemlerimizi doğrular nitelikte diğer bütün genlerle kıyaslandığında oldukça düşük ifade edildiği görüldü. Literatürde yer alan çalışmalardaki qRT-PCR sonuçları telositlerin vimentin, CD34 ve c-Kit belirteçlerini ifade ettiğini vurgulamaktadır (Aschacher vd., 2021; Qi vd., 2024; Yang vd., 2023). Çalışmamızda telositleri ayırtıramadığımız için elde ettiğimiz sonuçları doğrudan bu çalışmalarla ilişkilendirmekten çok göbek kordonu stromasında yapılan qRT-PCR analizleriyle ilişkilendirmek daha doğru olabilir. Özellikle yüzey belirteçlerinin incelendiği çalışmalarda qRT-PCR ile CD34 negatif; CD73, CD90 ve CD105 ifadeleri ise pozitif bulunmuştur (Ali vd., 2015). Elde ettiğimiz sonuçlar bu verilerle uyumludur. Sonuç olarak, elde edilen bütün qRT-PCR sonuçları immünfloresan sonuçlarımızı doğrular niteliktedir ve gen ifade düzeylerinin protein ifade düzeylerine uygun olduğunu göstermiştir.

Özetle; tez çalışması kapsamında yapılan çok yönlü analizler, insan göbek kordonu stromasında telosit benzeri hücrelerin varlığını ve yapısal özelliklerini ortaya koymuştur. Histolojik boyamalar, elektron mikroskobu incelemeleri, hücre kültürü çalışmaları ve immünfloresan işaretlemeler sonucunda, göbek kordonunun heterojen bir hücre popülasyonuna sahip olduğu; bu popülasyonun özellikle ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücreler ile daha küçük ve geniş sitoplazmalı stroma hücreleri içerdiği izlenmiştir. Telositlerin tanımlanmasında altın standart olarak kullanılan elektron mikroskobu ile bu hücrelerin ince yapıları tanımlanırken, kültür deneyleri ise hücreler arası iletişim ve büyüme dinamiklerini ortaya koymuştur. İmmünofloresan bulgular, CD34 belirtecinin bu hücreleri tanımlamada tek başına yeterli olmadığını göstermiş; buna karşın PDGFR- α , caveolin-1, c-Kit ve MSH'ye özgü belirteçlerin kullanımıyla telosit benzeri hücrelerin ayrımı daha belirgin hâle gelmiştir. Çalışmamızda kullanılan bütün yöntemler telosit benzeri hücrelerin tanımlanmasına katkı sağlamış ve hiçbirisi tek başına tam olarak yeterli olamamıştır. Sonuç olarak çalışma, insan göbek kordonu stromasında telosit benzeri hücrelerin ilk kez tanımlanması açısından literatüre özgün bir katkı sunmakta ve kök hücre mikronişinin hücre çeşitliliğine ışık tutmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının temel amacı insan göbek kordonu stromasında telosit benzeri hücrelerin varlığını araştırmak ve yapısal özelliklerini ayrıntılı incelemektir. Histolojik boyamalar, elektron mikroskobu gözlemleri, hücre kültürü deneyleri ve MSH ve telositlere özgü belirteçlerle yapılan immünfloresan işaretlemeler sonucunda göbek kordonunda farklı fenotipik özelliklere sahip hücre tiplerinden oluşan heterojen bir hücre popülasyonu izlendi. Bu popülasyon daha küçük ve geniş sitoplazmaya sahip stroma hücreleri ve ince ve uzun sitoplazmalı telosit benzeri hücrelerden oluşmuştu.

Bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda geniş ve kalın kesitlerde bu hücrelerin varlığı doğrulandıktan sonra, elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler sayesinde hücrelerin ince yapıları detaylı olarak tanımlandı. Heterojen popülasyondaki hücrelerin birbirleriyle ilişkisini ortaya koyabilen hücre kültürü deneylerinde ise hücre tiplerinin farklı büyüme dinamiklerini ortaya koydu; birbirleriyle ya da diğer hücre popülasyonu ile iletişimlerini izlendi. Akım sitometri deneylerinde anlamlı sayıda pozitif hücre elde edilemediği için FACS işlemi gerçekleştirilemedi ve telosit benzeri hücrelerin alt kültürleri yapılamadı; bu da bu hücreler için farklı dokularda farklı izolasyon yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koydu. Bulgular, göbek kordonu kesitlerinde ve kültür hücrelerinde yapılan immünfloresan işaretlemeler ve qRT-PCR verileri ile desteklendi. Literatürde telositleri tanımlamak için sıklıkla kullanılan belirteçlerden CD34'ün göbek kordonu stromasında bu hücrelerin varlığını göstermek için yeterli olmadığı bulunsada PDGFR- α , caveolin-1, c-Kit ve MSH'ye özgü belirteçlerle iki hücre tipi arasındaki ifade farklılığı ve benzerlikleri izlendi. Bu durumun farklı dokulardaki telositlerin aynı belirteçleri ifade etmiyor olmasından kaynaklanıyor olabileceği sonucuna varıldı.

Göbek kordonunda telosit benzeri hücrelerin varlığını ortaya koyan ve kök hücre nişinin hücre çeşitliliğine katkı sağlayan bu bulgular ışığında, telositlerin embriyolojik dönemdeki fizyolojik işlevlerinin daha ayrıntılı olarak araştırılması, ileride yenileyici tıp ve doku mühendisliği gibi alanlarda yeni uygulamaların önünü açabilir. Özellikle göbek kordonunun doğum sonrası biyolojik bir hücre kaynağı olarak değerlendirilmesi, telosit benzeri hücre içeriği sayesinde yeni hücresel tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilir. Ayrıca, telositlerin daha önemli şekilde tanımlanabilmesi için, yalnızca bu hücrelere özgü belirteçlerin varlığına odaklanan; gen, mikroRNA ve sekretom profillerini inceleyen ileri düzey moleküler çalışmalar hem hücresel yapıların daha iyi anlaşılmasına hem de literatüre yeni yaklaşımlar kazandırılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abd-Elhafeez, H. H., & Soliman, S. A. (2017). New Description of Telocyte Sheaths in the Bovine Uterine Tube: An Immunohistochemical and Scanning Microscopic Study. *Cells Tissues Organs*, 203(5), 295-315. <https://doi.org/10.1159/000452243>
- Ahmed, A. M., & Hussein, M. R. (2023). Telocytes in Cutaneous Biology: A Reappraisal. *Actas Dermosifiliogr*, 114(3), 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2022.08.023>
- Aleksandrovych, V., & Gil, K. (2021). Telocytes in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 1329, 205-216. https://doi.org/10.1007/978-3-030-73119-9_11
- Ali, H., Al-Yatama, M. K., Abu-Farha, M., Behbehani, K., & Al Madhoun, A. (2015). Multi-Lineage Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells Mediates Changes in the Expression Profile of Stemness Markers. *PLoS One*, 10(4). <https://doi.org/ARTN e012246510.1371/journal.pone.0122465>
- Alunno, A., Ibba-Manneschi, L., Bistoni, O., Rosa, I., Caterbi, S., Gerli, R., & Manetti, M. (2015). Telocytes in minor salivary glands of primary Sjogren's syndrome: association with the extent of inflammation and ectopic lymphoid neogenesis. *J Cell Mol Med*, 19(7), 1689-1696. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12545>
- Arufe, M. C., Fuente, A. D. I., Mateos, J., Fuentes, I. M., Francisco Javier de Toro, S., & Blanco, F. J. (2011). Analysis of the Chondrogenic Potential and Secretome of Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Stroma. *Stem Cells and Development*, 20(7), 1199-1212. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0315>
- Aschacher, T., Schmidt, K., Aschacher, O., Eichmair, E., Baranyi, U., Winkler, B., Grabenwoeger, M., Spittler, A., Enzmann, F., Messner, B., Riebandt, J., Laufer, G., Bergmann, M., & Ehrlich, M. (2021). Telocytes in the human ascending aorta: Characterization and exosome-related KLF-4/VEGF-A expression. *J Cell Mol Med*, 25(20), 9697-9709. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16919>
- Bahar Halpern, K., Massalha, H., Zwick, R. K., Moor, A. E., Castillo-Azofeifa, D., Rozenberg, M., Farack, L., Egozi, A., Miller, D. R., Averbukh, I., Harnik, Y., Weinberg-Corem, N., de Sauvage, F. J., Amit, I., Klein, O. D., Shoshkes-Carmel, M., & Itzkovitz, S. (2020). Lgr5+ telocytes are a signaling source at the intestinal villus tip. *Nat Commun*, 11(1), 1936. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15714-x>
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8(3), 301-316. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>
- Baksh, D., Yao, R., & Tuan, R. S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 25(6), 1384-1392. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0709>

- Bani, D., Formigli, L., Gherghiceanu, M., & Fausone-Pellegrini, M. S. (2010). Telocytes as supporting cells for myocardial tissue organization in developing and adult heart. *J Cell Mol Med*, 14(10), 2531-2538. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01119.x>
- Batsali, A. K., Kastrinaki, M. C., Papadaki, H. A., & Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: Biological Properties and Emerging Clinical Applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8(2), 144-155. <Go to ISI>://WOS:000317846400005
- Bei, Y., Wang, F., Yang, C., & Xiao, J. (2015). Telocytes in regenerative medicine. *J Cell Mol Med*, 19(7), 1441-1454. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12594>
- Bei, Y., Zhou, Q., Fu, S., Lv, D., Chen, P., Chen, Y., Wang, F., & Xiao, J. (2015). Cardiac telocytes and fibroblasts in primary culture: different morphologies and immunophenotypes. *PLoS One*, 10(2), e0115991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115991>
- Bimpong, S., Abaidoo, C. S., Atuahene, O. O., & Tetteh, J. (2019). Morphometric Characterization of Umbilical Cord Vessels and Neonatal Outcome. *International Journal of Anatomy and Research*, 7(1.1), 6050-6058. <https://doi.org/10.16965/ijar.2018.404>
- Blanco-Elices, C., Chato-Astrain, J., Gonzalez-Gonzalez, A., Sanchez-Porras, D., Carriel, V., Fernandez-Valades, R., Sanchez-Quevedo, M. D. C., Alaminos, M., & Garzon, I. (2022). Histological Profiling of the Human Umbilical Cord: A Potential Alternative Cell Source in Tissue Engineering. *J Pers Med*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/jpm12040648>
- Bojin, F. M., Gavriiliuc, O. I., Cristea, M. I., Tanasie, G., Tatu, C. S., Panaitescu, C., & Paunescu, V. (2011). Telocytes within human skeletal muscle stem cell niche. *J Cell Mol Med*, 15(10), 2269-2272. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01386.x>
- Bosco, C., & Diaz, E. (2016). Presence of Telocytes in a Non-innervated Organ: The Placenta. *Adv Exp Med Biol*, 913, 149-161. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_10
- Bosco, C., Diaz, E., Gutierrez, R., Gonzalez, J., Parra-Cordero, M., Rodrigo, R., & Barja, P. (2015). A putative role for telocytes in placental barrier impairment during preeclampsia. *Med Hypotheses*, 84(1), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.11.019>
- Bosco, C., Diaz, E., Gutierrez, R., Gonzalez, J., & Perez, J. (2013). Ganglionic nervous cells and telocytes in the pancreas of Octodon degus: extra and intrapancreatic ganglionic cells and telocytes in the degus. *Auton Neurosci*, 177(2), 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.05.002>
- Can, A., & Balci, D. (2011). Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 698, 51-62. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4_5
- Can, A., Celikkan, F. T., & Cinar, O. (2017). Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy*, 19(12), 1351-1382. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.08.004>

- Can, A., & Karahuseyinoglu, S. (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*, 25(11), 2886-2895. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0417>
- Cantarero, I., Bartolomé, M. J. L., & Escribano, C. J. (2011). Identification of Telocytes in the Lamina Propria of Rat Duodenum: Transmission Electron Microscopy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(1), 26-30. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01207.x>
- Cantarero, I., Luesma, M. J., & Junquera, C. (2011). The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *J Cell Mol Med*, 15(12), 2594-2600. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01312.x>
- Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., & Troyer, D. (2006). Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-8>
- Carlson, B. (2019). *Human embryology and developmental biology*. Mosby/Elsevier. UNSW.
- Ceafalan, L., Gherghiceanu, M., Popescu, L. M., & Simionescu, O. (2012). Telocytes in human skin--are they involved in skin regeneration? *J Cell Mol Med*, 16(7), 1405-1420. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01580.x>
- Chang, Y., Li, C., Gan, L., Li, H., & Guo, Z. (2015). Telocytes in the Spleen. *PLoS One*, 10(9), e0138851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138851>
- Chen, X., Zeng, J., Huang, Y., Gong, M., Ye, Y., Zhao, H., Chen, Z., & Zhang, H. (2021). Telocytes and their structural relationships with surrounding cell types in the skin of silky fowl by immunohistochemical, transmission electron microscopical and morphometric analysis. *Poult Sci*, 100(9), 101367. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101367>
- Chen, X., Zheng, Y., Manole, C. G., Wang, X., & Wang, Q. (2013). Telocytes in human oesophagus. *J Cell Mol Med*, 17(11), 1506-1512. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12149>
- Chon, B. H., Lee, E. J., Jing, L., Setton, L. A., & Chen, J. (2013). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Exhibit Immature Nucleus Pulposus Cell Phenotype in a Laminin-Rich Pseudo-Three-Dimensional Culture System. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5). <https://doi.org/10.1186/scrt331>
- Chughtai, A., Abdullah, M. S., Izhar, S., Irfan, N., Iftikhar, S., & Laique, T. (2022). Morphological Variations of Umbilical Cord in Normal Pregnancies Among Local Population. *PJMHS*, 16(2), 80-82. <https://doi.org/10.53350/pjmhs2216280>
- Ciontea, S. M., Radu, E., Regalia, T., Ceafalan, L., Cretoiu, D., Gherghiceanu, M., Braga, R. I., Malincenco, M., Zagrean, L., Hinescu, M. E., & Popescu, L. M. (2005). C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J Cell Mol Med*, 9(2), 407-420. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00366.x>
- Cismasiu, V. B., & Popescu, L. M. (2015). Telocytes transfer extracellular vesicles loaded with microRNAs to stem cells. *J Cell Mol Med*, 19(2), 351-358. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12529>

- Collin, G. B., Marshall, J. D., King, B. L., Milan, G., Maffei, P., Jagger, D. J., & Naggert, J. K. (2012). The Alstrom syndrome protein, ALMS1, interacts with alpha-actinin and components of the endosome recycling pathway. *PLoS One*, 7(5), e37925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037925>
- Conconi, M. T., Burra, P., Di Liddo, R., Calore, C., Turetta, M., Bellini, S., Bo, P., Nussdorfer, G. G., & Parnigotto, P. P. (2006). CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*, 18(6), 1089-1096. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089012>
- Corradi, L. S., Jesus, M. M., Fochi, R. A., Vilamaior, P. S., Justulin, L. A., Jr., Goes, R. M., Felisbino, S. L., & Taboga, S. R. (2013). Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. *J Cell Mol Med*, 17(3), 398-406. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12021>
- Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Corsello, T., Farina, F., & Anzalone, R. (2013). Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol*, 28(10), 1235-1244. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1235>
- Corselli, M., Chen, C. W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J. P., & Peault, B. (2012). The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 21(8), 1299-1308. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0200>
- Coskun, H., & Can, A. (2015). The assessment of the in vivo to in vitro cellular transition of human umbilical cord multipotent stromal cells. *Placenta*, 36(2), 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.11.024>
- Cretoi, D. (2016). The Third Dimension of Telocytes Revealed by FIB-SEM Tomography. *Adv Exp Med Biol*, 913, 325-334. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_21
- Cretoi, D., Ciontea, S. M., Popescu, L. M., Ceafalan, L., & Ardeleanu, C. (2006). Interstitial Cajal-like cells (ICLC) as steroid hormone sensors in human myometrium: immunocytochemical approach. *J Cell Mol Med*, 10(3), 789-795. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00438.x>
- Cretoi, D., & Cretoi, S. M. (2016). Telocytes in the reproductive organs: Current understanding and future challenges. *Semin Cell Dev Biol*, 55, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.018>
- Cretoi, D., Cretoi, S. M., Simionescu, A. A., & Popescu, L. M. (2012). Telocytes, a distinct type of cell among the stromal cells present in the lamina propria of jejunum. *Histol Histopathol*, 27(8), 1067-1078. <https://doi.org/10.14670/HH-27.1067>
- Cretoi, D., Hummel, E., Zimmermann, H., Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2014). Human cardiac telocytes: 3D imaging by FIB-SEM tomography. *J Cell Mol Med*, 18(11), 2157-2164. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12468>
- Cretoi, D., Roatesi, S., Bica, I., Plesca, C., Stefan, A., Bajenaru, O., Condrat, C. E., & Cretoi, S. M. (2020). Simulation and Modeling of Telocytes Behavior in Signaling and Intercellular Communication Processes. *Int J Mol Sci*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072615>
- Cretoi, D., Xu, J., Xiao, J., & Cretoi, S. M. (2016). Telocytes and Their Extracellular Vesicles-Evidence and Hypotheses. *Int J Mol Sci*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081322>

- Cretoiu, S. M. (2016a). Immunohistochemistry of Telocytes in the Uterus and Fallopian Tubes. *Adv Exp Med Biol*, 913, 335-357. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_22
- Cretoiu, S. M. (2016b). Telocytes in focus. *Semin Cell Dev Biol*, 55, 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.05.019>
- Cretoiu, S. M., Cretoiu, D., Marin, A., Radu, B. M., & Popescu, L. M. (2013). Telocytes: ultrastructural, immunohistochemical and electrophysiological characteristics in human myometrium. *Reproduction*, 145(4), 357-370. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0369>
- Cretoiu, S. M., & Popescu, L. M. (2014). Telocytes revisited. *Biomol Concepts*, 5(5), 353-369. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0029>
- Crisan, M., Chen, C. W., Corselli, M., Andriolo, G., Lazzari, L., & Peault, B. (2009). Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann N Y Acad Sci*, 1176, 118-123. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04967.x>
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H. J., Giacobino, J. P., Lazzari, L.,...Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301-313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- Damasceno, E. B., & Lima, P. P. d. (2013). Wharton S Jelly Absence: A Possible Cause of Stillbirth. *Autopsy and Case Reports*, 3(4), 43-47. <https://doi.org/10.4322/acr.2013.038>
- Davies, J. E., Walker, J. T., & Keating, A. (2017). Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(7), 1620-1630. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0492>
- Dawidowicz, J., Szotek, S., Matysiak, N., Mielanczyk, L., & Maksymowicz, K. (2015). Electron microscopy of human fascia lata: focus on telocytes. *J Cell Mol Med*, 19(10), 2500-2506. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12665>
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Garcia, M. P., Gonzalez-Gomez, M., Carrasco, J. L., Alvarez-Arguelles, H., & Diaz-Flores, L., Jr. (2020). Telocytes/CD34+ Stromal Cells in Pathologically Affected White Adipose Tissue. *Int J Mol Sci*, 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249694>
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Garcia, M. P., Gonzalez-Gomez, M., Diaz-Flores, L., Jr., Alvarez-Arguelles, H., & Luis Carrasco, J. (2020). Presence/Absence and Specific Location of Resident CD34+ Stromal Cells/Telocytes Condition Stromal Cell Development in Repair and Tumors. *Front Cell Dev Biol*, 8, 544845. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.544845>
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Garcia, M. P., Saez, F. J., Aparicio, F., Diaz-Flores, L., Jr., & Madrid, J. F. (2014). Uptake and intracytoplasmic storage of pigmented particles by human CD34+ stromal cells/telocytes: endocytic property of telocytes. *J Cell Mol Med*, 18(12), 2478-2487. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12437>
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Saez, F. J., Diaz-Flores, L., Jr., & Madrid, J. F. (2013). Telocytes in neuromuscular spindles. *J Cell Mol Med*, 17(4), 457-465. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12015>

- Dobra, M. A., Vrapciu, A. D., Pop, F., Petre, N., & Rusu, M. C. (2018). The molecular phenotypes of ureteral telocytes are layer-specific. *Acta Histochem*, 120(1), 41-45. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.11.003>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donlon, C. R., Furdon, S. A., & Clark, D. A. (2002). Look Before You Clamp. *Advances in Neonatal Care*, 2(1), 19-26. <https://doi.org/10.1053/adnc.2002.31512>
- Driskell, R. R., Lichtenberger, B. M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B. D., Charalambous, M., Ferron, S. R., Herault, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A. C., & Watt, F. M. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, 504(7479), 277-281. <https://doi.org/10.1038/nature12783>
- Erkan, E., Serdaroglu, B., Alptekin, I., Sahin, D., Hendem, D. U., Celikkan, F. T., & Can, A. (2024). Revisiting the human umbilical cord epithelium. An atypical epithelial sheath with distinctive features. *Cell Tissue Res*, 398(3), 175-189. <https://doi.org/10.1007/s00441-024-03920-8>
- Faussone-Pellegrini, M. S., & Bani, D. (2010). Relationships between telocytes and cardiomyocytes during pre- and post-natal life. *J Cell Mol Med*, 14(5), 1061-1063. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01074.x>
- Faussone Pellegrini, M. S., & Popescu, L. M. (2011). Telocytes. *Biomol Concepts*, 2(6), 481-489. <https://doi.org/10.1515/BMC.2011.039>
- Fernandez-Pernas, P., Fafian-Labora, J., Lesende-Rodriguez, I., Mateos, J., De la Fuente, A., Fuentes, I., De Toro Santos, J., Blanco Garcia, F., & Arufe, M. C. (2016). 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine Increases In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells From Human Umbilical Cord Stroma Through SRC2. *J Cell Biochem*, 117(9), 2097-2108. <https://doi.org/10.1002/jcb.25515>
- Fertig, E. T., Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2014). Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography. *J Cell Mol Med*, 18(10), 1938-1943. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12436>
- Fong, C. Y., Tam, K., Cheyyatraivendran, S., Gan, S. U., Gauthaman, K., Armugam, A., Jeyaseelan, K., Choolani, M., Biswas, A., & Bongso, A. (2014). Human Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. *J Cell Biochem*, 115(2), 290-302. <https://doi.org/10.1002/jcb.24661>
- Fu, Y. S., Cheng, Y. C., Lin, M. Y., Cheng, H., Chu, P. M., Chou, S. C., Shih, Y. H., Ko, M. H., & Sung, M. S. (2006). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*, 24(1), 115-124. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0053>
- Fujii-Tezuka, R., Ishige-Wada, M., Nagoshi, N., Okano, H., Mugishima, H., Takahashi, S., Morioka, I., & Matsumoto, T. (2021). Umbilical artery tissue contains p75 neurotrophin receptor-positive pericyte-like cells that possess neurosphere formation capacity and neurogenic differentiation potential. *Regen Ther*, 16, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.12.002>

- Garzón, I., Alfonso-Rodríguez, C. A., Martínez-Gómez, C., Carriel, V., Martín-Piedra, M. A., Fernández-Valadés, R., Sánchez-Quevedo, M. C., & Alaminos, M. (2014). Expression of epithelial markers by human umbilical cord stem cells. A topographical analysis. *Placenta*, 35(12), 994-1000. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.007>
- Gauthier-Fisher, A., Szaraz, P., & Librach, C. L. (2019). Pericytes in the Umbilical Cord. *Adv Exp Med Biol*, 1122, 211-233. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11093-2_12
- Ge, Z., Qiu, C., Zhou, J., Yang, Z., Jiang, T., Yuan, W., Yu, L., & Li, J. (2024). Proteomic analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells and human amniotic epithelial stem cells: a comparison of therapeutic potential. *Sci Rep*, 14(1), 28061. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79063-1>
- Gevaert, T., De Vos, R., Van Der Aa, F., Joniau, S., van den Oord, J., Roskams, T., & De Ridder, D. (2012). Identification of telocytes in the upper lamina propria of the human urinary tract. *J Cell Mol Med*, 16(9), 2085-2093. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01504.x>
- Gherghiceanu, M., Manole, C. G., & Popescu, L. M. (2010). Telocytes in endocardium: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med*, 14(9), 2330-2334. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01133.x>
- Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2005). Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. Transmission electron microscope (TEM) identification. *J Cell Mol Med*, 9(4), 893-910. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00387.x>
- Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2010). Cardiomyocyte precursors and telocytes in epicardial stem cell niche: electron microscope images. *J Cell Mol Med*, 14(4), 871-877. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01060.x>
- Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2011). Heterocellular communication in the heart: electron tomography of telocyte-myocyte junctions. *J Cell Mol Med*, 15(4), 1005-1011. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01299.x>
- Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2012). Cardiac telocytes - their junctions and functional implications. *Cell Tissue Res*, 348(2), 265-279. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1333-8>
- Gil-Kulik, P., Świstowska, M., Krzyżanowski, A., Petniak, A., Kwaśniewska, A., Płachno, B. J., Gałkowski, D., Bogucka-Kocka, A., & Kocki, J. (2022). Evaluation of the Impact of Pregnancy-Associated Factors on the Quality of Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Using SOX2 Gene Expression as a Marker. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7630. <https://doi.org/10.3390/ijms23147630>
- Gil, K., Urbanowicz, W., & Thor, P. (2009). [Localization and functions of c-kit positive cells in the urinary tract]. *Folia Med Cracov*, 50(3-4), 85-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21853875> (Rozmieszczenie i funkcje komórek cajuła w drogach moczowych.)
- Guenther, R., Dreschers, S., Maassen, J., Reibert, D., Skazik-Voogt, C., & Gutermuth, A. (2022). The Treasury of Wharton's Jelly. *Stem Cell Rev Rep*, 18(5), 1627-1638. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10217-8>

- Gupta, A., Shetty, D., & Philip, P. (2017). Single Umbilical Artery With Antenatally Diagnosed Umbilical Artery Aneurysm in a Newborn: A Rare Case Report. *International Journal of Contemporary Pediatrics*. <https://doi.org/10.18203/2349-3291.ijcp20163984>
- Hagen-Ansert, S. (2023). *Textbook of Diagnostic Sonography* (9th Edition ed.). Elsevier.
- Heil, J. R., & Bordoni, B. (2025). Embryology, Umbilical Cord. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491422>
- Hinescu, M. E., Ardeleanu, C., Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2007). Interstitial Cajal-like cells in human gallbladder. *J Mol Histol*, 38(4), 275-284. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9099-0>
- Hinescu, M. E., Gherghiceanu, M., Suci, L., & Popescu, L. M. (2011). Telocytes in pleura: two- and three-dimensional imaging by transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res*, 343(2), 389-397. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1095-0>
- Hinescu, M. E., Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., & Fausone-Pellegrini, M. S. (2008). Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery: an ultrastructural and immunohistochemical approach. *J Cell Mol Med*, 12(1), 260-270. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00226.x>
- Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, 127(3), 526-537. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>
- Horn, L. C., Meinel, A., & Hentschel, B. (2012). c-kit/CD 117 positive cells in the myometrium of pregnant women and those with uterine endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*, 286(1), 105-107. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2220-y>
- Hussein, M. M., & Mokhtar, D. M. (2018). The roles of telocytes in lung development and angiogenesis: An immunohistochemical, ultrastructural, scanning electron microscopy and morphometrical study. *Dev Biol*, 443(2), 137-152. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.09.010>
- Huwait, E. A. (2020). Telocytes: History, Character and Importance in Medicine. *The Annals of Clinical and Analytical Medicine*, 11(01). <https://doi.org/10.4328/acam.6144>
- Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., Riggsbee, K. L., & Tallquist, M. D. (2019). Platelet-derived growth factor receptor-alpha is essential for cardiac fibroblast survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 317(2), H330-H344. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00054.2019>
- Jain, A., Shrivastava, P., & Jain, R. (2019). Histomorphometric Assessment of Wharton's Jelly Area in Normal and Pre-Eclamptic Pregnancies and Its Correlation With Placental Weight. *International Journal of Anatomy and Research*, 7(3.1), 6775-6779. <https://doi.org/10.16965/ijar.2019.221>
- Janas, P., Kucybała, I., Radon-Pokracka, M., & Huras, H. (2018). Telocytes in the female reproductive system: An overview of up-to-date knowledge. *Adv Clin Exp Med*, 27(4), 559-565. <https://doi.org/10.17219/acem/68845>
- Jurewicz, E., Kasacka, I., Bankowski, E., & Filipek, A. (2012). Identification and localization of S100A6 in human umbilical cord. *Cell Biol Int*, 36(1), 109-112. <https://doi.org/10.1042/CBI20110233>

- Kadivar, M., Khatami, S., Mortazavi, Y., Shokrgozar, M. A., Taghikhani, M., & Soleimani, M. (2006). In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(2), 639-647. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.047>
- Kadner, A., Zund, G., Maurus, C., Breymann, C., Yakarisik, S., Kadner, G., Turina, M., & Hoerstrup, S. P. (2004). Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25(4), 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2003.12.038>
- Kang, Y., Zhu, Z., Zheng, Y., Wan, W., Manole, C. G., & Zhang, Q. (2015). Skin telocytes versus fibroblasts: two distinct dermal cell populations. *J Cell Mol Med*, 19(11), 2530-2539. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12671>
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. O., Tukun, A., Uckan, D., & Can, A. (2007). Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319-331. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>
- Katsura, D., Takahashi, Y., Iwagaki, S., Chiaki, R., Asai, K., Koike, M., Tsuji, S., Kimura, F., & Murakami, T. (2021). Successful Amniotransfusion for Severe Fetal Growth Restriction With Umbilical Cord Complications: Two Case Reports. *Journal of Medical Case Reports*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13256-021-02904-4>
- Klein, M., Csobonyeiova, M., Ziaran, S., Danisovic, L., & Varga, I. (2021). Cardiac Telocytes 16 Years on-What Have We Learned So Far, and How Close Are We to Routine Application of the Knowledge in Cardiovascular Regenerative Medicine? *Int J Mol Sci*, 22(20). <https://doi.org/10.3390/ijms222010942>
- Koleda, P., Apoznanski, W., Wozniak, Z., Rusiecki, L., Szydelko, T., Pilecki, W., Polok, M., Kalka, D., & Pupka, A. (2012). Changes in interstitial cell of Cajal-like cells density in congenital ureteropelvic junction obstruction. *Int Urol Nephrol*, 44(1), 7-12. <https://doi.org/10.1007/s11255-011-9970-5>
- Kondo, A., & Kaestner, K. H. (2019). Emerging diverse roles of telocytes. *Development*, 146(14). <https://doi.org/10.1242/dev.175018>
- Kostin, S. (2010). Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med*, 14(7), 1917-1921. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01111.x>
- Kostin, S., & Popescu, L. M. (2009). A distinct type of cell in myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLCs). *J Cell Mol Med*, 13(2), 295-308. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00668.x>
- Larsen, W. (2020). *Human Embryology* (5th Edition ed.). Churchill Livingstone.
- Li, H., Lu, S., Liu, H., Ge, J., & Zhang, H. (2014). Scanning electron microscope evidence of telocytes in vasculature. *J Cell Mol Med*, 18(7), 1486-1489. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12333>
- Li, H., Zhang, H., Yang, L., Lu, S., & Ge, J. (2014). Telocytes in mice bone marrow: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med*, 18(6), 975-978. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12337>

- Li, L., Lin, M., Li, L., Wang, R., Zhang, C., Qi, G., Xu, M., Rong, R., & Zhu, T. (2014). Renal telocytes contribute to the repair of ischemically injured renal tubules. *J Cell Mol Med*, 18(6), 1144-1156. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12274>
- Li, S., Shen, X., & He, S. (2019). Expression of toll-like receptors and their regulatory roles in murine cardiac telocytes. *J Cell Mol Med*, 23(8), 5360-5368. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14416>
- Li, Y. (2024). Comparative Analysis of Decellularization Methods for the Production of Decellularized Umbilical Cord Matrix. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(7), 7686-7701. <https://doi.org/10.3390/cimb46070455>
- Li, Y. Y., Zhang, S., Li, Y. G., & Wang, Y. (2016). Isolation, culture, purification and ultrastructural investigation of cardiac telocytes. *Mol Med Rep*, 14(2), 1194-1200. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5386>
- Liu, J., Cao, Y., Song, Y., Huang, Q., Wang, F., Yang, W., & Yang, C. (2016). Telocytes in Liver. *Curr Stem Cell Res Ther*, 11(5), 415-419. <https://doi.org/10.2174/1574888x10666150630112035>
- Liu, T., Wang, S., Li, Q., Huang, Y., Chen, C., & Zheng, J. (2016). Telocytes as potential targets in a cyclophosphamide-induced animal model of premature ovarian failure. *Mol Med Rep*, 14(3), 2415-2422. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5540>
- Liu, Y., Liang, Y., Wang, S., Tarique, I., Vistro, W. A., Zhang, H., Haseeb, A., Gandahi, N. S., Iqbal, A., An, T., Yang, H., Chen, Q., & Yang, P. (2019). Identification and characterization of telocytes in rat testis. *Aging (Albany NY)*, 11(15), 5757-5768. <https://doi.org/10.18632/aging.102158>
- Lockwood, C., Moore, T., Copel, J., Silver, R., & Resnik, R. (2022). *Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine Principles and Practice* (9th Edition ed.).
- Lu, L. L., Liu, Y. J., Yang, S. G., Zhao, Q. J., Wang, X., Gong, W., Han, Z. B., Xu, Z. S., Lu, Y. X., Liu, D., Chen, Z. Z., & Han, Z. C. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*, 91(8), 1017-1026. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870554>
- Luesma, M. J., Cantarero, I., Sanchez-Cano, A. I., Rodellar, C., & Junquera, C. (2021). Ultrastructural evidence for telocytes in equine tendon. *J Anat*, 238(3), 527-535. <https://doi.org/10.1111/joa.13335>
- Luesma, M. J., Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2013). Telocytes and stem cells in limbus and uvea of mouse eye. *J Cell Mol Med*, 17(8), 1016-1024. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12111>
- Lund, R. D., Wang, S., Lu, B., Girman, S., Holmes, T., Sauve, Y., Messina, D. J., Harris, I. R., Kihm, A. J., Harmon, A. M., Chin, F. Y., Gosiewska, A., & Mistry, S. K. (2007). Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*, 25(3), 602-611. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0308>
- Lupatov, A. Y., Karalkin, P. A., Suzdal'tseva, Y. G., Burunova, V. V., Yarygin, V. N., & Yarygin, K. N. (2006). Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical

fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med*, 142(4), 521-526. <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0407-6>

- Makarchuk, O. M. (2023). Pregnancy and Umbilical Cord Pathology: Structural and Functional Parameters of the Umbilical Cord. *Journal of Medicine and Life*, 16(8), 1282-1291. <https://doi.org/10.25122/jml-2023-0025>
- Manetti, M., Guiducci, S., Ruffo, M., Rosa, I., Fausone-Pellegrini, M. S., Matucci-Cerinic, M., & Ibba-Manneschi, L. (2013). Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J Cell Mol Med*, 17(4), 482-496. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12028>
- Manetti, M., Rosa, I., Messerini, L., Guiducci, S., Matucci-Cerinic, M., & Ibba-Manneschi, L. (2014). A loss of telocytes accompanies fibrosis of multiple organs in systemic sclerosis. *J Cell Mol Med*, 18(2), 253-262. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12228>
- Manole, C. G., Cismasiu, V., Gherghiceanu, M., & Popescu, L. M. (2011). Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neo-angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 15(11), 2284-2296. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01449.x>
- Marini, M., Mencucci, R., Rosa, I., Favuzza, E., Guasti, D., Ibba-Manneschi, L., & Manetti, M. (2017). Telocytes in normal and keratoconic human cornea: an immunohistochemical and transmission electron microscopy study. *J Cell Mol Med*, 21(12), 3602-3611. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13270>
- Marini, M., Rosa, I., Guasti, D., Gacci, M., Sgambati, E., Ibba-Manneschi, L., & Manetti, M. (2018). Reappraising the microscopic anatomy of human testis: identification of telocyte networks in the peritubular and intertubular stromal space. *Sci Rep*, 8(1), 14780. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33126-2>
- Matyja, A., Gil, K., Pasternak, A., Sztefko, K., Gajda, M., Tomaszewski, K. A., Matyja, M., Walocha, J. A., Kulig, J., & Thor, P. (2013). Telocytes: new insight into the pathogenesis of gallstone disease. *J Cell Mol Med*, 17(6), 734-742. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12057>
- Maxia, C., Murtas, D., Isola, M., Tamma, R., Zucca, I., Piras, F., Ribatti, D., Diana, A., & Perra, M. T. (2018). Immunophenotypic characterization of telocyte-like cells in pterygium. *Mol Vis*, 24, 853-866. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30713424>
- Mazzoni, T. S., Viadanna, R. R., & Quagio-Grassiotto, I. (2019). Presence, localization and morphology of TELOCYTES in developmental gonads of fishes. *J Morphol*, 280(5), 654-665. <https://doi.org/10.1002/jmor.20972>
- Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., Troyer, D., & Medicetty, S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*, 21(1), 50-60. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-50>
- Mitrofanova, L. B., Gorshkov, A. N., Konovalov, P. V., & Krylova, J. S. (2018). Telocytes in the human sinoatrial node. *J Cell Mol Med*, 22(1), 521-532. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13340>

- Montiel-Eulefi, E., Sánchez, R., Rojas, M., & Bustos-Obregón, E. (2009). Epiblast Embryo Stem Cells Give Origin to Adult Pluripotent Cell Populations: Primordial Germ Cell, Pericytic and Haematopoietic Stem Cells. A Review. *International Journal of Morphology*, 27(4), 1325-1333. <Go to ISI>://WOS:000279048100056
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2020). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (11th Edition ed.). Elsevier.
- Mou, Y., Wang, Y., Li, J., Lu, S., Duan, C., Du, Z., Yang, G., Chen, W., Zhao, S., Zhou, J., & Wang, C. (2013). Immunohistochemical characterization and functional identification of mammary gland telocytes in the self-assembly of reconstituted breast cancer tissue in vitro. *J Cell Mol Med*, 17(1), 65-75. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01646.x>
- Nanaev, A. K., Kohnen, G., Milovanov, A. P., Domogatsky, S. P., & Kaufmann, P. (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*, 18(1), 53-64. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(97\)90071-0](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(97)90071-0)
- Nandadasa, S., Nelson, C. M., & Apte, S. (2015). ADAMTS9-Mediated Extracellular Matrix Dynamics Regulates Umbilical Cord Vascular Smooth Muscle Differentiation and Rotation. *Cell Reports*, 11(10), 1519-1528. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.005>
- Niculescu, M. I. (2016). Telocytes in Exocrine Glands Stroma. *Adv Exp Med Biol*, 913, 163-176. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_11
- Niculescu, M. I., Bucur, A., Dinca, O., Rusu, M. C., & Popescu, L. M. (2012). Telocytes in parotid glands. *Anat Rec (Hoboken)*, 295(3), 378-385. <https://doi.org/10.1002/ar.21540>
- Niculescu, M. I., & Popescu, L. M. (2012). Telocytes in the interstitium of human exocrine pancreas: ultrastructural evidence. *Pancreas*, 41(6), 949-956. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31823fbded>
- Niculite, C. M., Regalia, T. M., Gherghiceanu, M., Huica, R., Surcel, M., Ursaciuc, C., Leabu, M., & Popescu, L. M. (2015). Dynamics of telopodes (telocyte prolongations) in cell culture depends on extracellular matrix protein. *Mol Cell Biochem*, 398(1-2), 157-164. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2215-z>
- Nizyaeva, N. V., Sukhacheva, T. V., Serov, R. A., Kulikova, G. V., Nagovitsyna, M. N., Kan, N. E., Tyutyunnik, V. L., Pavlovich, S. V., Poltavtseva, R. A., Yarotskaya, E. L., Shchegolev, A. I., & Sukhikh, G. T. (2018). Ultrastructural and Immunohistochemical Features of Telocytes in Placental Villi in Preeclampsia. *Sci Rep*, 8(1), 3453. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21492-w>
- Othman, E. R., Elgamal, D. A., Refaiy, A. M., Abdelaal, II, Abdel-Mola, A. F., & Al-Hendy, A. (2016). Identification and potential role of telocytes in human uterine leiomyoma. *Contracept Reprod Med*, 1, 12. <https://doi.org/10.1186/s40834-016-0022-5>
- Padhi, S., Sarangi, R., & Mallick, S. (2013). Pancreatic extragastrointestinal stromal tumors, interstitial Cajal like cells, and telocytes. *JOP*, 14(1), 1-14. <https://doi.org/10.6092/1590-8577/1293>

- Pal, K., Ashri, H., & Al-Ghazal, F. A. (2008). Allantoic Cyst and Patent Urachus. *The Indian Journal of Pediatrics*, 76(2), 221-223. <https://doi.org/10.1007/s12098-008-0218-z>
- Pasternak, A., Gil, K., Gajda, M., Tomaszewski, K. A., Matyja, A., & Walocha, J. A. (2014). Interstitial cajal-like cell: a new player in cholelithiasis? *Am J Gastroenterol*, 109(4), 603-604. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.251>
- Pawlicki, P., Hejmej, A., Milon, A., Lustofin, K., Plachno, B. J., Tworzydło, W., Gorowska-Wojtowicz, E., Pawlicka, B., Kotula-Balak, M., & Bilinska, B. (2019). Telocytes in the mouse testicular interstitium: implications of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) and estrogen-related receptor (ERR) in the regulation of mouse testicular interstitial cells. *Protoplasma*, 256(2), 393-408. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1305-2>
- Polchow, B., Kebbel, K., Schmiedeknecht, G., Reichardt, A., Henrich, W., Hetzer, R., & Lueders, C. (2012). Cryopreservation of Human Vascular Umbilical Cord Cells Under Good Manufacturing Practice Conditions for Future Cell Banks. *Journal of Translational Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-98>
- Popescu, B. O., Gherghiceanu, M., Kostin, S., Ceafalan, L., & Popescu, L. M. (2012). Telocytes in meninges and choroid plexus. *Neurosci Lett*, 516(2), 265-269. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.04.006>
- Popescu, L. M., Andrei, F., & Hinescu, M. E. (2005). Snapshots of mammary gland interstitial cells: methylene-blue vital staining and c-kit immunopositivity. *J Cell Mol Med*, 9(2), 476-477. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00375.x>
- Popescu, L. M., Ciontea, S. M., Crețoiu, D., Hinescu, M. E., Radu, E., Ionescu, N., Ceausu, M., Gherghiceanu, M., Braga, R. I., Vasilescu, F., Zagrean, L., & Ardeleanu, C. (2005). Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *J Cell Mol Med*, 9(2), 479-523. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00376.x>
- Popescu, L. M., & Fausone-Pellegrini, M. S. (2010). TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med*, 14(4), 729-740. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01059.x>
- Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Suci, L. C., Manole, C. G., & Hinescu, M. E. (2011). Telocytes and putative stem cells in the lungs: electron microscopy, electron tomography and laser scanning microscopy. *Cell Tissue Res*, 345(3), 391-403. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1229-z>
- Popescu, L. M., Hinescu, M. E., Ionescu, N., Ciontea, S. M., Crețoiu, D., & Ardelean, C. (2005). Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med*, 9(1), 169-190. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00347.x>
- Popescu, L. M., Manole, C. G., Gherghiceanu, M., Ardelean, A., Nicolescu, M. I., Hinescu, M. E., & Kostin, S. (2010). Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med*, 14(8), 2085-2093. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01129.x>
- Popescu, L. M., Manole, E., Serboiu, C. S., Manole, C. G., Suci, L. C., Gherghiceanu, M., & Popescu, B. O. (2011). Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication

- for muscle regeneration. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1379-1392. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01330.x>
- Qi, G., Lin, M., Xu, M., Manole, C. G., Wang, X., & Zhu, T. (2012). Telocytes in the human kidney cortex. *J Cell Mol Med*, 16(12), 3116-3122. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01582.x>
- Qi, Y., Yuan, L., Zeng, J., Wang, X., Ma, L., & Lv, J. (2024). Morphological identification and distribution comparison of telocytes in pituitary gland between normal and cryptorchid yaks. *BMC Vet Res*, 20(1), 463. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04307-1>
- Quaye Mensah, B. (2023). Ligamentum arteriosum and its telocytes: An ultrastructure description. *Anat Rec (Hoboken)*, 306(1), 187-192. <https://doi.org/10.1002/ar.25052>
- Radu, E., Regalia, T., Ceafalan, L., Andrei, F., Cretoiu, D., & Popescu, L. M. (2005). Cajal-type cells from human mammary gland stroma: phenotype characteristics in cell culture. *J Cell Mol Med*, 9(3), 748-752. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00509.x>
- Ranjbaran, H., Abediankenari, S., Mohammadi, M., Jafari, N., Khalilian, A., Rahmani, Z., Momeninezhad Amiri, M., & Ebrahimi, P. (2018). Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran*, 56(1), 28-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29436792>
- Rosa, I., Ibba-Manneschi, L., Guasti, D., Perigli, G., Faussone-Pellegrini, M. S., & Manetti, M. (2022). Morphologic evidence of telocytes in human thyroid stromal tissue. *J Cell Mol Med*, 26(8), 2477-2481. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17282>
- Rosa, I., Marini, M., & Manetti, M. (2021). Telocytes: An Emerging Component of Stem Cell Niche Microenvironment. *J Histochem Cytochem*, 69(12), 795-818. <https://doi.org/10.1369/00221554211025489>
- Rosa, I., Marini, M., Sgambati, E., Ibba-Manneschi, L., & Manetti, M. (2020). Telocytes and lymphatic endothelial cells: Two immunophenotypically distinct and spatially close cell entities. *Acta Histochem*, 122(3), 151530. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151530>
- Rosa, I., Romano, E., Fioretto, B. S., Guasti, D., Ibba-Manneschi, L., Matucci-Cerinic, M., & Manetti, M. (2021). Scleroderma-like Impairment in the Network of Telocytes/CD34(+) Stromal Cells in the Experimental Mouse Model of Bleomycin-Induced Dermal Fibrosis. *Int J Mol Sci*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212407>
- Rosa, I., Taverna, C., Novelli, L., Marini, M., Ibba-Manneschi, L., & Manetti, M. (2019). Telocytes Constitute a Widespread Interstitial Meshwork in the Lamina Propria and Underlying Striated Muscle of Human Tongue. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42415-3>
- Rusu, M. C., Cretoiu, D., Vrapciu, A. D., Hostiuc, S., Dermengiu, D., Manoiu, V. S., Cretoiu, S. M., & Mirancea, N. (2016). Telocytes of the human adult trigeminal ganglion. *Cell Biol Toxicol*, 32(3), 199-207. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9328-y>
- Rusu, M. C., Hostiuc, S., Vrapciu, A. D., Mogoanta, L., Manoiu, V. S., & Grigoriu, F. (2017). Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Ann Anat*, 209, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.09.006>

- Rusu, M. C., Jianu, A. M., Mirancea, N., Didilescu, A. C., Manoiu, V. S., & Paduraru, D. (2012). Tracheal telocytes. *J Cell Mol Med*, 16(2), 401-405. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01465.x>
- Rusu, M. C., Manoiu, V. S., Cretoiu, D., Cretoiu, S. M., & Vrapciu, A. D. (2018). Stromal cells/telocytes and endothelial progenitors in the perivascular niches of the trigeminal ganglion. *Ann Anat*, 218, 141-155. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.016>
- Rusu, M. C., Mirancea, N., Manoiu, V. S., Valcu, M., Nicolescu, M. I., & Paduraru, D. (2012). Skin telocytes. *Ann Anat*, 194(4), 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.11.007>
- Rusu, M. C., Mogoanta, L., Pop, F., & Dobra, M. A. (2018). Molecular phenotypes of the human kidney: Myoid stromal cells/telocytes and myoepithelial cells. *Ann Anat*, 218, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.015>
- Rusu, M. C., Nicolescu, M. I., Jianu, A. M., Lighezan, R., Manoiu, V. S., & Paduraru, D. (2012). Esophageal telocytes and hybrid morphologies. *Cell Biol Int*, 36(12), 1079-1088. <https://doi.org/10.1042/CBI20120007>
- Sadler, T. W. (2020). *Langman's Medical Embryology* (14th Edition ed.). Wolters Kluwer.
- Sanches, B. D. A., Maldarine, J. D. S., Tamarindo, G. H., Da Silva, A. D. T., Lima, M. L. D., Rahal, P., Goes, R. M., Taboga, S. R., & Carvalho, H. F. (2020). Explant culture: A relevant tool for the study of telocytes. *Cell Biol Int*, 44(12), 2395-2408. <https://doi.org/10.1002/cbin.11446>
- Sanches, B. D. A., Maldarine, J. S., Zani, B. C., Tamarindo, G. H., Biancardi, M. F., Santos, F. C. A., Rahal, P., Goes, R. M., Felisbino, S. L., Vilamaior, P. S. L., & Taboga, S. R. (2017). Telocytes play a key role in prostate tissue organisation during the gland morphogenesis. *J Cell Mol Med*, 21(12), 3309-3321. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13234>
- Sanches, B. D. A., Teofilo, F. B. S., Brunet, M. Y., Villapun, V. M., Man, K., Rocha, L. C., Neto, J. P., Matsumoto, M. R., Maldarine, J. S., Ciena, A. P., Cox, S. C., & Carvalho, H. F. (2024). Telocytes: current methods of research, challenges and future perspectives. *Cell Tissue Res*, 396(2), 141-155. <https://doi.org/10.1007/s00441-024-03888-5>
- Sánchez-Trujillo, L., García-Montero, C., Fraile-Martínez, Ó., Guijarro, L. G., Bravo, C., León-Luis, J. A. D., Saez, J. V., Buján, J., Álvarez-Mon, M., García-Honduvilla, N., Sáez, M. A., & Ortega, M. Á. (2022). Considering the Effects and Maternofoetal Implications of Vascular Disorders and the Umbilical Cord. *Medicina*, 58(12), 1754. <https://doi.org/10.3390/medicina58121754>
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M. M., & Davies, J. E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 23(2), 220-229. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0166>
- Schoenberg, M. D., & Moore, R. D. (1958). Studies on connective tissue. III. Enzymatic studies on the formation and nature of the carbohydrate intermediate of the connective tissue polysaccharides in the human umbilical cord. *AMA Arch Pathol*, 65(2), 115-124. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13497402>

- Schugar, R. C., Chirieleison, S. M., Wescoe, K. E., Schmidt, B. T., Askew, Y., Nance, J. J., Evron, J. M., Peault, B., & Deasy, B. M. (2009). High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 789526. <https://doi.org/10.1155/2009/789526>
- Sgambati, E., Marini, M., Thyron, G. D. Z., Vichi, D., Parretti, E., Mello, G., Brizzi, E., & Gheri, G. (2007). Lectin Binding in the Umbilical Cord in Altered Glycemia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 130(1), 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2005.12.017>
- Sherer, D. M., Al-Haddad, S., Cheng, R., & Dalloul, M. (2021). Current Perspectives of Prenatal Sonography of Umbilical Cord Morphology. *International Journal of Women S Health*, Volume 13, 939-971. <https://doi.org/10.2147/ijwh.s278747>
- Shivakumar, S. B., Bharti, D., Jang, S. O., Hwang, S. C., Park, J. K., Shin, J., Byun, J. H., Park, B.-W., & Rho, G. J. (2015). Cryopreservation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Following Controlled Rate Freezing Protocol Using Different Cryoprotectants; A Comparative Study. *International Journal of Stem Cells*, 8(2), 155-169. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.2.155>
- Shoshkes-Carmel, M. (2024). Telocytes in the Luminal GI Tract. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 17(5), 697-701. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2024.02.002>
- Shu, Y., Xiong, Y., Song, Y., Jin, S., & Bai, X. (2024). Positive association between circulating Caveolin-1 and microalbuminuria in overt diabetes mellitus in pregnancy. *J Endocrinol Invest*, 47(1), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s40618-023-02137-w>
- Smythies, J. (2015). Intercellular Signaling in Cancer-the SMT and TOFT Hypotheses, Exosomes, Telocytes and Metastases: Is the Messenger in the Message? *J Cancer*, 6(7), 604-609. <https://doi.org/10.7150/jca.12372>
- Smythies, J., & Edelstein, L. (2014). Telocytes, exosomes, gap junctions and the cytoskeleton: the makings of a primitive nervous system? *Front Cell Neurosci*, 7, 278. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00278>
- Sobolewski, K., Bańkowski, E., Pałka, J., & Jaworski, S. (2002). Binding of the Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) by Soluble Components of Human Umbilical Cord. *Acta Biochimica Polonica*, 49(4), 999-1004. https://doi.org/10.18388/abp.2002_3759
- Sohn, Y., Flores Semyonov, B., El-Mekkoussi, H., Wright, C. V. E., Kaestner, K. H., Choi, E., & Goldenring, J. R. (2024). Telocyte Recruitment During the Emergence of a Metaplastic Niche in the Stomach. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 18(2), 101347. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2024.04.004>
- Soliman, S. A. (2024). Immunohistochemical-properties of the dermal embryonic telocytes. *Sci Rep*, 14(1), 13899. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63802-5>
- Stefańska, K., Bryl, R., Hutchings, G., Shibli, J. A., & Dyszkiewicz-Konwińska, M. (2020). Human Umbilical Cord Stem Cells – The Discovery, History and Possible Application. *Medical Journal of Cell Biology*, 8(2), 78-82. <https://doi.org/10.2478/acb-2020-0009>

- Subramanian, A., Fong, C. Y., Biswas, A., & Bongso, A. (2015). Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, 10(6), e0127992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127992>
- Suciu, L., Nicolescu, M. I., & Popescu, L. M. (2010). Cardiac telocytes: serial dynamic images in cell culture. *J Cell Mol Med*, 14(11), 2687-2692. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01185.x>
- Suciu, L., Popescu, L. M., & Gherghiceanu, M. (2007). Human placenta: de visu demonstration of interstitial Cajal-like cells. *J Cell Mol Med*, 11(3), 590-597. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00058.x>
- Suciu, L., Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Regalia, T., Nicolescu, M. I., Hinescu, M. E., & Fausone-Pellegrini, M. S. (2010). Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs*, 192(5), 325-339. <https://doi.org/10.1159/000319467>
- Suciu, L. C., Popescu, B. O., Kostin, S., & Popescu, L. M. (2012). Platelet-derived growth factor receptor-beta-positive telocytes in skeletal muscle interstitium. *J Cell Mol Med*, 16(4), 701-707. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01505.x>
- Sukhacheva, T. V., Nizyaeva, N. V., Samsonova, M. V., Cherniaev, A. L., Burov, A. A., Iurova, M. V., Shchegolev, A. I., Serov, R. A., & Sukhikh, G. T. (2021). Morpho-functional changes of cardiac telocytes in isolated atrial amyloidosis in patients with atrial fibrillation. *Sci Rep*, 11(1), 3563. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82554-0>
- Sun, X., Zheng, M., Zhang, M., Qian, M., Zheng, Y., Li, M., Cretioiu, D., Chen, C., Chen, L., Popescu, L. M., & Wang, X. (2014). Differences in the expression of chromosome 1 genes between lung telocytes and other cells: mesenchymal stem cells, fibroblasts, alveolar type II cells, airway epithelial cells and lymphocytes. *J Cell Mol Med*, 18(5), 801-810. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12302>
- Takechi, K., Kuwabara, Y., & Mizuno, M. (1993). Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*, 14(2), 235-245. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(05\)80264-4](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(05)80264-4)
- Tang, H., Liang, T., Zhou, Y., Ju, H., Song, D., & Fang, H. (2022). Telocytes reduce oxidative stress by downregulating DUOX2 expression in inflamed lungs of mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 54(4), 574-582. <https://doi.org/10.3724/abbs.2022017>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Trivedi, S., Ratanoo, L., Purohit, S., & Rastogi, P. (2020). Absence of Wharton's Jelly: An Association With Feto-Maternal Morbidity. *International Journal of Reproduction Contraception Obstetrics and Gynecology*, 9(3), 1318. <https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20200926>
- Ullah, S., Yang, P., Zhang, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, W., Waqas, Y., Le, Y., Chen, B., & Chen, Q. (2014). Identification and characterization of telocytes in the uterus of the oviduct in the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*: TEM evidence. *J Cell Mol Med*, 18(12), 2385-2392. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12392>

- Urban, L., Miko, M., Kajanova, M., Bozikova, S., Mrazova, H., & Varga, I. (2016). Telocytes (interstitial Cajal-like cells) in human Fallopian tubes. *Bratisl Lek Listy*, 117(5), 263-267. https://doi.org/10.4149/bll_2016_051
- Valente, S., Villacampa Lahoz, M., Vasuri, F., & Pasquinelli, G. (2024). Immunohistochemical and Ultrastructural Characterization of Telocytes in Normal and Diabetic Human Kidneys. *Biomolecules*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/biom14080968>
- Vannucchi, M. G., Traini, C., Manetti, M., Ibba-Manneschi, L., & Faussone-Pellegrini, M. S. (2013). Telocytes express PDGFRalpha in the human gastrointestinal tract. *J Cell Mol Med*, 17(9), 1099-1108. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12134>
- Vanterpool, S. F., Been, J. V., Houben, M. L., Nikkels, P. G., De Krijger, R. R., Zimmermann, L. J., Kramer, B. W., Progulske-Fox, A., & Reyes, L. (2016). Porphyromonas gingivalis within Placental Villous Mesenchyme and Umbilical Cord Stroma Is Associated with Adverse Pregnancy Outcome. *PLoS One*, 11(1), e0146157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146157>
- Varga, I., Kyselovič, J., Danisovic, L., Gálfiová, P., Kachlik, D., Polák, Š., & Klein, M. (2018). Recently Discovered Interstitial Cells Termed Telocytes: Distinguishing Cell-Biological and Histological Facts From Fictions. *Biologia*, 74(2), 195-203. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0162-y>
- Varga, I., Polak, S., Kyselovic, J., Kachlik, D., Danisovic, L., & Klein, M. (2019). Recently Discovered Interstitial Cell Population of Telocytes: Distinguishing Facts from Fiction Regarding Their Role in the Pathogenesis of Diverse Diseases Called "Telocytopathies". *Medicina (Kaunas)*, 55(2). <https://doi.org/10.3390/medicina55020056>
- Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., & Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330-1337. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013>
- Wang, J., Jin, M., Ma, W.-h., Zhu, Z., & Wang, X. (2016). The History of Telocyte Discovery and Understanding. 1-21. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_1
- Wang, L., Song, D., Wei, C., Chen, C., Yang, Y., Deng, X., & Gu, J. (2020). Telocytes inhibited inflammatory factor expression and enhanced cell migration in LPS-induced skin wound healing models in vitro and in vivo. *J Transl Med*, 18(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02217-y>
- Wang, L., Xiao, L., Zhang, R., Jin, H., & Shi, H. (2020). Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of telocytes in human scalp tissue. *Sci Rep*, 10(1), 1693. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58628-w>
- Weiss, M. L., Medicetty, S., Bledsoe, A. R., Rachakatla, R. S., Choi, M., Merchav, S., Luo, Y., Rao, M. S., Velagaleti, G., & Troyer, D. (2006). Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*, 24(3), 781-792. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0330>
- Wong, S., Guo, W. H., & Wang, Y. L. (2014). Fibroblasts probe substrate rigidity with filopodia extensions before occupying an area. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(48), 17176-17181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412285111>

- Wu, K. H., Zhou, B., Lu, S. H., Feng, B., Yang, S. G., Du, W. T., Gu, D. S., Han, Z. C., & Liu, Y. L. (2007). In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem*, 100(3), 608-616. <https://doi.org/10.1002/jcb.21078>
- Xiangdong, W., & Cretoiu, D. (2016). *Telocytes Connecting Cells* (1 ed., Vol. 913). Advances in Experimental Medicine and Biology.
- Xiao, J., Wang, F., Liu, Z., & Yang, C. (2013). Telocytes in liver: electron microscopic and immunofluorescent evidence. *J Cell Mol Med*, 17(12), 1537-1542. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12195>
- Xu, Y., Tian, H., Cheng, J., Liang, S., Li, T., & Liu, J. (2019). Immunohistochemical biomarkers and distribution of telocytes in ApoE(-/-) mice. *Cell Biol Int*, 43(11), 1286-1295. <https://doi.org/10.1002/cbin.11128>
- Xu, Y., Tian, H., Qiao, G., & Zheng, W. (2021). Telocytes in the atherosclerotic carotid artery: Immunofluorescence and TEM evidence. *Acta Histochem*, 123(2), 151681. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151681>
- Yang, D., Yuan, L., Chen, S., Zhang, Y., Ma, X., Xing, Y., & Song, J. (2023). Morphological and histochemical identification of telocytes in adult yak epididymis. *Sci Rep*, 13(1), 5295. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32220-4>
- Yang, P., Ahmad, N., Hunag, Y., Ullah, S., Zhang, Q., Waqas, Y., Liu, Y., Li, Q., Hu, L., & Chen, Q. (2015). Telocytes: novel interstitial cells present in the testis parenchyma of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *J Cell Mol Med*, 19(12), 2888-2899. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12731>
- Yang, P., Liu, Y., Ahmed, N., Ullah, S., Liu, Y. I., & Chen, Q. (2015). Ultrastructural identification of telocytes in the muscularis of chicken ileum. *Exp Ther Med*, 10(6), 2325-2330. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2841>
- Yang, Y., Sun, W., Wu, S. M., Xiao, J., & Kong, X. (2014). Telocytes in human heart valves. *J Cell Mol Med*, 18(5), 759-765. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12285>
- Yu, J., Wu, Y. W., Gu, Y., Fang, Q., Sievers, R. E., Ding, C., Olgin, J. E., & Lee, R. J. (2015). Immuno-modification of Enhancing Stem Cells Targeting for Myocardial Repair. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(7), 1483-1491. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12439>
- Zani, B. C., Sanches, B. D. A., Maldarine, J. S., Biancardi, M. F., Santos, F. C. A., Barquilha, C. N., Zucaro, M. I., Baraldi, C. M. B., Felisbino, S. L., Goes, R. M., Vilamaior, P. S. L., & Taboga, S. R. (2018). Telocytes role during the postnatal development of the Mongolian gerbil jejunum. *Exp Mol Pathol*, 105(1), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.07.003>
- Zhang, D., Song, D., Shi, L., Sun, X., Zheng, Y., Zeng, Y., & Wang, X. (2020). Mechanisms of interactions between lung-origin telocytes and mesenchymal stem cells to treat experimental acute lung injury. *Clin Transl Med*, 10(8), e231. <https://doi.org/10.1002/ctm2.231>
- Zhang, H., Tao, Y., Ren, S., Liu, H., Zhou, H., Hu, J., Tang, Y., Zhang, B., & Chen, H. (2018). Simultaneous harvesting of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. *Exp Ther Med*, 15(1), 806-812. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5502>

- Zhang, X., Lu, P., & Shen, X. (2023). Morphologies and potential roles of telocytes in nervous tissue. *Clinical and Translational Discovery*, 3(2), e186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ctd2.186>
- Zheng, L., Li, L., Qi, G., Hu, M., Hu, C., Wang, S., Li, J., Zhang, M., Zhang, W., Zeng, Y., Zhang, Y., Li, L., Wang, X., Lin, M., Zhu, T., & Rong, R. (2018). Transplantation of Telocytes Attenuates Unilateral Ureter Obstruction-Induced Renal Fibrosis in Rats. *Cell Physiol Biochem*, 46(5), 2056-2071. <https://doi.org/10.1159/000489445>
- Zheng, M., Sun, X., Zhang, M., Qian, M., Zheng, Y., Li, M., Cretoiu, S. M., Chen, C., Chen, L., Cretoiu, D., Popescu, L. M., Fang, H., & Wang, X. (2014). Variations of chromosomes 2 and 3 gene expression profiles among pulmonary telocytes, pneumocytes, airway cells, mesenchymal stem cells and lymphocytes. *J Cell Mol Med*, 18(10), 2044-2060. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12429>
- Zheng, Y., Bai, C., & Wang, X. (2012a). Potential significance of telocytes in the pathogenesis of lung diseases. *Expert Rev Respir Med*, 6(1), 45-49. <https://doi.org/10.1586/ers.11.91>
- Zheng, Y., Bai, C., & Wang, X. (2012b). Telocyte morphologies and potential roles in diseases. *J Cell Physiol*, 227(6), 2311-2317. <https://doi.org/10.1002/jcp.23022>
- Zheng, Y., Chen, X., Qian, M., Zhang, M., Zhang, D., Bai, C., Wang, Q., & Wang, X. (2014). Human lung telocytes could promote the proliferation and angiogenesis of human pulmonary microvascular endothelial cells in vitro. *Mol Cell Ther*, 2, 3. <https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-3>
- Zheng, Y., Cretoiu, D., Yan, G., Cretoiu, S. M., Popescu, L. M., Fang, H., & Wang, X. (2014). Protein profiling of human lung telocytes and microvascular endothelial cells using iTRAQ quantitative proteomics. *J Cell Mol Med*, 18(6), 1035-1059. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12350>
- Zheng, Y., Cretoiu, D., Yan, G., Cretoiu, S. M., Popescu, L. M., & Wang, X. (2014). Comparative proteomic analysis of human lung telocytes with fibroblasts. *J Cell Mol Med*, 18(4), 568-589. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12290>
- Zheng, Y., Li, H., Manole, C. G., Sun, A., Ge, J., & Wang, X. (2011). Telocytes in trachea and lungs. *J Cell Mol Med*, 15(10), 2262-2268. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01404.x>
- Zheng, Y., Zhang, M., Qian, M., Wang, L., Cismasiu, V. B., Bai, C., Popescu, L. M., & Wang, X. (2013). Genetic comparison of mouse lung telocytes with mesenchymal stem cells and fibroblasts. *J Cell Mol Med*, 17(4), 567-577. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12052>
- Zheng, Y., Zhu, T., Lin, M., Wu, D., & Wang, X. (2012). Telocytes in the urinary system. *J Transl Med*, 10, 188. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-188>
- Zhou, J., Wang, Y., Zhu, P., Sun, H., Mou, Y., Duan, C., Yao, A., Lv, S., & Wang, C. (2014). Distribution and characteristics of telocytes as nurse cells in the architectural organization of engineered heart tissues. *Sci China Life Sci*, 57(2), 241-247. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4602-1>

Zhou, J., Zhang, Y., Wen, X., Cao, J., Li, D., Lin, Q., Wang, H., Liu, Z., Duan, C., Wu, K., & Wang, C. (2010). Telocytes accompanying cardiomyocyte in primary culture: two- and three-dimensional culture environment. *J Cell Mol Med*, 14(11), 2641-2645. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01186.x>

Zhou, Q., Wei, L., Zhong, C., Fu, S., Bei, Y., Huica, R. I., Wang, F., & Xiao, J. (2015). Cardiac telocytes are double positive for CD34/PDGFR-alpha. *J Cell Mol Med*, 19(8), 2036-2042. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12615>

Zhu, L., Shangguan, T., Chen, P., Wang, Y., Xiao, L., Liu, H., & He, W. (2023). Estradiol enhances T-type calcium channel activation in human myometrium telocytes. *J Reprod Dev*, 69(2), 87-94. <https://doi.org/10.1262/jrd.2022-132>

Zhu, Z., Ma, Q., Meng, X., Pan, Y., Li, Y., Wang, J., Liu, Y., & Yang, P. (2023). Interstitial Cell Dysregulation in Allergic Contact Dermatitis: A Morphodynamic Study of Novel Interstitial Cell Telocytes. *Microsc Microanal*, 29(2), 762-776. <https://doi.org/10.1093/micmic/ozad010>



EKLER

Ek-1. Etik Kurul Kararı

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU	
ETİK KURULUN ADI	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
TELEFON	0312 395 82 27
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	tipinsanetik@ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Başvuru No: 2023000546(2023/546) İnsan Göbek Kordonu Stromasında Telosit Benzeri Hücrelerin Tanımlanması	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Alp CAN	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:109-598-23	Tarih: 12 Ekim 2023
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU				
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
BASKININ UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Hakan ERGÜN			
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişkisi	İmza
Prof.Dr.Hakan ERGÜN	Tıbbi Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Berna ARDA	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hatice ILGIN RUHL	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevim AYDIN	Histoloji ve Embriyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Berna SAVAŞ	Tıbbi Patoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Yüksel ÖRÜN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Cihanşir AKYOL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Başak Ceyda MEÇO	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Emel OKULU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Zahide Çiler BÜYÜKATALAY YALDIZ	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Razak YILMAZ	Nöroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Serkan AKBULUT	Cerrahi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat YILDIRIM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Dr.İrem KAR	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	

Funda BAYKAL XILIG
A.Ü.T.F. İnsan Araştırmaları
Etik Kurulu

Ek-2. Bilgilendirilmiş Onam Formu

Bu form T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun ilgili formu örnek alınarak hazırlanmıştır.

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(Göbek kordonu bağışi için)

Değerli Anne Adayı,

Doğum sonrasında kullanılmayacak olan göbek kordonunuzu bağışlamanız üzere bilimsel bir çalışmaya davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu bilgilendirme formu söz konusu araştırmayı size kısaca tanıtabilmek amacıyla hazırlanmıştır. Araştırma ile ilgili olarak bu formda belirtildiği halde anlayamadığınız hususlar olursa hekiminize sorunuz. Kararınız ne olursa olsun, hekimleriniz sizin bütünüyle sağlık halinizin sağlanmasına ve korunmasına yönelik görevlerini bundan sonra da eksiksiz yerine getireceklerdir. Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde formu imzalamanız uygun olacaktır.

Bilgilendirme Bölümü

Söz konusu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülen "İnsan Göbek Kordonu Stromasında Telosit Benzeri Hücrelerin Tanımlanması" başlıklı araştırma projesidir.

Vücudumuzdaki organların çoğu hasarlandığında kendisini tam olarak yenileyemez ve eskisi gibi işlev göremez. Kök hücreleri vücudumuzun çeşitli dokularında bulunabilen ve uygun koşullar sağlandığında farklı hücreleri oluşturabilen hücrelerdir. Bu hücreler anneyi bebeğe bağlayan göbek bağında (göbek kordonunda) da bulunur. Göbek kordonu doğumdan sonra kesilir ve bebekten ayrılır, eşe (plasentaya) bağlı olarak eşle birlikte atılır. Bu çalışmada göbek kordonunun zaten doğum sonrasında bebek çıktıktan sonra atılmış olan bir kısmı kullanılacaktır. Göbek kordonunuzdan steril laboratuvar koşullarında barındırdığı kök hücre potansiyeli taşıdığı düşünülen telosit benzeri hücreler elde edilecek, çoğaltılacak ve tanımlanacaktır.

Vücudtan zaten atılmış olan göbek kordonu kullanılacağı için bu uygulama sırasında gönüllü olan siz ve bebeğiniz herhangi bir rahatsızlık yaşamayacaksınız. Sizden alınan göbek kordonu başka çalışmalarda kullanılmayacaktır.

Araştırmaya gönüllü olarak katılmaktasınız. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz, araştırmayı istediğiniz herhangi bir evresinde bırakabilirsiniz. Onayınız olmaksızın araştırmacılar tarafından araştırma dışı bırakılabiliyorsunuz. Sizinle birlikte bu çalışmaya 12 anne adayını katılmaktadır. Araştırma için gönüllüler hiçbir mali yük altına girmeyecektir ve kendilerine bir ödeme yapılmayacaktır.

Onay Bölümü

Yukarıda yer alan klinik araştırmaya başlanmadan önce "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu"ndaki açıklamaları okudum ve sözlü açıklamalar aşağıda adı belirtilen kişi tarafından yapıldı. Aklıma gelen tüm soruları ilgili araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntısıyla anladım bulunmaktayım. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı biliyorum. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızamla kabul ediyorum. Benden alınan göbek kordonunun başka amaçla kullanılmasına onay vermiyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün;

Adı-Soyadı:

Adresi:

Telefon:

Tarih ve İmza:

Bu form T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun ilgili formu örnek alınarak hazırlanmıştır.

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin;

Adı-Soyadı
Adresi
Tel-Faks
Tarih ve İmza

Açıklamaları yapan araştırmacının;

Adı-Soyadı
Adresi
Tel-Faks
Tarih ve İmza

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının;

Adı-Soyadı
Adresi
Tel-Faks
Tarih ve İmza

ÖZGEÇMİŞ

