



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3D ENDOMETRİUM BENZERİ KÜLTÜR SİSTEMİ KULLANILARAK
İN VİTRO İMPLANTASYON MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

REMZİYE KENDİRCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA/2017



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3D ENDOMETRİUM BENZERİ KÜLTÜR SİSTEMİ KULLANILARAK
İN VİTRO İMPLANTASYON MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

REMZİYE KENDİRCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

ARAŞTIRMACILAR
YRD. DOÇ. DR. AYLİN ŞENDEMİR ÜRKMEZ
PROF. DR. ESİN HAMEŞ

MANİSA/2017

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Remziye KENDİRCİ

İmza



TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ

Tezimin gerçekleşmesinde bana her zaman yol gösteren, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, eğitimim boyunca manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER' e

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU ve Doç.Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER hocalarıma,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, hayırlı dileklerini biran olsun eksiltmeyen canım annem Filiz KENDİRCİ ve canım babam Hasan KENDİRCİ' ye

Yaşama sevincim, canım kardeşim Volkan KENDİRCİ' ye ve

Manevi desteklerini esirgemeyen asistan arkadaşlarıma, çok teşekkür ederim.

Remziye KENDİRCİ

Manisa/2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR/ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR ve SİMGELER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ	3
4. GENEL BİLGİLER	
4.1. Dişi Üreme Sistemi	5
4.1.1. Uterus Histolojisi	6
4.1.1.1. Endometrium Histolojisi	9
4.1.1.2. Menstrual Siklus ve Hormonal Değişiklikler	13
4.1.1.3. Endometrium Foliküler Faz	16
4.1.1.4. Endometrium Luteal Faz	18
4.1.1.5. Endometrium Menstrual Faz	19
4.2. İmplantasyon	21
4.2.1. İnfertilitede İmplantasyon Problemleri	25
4.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş	27
4.3.1. İmplantasyon, Embriyogenez ve Organ Gelişiminde Görülen Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Tip 1)	29
4.3.2. Doku Onarımı ve Organ Fibrozisinde Görülen Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Tip 2)	30

4.3.3. Kanser İlerlemesi ve Metastazda Görülen Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Tip 3)	31
---	----

4.4. İki Boyutlu Kültür	31
-------------------------------	----

4.4.1. İki Boyutlu Destek Materyalleri	35
--	----

4.5. Üç Boyutlu Kültür	38
------------------------------	----

4.5.1. Poröz Bakteriyal Selüloz Doku İskelesi	41
---	----

4.5.2. Kollajen Fiber Doku İskelesi	42
---	----

4.5.3. Kollajen Köpük Doku İskelesi	42
---	----

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Hücre Kültürü	44
--------------------------	----

5.1.1. RL-95-2 (CRL-1671) Kültürü	44
---	----

5.1.2. JAR Sferoid (HTB-144) Kültürü	44
--	----

5.2. Hücrelerin Pasajlanması	45
------------------------------------	----

5.3. Hücrelerin Sıvı Azotta Stoklanması	45
---	----

5.4. Doku İskeleleri Üretimi	46
------------------------------------	----

5.4.1. Poröz Bakteriyal Selüloz Doku İskelesi Üretimi	46
---	----

5.4.2. Kollajen Fiber Doku İskelesi Üretimi (Elektro eğirme Yöntemi)	46
--	----

5.4.3. Kollajen Köpük Doku İskelesi Üretimi (Liyofilizasyon Yöntemi)	47
--	----

5.5. Doku İskelelerinin SEM ile Karakterizasyonlarının Yapılması	47
--	----

5.6. Doku İskelelerine Hücre Ekimi ve Kültürü	47
---	----

5.7. Frozen Kesitlerin Alınması	49
---------------------------------------	----

5.8. Hücrelerin İmmunositokimya Boyaması	50
5.9. Bakteriyal Selüloz ve Kollajen Köpük Doku İskelelerinin Histokimyasal Hematoksilen Eozin Boyaması	50
5.10. Bakteriyal Selüloz ve Kollajen Köpük Doku İskelelerinin İmmunohistokimya Boyaması	51
5.11. Kollajen Fiber Doku İskelesinin İmmunofloresan Boyaması	51
5.12. İmmunoreaktivitenin Değerlendirilmesi	52
6.BULGULAR	
6.1. İki Boyutlu Hücre Kültürü Bulguları	53
6.2. Doku İskelelerinin SEM ile Karakterizasyon Bulguları	55
6.3. Üç Boyutlu Kültür Modeli Bulguları	56
6.3.1. Poröz Bakteriyal Selüloz Doku İskelesi Bulguları	57
6.3.2. Kollajen Fiber Doku İskelesi Bulguları	60
6.3.3. Kollajen Köpük Doku İskelesi Bulguları	63
6.4. Hücrelerin İmmunositokimya Boyanma Bulguları	66
6.5. Bakteriyal Selüloz ve Kollajen Köpük Doku İskelelerinin Hücreler ile Kültürü Sonrasında Histokimyasal Analizi	70
6.6. Bakteriyal Selüloz ve Kollajen Köpük Doku İskelelerinin Hücreler ile Kültürü Sonrasında İmmunohistokimyasal Analizi	74
6.7. Kollajen Fiber Doku İskelesinin İmmunofloresan Analizi	107
7. TARTIŞMA	154
8. KAYNAKLAR	166
9. ÖZGEÇMİŞ	174

KISALTMALAR ve SİMGELER

2D: İki boyutlu

3D: Üç boyutlu

BC: Bakteriyal selüloz

BS: Yetişkin sığır serumu

BSA: Sığır serum albümin

CAMs: Selüler adezyon molekülleri

COL/F: Kollajen fiber

COL/K: Kollajen köpük

CS: Dana serumu

CSF: Koloni stimüle edici faktör

DAB: Diaminobenzidin

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagles Medium

DMEM-F12: Dulbecco's Modification of Eagles Medium Nutrient Mixture-F12

EBSS: Earl's Balanced Salt Solution

ECM: Ekstraselüler matriks

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EMEM: Earl's Medium Essential Medium

ENDMG: Endotel mezenkim geçişi

EPF: Erken gebelik faktörü

FCS: Fetal dana serumu

FSH: Folikül stimüle edici faktör

GAG: Glikozaminoglikan

HAM'S F12: Hamster Ovary Nutrient Mixture F12

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HOS: At serumu

HS: İnsan serumu

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

LH: Luteinizan hormon

LIF: Lökosit inhibitör faktör

M199: Medium 199 with Earle's Salts

MEG: Mezenkim epitel geçişi

α -MEM: α -Modification of Eagles Medium

MUC1: Musin 1

NBCS: Yeni doğmuş buzağı serumu

PBS: Fosfatlı tampon solüsyonu

PDGF: Trombosit türevli büyüme faktörü

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

α -SMA: α -düz kas aktini

TE: Trofoektoderm

TGF- β : Transforming büyüme faktörü- β

TNF- α : Tümör nekroz faktör α

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ZP: Zona pellucida



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Dişi üreme sistemi yapıları	5
Şekil 2.	Uterus tabakaları	7
Şekil 3.	Uterus tabakalarının histolojik görüntüsü	8
Şekil 4.	Endometrium fonksiyonel ve bazal tabakası	10
Şekil 5.	Endometrium tabakalarının histolojik görüntüsü	11
Şekil 6.	Endometrium kanlanması	12
Şekil 7.	Uterus menstrual siklus fazları	14
Şekil 8.	Menstrual siklusun proliferasyon, sekretuar ve menstrual fazı	15
Şekil 9.	Endometrium erken foliküler faz histolojik görüntüsü	17
Şekil 10.	Endometrium geç foliküler faz histolojik görüntüsü	18
Şekil 11.	Endometrium luteal faz histolojik görüntüsü	19
Şekil 12.	Endometrium menstrual faz histolojik görüntüsü	20
Şekil 13.	Endometriumda pinopod ekspresyonu	22
Şekil 14.	İmplantasyon basamaklarında etkili olan moleküller	23
Şekil 15.	İmplantasyon sırasında embriyo ve endometrium etkileşimi	23
Şekil 16.	Tip 1 epitelyal mezenkimal geçişte görülen hücresel dönüşüm basamakları	30
Şekil 17.	Hedef hücreye göre epitelyal mezenkimal geçiş tipleri	31

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Poröz bakteriyel selüloz, kollajen fiber ve kollajen köpük doku iskelelerinin kültür ortamında şartlandırılmaları	48
Resim 2.	RL95-2 hücrelerinin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	53
Resim 3.	JAR hücrelerinin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerindeki hücre kültürü	54
Resim 4.	Doku iskelelerinin SEM ile elde edilen mikro yapı görüntüleri	55
Resim 5.	JAR, RL95-2, RL95-2 ve JAR kombine hücrelerinin BC ve COL/K doku iskeleleri ile 14. gün kültürü	56
Resim 6.	JAR hücrelerinin BC ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	57
Resim 7.	RL95-2 hücrelerinin BC ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	58
Resim 8.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC doku iskelesinde 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde kültürü	59
Resim 9.	JAR hücrelerinin COL/F ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	60
Resim 10.	RL95-2 hücrelerinin COL/F ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	61
Resim 11.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/F ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	62
Resim 12.	JAR hücrelerinin COL/K ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	63
Resim 13.	RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	64
Resim 14.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü	65
Resim 15.	JAR hücrelerinin immunositokimya boyanma bulguları	67
Resim 16.	RL95-2 hücrelerinin immunositokimya boyanma bulguları	68
Resim 17.	JAR ve RL95-2 hücrelerinde immunohistokimya tekniğinin kontrolü amacıyla yapılan negatif kontrol boyamaları	69
Resim 18.	BC doku iskelesi üzerinde JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerin kültürü sonrasında 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde H-E analizi	71
Resim 19.	COL/K doku iskelesi üzerinde JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerin kültürü sonrasında 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde H-E analizi	73
Resim 20.	JAR hücrelerinin BC ile kültürünün 3. gününde, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	75
Resim 21.	RL95-2 hücrelerinin BC ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	76
Resim 22.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	77
Resim 23.	JAR hücrelerinin BC ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	78

Resim 24.	RL95-2 hücrelerinin BC ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	79
Resim 25.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	80
Resim 26.	JAR hücrelerinin BC ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	81
Resim 27.	RL95-2 hücrelerinin BC ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	82
Resim 28.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	83
Resim 29.	JAR hücrelerinin BC ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	84
Resim 30.	RL95-2 hücrelerinin BC ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	85
Resim 31.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	86
Resim 32.	JAR hücrelerinin BC ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	87
Resim 33.	RL95-2 hücrelerinin BC ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	88
Resim 34.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	89
Resim 35.	JAR hücrelerinin COL/K ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	90
Resim 36.	RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	91
Resim 37.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	92
Resim 38.	JAR hücrelerinin COL/K ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	93
Resim 39.	RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	94

Resim 40.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	95
Resim 41.	JAR hücrelerinin COL/K ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	96
Resim 42.	RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	97
Resim 43.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	98
Resim 44.	JAR hücrelerinin COL/K ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	99
Resim 45.	RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	100
Resim 46.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	101
Resim 47.	JAR hücrelerinin COL/K ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	102
Resim 48.	RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	103
Resim 49.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi	104
Resim 50.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	108
Resim 51.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	109
Resim 52.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	110
Resim 53.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	111
Resim 54.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	112
Resim 55.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	113
Resim 56.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	114
Resim 57.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	115
Resim 58.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	116
Resim 59.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	117

Resim 60.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	118
Resim 61.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	119
Resim 62.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	120
Resim 63.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	121
Resim 64.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	122
Resim 65.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	123
Resim 66.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	124
Resim 67.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	125
Resim 68.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	126
Resim 69.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	127
Resim 70.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	128
Resim 71.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	129
Resim 72.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	130
Resim 73.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	131
Resim 74.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	132
Resim 75.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	133
Resim 76.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	134
Resim 77.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	135
Resim 78.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	136
Resim 79.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	137
Resim 80.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	138
Resim 81.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	139
Resim 82.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	140
Resim 83.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	141
Resim 84.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	142

Resim 85.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	143
Resim 86.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	144
Resim 87.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	145
Resim 88.	JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	146
Resim 89.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	147
Resim 90.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	148
Resim 91.	RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	149
Resim 92.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi	150
Resim 93.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi	151
Resim 94.	RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi	152
Resim 95.	JAR, RL95-2 ve RL95-2 + JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile kültürü sonrasında kontrol immunofloresan analizi	152

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Endometrial bez ve stromal dokunun siklus günlerine göre histolojik değişimi	15
Tablo 2.	Endometrium biyokimyasal reseptivite belirteçleri	22
Tablo 3.	Fetüsün reddedilmemesi için geliştirilen tolerans mekanizması	24
Tablo 4.	İmplantasyonda rol oynayan faktörlerin kaynakları ve etkili oldukları implantasyon dönemleri	25
Tablo 5.	Epitel mezenkim geçişi belirteçleri	28
Tablo 6.	<i>İn Vitro</i> koşullarda hücrelerin sentezleyemediği inorganik iyonlar	33
Tablo 7.	Serum içeriğinde bulunan bileşikler	34
Tablo 8.	ECM'i taklit eden doku iskelelerinin avantajları ve dezavantajları	39
Tablo 9.	3D'ün 2D kültüre göre avantajları	41
Tablo 10.	BC, COL/K ve COL/F doku iskelelerine JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 24 gözlü kültür plaklarına ekimi	49
Tablo 11.	JAR ve RL95-2 hücrelerinin immunoreaktivite değerlendirilmesi	69
Tablo 12.	JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde BC doku iskelesi ile immunoreaktivite değerlendirilmesi	105
Tablo 13.	JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde COL/K doku iskelesi ile immunoreaktivite değerlendirilmesi	106
Tablo 14.	JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde COL/F doku iskelesi ile immunoreaktivite değerlendirilmesi	153

Başlık: 3D Endometrium Benzeri Kültür Sistemi Kullanılarak *In Vitro* İmplantasyon Modelinin Geliştirilmesi

Öğrencinin adı: Remziye KENDİRCİ

Danışman: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

1.ÖZET

Amaç: Hem embriyo hem de kanser hücrelerinin invazyon modelinde kullanılabilecek üç boyutlu (3D) endometrium benzeri kültür sisteminin geliştirilmesi ve bu sisteme invaziv özellikte olan hücrenin ekimi ile epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır. *In Vitro* üç boyutlu endometrium benzeri kültür sistemi, poröz bakteriyel selüloz (BC), kollajen köpük (COL/K) ve kollajen fiber (COL/F) doku iskeleleri üzerine endometrium epitelyal hücre hattı (RL95-2) ile invaziv sferoid oluşturma özelliği olan trofoblast benzeri koriyokarsinom (JAR) hücre hatlarının tekli ve ikili ekimi sonucunda implantasyon, invazyon basamaklarında görülen epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada üretilen üç farklı tip doku iskelesi ile ticari olarak satın alınan RL95-2 ve JAR hücreleri kullanılmıştır. Hücreler uygun besiyerlerinde kültüre edilip, %80 konfluent olduktan sonra doku iskeleleri üzerine tekli veya ikili olarak ekilmiştir. Kültürün 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde iskeleler %4 paraformaldehit ile fikse edilerek frozen kesitleri alınmıştır. Epitelyal belirteç olarak E-kaderin, mezenkimal belirteç olarak N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 dağılımları indirekt immunoperoksidaz ya da immunofloresan boyama yöntemleri ile analiz edilmiştir. Doku iskelelerinin karakterizasyonu ise SEM yöntemi ile yapılmıştır.

Bulgular: RL95-2 hücrelerinde E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunoreaktivitelerinin JAR hücrelerinden daha fazla olduğu, E-kaderin ve Syndecan-1 dağılımlarının RL95-2 hücresinde, N-kaderin ve Syndecan-1 immunoreaktivitelerinin de JAR hücrelerinde diğer belirteçlere oranla daha fazla olduğu görüldü. Doku iskelelerinin karakterizasyonu sonucunda; BC gözenek büyüklüğü $97 \pm 28 \mu\text{m}$, COL/K gözenek büyüklüğü $109 \pm 21 \mu\text{m}$ ve COL/F doku iskelelerinin çapının ise $0,67 \pm 0,14 \mu\text{m}$ olduğu saptandı. Epitelyal mezenkimal geçiş belirteçlerinin her üç doku iskelesinde de boyandığı, fakat BC' un özellikle metastatik kurulacak modellerde JAR hücrelerinin kullanılmasında, COL/K doku iskelesinde JAR hücrelerinin 7. günde, RL95-2 hücrelerinin ise 14. günde mezenkimal özelliklerinin daha fazla olduğu, COL/F doku iskelesi kültüründe ise, RL95-2 hücrelerinin erken dönem kültürlerinde epitelyal özellikten mezenkimal özelliğe dönmesini desteklediği, RL95-2 ve JAR hücrelerinde E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1' in kültürün 14. gününde daha fazla olduğu gözlemlendi.

Sonuç ve Yorum: Farklı iskeleler kullanılarak geliştirilen 3D endometrium benzeri kültür sistemi ile hem kanser hücrelerinin invazyonu sırasında hem de embriyo implantasyonu sırasında görülen epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının farklı günlerdeki ifadelerinde değişim saptandığı ve kurulan bu modellerin ileriki araştırmalar için bir ön çalışma niteliğinde olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: 3D Kültür Sistemi, *In Vitro* İmplantasyon, Metastaz, Bakteriyel Selüloz, Kollajen iskele, JAR Sferoidi

Title: Development of Endometrium Like 3D Culture System Using *In Vitro* Model Implantation

Student's name: Remziye KENDİRCİ

Supervisor: H. Seda VATANSEVER

Department: Department of Histology and Embryology

2. SUMMARY

Aim: For using both embryo and invasion models, we aimed to investigate three dimensional (3D) endometrium-like culture system invasive culture and epithelial mesenchymal transition mechanism. Via *in vitro* three-dimensional endometrium-like culture system, epithelial mesenchymal transition in both implantation and invasion process were analyzed using single or combine culture of endometrium epithelial (RL95-2) and trophoblast-like choriocarcinoma (JAR) cell lines on bacterial cellulose (BC), collagen foam (COL/K) and collagen fiber (COL/F) porous scaffolds.

Materials and Methods: Three different types of tissue scaffolds were used in the study and RL95-2 and JAR cells were purchased commercially. Cells were cultured on appropriate media, after 80% confluency of the cells, they were plated onto scaffolds separately or combine. On culture time; 3., 5., 7., 10. and 14. days, the scaffolds were fixed with 4% paraformaldehyde and frozen sections were taken. Distributions of E-cadherin as an epithelial marker, N-cadherin, Vimentin, α -SMA and Syndecan-1 as a mesenchymal marker were analyzed by indirect immunoperoxidase or immunofluorescence staining methods. Characterization of scaffolds were analyzed by SEM method.

Results: In the RL95-2 cells, immunoreactivities of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, α -SMA and Syndecan-1 were higher than JAR cells, in addition, E-cadherin and Syndecan-1 immunoreactivities in RL95-2 cells, N-cadherin and Syndecan-1 immunoreactivities in JAR cells were significantly higher. After the characterization of the scaffolds BC pore size of 97 ± 28 μ m, a COL/K pore size of 109 ± 21 μ m and a COL/F tissue scaffold of $0, 67 \pm 0,14$ μ m in diameter were detected. The epithelial mesenchymal transition markers were stained in all three scaffolds, however, for epithelial mesenchymal transition BC and JAR cells, the mesenchymal properties of JAR cells on day 7, RL95-2 cells on day 14 on COL/K tissue scaffold were higher, whereas COL/F scaffold was supported epithelial properties of RL95-2 cells, in addition, immunoreactivities of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, α -SMA and Syndecan-1 were higher on combine culture of RL95-2 + JAR cells on this scaffold at 14. Day of the culture time.

Conclusion: The newly developed 3D endometrium-like culture system using different scaffolds was supported the epithelial mesenchymal transition mechanisms in both cancer cell invasion and embryo implantation during different culture periods and it can be a preliminary study for further research.

Key words: 3D Culture System, *In Vitro* Implantation, Metastasis, Bacterial Cellulose, Collagen Scaffold, JAR Spheroids

3.GİRİŞ

Hücre kültürü *in vivo* ortam şartlarının sağlandığı *in vitro* ortamda hücrelerin kontrollü olarak eldesi, çoğaltılması, farklılaştırılması ve yaşatılması prensiplerini içerir. Hücre kültürünün 1950-1960 yıllarında ilk defa uygulanmasından sonra günümüze kadar gelen yeni yöntemler ile hücre kültür sistemleri geliştirilmiş ve kanser çalışmaları ile kök hücre çalışmalarının yapılabileceği bilimsel araştırmalara olanak sağlamıştır.

Yapılan tüm bilimsel uygulamaların temelinde olduğu gibi hücre kültüründe de sonuçların tekrarlanabilirliği, güvenilirliği, doğru tekniğin uygulanması temel şart olarak kabul edilir. Hücre kültüründe laboratuvar uygulamalarının tanımlanması, standardizasyonu ve *În Vitro* prosedürlerin geliştirilmesini kapsayan ve tüm dünyada kabul edilen “İyi Hücre Kültürü Uygulamaları” (Good Cell Culture Applications-GCCP) tanımlanmıştır. GCCP’nin tanımına göre hücre kültürü “*in vitro* ortamda *in vivo* ya en yakın şekilde hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesidir” (Hartung ve ark, 2002).

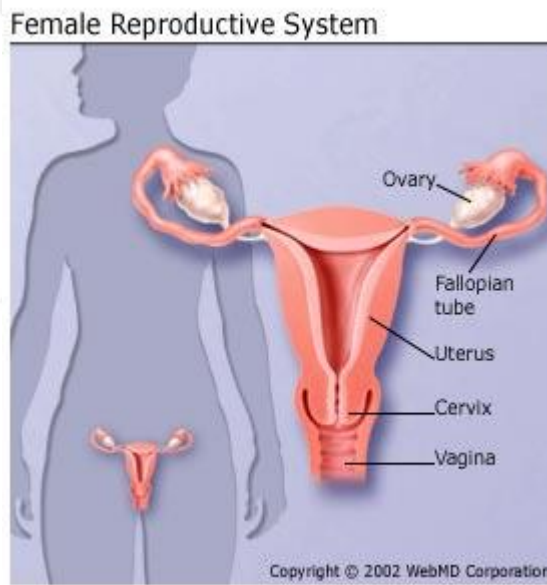
Tüm genel hatlarıyla hücre kültürü prensibi 1907 yılında Harrison tarafından sinir liflerinin kökenini araştırırken geliştirilmiştir (Harrison ve ark, 1907). Harrison hücre kültürünü, vücut dışında hücrelerin muhafaza edilebilmesini sağlayan ve zaman içerisinde bu hücrelerdeki farklılıkları gözlemlemeye yardımcı bir araç olarak tanımlamıştır (Harrison, 1910).

Hücre kültüründe, doku mühendisliğinin de yardımıyla yeni kültür sistemleri geliştirilip, klinikte tedaviye ve teşhise yönelik uygulamalarda mümkündür. Vücut içinde hücrelerin bulunduğu ortam üç boyutlu (3D) olduğu için, iki boyutlu (2D) kültür sistemlerinde hücrelerde morfolojik özelliklerde değişim ve hücreler arası etkileşim farklılıkları görülebilmektedir (Breslin ve O'Driscoll, 2013). 3D kültür substratları hücrelerin tutunması için mekanik bir destek oluştururken aynı zamanda *in vitro* dokuların bütünlüğü ve kararlılığını korumaya yardımcı olmaktadır. 3D kültür sistemlerinde temel amaç, hücrelerin hedef doku içerisindeki fenotipini taklit etmesini sağlamaktadır (Kunz Schughart ve ark, 2004). Ayrıca 3D kültür sistemleri hücrelerin farklılaşma kapasitelerinde, göçünde ve proliferasyonunda etkili olan hücre-hücre veya hücre-hücre dışı matriks (ekstraselüler matriks-ECM) sinyalizasyonu tanımlamaya yardımcı olmaktadır (Weaver ve ark, 1997). Bu çalışmada 3D kültür sistemi, biyouyumlu olan ve hücrelerin proliferasyonuna yardımcı bakteriyel selüloz

(BC) ile yine biyouyumlu organ ve doku rejenerasyonunu teşvik eden içerdği çapraz bağlar ile hücrelerin invaze olmaları için zemin hazırlayan kollajen köpük (COL/K) ve kollajen fiber (COL/F) doku iskeleleri kullanıldı. Endometrium epitelyal hücre hatları ile biyouyumlu BC ve COL doku iskeleleri kullanılarak 3D endometrium benzeri kültür sistemi geliştirilmesi amaçlandı. Hücre kültüründe 3D endometrium benzeri kültür sistemi kullanılması, embriyo implantasyonu için bir yeni kültür sistemi geliştirilmesi yanı sıra, buna benzer mekanizma ile olduğu düşünülen kanser metastaz modelleri içinde yeni bir 3D kültür sistemi olması diğer bir amaçtır. İmplantasyon, metastaz vb. farklı hücrelerin yer aldığı fizyolojik veya patolojik durumlardaki epitelyal mezenkimal geçiş varlığının bilinmesi üzerine geliştirilen bu sistemde, hücrelerin endometriuma implantasyonu veya kanser hücrelerinin metastazları sırasında, invazyonlarını kolaylaştırmak ve doğru bir şekilde tutunmalarını sağlamak için kullanılan bu değişimin varlığının saptanması da hedeflendi. Ayrıca geliştirilen 3D implantasyon modeli ile primer insan endometrial hücre çalışma zorluğunun önüne geçilmesi, örnek toplamadaki yetersizlik ve etik problemler yaşanılmadan *in vitro* çalışma olanağının sağlanabilecek olması da diğer bir hedeftir.

4.1. DIŞI ÜREME SİSTEMİ

Diőı üreme sistemi; iç genital ve dış genital organlar olmak üzere incelenir. İç genital organlar pelviste yerleşik, bir çift ovaryum, genital kanallar olan fallop tüpleri (ovidukt veya tuba uterina), uterus, serviks ve vajina kapsamındadır. Dış genital organlar ise labia major, labia minor ve klitoristir. Meme bezleri ve plasenta ise fonksiyonel olarak genital sistemle ilişkilidir (Şekil 1). Kadın germ hücreleri olan oositler ve steroid hormonlar, siklik değışimlerin merkezi olan ovaryumlarda üretilir. Oositin fertilizasyonu fallop tüplerinde gerçekleşir ve fertilize olmuş oosit gebelik süresince uterusu yer alır. Uterus, menstrual siklus olarak adlandırılan düzenli aralıklarla tekrarlayan değışikliklere uğrar. İç genital organların vücut dışına açıldığı yer ise vajinadır (Ovalle ve Nahirney, 2013).



Şekil 1: Diőı üreme sistemi yapıları <http://www.webmd.com/sex-relationships/guide/your-guide-female-reproductive-system#1>

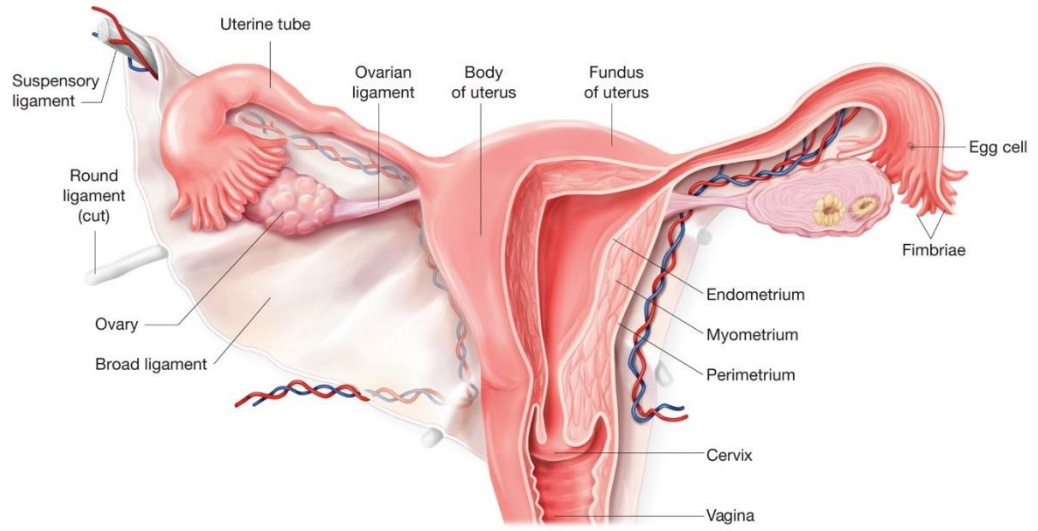
Diőı üreme sisteminin embriyolojik gelişimi, karın arka duvarındaki intermedial mezodermden farklı olan ürogenital kabartıdan köken alır. Vitellüs kesesinden gelişen primordiyal germ hücreleri, gebeliğin altıncı haftasında ürogenital kabartıya göç ederler. Germ hücrelerinin çevresindeki mezenkim ve sölom yüzey epiteli arasındaki etkileşim ile gonad gelişimi ilerler. Yüzey epiteli foliküler hücrelere farklılaşırken, oogoniumlar primitif ovaryumdaki germ hücrelerinden gelişirler. Dolaşımda, fetal

hormonların etkili olmaya başlamasından sonra kadın genital kanal sistemi ile dış genital organlar gelişir (Ovalle ve Nahirney, 2013).

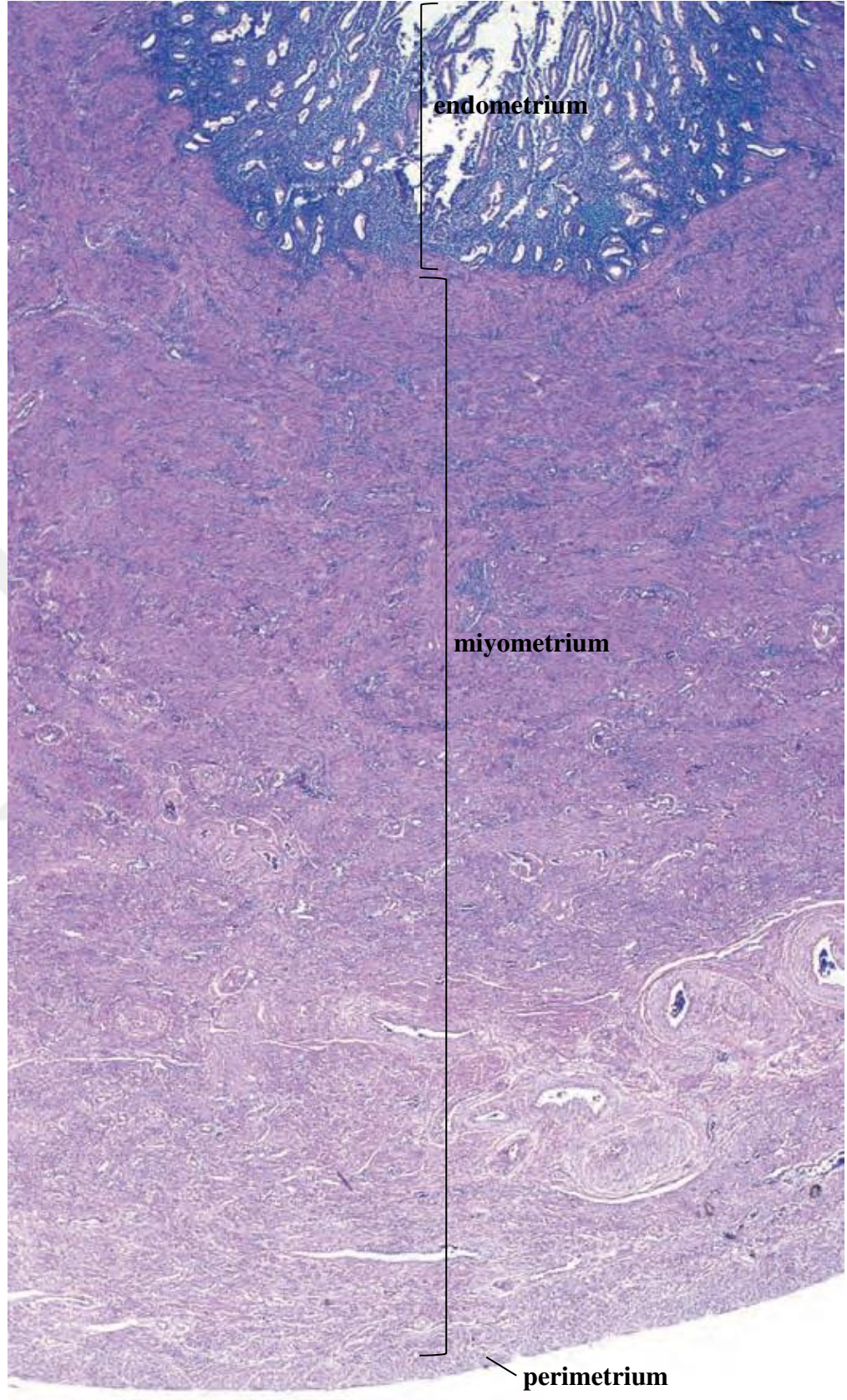
4.1.1. UTERUS HISTOLOJİSİ

Uterus; pelviste mesane ile rektum arasında yer alır. Lümeni müköz membranla örtülü, duvarı kalın müsküler yapıdadır. Gövde veya korpus bölümü, organın genişlemiş üst bölümüdür. Korpusun anterior yüzeyi düz, posterior yüzeyi konvektir. Fundus ise korpusun tuba uterina bağlantısının üstünde yer alan genişlemiş bölümüdür. Fundusun duvarından, fallop tüpleri organın içine doğru giriş yapar. Korpus ve fundus histolojik olarak hemen hemen aynıdır (Ross ve Pawlina, 2006). Uterus histolojik olarak üç tabakadan oluşur; perimetrium, miyometrium ve endometrium. Perimetrium; en dışta olup bağ doku yapısındadır. Peritoneal mezotel ile örtülüdür. Mezotelyumun hemen altında elastik doku tabakası bulunur. Miyometrium; en kalın ve ortadaki tabakadır. Birbirine bağlı düz kas demetlerinden oluşur. Düz kas demetleri birbirinden tam olarak ayırt edilemez ve uterusun işleviyle ilişkili üç tabakadan oluşur. Orta kas tabakası, stratum vaskülare olarak adlandırılan kan damarı ve lenfatikleri içerir. İç ve dış tabaka longitudinal, orta tabaka ise sirküler seyirlidir. Uterin kontraksiyon sırasında miyometriumun üç tabakası yapısal ve fonksiyonel bir sinsityum oluştururlar.

Endometrium; uterusun mukozasıdır basit prizmatik epitelden oluşan menstrual siklik değişimlere uğrayan yerdir (Şekil 2 ve Şekil 3). (Ovalle ve Nahirney, 2013).



Şekil 2: Uterus tabakaları <http://anatomy-medicine.com/endocrine-system/101-the-uterus.html>



Şekil 3: Uterus tabakalarının histolojik görüntüsü (Ross ve Pawlina, 2006).

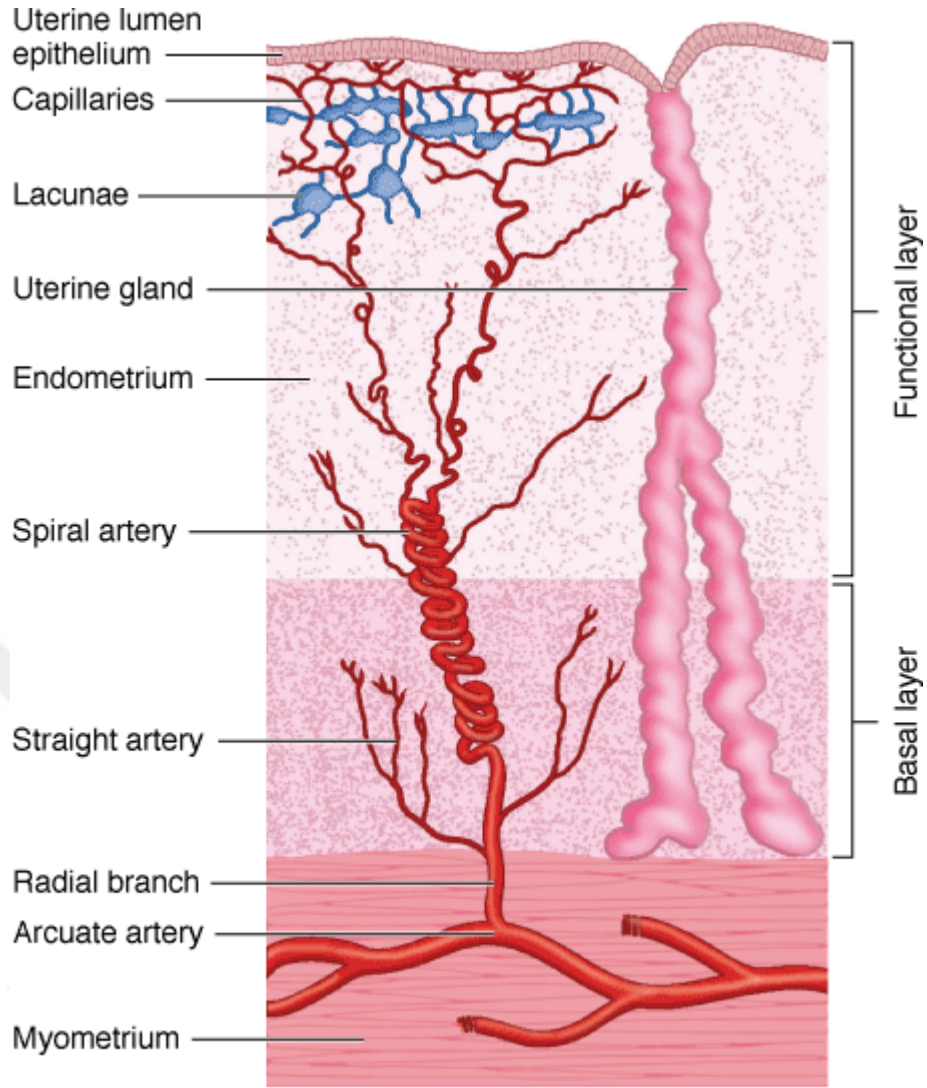
Miyometrium ve endometrium, her ay uterusu embriyo implantasyonuna hazırlayan siklik değişimlere uğrar. Bu değişimler menstrual siklusu oluşturmakla birlikte eğer embriyonun implantasyonu gerçekleşirse siklus durur. Ancak gebelik boyunca her iki tabakada büyüme ve gelişmeye devam eder.

Gebe olmayan uterusda 50 µm uzunluğunda düz kas hücreleri yer alır. Uterusun gebelik sırasında büyük ölçüde genişlemesini uzunlukları 500 µm bulan düz kas hücreleri sağlar. Diferansiye olmamış mezenkimal hücreler farklılaşarak, var olan kas hücreleri bölünüp yeni lifler oluşarak bağ dokusu miktarında artar. Gebelik ilerleyip fetus büyüdükçe, uterus duvarı giderek incelmekle birlikte, doğumdan sonra eski haline geri döner. Gebelik sırasında miyometriumu sağlamlaştırmak için üretilen kollajen, daha sonra kollajeni üreten hücreler tarafından enzimatik yıkıma uğratılır (Ross ve Pawlina, 2006).

Progesteron; korpus luteum ve plasentadan salgılanıp uterus kaslarının kasılmasını engellerken, oksitosin; hipofizden salgılanıp uterus kaslarının kasılmasını artırır. Miyometriumun normal hacmini koruması ve fonksiyonlarını sürdürmesi için ise östrojen gereklidir (Standring, 2015).

4.1.1.1. ENDOMETRİUM HİSTOLOJİSİ

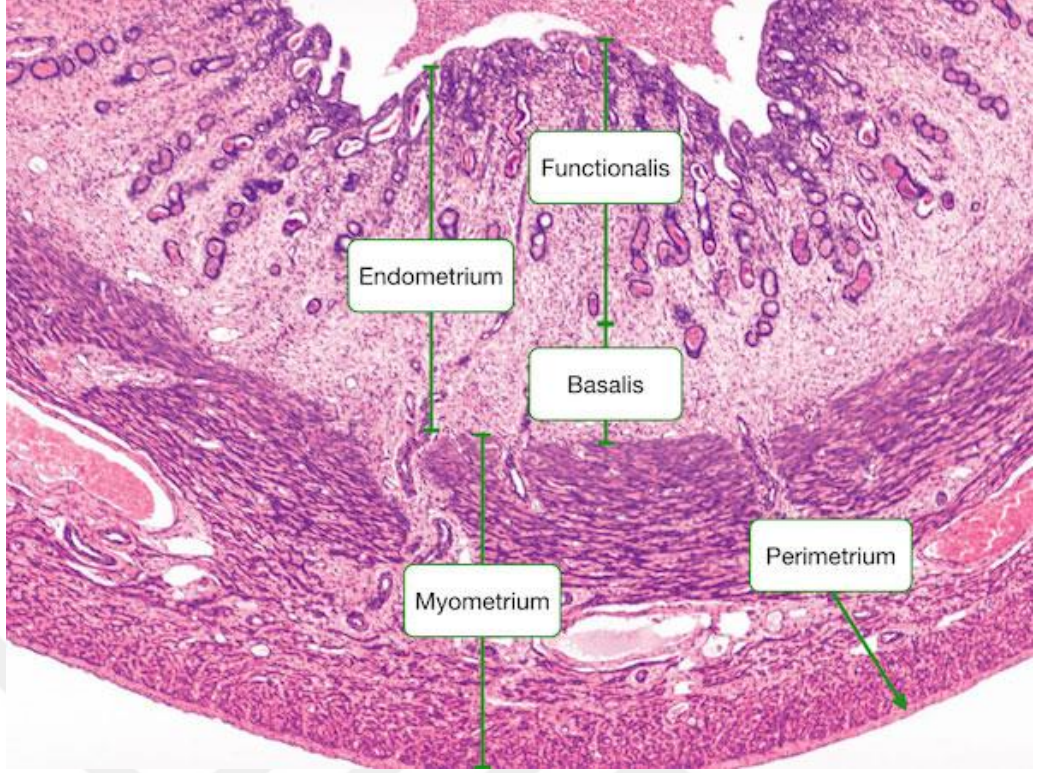
Uterusun en iç tabakası olup soluk kırmızı renkli ve yaklaşık 5 mm kalınlığındadır. Endometrium üreme çağında, embriyo implantasyonuna ve embriyonik fetal gelişim olaylarına hazırlayan siklik değişimlere uğrar. Salgı hücreleri ve silyumlu hücreleri içeren tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Basit tübüler yapıdaki uterus bezleri ile hücreden zengin stromadan oluşur. Uterus bezleri, yüzey epitelinin lamina propiyyaya yani endometrial stroma invajine olmasıyla gelişir. Bu sebeple basit tübüler bezler silyumlu hücreleri içerir. Endometrial stroma ise mezenkime benzeyip yüksek düzeyde selüler yapıdadır ve bol miktarda interselüler ara madde içerir. Endometrium implantasyonun gerçekleştiği yerdir. Kalın ve yüzeyel olan fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonale) ile yüzeyel tabakanın rejenerasyonunu sağlayan bazal tabakadan (stratum bazale) oluşur. Stratum fonksiyonale; menstruasyondan en fazla etkilenen yer ve menstrual siklus sırasında prolifer ve dejenere olan kısımdır. Stratum bazale ise hormonal değişikliklerden etkilenmeyip menstruasyon sırasında dökülmeyen kısımdır (Şekil 4-5) (Ovalle ve Nahirney, 2013).



Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition*: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Şekil 4: Endometrium fonksiyonel ve bazal tabakası

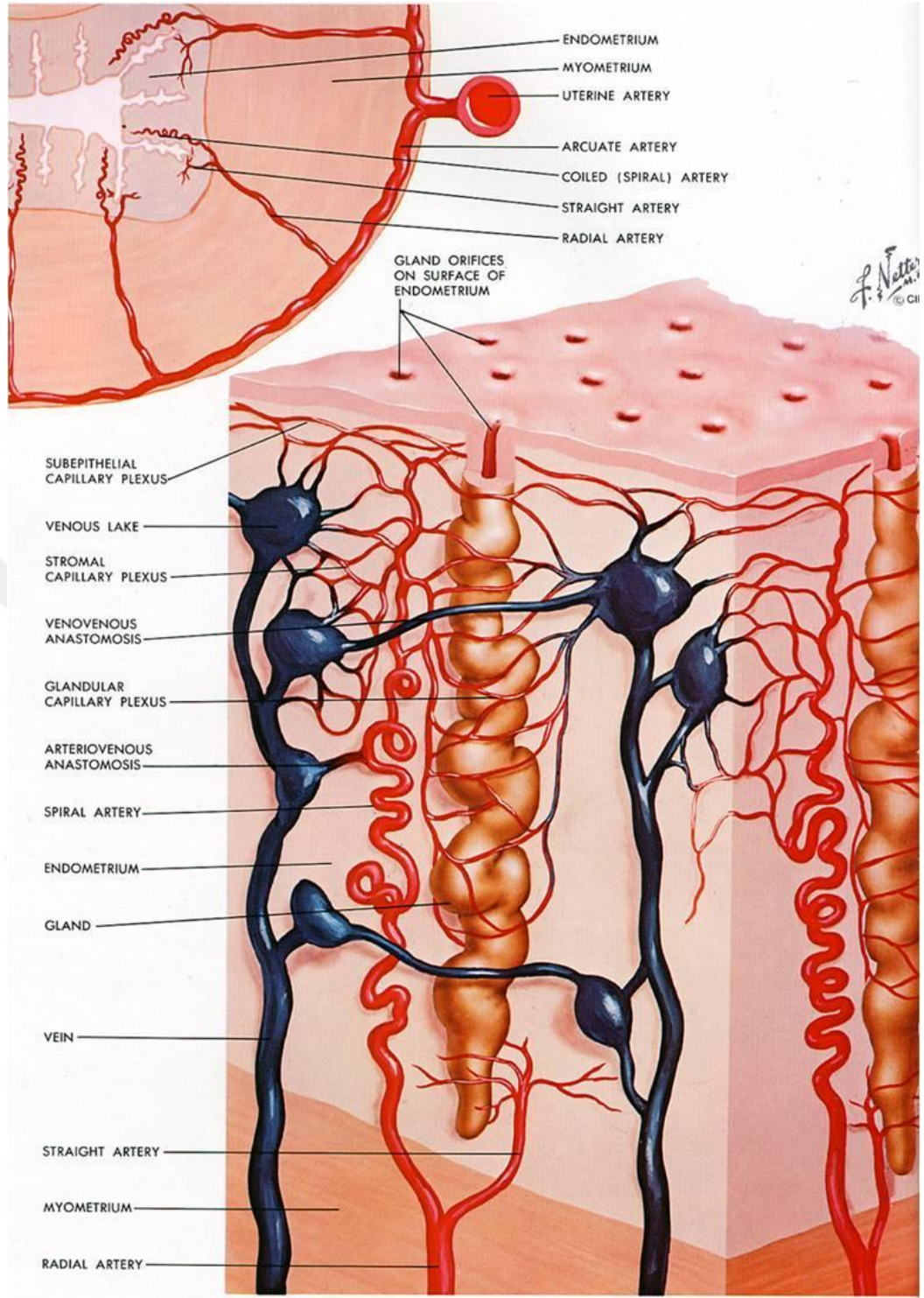
<http://histonano.com/books/Junqueira%27s%20Basic%20Histology%20PDF%20W>
<HOLE%20BOOK/22.%20The%20Female%20Reproductive%20System.htm>



Şekil 5: Endometrium tabakalarının histolojik görüntüsü

http://medcell.med.yale.edu/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php

Fonksiyonel ve bazal tabakanın kanlanması iki ayrı kaynaktan gerçekleşir. Serozanın hemen altında, uterusu çevreleyen uterus arteri, 6-10 arkuat artere dallanarak kan verir. Arkuat arterden ayrılan radial arter, miyometriumun iç kas tabakasına penetre olarak bazal arter ve spiral arteri oluşturur. Bazal arterler, kısa ve düz yapıda olup stratum bazaleyi kanlandırarak, kesintisiz dolaşım sağlar. Spiral arterler ise; stratum bazaleyi geçerek uterus bezlerine paralel bir şekilde uzanarak endometrial yüzeye ulaşarak, çevrelerindeki yoğun kapiler ağı drenaj olurlar. Kapiler ağı, ince duvarlı venöz göllenmelere dallanarak, efferent venlere drenaj olur (Şekil 6). Menstrual siklus sırasında düz arter ve spiral arterlerin proksimal parçaları değişime uğramazken, östrojen ve progesteron etkisi altında spiral arterlerin distal parçaları menstrual siklus boyunca dejenerasyona ve rejenerasyona uğrar (Ovalle ve Nahirney, 2013). Menstruasyondan bir gün önce arterlerdeki vazo konstrüksiyon bu damarlardan kanlanan kapillerde iskemi ve rüptürlere neden olur. Uterus bezleri nekroza uğrar. Endometriumdan dökülen; uterus sekresyonları ve kan vajinadan dışarı atılır (Ovalle ve Nahirney, 2013).



Şekil 6: Endometrium kanlanması

https://classconnection.s3.amazonaws.com/103/flashcards/134103/jpg/endometrium_blood_supply1320440092871.jpg

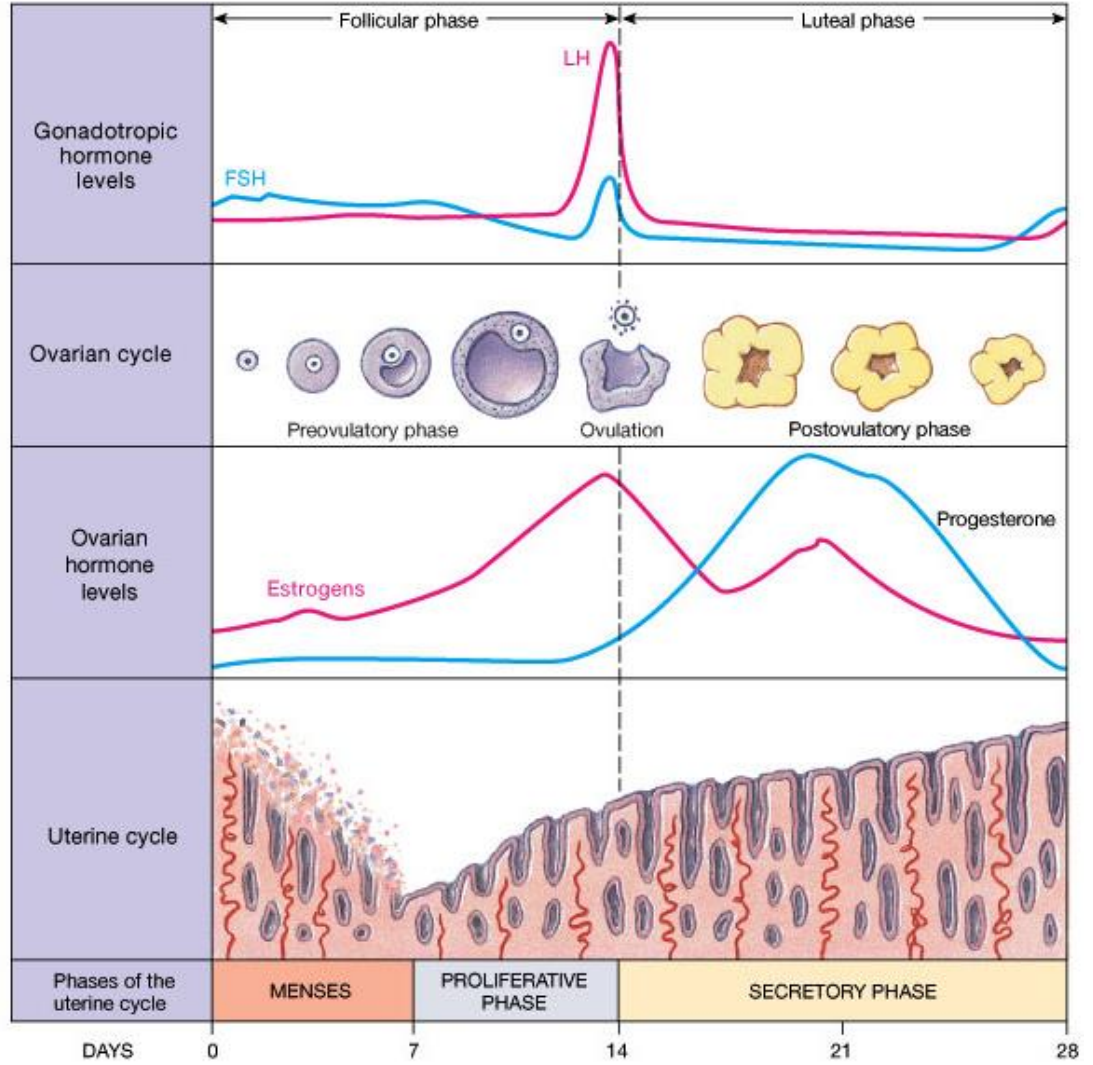
4.1.1.2. MENSTRUAL SİKLUS ve HORMONAL DEĞİŞİKLİKLER

Uterus, embriyonun gelişmesi ve büyümesi için özelleşmiş bir organ olup bu fonksiyonları yerine getirmek için endometriumda birtakım hazırlıklar yapar. Östrojen ve progesteron siklik değişimleri kontrol ederek endometriumun yapısını, büyümesini, değişmesini ve dökülmesini sağlar. Bu değişimde steroid hormonların yanısıra lokal parakrin ve otokrin faktörlerde rol alır. Lokal faktörlerin en önemli kaynağı olan lökositler; implantasyon, serviks açılması ve doğumda rol alır (Kayışlı ve ark, 2002).

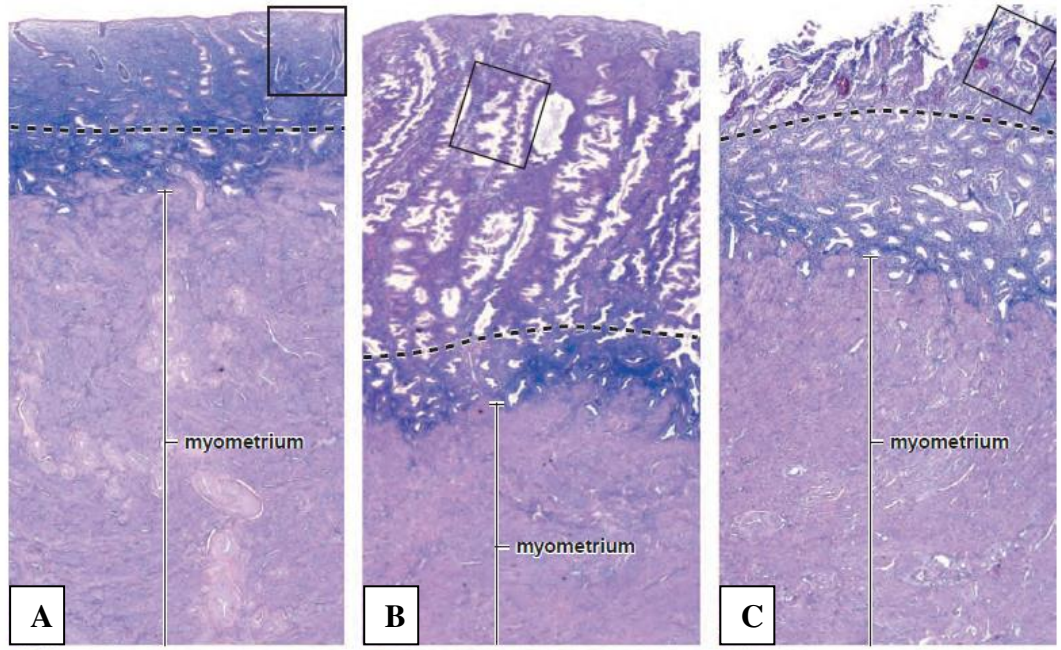
Menstrual siklus, reproduktif dönemde gebelik olmadığı durumda, 28 günde bir tekrarlayan ve yaklaşık beş gün süren morfolojik, fizyolojik ve hormonal değişikliklerdir. Menstrual döngü sıklığı ile doğurganlık arasında ilişki bulunur ve menstrual döngü bozukluğu olan kadınlarda üreme yeteneğinde azalma görülür (Koeppen ve Stanton, 2009). Menstrual fazda ortalama 35-50 ml kan kaybı oluşur. Pitüer bezin pars distalisinden salgılanan ve ovaryum steroid salgılarını düzenleyen gonadotropinler tarafından kontrol edilirler. Hipofiz, ovaryum folikülleri ve korpus luteum hormonlarının karşılıklı etkileşimleri sonucu, endometrium ve ovaryum siklik değişimler geçirir. Menstrual siklus, menstrual faz (1-4.gün), foliküler veya proliferatif faz (4-15.gün), luteal-sekretuar veya progestasyonel faz (15-27.gün), pre menstrual veya iskemik faz (28.gün) olmak üzere dört evreyi içerir (Ovalle ve Nahirney, 2013).

Siklik değişimlerde etkili hormonlar; hipofizden salınan, Folikül Uyarıcı Hormon (Follicle Stimulating Hormone-FSH), Luteinizan Hormon (LH), prolaktin ile ovaryumdan salınan östrojen ve progesterondur. Östrojen; uterus rejenerasyonunu uyarıp menstrual kanamadan sonra endometrium kalınlığını iki üç katına çıkararak büyümesini sağlarken, progesteron; endometrium salgı bezlerinin genişlemesini sağlayarak implante olacak embriyo için gerekli birçok maddenin salgılanmasına yardımcı olur. Endometrium fonksiyonals tabakasının nekroze olarak dökülmesi ve kanlanması başlanması menstrual siklusun birinci günüdür. Bazale tabakası ise, foliküler fazda endometriumu yeniden onarmak üzere korunur. Menstrual faz FSH etkisindedir ve ovaryumlarda foliküler büyümeyi sağlarken, foliküler faz östrojen etkisindedir ve endometrium rejenerasyonu gerçekleşirken bir yandan ovaryum folikülü matürasyonu gerçekleşir. LH'ın pik olmasıyla ovulasyon tetiklenir. Luteal faz, progesteron etkisindedir ve korpus luteum gelişimini uyarır. Korpus luteum tarafından üretilen progesteron, uterus bezlerinin gelişimini etkileyerek, uterus epitel

hücrelerinde glikojen birikimini ve spiral arterlerin uzamasını stimüle eder. Tüm bu endometriumdaki değişiklikler, embriyonun implantasyonu için optimal bir çevre sağlamaya yöneliktir (Şekil 7-8 ve Tablo 1) (Ovalle ve Nahirney, 2013).



Şekil 7: Uterus menstrual siklus fazları <http://asanafoods.com/blog/maca-effects-on-thyroid-hrt-and-menstrual-periods/>



Şekil 8: Menstrual siklusun foliküler, luteal ve menstrual fazı. Kesikli çizgi stratum fonksiyonale ve stratum bazaleyi ayırmakta. A; endometrium foliküler fazı. B; endometrium luteal fazı. Endometrium kalınlığı artmış ve bezler kıvrıntılıdır. C; stratum fonksiyonalisin büyük bir bölümü dejenere olup dökülmüştür (Ovalle ve Nahirney, 2013).

Tablo 1: Endometrial bez ve stromal dokunun siklus günlerine göre histolojik değişimi

Foliküler Dönem	Bez Özellikleri	Stroma Özellikleri
Erken Dönem (4-7.günler)	Kısa dar lümenli bezler, kübik epitel ve mitoz mevcut	Yoğun stroma yapısı içinde iğsi veya yıldızsı hücreler
Orta Dönem (8-10.günler)	Uzun hafif kıvrıntılı yapıda bezler, silindirik epitel ve mitoz mevcut	Değişken miktarda ödemli stroma ve mitoz mevcut
Geç Dönem (11-14.günler)	Kıvrıntılı yapıda bezler, silindirik epitel	Daha yoğun yapı içinde sık mitoz

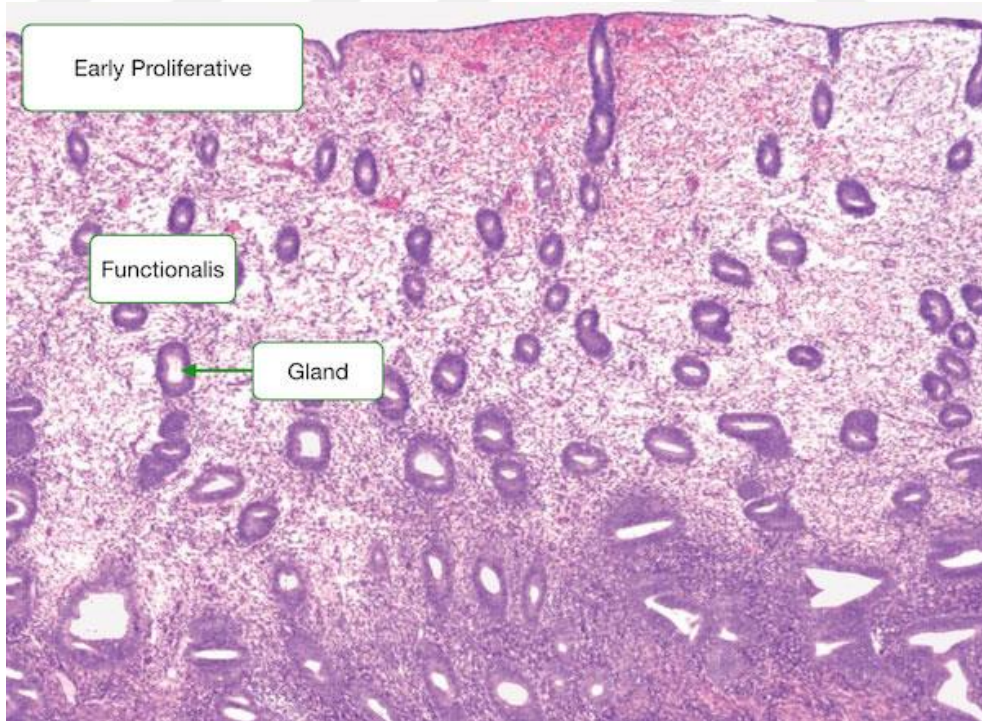
Luteal Dönem	Bez Özellikleri	Stroma Özellikleri
Erken Luteal Dönem		
16-17.gün	Subnükleer glikojen vakuollerinin görülmesi ve yaygınlaşması	Belirgin bir değişim yok
18-19.gün	Glikojen vakuollerinin lümene doğru kayması	Belirgin bir değişim yok
19-20.gün	Lümenlerde salgının artan şekillerde görülmesi	Belirgin bir değişim yok
Geç Luteal Dönem		
21-22.gün	Lümenlerde salgının artan şekillerde görülmesi	Yoğun ödem oluşması
23-24.gün	Değişen miktarlarda lümen salgısı ile birlikte epitelde vakuoller lümene kaynaşır	Spiral arteriyollerin belirginleşmesi ve çevrede predesidua oluşumu
25-26.gün	Değişen miktarlarda lümen salgısı ile birlikte epitelde vakuoller lümene kaynaşır	Yüzey epiteli altında predesidua nın başlayarak yaygınlaşması
27.gün	Bez epiteli tabanlarında	Fokal nekroz, belirgin
Pre menstrual Dönem	nükleer parçacıklar (apoptosis)	lenfositler
28.gün	Kıvrımlanmanın	Küçük damarlarda fibrin
Menstrual Dönem	korunduğu bezlerde parçalanma	oluşumu ve kanama başlangıcı

4.1.1.3. ENDOMETRİUM FOLİKÜLER FAZ

Bu evre östrojen bağlantılı graff folikül gelişimi ile karakterizedir. Graff folikül gelişimi ile 17 β -östrodiol ve inhibin B yüksek konsantrasyonlarda üretilir. Hipotalamus ve hipofizde, östrodiolün konsantrasyonunun artması, yüksek frekanslı dalgalar halinde LH salgılanmasını uyarak folikül gelişimi ve ovulasyonu

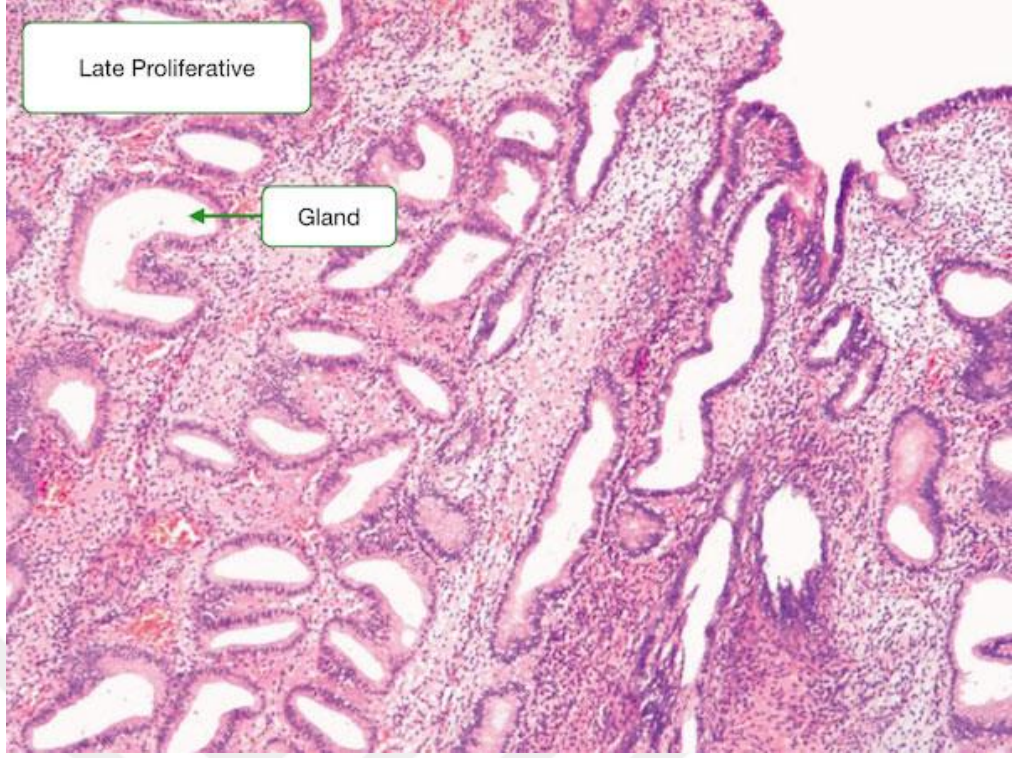
tetikleyerek FSH salgılanmasının azalmasına sebep olur. LH'nin pik yapmasından hemen önce kısa süreliğine azalan inhibin B ovulasyondan iki gün sonra seviyesi artar. İnhibin A ise FSH ve LH'nin pik konsantrasyonlara ulaştığı geç foliküler dönemde artarak luteal dönemin ortasında maksimum düzeye ulaşmadan önce kısa süreliğine azalır (Çelik, 2011).

Foliküler faz menstruasyondan hemen sonra başlayarak endometrium rejenerasyonunun gerçekleşmesi ile ovulasyondan bir iki gün sonra biter. Uterus bezlerinin bazal bölümlerindeki epitel gelişerek, dökülmüş mukozal yüzeyi örtmek üzere gelişir. Bezlerin prizmatik hücrelerinde yüksek oranda mitoz görülerek, stromadaki bağ doku hücreleri çoğalıp lamina propiye yeniden şekillendirilir. Uterus bezleri uzayarak sıkıca bir arada düzenlenir. Başlangıçta basit ve düz durumda olan bezler ile spiral arterler, bazaldan rejenere olmuş mukozal yüzeye doğru uzanırlar (Şekil 9). Geç foliküler fazda spiral arterler, iyice kıvrılarak sarmallar yaparlar. Yine bu evrede mitoz artışı ve epitel hücre yüksekliğinde artışla birlikte hücre çekirdekleri farklı seviyelerde görülür. Foliküler faz süresince endometrium kalınlığı 0,5 mm den 2-3 mm ye kadar kalınlaşır (Şekil 10) (Ovalle ve Nahirney, 2013).



Şekil 9: Endometrium erken foliküler faz histolojik görüntüsü

http://medcell.med.yale.edu/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php



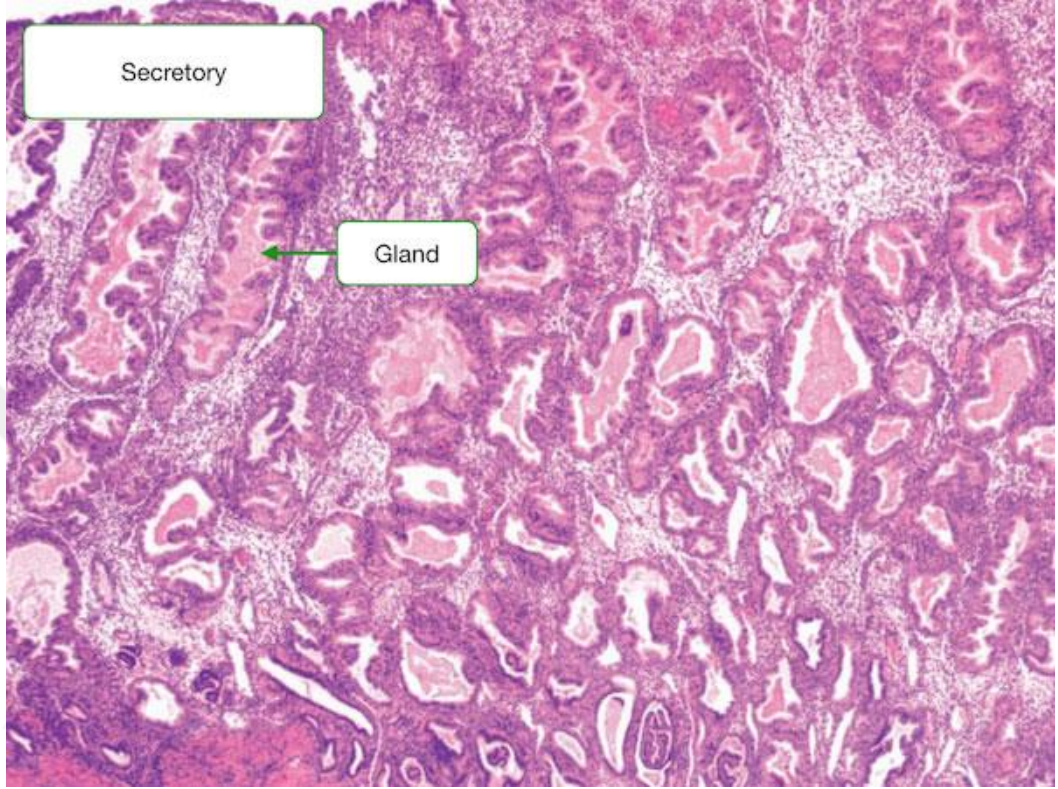
Şekil 10: Endometrium geç foliküler faz histolojik görüntüsü

http://medcell.med.yale.edu/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php

4.1.1.4. ENDOMETRİUM LUTEAL FAZ

Bu evre ovulasyondan hemen sonra, rüptüre folikülün granüloza ve teka hücrelerinin hızlı morfolojik dönüşüm geçirip korpus luteumu oluşturması ile başlayarak, menstrual siklusun 26-27. günlerinde biter. Korpus luteum tarafından östrojen ve progesteron salgılanır. Oositin fertilize olması ile özellikle progesteron etkisiyle endometrium implantasyona hazırlanır (Ross ve Pawlina, 2006). Progesteron tarafından uyarılan sekretuar aktivitenin ilk belirtileri, ovulasyondan iki üç gün sonra bez epitel hücrelerinde ve mukozal yüzeyde görülür. Yüzeyel tabakadaki ödemin kaybolması ile endometrium hafifçe büzülerek, epitel hücrelerinin yuvarlak çekirdekleri, tüm hücrelerde aynı seviyede ve üniform bir hal kazanır. Hücrenin bazal bölgesinde glikojen birimi olur. Mitotik aktivite bu evrede azdır. Glikojen 21-25. günlerde daha aktif salgılanır ve epitel hücrelerinin apikalinde lokalize olur. Bu evrede endometrial kalınlık, dört mm veya daha fazladır. Endometrium maksimum kalınlığa ulaşır. Uterus bezleri, tırtıklı testere görünümlü bir hal kazanır. Yüksek oranda glikojen ve glikoprotein içeren yoğun ve mukoid özellikteki sekresyonlar bezlerin lümenine verilir ve bu evrede epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinde baloncuklar şeklinde

görülür. Stromadaki hücreler, soluk renkli ve büyük, bezler dilate durumda ve spiral arterler endometrium yüzeyine yaklaşıktır. Gebeliğin gerçekleşmesi durumunda, stromal hücreler lipid ve glikojen depolayan desidual hücrelere dönüşürler (Şekil 11) (Ovalle ve Nahirney, 2013).



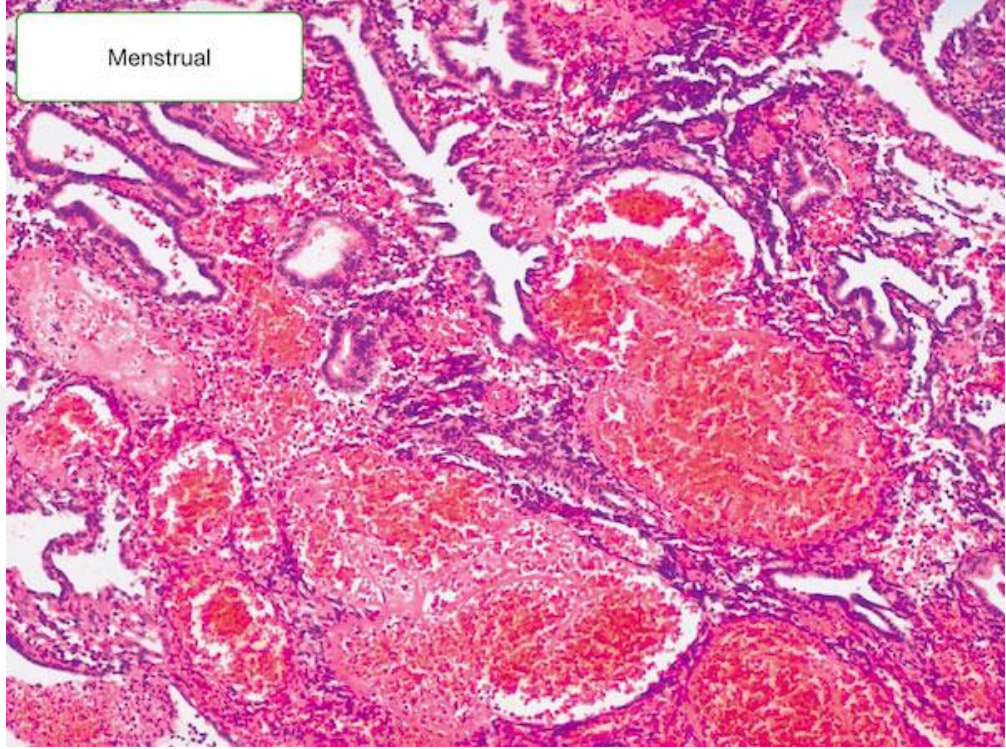
Şekil 11: Endometrium luteal faz histolojik görüntüsü

http://medcell.med.yale.edu/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php

4.1.1.5. ENDOMETRİUM MENSTRUAL FAZ

Ovaryumdan progesteron ve östrojen salgılarının azalması sonucu oluşur. Fertilizasyonun gerçekleşmediği durumda korpus luteum 10 gün aktif hormon üretir. Hormon düzeylerinde ani düşüşle birlikte stratum fonksiyonaleye kan desteğinde değişimler meydana gelir. Spiral arterlerin duvarlarındaki periyodik kasılmalar, stratum fonksiyonalenin iskemik hale gelmesine sebep olur. Stromadaki ödem azalması ve bezlerin salgılarının durması ile endometrium yükseklik olarak büzülür. İki gün sonra, kısa süreli kan akımı ve uzun süreli arteriyal kontraksiyon nedeniyle yüzey epiteli bozulup, kan damarları rüptüre olur. Uterin sıvı, kan ve stratum fonksiyonaleden dökülen stromal ve epitelyal hücreler vajinal akıntıyı oluşturur. Bu akım ile ven, arter ve bezlerin kopmuş uçları ortaya çıkar. Bu atılım, sadece stratum

bazale kalana kadar devam eder. Kan pıhtılaşması menstrual kanama periyodunda inhibe edilir. Venlerin açık uçlarında devamlı olarak kan sızıntısı olurken, arteriyal kan akımı, spiral arter duvarlarının gevşediği periyotta meydana gelir (Şekil 12) (Ross ve Pawlina, 2006).



Şekil 12: Endometrium menstrual faz histolojik görüntüsü

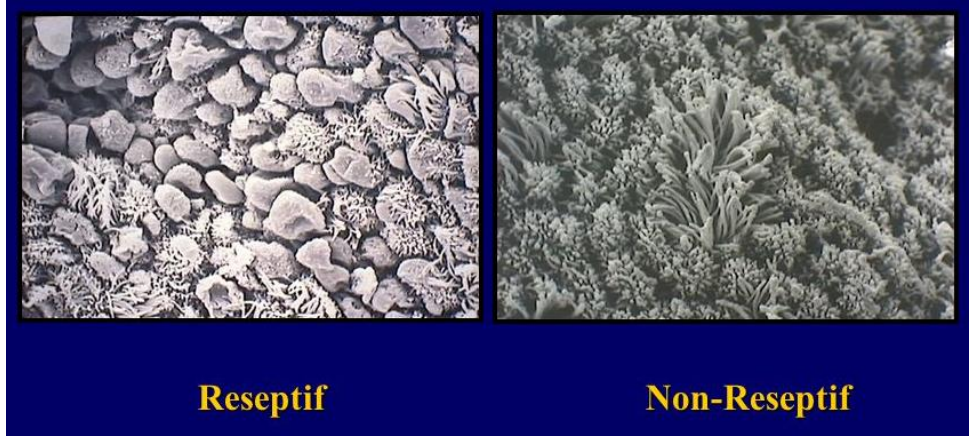
http://medcell.med.yale.edu/histology/female_genital_tract_uterine_cycle.php

4.2. İMPLANTASYON

İnsanda implantasyon süreci; oosit matürasyonunun erken dönemlerinde başlayan, embriyo ve endometrium arasındaki kompleks ve karmaşık bir ilişki ile kontrol edilmektedir (Emiliani ve ark, 2005). Embriyonun endometriuma gelerek zona pellucidasından (ZP) ayrılması (hatching) ile blastokistin dış tabakası olan trofoektodermin (TE) uterusun luminal epiteli (LE) ile etkileşime girdiği genel bir birliktelik safhasını gerektirir (Kimber, 2000). İnsan embriyosu, fertilizasyondan sonraki altıncı günde blastokist haline gelerek implantasyon sürecine girer. İnsan embriyosu 6-8 hücre aşamasındayken implantasyon yeteneği kazanır. İmplantasyonu takiben, plasantasyon olarak da isimlendirilen evrede, plasenta oluşumu ile gebeliğin sonuna kadar embriyoyu destekleyecek yapı kurulmuş olur (Parr ve Parr, 1989).

Endometrium ve embriyo, otokrin, parakrin ve endokrin etkileşimler ile implantasyona hazırlanır (Çelik, 2011). Bu hazırlık aşaması daha embriyo oluşmadan önceki fertilizasyon aşamasında başlar. Örneğin; ejakülatta bulunan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF), endometriumu uyarak implantasyon sürecine katkıda bulunur (Obermair ve ark, 1999). Başka bir örnek ise; fertilizasyondan yaklaşık iki gün sonra maternal dolaşımda saptanan Erken Gebelik Faktörü (Early Pregnancy Factor-EPF) embriyodan gelen sinyale yanıt olarak üretilir (Morton ve ark, 1992). Progesteron hormonu aracılığıyla korpus luteum da endometriuma gönderdiği sinyaller ile uterusu gebeliğe hazırlar.

Endometrium reseptivitesini belirleyen morfolojik ve biyokimyasal belirteçler bulunmaktadır. Endometriumda reseptif dönemde ortaya çıkan kübik hücre özelliğinde olan ve implantasyon için gerekli olan pinopodlar morfolojik belirteç olarak sınıflandırılır (Şekil 13).



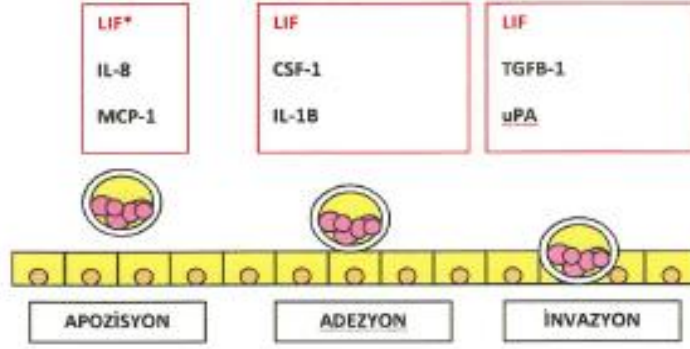
Şekil 13: Endometriumda pinopod ekspresyonu
<http://slideplayer.biz.tr/slide/2001974/>

Biyokimyasal belirteçler ise endometriumun işlevinin belirlenmesinde rol alarak endometrial fonksiyon testlerinde kullanılır (Tablo 2).

Tablo 2: Endometrium biyokimyasal reseptivite belirteçleri

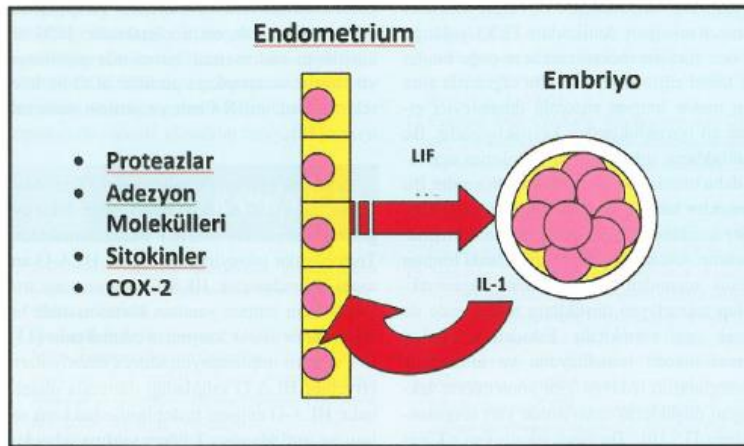
Hücre Adezyon Molekülleri	İntegrinler ($\alpha V\beta 3$), Trophinin/Tastin, Musin (MUC1)
Büyüme Faktörleri ve Sitokinler	Lökemia İnhibitör Faktör (Leukemia Inhibitory Factor-LIF), Koloni Stimüle Edici Faktör (Colony Stimulating Factor-CSF), Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor-EGF), IL-1
Siklinler	Siklin E, p27
Ekstraselüler Matriks Proteinleri	Fibröz proteinler (Kollajen, Elastin), Laminin, Fibronektin, Fibrillin, Netrin

İmplantasyon; apozisyon, adezyon ve invazyonu olmak üzere üç aşamayı içerir. Blastokistin embriyonik kutbunun endometriuma teması apozisyon, yapışması adezyon ve gömülme sürecinde invazyonu olarak tanımlanır. Her üç aşamada da etkili olan faktörler farklıdır (Şekil 14).



Şekil 14: İmplantasyon basamaklarında etkili olan bazı moleküller (Çelik, 2011).

Endometrium ile embriyonun embriyonal kutbu arasında karşılıklı parakrin bir etkileşim vardır. Özellikle endometriumdan salgılanan LIF; embriyonun endometriumu tanıması için mesaj özelliği taşıırken, Epidermal Büyüme Faktörü ve reseptörü (Epidermal Growth Factor EGF ve EGF-R) implantasyon sürecinde blastokistin gelişimi, trofoblast proliferasyonu ve hatching gibi olaylarda rol alır (Şekil 15) (Obermair ve ark, 1999).



Şekil 15: İmplantasyon sırasında embriyo ve endometrium etkileşimi (Çelik, 2011).

İmmün sisteme ait hücreler overlerde, fallop tüplerinde ve endometrium da otokrin veya parakrin etkilerle düzenleyici etki gösterirler (Jones ve ark, 2004). İmplantasyon immünolojik açıdan inflamatuvar bir reaksiyon olup, endometrium lenfosit topluluklarını içerir. Genel olarak, doğal öldürücü (Natural Killer) hücrelerin bir türü olan ve implantasyon anında görülen granüle lenfositler, makrofajlar ve T hücrelerinden oluşur (Johnson ve ark, 1999). Lökositlerin organizasyonu trofoblast ile implantasyon alanındaki etkileşime bağlı olarak değişiklik gösterir. Fetüs, anneden ve babadan gelen doku antijenlerini taşıdığı ve yabancı olduğu halde, çeşitli mekanizmalarla reddedilmez. Fetüse karşı geliştirilen bu tolerans geri dönüşümlüdür (Tablo 3).

Tablo 3: Fetüsün reddedilmemesi için geliştirilen tolerans mekanizması

- Trofoblastların mekanik bariyeri
- Maternal immün sistemin baskılanması
- Paternal HLA antijenlerine karşı özgün immunsupresyon (Paternal HLA antijenlerini tanıyan T lenfositler seçici olarak ortadan kaldırılır)
- Trofoblast yüzeyinde MHC class I moleküllerin yokluğu (HLA-A, B, C)
- T lenfositlerin nutrient yoksunluğuna maruz bırakılması

İmplantasyon da selüler adezyon molekülleri (CAM); integrin, kaderin, selektin ve Ig'ler de rol alır. CAM'lar yüzey ligandlarıdır ve glikoprotein yapıda olup, hücre-hücre adezyonuna aracı olurlar. İntegrinler hücre matriksine ve embriyolojik gelişim dahil birçok fizyolojik olaya katılırlar. Ca^{+2} bağımlı hücre-hücre adezyon mekanizmasından sorumlu olan E-kaderin ve N-kaderin ile P-selektin, L-selektin ve E-selektin de implantasyonda rol alan selüler adezyon molekülleridir. Bunlardan L-selektin ve E-kaderin en önemlisidir ve erken blastokistin uterin duvar ile ilişkisinde rol almaktadırlar (Tablo 4) (Salmani ve ark, 2008).

Tablo 4: İmplantasyonda rol oynayan faktörlerin kaynakları ve en etkili oldukları implantasyon dönemleri (Gökçimen ve Temel, 2004).

Faktör	Kaynak	Dönem I	Dönem II	Dönem III
Progesteron	Korpus luteum	+		
Östrojen	Korpus luteum	+		
HB-EGF	Endometriyum	+		
PGI-2	Endometriyum	+		
İntegrinler	Endometriyum	+		
Dezmozomal proteinler	Endometriyum	+	+	
Muc-1	Endometriyum	+		
Muc-4	Endometriyum		+	
H tip 1 antijeni	Endometriyum		+	
Le-y karbohidrat antijeni	Endometriyum		+	
	Blastokist		+	
HSPG	Endometriyum		+	
Trofinin				
Tastin	Endometriyum		+	
Bystin				
Kollajen IV	Endometriyum		+	
Laminin 2	Endometriyum		+	
Laminin 4	Endometriyum		+	
CD44 izoformları	Endometriyum		+	
TGF- β 1	Endometriyum	+		
IL-1				
IL-6	Endometriyum	+		
IGF-1				
IGF-2	Endometriyum	+	+	
IGFBP				
LIF	Endometriyum		+	

Musinler yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir ve implantasyonda rol alırlar. Ancak 14 tip insan musinlerinden sadece MUC1 ve daha az olarak da MUC6 endometriumda saptanmıştır (Gipson ve Inatomi, 1997). MUC1 implantasyonu inhibe eder ancak blastokist den eksprese olan faktörler, lokal olarak MUC1'in kaybolmasını sağlamaktadır (Brayman ve ark, 2004).

IL-1, IL-11, IL-6, IL-10, IL-15, IL-18, Koloni Stimüle Edici Faktör (Colony Stimulating Factor-CSF), Tümör Nekroz Faktör α (Tumour Necrosis Factor α -TNF- α), Transforming Büyüme Faktörü β (Transforming Growth Factor β -TGF- β) da implantasyonda rol alır (Dimitriadis ve ark, 2005). IL-1; monosit ve makrofajlarda üretilir. Hücre proliferasyonunu ve diferasyonunu düzenler. Endometrium ve embriyoda bulunarak birçok molekülün ekspresyonunu (IL-6, IL-8, LIF, TNF- α , COX-2, PGE2, PGF2 α ve reseptörleri EP1, matriks metalloproteinaz 1,9) regüle eder (Dominguez ve ark, 2002).

4.2.1. İNFERTİLİTEDE İMPLANTASYON PROBLEMLERİ

Reprodüktif çağdaki çiftlerin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye girmesine rağmen gebelik oluşmaması durumuna infertilite denir (Vayena ve ark, 2002). İnfertilite reprodüktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk altı ay

içinde, geri kalanların ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir (Wang ve ark, 2003).

İmplantasyon sorunlarının üçte biri embriyo anomalilerine, üçte ikisi de endometrial reseptivitenin yetersiz oluşuna bağlıdır (Simón ve ark, 1998). Tüp bebek tedavilerinde iyi kalitede embriyo transfer edilmesine rağmen; endometrit, endokrin anomaliler, immunolojik faktörler, konjenital veya sonradan gelişen anatomik nedenler implantasyon başarısızlığına sebep olmaktadır. Konjenital anomaliler ve kazanılmış hastalıklar endometrial reseptiviteyi etkileyerek tekrarlayan gebelik kaybı veya infertiliteyle kendini gösteren implantasyon problemlerine neden olmaktadır.

Maternal ve fetal dokular arasındaki otokrin, parakrin ve endokrin etkileşimler de düzensizlik veya eksiklik olduğu durumda implantasyon başarısızlığı görülür (Kodaman ve Taylor, 2004). İmplantasyon ovulasyon sonrası 7-10. günlerde, 48 saat gibi belirli zaman aralığında “implantasyon penceresi” olarak adlandırılan dönemde meydana gelir. Erken spontan düşük riski, bu dönemin sonlarında oluşan implantasyonlarda artmaktadır (Wilcox ve ark, 1999). Bu dönemin dışında ise endometrium embriyo için reseptif değildir ve kabul edici özellik göstermez (Hoozemans ve ark, 2004).

Apozisyon, adezyon ve invazyon basamaklarında reseptiviteyi belirleyen ve etkili olan LIF'in endometrium tarafından salgılanmaması veya özellikle implantasyon penceresi döneminde olmaması implantasyon başarısızlığına sebep olur. Öte yandan, LIF'in fallop tüplerinde ekspresyonunun artması burada endometriumu taklit eden implantasyon penceresinin oluşmasına ve dış gebelik oluşumuna neden olabilir (Wallach ve Vlahos, 2004).

Başarılı implantasyon trofoblast etrafındaki lokal immünosüpresyonlara bağlıdır. Steroid hormonların etkisi altında, HOX ve LIF gibi endometrial faktörler implantasyonu regüle eder. Bu gibi faktörlerin eksikliğinde veya yokluğunda implantasyon başarısızlığı görülür (Hannan ve Salamonsen, 2008). Menstrüel siklus boyunca birçok endometrial gen ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir. Örneğin; endometriozis veya submüköz myoma gibi durumlarda gelişen HOX geni disregülasyonu, implantasyon defektlerine yol açabilir (Talbi ve ark, 2006). $\alpha V\beta 3$

integrinin açıklanamayan infertilite, endometriozis ve polikistik over sendromu olgularında ekspresyon ifadelerinde farklılık saptanmıştır (Apparao ve ark, 2002).

Ovaryan hormon olan östrojenin implantasyonda önemli bir rolü vardır. Östrojen, implantasyonda doğrudan ya da dolaylı etki gösteren moleküller (sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinazlar, adezyon molekülleri, ECM komponentleri) üzerinde etki göstererek başarılı bir implantasyonu etkileyebilir (Minas ve ark, 2005).

İnfertilite olgularının yaklaşık %10'unda, tekrarlayan düşük olgularının ise %60'ında bir neden belirlenemeyip bunun implantasyon penceresi dönemine rastlamamasından kaynaklandığı bilinmektedir. Bu olgularda, embriyo ile endometrium arasındaki iletişimde sorunlar meydana getiren erken implantasyon ve fetüse karşı oluşabilecek immün yanıtın engellenemediği geç implantasyon görülür.

4.3. EPİTELİYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ

Epitelyal mezenkimal geçiş, hücrelerin ve hücreler arası matriks elemanlarının yapısal ve biyokimyasal değişim geçirdiği fizyolojik ve patolojik bir olaydır. Epitelyal mezenkimal geçiş sürecinin tamamlanması için; bazal membran yapısının değişmesi, bozulması ve epitel hücrelerinin bazal membran altındaki gevşek bağ dokusu içine göç etmeleri ve hücreler arası matriks elemanlarının üretiminde büyük oranda artış olması gerekmektedir (Kalluri ve Neilson, 2003).

Epitelyal mezenkimal geçiş sürecinde etkili ve bu sürecin aşamalarını tanımlamada etkili birçok belirteç vardır (Tablo 5).

Tablo 5: Epitel mezenkim geçiş belirteçleri (Zeisberg ve Neilson, 2009).

KAZANILAN BELİRTEÇLER		AZALAN/KAYBOLAN BELİRTEÇLER	
Epitel Mezenkim Geçiş Tipi		Epitel Mezenkim Geçiş Tipi	
Hücre Yüzeyi Proteinleri			
N-kaderin	1,2	E-kaderin	1,2,3
OB-kaderin	3	ZO-1	1,2,3
α5β1-integrin	1,3		
α5β6-integrin	1,3		
Syndecan-1	1,3		
Hücre İskeleti Proteinleri			
FSP-1	1,2,3	Sitokeratin	1,2,3
α-SMA	2,3		
Vimentin	1,2		
β-katenin	1,2,3		
Hücreler Arası Matriks Proteinleri			
Tip 1 kollajen	1,3	Tip 4 kollajen	1,2,3
Tip 2 kollajen	1,3	Laminin 1	1,2,3
Fibronektin	1,2		
Laminin 5	1,2		

Kaderinler, tüm dokularda hücreler arası kohezyonu koruyan transmembran adezyon proteinleridir (Shashikanth ve ark, 2015). Hücreler arasındaki bağlantıların azalması, tümör invazyonu ve metastaz gibi bazı malign özelliklerle ilişkilidir. E-kaderin; kalsiyum bağımlı, post-golgi ekzositozu ile bazolateral hücre yüzeyine iletilen hücre yapışma proteindir (Lock ve ark, 2005). Epitel hücrelerinin hücre-hücre etkileşimlerini, hareketlerini ve çoğalmalarını düzenleyen mekanizmalara katılırlar. N-kaderin; olgun glutamaterjik sinapsların pre ve postsinaptik membranlarında eksprese edilen sinaptik aralık boyunca hücre dışı alanların homofilik etkileşim yoluyla transsinaptik yapışmaya aracılık eden proteinlerdir (Pielarski ve ark, 2013). N-kaderin, hücre-hücre bağlantısının yanısıra hücre polaritesinin düzenlenmesinde de rol alarak hücre göçünü etkileyebilen hücre içi sinyalleri iletebilir. Bu kaderin aracılı sinyaller

epitelyal mezenkimal geçişte hücrelerin göç yönünü belirler (Pégion ve Manneville, 2012).

Vimentin; özellikle mezenkimal hücrelerde bulunur. Hücre iskeleti ağını oluşturan tip III ara filamenttir. Hücre çekirdeğinin periferinde bulunarak hücre zarı üzerine, endoplazmik retikuluma ve mitokondriye ya lateral ya da terminal olarak bağlanma sergiler. Hücrelere mekanik destek sağlanmasında, organel yerleşiminde, hücre göçü ve adezyonunda, hücre sinyal iletiminde rolleri bulunur (Pérez ve ark, 2015). Epitelyal mezenkimal geçiş sırasında ifade seviyesindeki artış, kanser hücrelerindeki mekanik bütünlüğü korumak için oluşturulan hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile ilişkilidir (Liu ve ark, 2015).

Düz kaslarda ve miyoepitelyal hücrelerden kaynaklanan tümörlerde ifade edilen α -SMA hücre iskeleti proteindir. Aktinler, tüm ökaryotik hücrelerde yüksek oranda korunan proteinlerdir. Aktin filamentleri, hücre iskeletinin bir parçasını oluşturarak hücre şekli ve hareketinin düzenlenmesinde rol oynarlar. α -SMA gelişimsel olarak düzenlenmiş ve dokuya spesifik bir şekilde ifade edilen sitoplazmik aktindir (Kalluri ve Neilson, 2003). Miyofibroblastlar ile ilişkili α -SMA, kanser hücrelerinin ilerlemesi ve metastazında önemli rol oynarlar (Ding ve ark, 2014).

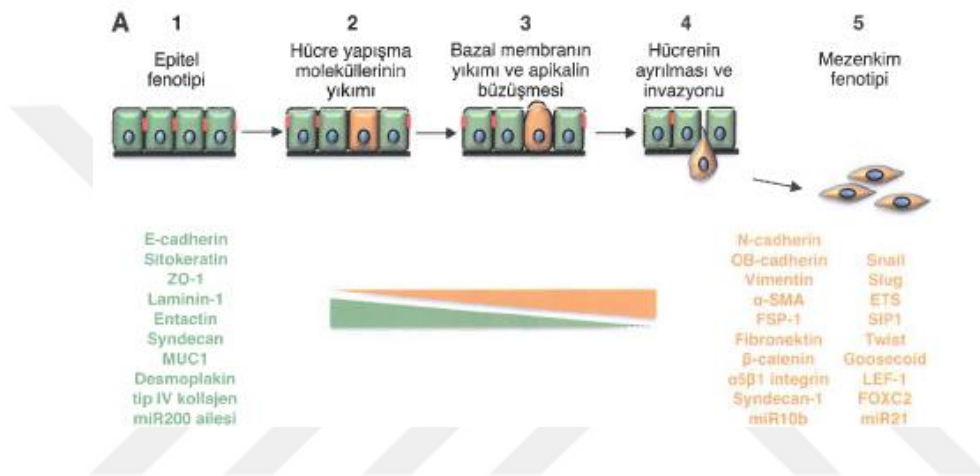
Heparan sülfat ve kondroitin sülfatı taşıyan, hücre iskeletini interstisyel matrise bağlayan hücre yüzeyi proteoglikanı olan Syndecan-1, çoğunlukla tek tabakalı ve çok tabakalı epitel hücreleri ile plazma hücreleri tarafından eksprese edilir. Epitelyal mezenkimal geçiş sırasında ifade seviyesi artar. Kanser hücre çoğalması ve invazyonunda, anjiyogeneze rol oynar (Teng ve ark, 2012).

4.3.1. İMPLANTASYON, EMBRİYOGENEZ ve ORGAN GELİŞİMİNDE GÖRÜLEN EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ (TİP 1)

Embriyo gelişim sürecinde epitel hücreleri mezenkim hücrelerine dönüşerek, gevşek bağ dokusu matriksi içinde kutuplaşmayan, hareketli hücrelere farklılaşır. Trofoblast hücrelerinin implantasyondan sonra yayılımcı sinsityotrofoblastlara dönüşmesi, gastrülasyon sırasında epiblast tabakasındaki hücrelerin mezoderm tabakasını oluşturması veya nöral kristadan kökenli nöroektoderm hücrelerinin mezenkim hücrelerine dönüşümü ve göçü, embriyonik hayatta görülen epitelyal mezenkimal geçiştir. İnsanda ilk epitelyal mezenkimal geçiş 14-15. günde gerçekleşir

ve oluşan doku birincil mezenkim olarak adlandırılır. İkinci epitelyal mezenkimal geçiş yaklaşık 10 gün sonra gerçekleşerek, paraksiyel mezoderm türevlerinin ortaya çıkmasına öncülük eden ikincil mezenkim oluşur (Can, 2014) (Şekil 16).

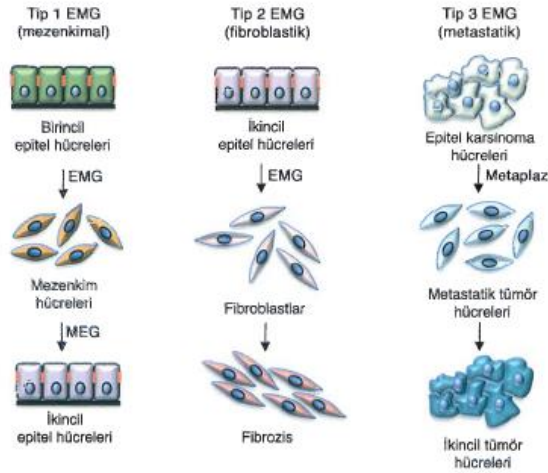
İmplantasyon ve plasenta, epiblast hücrelerindeki epitelyal mezenkimal geçiş ile oluşur. Primitif çizgi boyunca yer alan hücreler apikal bazal kutuplaşmaları olan E-kaderin ifade eden hücrelerdir. Bu hücrelerin invajinasyonu, mezoderm tabakasının oluşumunu başlatır. Embriyogenez aşamasında mezodermin oluşumu tip 1 epitelyal mezenkimal geçiş örneğidir (Can, 2014).



Şekil 16: Tip 1 epitelyal mezenkimal geçiş de görülen hücresel dönüşüm basamakları (Can, 2014).

4.3.2. DOKU ONARIMI ve ORGAN FİBROZİSİNDE GÖRÜLEN EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ (TİP 2)

Bazı epitel dokularında görülen fibrozis, sitokinler ve fibroblastlar tarafından salgılanan kollajen, tenascin, laminin, elastin gibi hücrelerarası matriks bileşenleri aracılığıyla gerçekleşir. Tip 2 epitelyal mezenkimal geçiş daha çok bağırsak, böbrek, akciğer, karaciğerde görülür ve ikincil epitel hücrelerinin mezenkim hücrelerine dönüşümü olarak tanımlanır (Şekil 17) (Zeisberg ve ark, 2008).



Şekil 17: Hedef hücreye göre epitelyal mezenkimal geçiş tipleri (Can, 2014)

4.3.3. KANSER İLERLEMESİ ve METASTAZDA GÖRÜLEN EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ (TİP 3)

Anjiyogenez ve epitel hücrelerinin aşırı bölünmesi, epitel hücresi kökenli kanserlerin başlangıcı olarak kabul edilir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Hücrenin yayılımcı özelliği bazal membran istilasını ile ortaya çıkarak, tümörün yaşamı tehdit eden seviyeye ulaştığını göstermektedir.

Tip 3 epitelyal mezenkimal geçiş gösteren hücreler tipik olarak primer tümör gibi davranırlar, daha sonraki aşamada invazyon metastaz aşamasına girerler. Yani sırasıyla damar içine yayılım, dolaşım boyunca taşınım, damar dışına sızma, mikro metastaz oluşumu ve kolonileşme görülür (Fidler ve Poste, 2008).

4.4. İKİ BOYUTLU KÜLTÜR

Hücre kültürü, izole hücre popülasyonlarının pek çok fizikokimyasal ve fizyolojik değişkenlerden uzak olarak incelenebildiği bir ortamdır. Hücre kültürü; kanser araştırmalarında, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler ve biyolojik çalışmalarda, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku ve deri mühendisliğinde, aşı üretimi vb. çalışmalarında kullanılır (Vunjak ve Freshney, 2006).

Hasta hakları, hayvan hakları, hayvan refahı gibi etik kavramlar göz önüne alındığında *in vitro* testler ayrıcalık kazanmıştır. Hücre kültürü araştırma laboratuvarı, çeşitli hücrelerin *in vitro* kültürlerini yaparak araştırmacılara kök hücre, hücre

mekaniği çalışmaları gibi konularda hücre içi ve hücreler arası biyokimyasal olayların moleküler düzeyde incelenebilmesi için devamlı olarak hücrelerin temin edilmesi ve bu hücrelere istenilen deneysel uygulanmaların yapılması için fırsat sağlamaktadır (Hakeri, 2006).

Hücre kültüründe çevre şartlarının kontrolü mümkündür; pH, ısı, osmotik basınç, O₂, CO₂ gibi değerlerle karakterize fizikokimyasal ortam kontrol edilebilir. Numunenin homojenitesinin karakterizasyonu mümkündür. Doku numuneleri heterojendir ve orijininin uzaklaştıkça özelliklerinde değişimler olur. Ancak aynı pasaj düzeyinde ve özellikle sıvı azotta muhafaza ile bu sorun çözülebilir. Belli periyotlarla ve yapılacak kontroller ile örneklerin homojenitesindeki olası sapmalar belirlenebilir. Hücre kültürünün tekrarlanabilirlik oranı yüksektir. İstatistik değerlendirmeler kolaylıkla gerçekleştirilebilir. *In vivo* uygulamalarda bu konuda önemli sınırlamalar mevcuttur. Ayrıca hücre kültürü çalışmaları ekonomiktir. Kùltürler, doğrudan düşük dozda ve kesin konsantrasyondaki re-ajanlar ile karşılaştırıldığından hücre ile doğrudan temas eder. Dolayısıyla *in vitro* enjeksiyonlarda gerektiğinden çok daha az miktarda maddeye gereksinim vardır (Vunjak ve Freshney, 2006).

Ancak hücre kültürünün dezavantajlarında mevcuttur; deneyim gereklidir, katı aseptik şartları vardır, hücrelerin orijininde eğer ayırıcı özellikler kaybolursa kültüre hücreleri fonksiyonel doku hücrelerinden ayırmak zorlaşır. Karakterizasyon için stabil belirteçlere ihtiyaç vardır ki bu belirteçler için de modifiye kültür şartları gereklidir. Bilinen dezavantajlarından dolayı her ne kadar alternatif yöntemler geliştirilmekteyse de henüz hücre kültürü teknolojisinin yerini tam olarak alabilecek bir teknik tanımlanamamıştır (Doyle ve Griffiths, 2000).

Besiyerleri (vasat, medium) kültür ortamının en önemli bileşeni konumunda olup, hücrelere besin, büyüme faktörleri, hormonlar gibi büyümeyi uyaran ajanlarının yanı sıra kültür ortamının pH'ını ve osmotik basıncının regülasyonunu da sağlar. Besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli mikro çevreyi sağlar. Kùltürde fizikokimyasal şartların (pH ve osmolarite) devamlılığını, hücrelerin ve hücre ürünlerinin sentezi için nutrient sağlar.

Besiyerlerinin tarihsel gelişimine bakıldığında, ilk hücre kültürü deneyleri taze doku özütleri ve vücut sıvıları ile gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, zaman içerisinde standardizasyon ve besiyeri kalitesi gibi artan ihtiyaçlar doğrultusunda tanımlanmış ticari besiyerlerinin kullanımı önem kazanmıştır. Hücre kültüründe *in vitro* koşullarda hücrelerin sentezleyemediği esansiyel nutrientler vardır bunlar; inorganik iyonlar, aminoasitler, vitaminler, enerji kaynakları ve erimiş gazlardır. Hücrelerin canlılıklarının devamlılığı için ticari besiyeri içeriklerine hücrelerin sentezleyemediği esansiyel nutrientler eklenmiştir.

In Vitro koşullarda hücrelerin sentezleyemediği inorganik iyonlar mevcuttur; Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , P^+ , HCO_3 , Cl^- , SO_4 'dır. Esansiyel aminoasitler; L-lizin, L-metionin, L-fenilalanin, L-treonin, L-tirozin, L-valin, L-arjinin, L-sistin, L-glutamin, L-histidin, esansiyel olmayan aminoasitler; L-pirolin, L-glisin, L-serin, L-alanin, L-asparajin, L-aspartik asit, vitaminler; riboflavin, tiamin, kolin, inositol, biotin, folik asit, nikotinamid, piridoksin, enerji kaynakları; D-glukoz, L-glukoz, erimiş gazlar; O_2 ve CO_2 'dir (Tablo 6).

Tablo 6: *In Vitro* koşullarda hücrelerin sentezleyemediği inorganik iyonlar

İnorganik İyonlar	Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , P^+ , HCO_3 , Cl^- , SO_4
Esansiyel Aminoasitler	L-lizin, L-metionin, L-fenilalanin, L-treonin, L-tirozin, L-valin, L-arjinin, L-sistin, L-glutamin, L-histidin
Esansiyel Olmayan Aminoasitler	L-pirolin, L-glisin, L-serin, L-alanin, L-asparajin, L-aspartik asit
Vitaminler	Riboflavin, Tiamin, Kolin, İnositol, Biotin, Folik Asit, Nikotinamid, Piridoksin
Enerji Kaynakları	D-glukoz, L-glukoz
Erimiş Gazlar	O_2 , CO_2

Hücre kültüründe kullanılan serum, besleyici ve çoğalmayı sağlayıcı özelliğe sahip ve vasat bileşimine sudan sonra giren en önemli maddedir. Serum, hücre membran geçirgenliğini kontrol ederek lipidlerin, enzimlerin, mikro gıdaların ve iz

elementlerin hücre içerisine taşınmasında rol alır. Toksinleri bağlayan tampon özelliği vardır. Tripsin ve proteaz gibi enzimleri nötrleyerek, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini yönlendirir. Doku ve hücre kültürlerinde kullanılan hayvan orjinli serumlara örnek olarak; Fetal Buzağı Serum (Fetal Calf Serum-FCS), Yeni Doğmuş Buzağı Serum (New Born Calf Serum-NBCS), Buzağı Serum (Calf Serum-CS), Yetişkin Sığır Serum (Bovine Serum-BS), At Serum (Horse Serum-Hos), İnsan Serum (Human Serum-HS) verilebilir. Serum içeriğinde; proteinler, polipeptitler, hormonlar, nutrientler, metabolitler, mineraller ve iz elementler bulunur.

Serumda en çok bulunan bileşik proteinlerdir (albümin, globülin, fibrinojen, α -2 makroglobülin, fötin, transferin). Proteinler, lipoprotein/glikoprotein şeklinde hormonların yapısında ve bazı minerallerle birlikte bulunabilirler. Bu nedenle serum içindeki protein miktarının tespiti zordur. Serum içeriğinde bulunan protein yapıdaki albümin; plazma osmotik basıncının devamlılığını sağlar, globülinler; serum içeriğinde immunglobulin halinde bulunurken, fibrinojen; hücre-hücre, hücre-yüzey bağlanmasını sağlar. Serum içeriğindeki polipeptid yapıda büyüme faktörleri bulunur. Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor-PDGF), Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor-EGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin Like Growth Factor-IGF). Serum içeriğindeki hormonların (insülin, hidrokortizon) ise hücreler üzerinde çeşitli etkileri vardır. Örneğin; insülin, hücrede glikoz ve aminoasit artışını sağlar. Bazı büyüme faktörleri insülin reseptörlerine bağlanabilir ve glikoz artışını düzenleyebilir. Hidrokortizon ise özellikle fetal serumda bulunur ve hücre matriks bağlantısını artırıcı özelliği bulunur (Tablo 7) (Doyle ve Griffiths, 2000).

Tablo 7: Serum içeriğinde bulunan bileşikler

Protein	Albümin, Globülin, Fibrinojen, α -2 Makro Globülin, Fötin, Transferin
Büyüme Faktörleri	PDGF, EGF, IGF
Hormonlar	İnsülin, Hidrokortizon

Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri çeşitlilik göstermektedir. Earl's Balanced Salt Solution (EBSS), Earl's Medium Essential Medium (EMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) hücre kültüründe kullanılan bazı besiyerleridir. Ancak en çok

kullanılanlar; DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium) çoğu memeli hücrelerinin üremesini desteklerler, RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) memeli hücreleri için kapsamlı olarak genişletilmiştir. DMEM-F12 (Dulbecco's Modification of Eagles Medium Nutrient Mixture F12) besleyici karışım F12'nin DMEM besiyerine ilavesidir ve memeli hücre kültüründe daha fazla güvenilirlik, tutarlılık ve kontrolü sağlar. Ham's F12 (Hamster Ovary Nutrient Mixture F12) memeli hücre kültüründe kullanılan bir başka besiyeridir. M199 (Medium 199 with Earle's Salts) da en çok kullanılan besiyerleri içindedir. α -MEM (α -Modification of Eagles Medium) besiyerine esansiyel olmayan aminoasit, sodyum pirüvat ve ek vitaminlerin eklenmesi ile oluşturulmuş ve daha çok primer kültür için kullanılan besiyeridir (Freshney, 1986).

Hücre kültüründe canlı bir organ veya dokudan çeşitli yöntemler ile elde edilmiş hücrelerin kültürüne primer kültür denir. Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürleridir. Hücre hatları ise; primer hücrelerin spontan mutasyonu, kimyasal madde uygulanması ile mutasyon oluşturularak elde edilen ölümsüz hücre tipleridir (Doyle ve Griffiths 2000).

Hücre kültüründe kullanılan ve iyon bileşimi bakımından ekstraselüler ortama yakın olup hücre çoğalmasını destekleyen pH indikatörü fenol kırmızısı, çoğu besiyeri içerisinde mevcuttur. Yapılan çalışmalarda fenol kırmızısının östrojeni taklit etme özelliğinde olduğu bildirilmiştir.

4.4.1. İKİ BOYUTLU DESTEK MATERYALLERİ

Hücreler *in vitro* ortamda üreyebilmeleri için bir biyomalzeme üzerinde tek tabakalı olarak (monolayer) olarak tutunmak zorundadırlar. Hücrelerin çoğalmaya başlaması için önce yüzey üzerine tutunup yayılması gereklidir. Dolayısıyla hücre kültürünün başarılı olabilmesi için her bir hücre tipinin tutunmasına, yayılmasına ve üzerinde doğal fonksiyonlarını yerine getirmesine olanak veren substrat malzemesinin seçimi çok önemlidir. Bu tip, üremek için tutunmaya gereksinim duyan hücrelere “tutunma bağımlı, monolayer” hücreler denir. Uzun süre kültüre edilerek transforme olmuş, çoğunlukla kanser hücrelerinden elde edilmiş bazı hücreler tutunma bağımlılıklarından kurtularak süspanse (bir destek materyaline ihtiyaç duymadan) halde üretilebilirler, ancak çoğu hücreler tutunma bağımlı oldukları için substrat

seçimi kültüre başlamadan önce verilmesi gereken en önemli kararların içinde gelir (Doyle ve Griffiths, 2000).

A) Hücre Kültüründe Kullanılan Klasik Biyomalzemeler

Cam: Kültürler için ilk kullanılan malzemedir ancak kullanımı oldukça azalmıştır. Avantajları arasında ucuz olmaları ve kolay sterilize edilebilmeleri gelir. Yüzeyinin ve optik özelliklerinin düzensizlik gösterebilmesi açısından fazla tercih edilmezler.

Plastik: Tek kullanımlık polistren kültür kapları günümüzde rutin hücre kültürü çalışmalarında en sık kullanılan araçlardır. Kullanışlı optik özellikler ve düzgün bir kültür yüzeyine sahiptirler. Polistren hidrofobik bir polimer olmasına rağmen, üretimden sonra uygulanan korona atışı, gaz plazma gibi yüzey işlemleri ile veya kimyasal olarak hücre tutunmasına ve büyümesine elverişli hale getirilir. Plastik yüzeylerde yüksek serum içeriği kullanılması, yüzeye bağlanan protein miktarını artırarak yüzey özelliklerini maskeleyebilir.

Kültür kaplarında polistren en yoğun kullanılan ve ucuz plastik olmakla beraber, polivinilklorit, polikarbonat, politetrafloretilen, melinex, thermanox gibi çeşitli polimerlerde hücre büyümesi için kullanılabilir.

B) Geçirgen Zar Biyomalzemeler: Yarı geçirgen zarlar kimyalarına ve gözenek büyüklüğüne bağlı olarak gazların, suyun ve farklı küçük moleküllerin geçişine izin verirken; hücreler, bazı proteinler ve benzeri büyük moleküller için bariyer oluştururlar. Hücreleri bu tarz substratlar üzerinde büyütme O_2 , CO_2 ve besinlerin hücrelere daha rahat difüze olmalarını sağlarken bir yandan da epitel hücreleri gibi ortam geçirgenliğine duyarlı hücreler için doğal habitatlarına yakın destek substratları sağlamış olurlar.

C) Yüzey Kaplamaları: Özellikle cam substratların hücre besiyeri ortamıyla yıkanması hücre kültürü verimini artırır. Bunun nedeni olarak, hücrelerin yüzeyde oluşturduğu mikro/nano desenleme veya yüzeyden temizlenemeyen çok az miktarda kalıntının neden olduğu düşünülmektedir. Benzeri etkileri daha kontrollü ve sentetik olarak elde etmek için günümüzde kültür kabı yüzeylerine farklı kaplamalar yapılmaktadır. En fazla kullanılan 2D kültür destek materyalleri; polilizin, kollajen,

jelatin, fibronektin, laminin, iyon implantasyonu ve ekstraselüler matriks kaplamalarıdır.

Polizin: Poly-L-lizin ve Poly-D-lizin formları vardır. Polizin yüzey yükünü değiştirerek hücre tutunmasını güçlendirir. Özellikle serumsuz kültür vasatları kullanılacaksa tercih edilmelidir.

Kollajen ve Jelatin: Kollajen vücudumuzda pek çok dokunun ekstraselüler matriksinde bulunan bir proteindir. Jelatin ise kollajenin denatüre edilmiş formudur. Bu iki maddenin substrat yüzeyine kaplanması hücrelerin doğal ortamlarına benzerlik yaratarak, hücre fenotiplerinin korunması açısından olumlu sonuçlar verir.

Fibronektin ve Laminin: Kollajen ve jelatin gibi fibronektin ve laminin de ekstraselüler matriks proteinleridir ve hücrelerin tutunmasını güçlendirerek hücrelerin fonksiyonlarını devam ettirmelerini desteklerler.

Matrijel: İlk defa 1972'de Hynda Kleinman tarafından belgelenmiştir. Jelatin, laminin, kollajen vb. gibi proteinleri içeren organik bir karışımdır. Bu karışım içeriği itibariyle, *in vivo* ortamdaki ECM yapısına benzediği için, hücrelerin laboratuvar koşullarında büyütülmesinde substrat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca matrijel bazal membran yapısında olup zengin büyüme faktörleri ve enzimler içerir.

İyon İmplantasyonu: Daha çok ileri teknolojik cihazların yüzey modifikasyonunda kullanılan bu teknik, son yıllarda hücre kültürü substratlarının yüzeylerini modifiye etmek için kullanılmaktadır. Yüzeye hücre tutunmasını ya da fonksiyonlarını destekleyici bazı iyonların kaplama oluşturmada, yüzey molekülleri arasına yerleştirilmesi esasına dayanır.

Ekstraselüler Matriks: Destekleyici substrat üzerinde ilgili bir hücre tipini kültüre edip o hücrelerin ürettiği ekstraselüler matriks üzerinde ikinci bir hücre grubunu kültüre etme esasına dayanır. Hücrelerin gereksinim duyduğu doğal ortamına diğer kaplamalara oranla daha yakın olması açısından avantajlıdır. Ancak hem ekstra maliyet ve iş gücü gerektirmesi, hem de oluşan ürünün daha az kontrollü olmasından dolayı sonuçlarda farklılıklar yaratabilmesi açısından kullanım zorluğu ve kısıtlılığı vardır.

D) Yüzey Desenleme: Hücre-hücre ve hücre-biyomalzeme etkileşimlerinin incelenmesi, hücresel fonksiyonların ve mikro çevresel koşulların hücre fenotiplerini nasıl etkilediğinin araştırılmasında kullanılır. Bazı hücreler, *in vitro* koşullarda çoğalabilmek, üreyebilmek, canlılıklarını devam ettirebilmek ya da farklılaşabilmek için doğal mikro çevrelerine benzer yüzey desenleme ile oluşturulmuş kültür substratlarına ihtiyaç duyarlar. Örneğin; kemik hücrelerinin kaba pürüzlü yüzeylerde, sinir hücrelerinin ise ince fiber ağ içeren yüzey desenleme ile oluşturulmuş kültür plaklarında daha sağlıklı büyüdükleri gösterilmiştir. Bu şekilde desenlenmiş yüzeyler üzerinde, fotolitografik teknikler, lazer litografi ve soft litografik teknikler başlıca mikro desenleme yöntemleri arasındadır.

4.5. ÜÇ BOYUTLU KÜLTÜR

Hücre kültürü biyoloji, tıp ve genetik alanlarında çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Çalışılan materyal de hücre olduğundan *in vivo* ya en yakın sonuçlar elde edilmelidir. Ancak rutinde kullanılan 2D kültür sistemleri tam olarak hücrelerin özelliklerini yansıtamamakta ve yaşam döngülerinin her aşamasında gereken boyutsal ve zamansal organizasyona olanak vermemektedir. 3D kültür ortamında, *in vivo* da olduğu gibi hücre zarı ECM ile tam bir temas halindedir oysa ki 2D kültürde hücre zarının sadece bir kısmı ECM ile temas halinde olup hücrenin diğer kısımları boş kültür ortamına maruz kalmaktadır. Buda *in vivo* dan uzak doğal olmayan, polarize integrin bağlanmasını sağlayarak hücrelerin kimyasal aktiviteler içerisine girmesine ve hücrelerin olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır (Gieni ve Hendzel, 2008).

Hücre göçü *in vivo* koşullar altında hücrelerin sahip oldukları özelliklerle zaman içerisinde gelişir oysa ki 2D kültür sistemleri yüzeysel bir ortam sağladığından hücre göçünü normalden çok daha kolay hale getirerek hücrelerin anormal göç yetenekleri kazanmalarına sebep olur (Gieni ve Hendzel, 2008).

3D kültür sistemleri; hücrelerin sağlıklı büyüüp yaşamasında en önemli faktör olan ECM'i taklit eder özellikte olmalıdır. Bu amaçla doku mühendisliği yardımıyla geliştirilen kültür sistemleri hücre dışı matriksi taklit eder. ECM hücrelere mekanik destek (fibronektin, kollajen, laminin), farklılaşma, direkt hücre bağlantısı, hücreler arası iletişim, morfoloji, proliferasyon, göç ve gen ekspresyonu sağlamaktadır. Doku iskelelerinin sadece ECM'i taklit eder özellikte olması hücre kültüründe kullanım için

yeterli değildir. İskeleler büyüme faktörü salınımı yapabilecek yapıya sahip, integrin bağlanma bölgesi içerir özellikte olmalıdır (Lee ve Mooney, 2001).

Bu kapsamda mikro gözenekli doku iskeleleri, nano fibriller doku iskeleleri, doğal ve yapay hidrojel doku iskeleleri ECM’i taklit eden 3D kültür sistemleri olarak kullanılmaktadır (Tablo 8).

Tablo 8: ECM’i taklit eden doku iskelelerinin avantajları ve dezavantajları

Doku İskeleleri	Avantajları	Dezavantajları
Mikro Gözenekli Doku İskeleleri	Kullanımı kolaydır	Gözenekleri çok geniştir (100 mikron), hücreler 2D ortamda gibi davranış sergilerler
Nano Fibriller Doku İskeleleri	ECM’i iyi taklit eder	Strese dayanıklı değildir
Hidrojel Doku İskeleleri	Küçük gözeneklere sahiptir. Strese karşı dayanıklıdır. Yüksek miktarda su tutma özelliği vardır. Hücrelerin temel gereksinimlerini yürütebilir.	Kompleks tanımlanmış yapıya sahiptirler

Hidrojel doku iskeleleri doğal ve yapay olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Doğal hidrojeller ECM’i daha iyi taklit edebilmesi için; kollajen, fibrin, hiyaluronik asit, kitosan, aljinat ve ipek fibriller gibi hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşturulur.

3D kültür sistemi hücrelerin çoğalmasına izin vererek, doku iskelelerine tutunmasını sağlamalıdır. Hücreye toksik etki göstermeyerek, hücreleri taşıyabilecek mekanik gücü içermelidir. İn vivo çalışmalarda da kullanılabilme üzere tasarlanan iskeleler hücrelerin çoğalmasına paralel bir şekilde biyobozunur özellikte olmalıdır. Hücre kültüründe kullanılan 3D kültür sistemleri yapılacak çalışmaya ve hücre tipine göre çeşitlilik göstermektedir (Paul ve ark, 2004).

A) Mikro Akış Kanalları: Yüzey desenleme yöntemleri ile oluşturulan hem iki hem de üç boyutlu substratlar da kullanılan mikro akış kanalları hücre besisi ortamının ve hücre sinyallerinin kolaylıkla dolaşabileceği kanallar sistemine dayanır. Hücre beslenmesi ve hücreler arası iletişimin büyük oranda desteklendiği sistemlerdir.

B) Mekanik Uyarı Veren Substratlar: Vücut içindeki farklı dokuların mekanik özellikleri birbirine benzemektedir. Dolayısıyla sert dokularla yumuşak dokuların hücre kültüründe aynı substratların kullanılması doğal ortamın benzetilmesi açısından çok uygun değildir. Hücrelerin *in vivo* fizyolojik ortamlarında maruz kaldıkları yükler düşünülerek substrat yüzeylerini farklı sertlikte, farklı elastikiyette ve hücrelere değişik mekanik yükler uygulayacak şekilde modellemek mümkündür.

C) Sferoid (Handing Drops) Tekniği: Sferoidler hücre kolonilerinin küremsi topluluklarıdır. İlk olarak 1944 yılında Johannes Holtfreter tarafından embriyonik hücrelerin küresel agregatları oluşumunu göstermesiyle belgelenmiştir. Sferoidler doğal olarak solid dokuları, avasküler tümörleri ve embriyo benzeri oluşumları taklit ederler. Kolonize olmuş hücreler kendi 3D ECM'sini üreterek hücreler arası iletişim açısından *in vivo*ya yakın özellik gösterirler.

D) İskele (Scaffold Teknikleri): Hücre ve dokuya özgü *in vivo* ECM yapısını yansıtabilecek şekilde tasarlanmış farklı gözenekte, geçirgenlikte ve mekanik özellikte hücre yaşamı ve doku oluşumunu destekleyen biyomateryallerdir. Klinik ve rejeneratif tıp uygulamalarında iskeleler implant olarak kullanılırken, laboratuvar uygulamalarında 3D scaffold olarak adlandırılırlar.

E) Jel: Yumuşak doku benzeri bir sertliğe sahip olup ECM'i taklit eder. Doğal orijinli ECM karışımlarından yapılmış jeller (kollajen ve aljinat) daha çok tercih edilir. En yaygın kullanılanı matrijel dir. Jeller kültür içindeki hücreler tarafından organize edildiği için yapısı zamanla değişebilir.

F) Metal Substratlar: Paslanmaz çelik, titanyum gibi bazı metaller hücre büyümesi için uygun yüzeyler olmalarına rağmen, hem opak olup hücrelerin incelenmesini zorlaştırdıklarından, hem de biyobozunur olmadıklarından dolayı doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmazlar.

G) Biyoreaktörler: 3D hücre kültürü sistemlerinde iskele ile birlikte yüksek hacimli hücre üretimi ve *in vitro* doku mühendisliği uygulamaları için kullanılır. Biyoreaktörler, besleyici maddelerin dolaşımına, atıkların uzaklaştırılmasına ve reaktör içindeki ortamın homojen olmasına izin veren yapıya sahiptir.

Sonuç olarak, 3D kültür sistemleri; hücrelerin farklılaşma, genel hücre faaliyetleri, morfolojileri, çoğalma, canlılık, *in vivo* ortama benzerliği, uyaranlara karşı verdikleri tepkiler göz önüne alındığında 2D kültür sistemlerine göre daha avantajlıdır (Tablo 9).

Tablo 9: 3D'ün 2D kültüre göre avantajları <http://www.thewellbio.com/3d-cell-culture/>

Farklılaşma	Kök hücrelerin farklılaşma aktivasyonlarını artırır. Bazı diğer kök hücrelerin ise farklılaşmamış durumda kalmasını sağlar
Gen Ekspresyonu	Farklı gen ekspresyon seviyelerine sebep olarak 2D kültürde eksprese olmayan genlerin eksprese olmasını sağlar
Genel Hücre Fonksiyonları	Hücre-hücre etkileşimini indükler
Morfoloji	Hücre morfolojisinde polarizasyonda farklılıkları indükler
Proliferasyon	Mezenkimal kök hücrelerin büyümesini ve yüzeye tutunmasını artırır
Canlılık	Hücre büyümesini uzun vadede etkileyerek yaşam kalitesini artırır

4.5.1. PORÖZ BAKTERİYAL SELÜLOZ DOKU İSKELESİ

Bakteriyal selüloz aerobik gram negatif bakteri olan *Glucanoacetobacter xylinus* suşundan elde edilir (Cannon ve Anderson, 1991). Tip I kollajen içerir. Yüksek su tutma kapasitesine sahip, kristallik özelliği sergileyen, ince fiber ağı bulunan biyoyoumlu bir doğal polimerdir (Naritomi ve ark, 1998). Hücrelere kültüre edildikleri besiyerinden daha fazla besin difüze etmelerini sağlaması, hücrelerin çoğalmalarını sağlayan birincil etken olduğu düşünülmektedir. BC 'un içerdiği ince bir fiber ağ üzerinde hücreler koloni oluşturlar. Biyomedikal alanda BC en fazla yara

bandajlarında kullanılır. Hücre proliferasyonunu destekler ve durağan fazdaki hücrelerin büyümesini teşvik eder. ECM ve biyopolimer üretimini destekler. Ayrıca termal kararlılık (300 °C) gösterip birçok mikroorganizma tarafından parçalanmaya ve geniş bir pH değerleriyle çeşitli organik çözücülerde (Barud ve ark, 2007) çözünmeye karşı dirençlidir (Phillips ve Williams, 2009). Opak bir görüntüsüne rağmen yüzeyde büyüyen hücreler mikroskopta kolaylıkla gözlenebilir.

β -(1,4) glikozidik bağlarla bağlı D-glikoz homopolimeridir ve kimyasal olarak iyi tanımlanmış olup bitki selülozuyla özdeştir. Ancak yüksek oranda kristallik sergilemesi, çapı 40-60 nm yi bulan uzunluğu ise 1-10 um arasında değişen fibrillere sahip olması, yüksek saflıkta üretim aşamasının olması ve üretim sırasında bir biyojenik bileşiğe ihtiyaç duymaması onu bitkisel selülozlardan ayırır (Iguchi ve ark, 2000).

4.5.2. KOLLAJEN FİBER DOKU İSKELESİ

Kollajen organ ve doku rejenerasyonunu teşvik etmek için uzun zamandır kullanılan bir biyomalzeme dir. Özellikle cilt dokusu yenilenmesinde ve tedavisinde tercih edilmektedir. Kollajen hücrelerin invaze olmaları için zemin hazırlayan ve hücrelerin hedeflenen fonksiyonel doku ya da organ içerisine diferansiyasyonunu ve çoğalmasını yönlendiren çapraz bağlara sahip gözenekli bir biyomalzeme dir. Biyoyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir olması doku mühendisliğinde tercih edilme sebeplerinin başında gelmektedir. ECM proteinlerini içererek doku büyümesini destekler (Pham ve ark, 2006).

4.5.3. KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELESİ

Kollajen, doku ve organların oluşumunda önemli bir rol oynayarak hücrelerin çeşitli işlevsel faaliyetlerinde yer alır. Toplam vücut proteinlerinin yaklaşık %20-30'unu oluşturan en bol miktarda bulunan memeli proteindir. İyi bir yüzey aktif ajandır ve lipid içermeyen bir ara yüze dahi nüfuz etme kabiliyetine sahiptir. Albümin ve jelatin gibi diğer doğal polimerlere kıyasla üstün biyoyumluluk gösterir (Maeda ve ark, 1999).

Kollajen köpük iskelesi, hücre büyümesi için yapısal boşluklara ve *in vivo* ya benzer rastgele dizilmiş kollajen liflerine sahiptir. Hücrelerin büyümesi ve

canlılıklarını desteklemesinde en yararlı biyomalzemelerden biri kabul edilmektedir (Li ve ark, 2002).

Kollajen köpük, yüksek oranda glilozaminoglikan (GAG) içeriği sayesinde hücrelerdeki rejenerasyonu destekler. *İn vivo* biyolojik aktivitenin bazı yapısal belirleyicilerini içerir. Örneğin; fibroblastların kollajen yüzeyine bağlanmasını sağlayan ligant içerdikleri gibi aynı *in vivo* da olduğu gibi asetik asitte şişme kinetiğine sahiptirler (Yannas ve ark, 2010).



5.GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Tüm çalışmalar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD Temel Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2016-140 tarafından desteklenmiştir.

5.1.1. RL95-2 (CRL-1671) KÜLTÜRÜ

Endometrium epitelyal hücre hattı RL95-2 (CRL-1671) (ATCC-58027481) ATCC den ticari olarak satın alındı. Soğuk zincir ile getirilen hücre hattı 37 C°'lik su banyosunda çözündürülerek, 5 ml besiyeri ilavesi ile 1000 rpm da 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant atılıp, pellet üzerine 3 ml besiyeri ilave edilerek süspanse hale getirildi. Önceden 2 ml besiyeri ile şartlandırılmış 25 cm²'lik flaska aktarılarak 37 C° de, %5 CO₂'li ortamda (ESCO, CCL-170B-8) kültüre edildi.

RL95-2; %10 FBS (Capricorn Scientific, FB_100H/100), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B) ilaveli DMEM:F12 (Biosera, LM_D12221500) kültür besiyeri ile kültüre edildi. Tüm kültür koşulları standart olarak 37 C° de, %5 CO₂'li ortamda yapıldı. İki gün sonra, inverted mikroskop (Olympus, IX71) altında yüzeye tutunan ve tutunmayan hücreler gözlemlendi ve besiyeri değişimi yapıldı. Bunun sonucunda yüzeye tutunmayan hücreler besiyeri değişimi ile ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyine tutunan hücrelerin fotoğrafları çekilerek, konfluent olana kadar iki günde bir besiyeri değişimi yapıldı.

5.1.2. JAR SFEROİD (HTB-144) KÜLTÜRÜ

Trofoblast benzeri koryokarsinom hücre hattını temsil eden invaziv özellikteki JAR sferoidi (HTB-144) (ATCC-59061047) ATCC den ticari olarak satın alındı. Soğuk zincir ile getirilen hücre hattı 37 C°'lik su banyosunda çözündürülerek, 5 ml besiyeri ilavesi ile 1000 rpm da 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant atılıp, pellet üzerine 3 ml besiyeri ilave edilerek süspanse hale getirildi. Önceden 2 ml besiyeri ile şartlandırılmış 25 cm²'lik flaska aktarılarak 37 C° de, %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi.

JAR; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin ilaveli RPMI1640 (Biosera, LM_R16391500) kültür besiyeri ile kültüre edildi. Tüm kültür koşulları standart olarak 37 C° de, %5 CO₂'li ortamda yapıldı. İki gün sonra, inverted mikroskop altında yüzeye tutunan ve tutunmayan hücreler gözlendi ve besiyeri değişimi yapıldı. Bunun sonucunda yüzeye tutunmayan hücreler besiyeri değişimi ile ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyine tutunan hücrelerin fotoğrafları çekilerek, konfluent olana kadar iki günde bir besiyeri değişimi yapıldı.

5.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Kültürün yaklaşık 7. gününde, hücrelerin tutundukları kültür kabı yüzeyinde üremelerinin %70-80'e ulaştığı dönemde pasajlamaları yapıldı. Yapılan kültür pasaj 0 (P0) olarak kabul edildi ve hücreler her pasaj sonrasında P1, P2, P3 vb. olarak isimlendirmeleri yapıldı.

Pasaj işlemi için; yüzeye tutunmayan hücreler ile besiyeri kültür kabından uzaklaştırıldı. Yüzeyinde hücrelerin tutunduğu boş kültür kabına 2.5 ml %0.25 Tripsin-EDTA (Gibco, 1797206) eklenip, 37 C°'lik inkübatör de 3-5 dk bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin, yüzey tutunmalarından kurtulup süspanse hale geldiği görüldüğünde, Tripsin-EDTA' nın inhibisyonu için 2.5 ml besiyeri ilavesi yapıldı. İçeriğinde inhibe olmuş Tripsin-EDTA ve yüzen hücrelerin bulunduğu besiyeri 15 ml'lik konik tabanlı tüplere aktararak 1000 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant atılıp, pellet üzerine 3 ml besiyeri ilave edilerek süspanse hale getirildi. Önceden 2 ml besiyeri ile şartlandırılmış 25 cm²'lik flaska aktararak 37 C° de, %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi.

5.3. HÜCRELERİN SIVI AZOTTA STOKLANMASI

Kültür kabından besiyerinin tamamı uzaklaştırılarak 2.5 ml %0.25 Tripsin-EDTA ilavesi ile hücreler süspanse hale getirildi. Tripsin EDTA' nın hücreler üzerindeki üreme yeteneklerini inhibe edici özelliğinden kurtulmak için besiyeri ilavesi yapıldı. Süspanse hale gelen hücreler 1000 rpm da 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant atılarak pellet üzerine her bir etiketlenmiş kriyotüpte (vial, ampul) 1 ml dondurma vasatı (%90 Fetal Sığır Serum + %10 Dimetilsülfoksit (Applichem, 8L000376) olacak şekilde stoklama işlemi yapıldı.

5.4. DOKU İSKELELERİ ÜRETİMİ

Üç farklı tip doku iskelesi Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üretilmiştir.

5.4.1. PORÖZ BAKTERİYAL SELÜLOZ DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ

Poröz bakteriyel selüloz üretimi için *Glucanoacetobacter xylinus* suşu (ATCC 700178) kullanıldı. *G. xylinus* suşu üretimden önce 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 1-2 gün süre ile steril Hestrin&Schramm (HS) sıvı besi ortamında aktive edildi. HS ortamı, distile su, %2 glukoz (MERCK 108347), %0,5 maya özütü (MERCK 103753), %0,5 bakteriyolojik pepton (MERCK 107214), %0,115 sitrik asit (MERCK 100244) ve %0,27 Na₂HPO₄'ten (MERCK 106580) oluşan yapıdadır. Aktivasyon sonrası oluşan pelletler, parçalanmış %5'lik agar solüsyonu (Oxoid LP0011) içeren HS sıvı besin ortamına (1:1) %3 oranında inokule edilerek 5 gün süreyle hareketsiz olarak inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda üretilen BS'ler distile suda yıkandıktan sonra 0,1 M NaOH (MERCK 106462) ile saflaştırıldı ve 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale getirildi.

5.4.2. KOLLAJEN FİBER DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ (ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ)

55 mg kollajen (Santa Cruz Biotechnology, sc136157), 1 mL HFP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) (Sigma C9791) içinde manyetik karıştırıcı ile 1 gün boyunca karıştırılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Hazırlanan homojen kollajen solüsyonu 5 ml'lik şırıngaya çekilerek elektro eğirme düzeneğine yerleştirildi. Düzenekteki toplayıcı tabla alüminyum folyo ile kaplandı ve şırınga ucuna olan uzaklığı 15 cm olarak ayarlandı. Alüminyum folyo üzerine 10 mm çaplı lameller yapıştırılarak pompa 1 mL/sn ve elektrik akımı 18 kV olacak şekilde çalıştırıldı. Lamellerin üzerinde kollajen fiber doku iskelesi eğirilmesi sağlandı. İskeleler 120 dk boyunca UV ile sterilize edilerek kullanıma hazırlandı.

5.4.3. KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ (LİYOFİLİZASYON YÖNTEMİ)

Asetik asit içerisinde %5 oranında hazırlanan kollajen tip 1 (Santa Cruz Biotechnology, sc136157) solüsyonu hücre kültür kaplarına (6-12 veya 24 gözlü) eklendi. Büyük porlu iskelelerin üretimi için solüsyon -20°C'de, küçük porlu iskelelerin üretimi için solüsyon -80°C'de bir gece bekletildi. Donmuş olan solüsyon 8 saat boyunca liyofilize edilerek kollajen köpük doku iskelesi hazırlandı. İskeleler kullanılabileceği kadar desikatörde bekletildi. Kullanılmadan önce %70 etanol (Sigma, 32221) solüsyonu ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

5.5. DOKU İSKELELERİNİN SEM ile KARAKTERİZASYONLARININ YAPILMASI

Üretilen doku iskelelerinin yüzey yapıları ve por çapları taramalı elektron mikroskop (SEM) ile görüntülenmiştir. Bütün iskeleler üretim sonrası liyofilize edilerek kurutulmuş, SEM (Carl Zeiss 300 VP) görüntüleme öncesi altınla püskürtme kaplama yapılarak yüzeyleri iletken hale getirilmiştir.

5.6. DOKU İSKELELERİNE HÜCRE EKİMİ ve KÜLTÜRÜ

Çalışmamızda toplam 11 grup oluşturuldu. Gruplardan ikisi hücre kontrol grubu olarak ayrıldı ve tekli olarak kültüre edildi. Diğer gruplarda ise, hücreler iskele üzerine ekilerek 14 gün kültüre edildi. **Grup 1:** JAR (Hücre kontrol), **Grup 2:** RL95-2 (Hücre kontrol), **Grup 3:** BC+JAR, **Grup 4:** BC+RL95-2, **Grup 5:** BC+RL95-2+JAR, **Grup 6:** COL/K+JAR, **Grup 7:** COL/K+RL95-2, **Grup 8:** COL/K+RL95-2+JAR, **Grup 9:** COL/F+JAR, **Grup 10:** COL/F+RL95-2, **Grup 11:** COL/F+RL95-2+JAR olarak belirlendi.

Doku iskeleleri 1 gün öncesinden 24 gözlü kültür kaplarına alındı ve hücre içermeyen 500 µl kültür besiyeri ile 1 gece inkübe edildi (Resim 1).

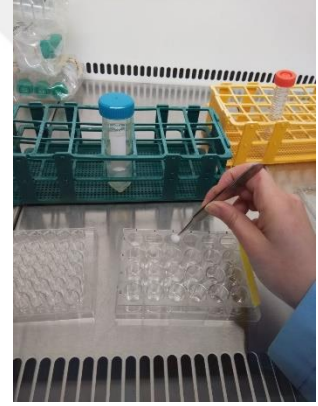
Bakteriyal Selüloz



Kollajen Fiber



Kollajen Köpük



Resim 1: Poröz bakteriyal selüloz, kollajen fiber ve kollajen köpük doku iskelelerinin kültür ortamında şartlandırılmaları

Hücre kontrolü olarak ayrılan ve iskeleye ekim yapılmayıp tekli olarak kültüre edilen JAR ve RL95-2 hücreleri 24 gözlü kültür plaklarına ekimi yapıldı. JAR ve RL95-2 hücre hatlarının iskeleye kombine ekileceği grupta, ilk endometrium epitelyal hücre hattının ekimi yapıldı. JAR ve RL95-2'nin tekli ekileceği grupta, kontrollü deney sağlanması açısından iskeleler şartlandırma besiyerinde bekletildi. RL95-2 hücre hattı Tripsin-EDTA ile süspanse hale getirildikten sonra 1000 rpm da 5 dk

santrifüj edildi. Pellet üzerine 1 ml besiyeri ilave edildi ve hücreler thoma lamı (Tiefe Depth Profondew, Germany) üzerinde sayıldı. 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi. Kombine grubun tüm günlerine, endometrium epitelyal hücre hattı ekildi. Ekimden 2 gün sonra endometrium epitelyal hücrelerin iskelelere tutunduğu görüldü. Bu aşamadan sonra, tüm grupların hücrelerinin ekimi yapıldı. JAR ve RL95-2 hücreleri süspanse hale getirildikten sonra 1000 rpm da 5 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 1 ml besiyeri ilave edildi ve hücreler thoma lamı üzerinde sayıldı. JAR sferoidleri 1.8×10^6 hücre/ml, RL95-2 hücreleri 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi (Tablo 10). Tüm grupların hücre ekiminden sonra, iki günde bir besiyeri değişimleri yapıldı.

Tablo 10: BC, COL/K ve COL/F doku iskelelerine JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 24 gözlü kültür plaklarına ekimi

BC+JAR	BC+JAR	BC+ RL95-2	BC+ RL95-2	BC+ RL95- 2+JAR	BC+ RL95- 2+JAR
COL/K+JAR	COL/K+JAR	COL/K+ RL95-2	COL/K+ RL95-2	COL/K+ RL95- 2+JAR	COL/K+ RL95- 2+JAR
COL/F+JAR	COL/F+JAR	COL/F+ RL95-2	COL/F+ RL95-2	COL/F+ RL95- 2+JAR	COL/F+ RL95- 2+JAR
COL/F+JAR		COL/F+ RL95-2		COL/F+ RL95- 2+JAR	

Hücre kontrol grupları kültürün 7.gününde, hücre ekimi yapılmış iskeleler ise kültürün 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerinde %4 paraformaldehit (Merck, TP704404) ile fikse edilerek +4 C° de saklandı.

5.7. FROZEN KESİTLERİN ALINMASI

Bakteriyal selüloz ve kollajen köpük iskeleleri Cryostat (Leica, CM1100) içerisinde dondurma mediumu (Jung, 020108926) ile bloklar oluşturuldu, -20 C° de 5-

10 dk bekletildikten sonra her bir örnekten 7 µm luk kesitler lizinli lamlara alındı ve kesitler boyamaların yapılacağı güne kadar -20 C° de saklandı.

5.8. HÜCRELERİN İMMUNOSİTOKİMYA BOYAMASI

Kontrol grubunu oluşturan ve doku iskelesi üzerinde olmayan JAR ve RL95-2 hücreleri %4 paraformaldehit ile 30 dk tespit edildikten sonra, 2x30 dk PBS ile yıkama işleminden sonra permeabilizasyon için %0,1 Triton X-100 (Appllichem, 4L003808) ile buz üzerinde 15 dakika bekletildi. PBS ile 3x5 dk yıkanan örnekler, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3 H₂O₂ (Merck, K31355100303) ile oda ısısında 10 dk bekletildi. Tekrar 3x5 dk PBS ile yıkanan hücreler, blok (Invitrogen, 859043) solüsyonu ile 1 saat oda ısısında bekletildi. Süre sonunda yıkama yapılmadan blocking solüsyonu çekildi ve 1:100 dilüsyonundaki primer antikorlar [anti-E-kaderin (Proteintech, 20874-1-AP), anti-N-kaderin (Proteintech, 13769-1-AP), anti-Vimentin (Proteintech, 10366-1-AP), anti-α-SMA (Proteintech, 14395-1-AP), anti-Syndecan-1 (Proteintech, 10593-1-AP)] uygulandı ve bir gece (16±18 saat) +4 C° de inkübe edildi. Ertesi gün 3x5 dk PBS ile yıkanarak antikorlar uzaklaştırıldı ve biotinlenmiş ikincil antikor ilavesi yapıldı ve 30 dk inkübe edildi. PBS ile 3x5 dk yıkama işleminden sonra streptavidin hidrojen peroksidaz (Invitrogen, 859043) ile oda ısısında 30 dk bekletildi. Tekrar PBS ile yıkanarak, immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminobenzidin (DAB) (Scytek, AEM080) ile 5 dk bekletilen örnekler distile su ile 3x5 dk yıkandı. Mayer's Hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile 2-3 dk boyanan örnekler distile suda 10 dk yıkama işleminden sonra immunohistokimya kapatma mediumu (Spring bioscience-DMM125) ile kapatıldı.

5.9. BAKTERİYAL SELÜLOZ ve KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELELERİNİN HİSTOKİMYASAL HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMASI

Frozen kesitleri alınarak -20 C° de saklanan preparatlar hematoksilen eozin boyamasından bir gün önce oda ısısına çıkarıldı. Ertesi gün 37 C° de bir gece bekletilmiş fosfatlı tampon solüsyonu (PBS, Biosera, LM_S20411500) içerisine alınarak 2 şer defa 30 dk (2x30 dk) yıkama yapılarak, dondurma mediumundan uzaklaştırılması sağlandı. Kesitler daha sonra Harris Hematoksilen ile (RRSP67E) 5

dk boyandı ve distile suda 5 dk bekletildi. Eosin içerisinde (Surgipath, Unno1989-01601E) 3 dk bekletildikten sonra kesitler tekrar distile su ile 5 dk yıkandı. Kesitler artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) (Alkomed Kimya Kozmetik ve Ltd. Şti AS64-17-5) geçirilerek ksilende (Tekkim, TK 090270-05000-2) 10 dk bekletildi ve entellan (Spring Bioscience, DMM-125) ile kapatılarak ışık mikroskobunda (Olympus IX40) incelendi.

5.10. BAKTERİYAL SELÜLOZ ve KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELELERİNİN İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMASI

Frozen kesitleri alınarak -20 C° de saklanan preparatlar bir gün önce oda ısısına çıkarıldı. Ertesi gün 37 C° de bir gece bekletilmiş PBS içerisine alınarak 2x30 dk yıkama yapılarak, dondurma mediumundan uzaklaştırılması sağlandı. 3x30 dk PBS ile yıkama işleminden sonra permeabilizasyon için %0,1 Triton X-100 ile buz üzerinde 15 dk bekletildi. PBS ile 3x5 dk yıkanan örnekler, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3 H₂O₂ oda ısısında 10 dk bekletildi. Tekrar 3x5 dk PBS ile yıkanan örnekler, blok solüsyonu ile 1 saat oda ısısında bekletildi. Süre sonunda yıkama yapılmadan blocking solüsyonu çekildi ve 1:100 dilüsyonundaki primer antikorlar; anti-E-kaderin, anti-N-kaderin, anti-Vimentin, anti- α -SMA ve anti-Syndecan-1 uygulanarak bir gece (16±18 saat) +4 C° de inkübe edildi. Ertesi gün 3x5 dk PBS ile yıkanarak antikorlar uzaklaştırıldı ve biotinlenmiş ikincil antikor ilavesi yapıldı ve 30 dk inkübe edildi. PBS ile 3x5 dk yıkama işleminden sonra streptavidin hidrojen peroksidaz ile oda ısısında 30 dk bekletildi. Tekrar PBS ile yıkanarak, immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk bekletilen örnekler distile su ile 3x5 dk yıkandı. Mayer's Hematoksilen ile 2-3 dk boyanan örnekler distile suda 10 dk yıkama işleminden sonra immunohistokimya kapatma mediumu ile kapatıldı.

5.11. KOLLAJEN FİBER DOKU İSKELESİNİN İMMUNOFLORESAN BOYAMASI

Kollajen fiber doku iskelelerinin cam üzerinde olmalarından dolayı kesit alınamadı ve boyamalar materyal üzerinde direkt olarak ikili antikor boyaması şeklinde yapıldı. Örnekler %4 paraformaldehit ile 30 dk fikse edildikten sonra 30 dk PBS ile yıkandı. %1'lik Bovine Serum Albümin (BSA, Sigma, A7906) ilaveli Triton

X-100 solüsyonu ile permeabilizasyon işlemi için 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda örnekler %1'lik BSA lı PBS ile 2x2 dk yıkandı. Bloklama aşamasında, %1'lik BSA içeren PBS içerisinde hazırlanmış %10'luk goat serum (Sigma, S26-M) ile 1 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra anti-E-kaderin ile anti- α -SMA, anti-Vimentin ile anti-N-kaderin ikili, anti-Syndecan-1 ise tekli olarak 1/100 dilüsyolarında hazırlanarak primer antikorlar 1 saat oda ısısında bekletildi. Örnekler süre sonunda %1'lik BSA içeren PBS ile 2x2 dk yıkandı. Ardından örneklerle 1/500 dilüsyonundaki rabbit anti-goat FITC (Millipore, AP308F) ve goat anti-rabbit Rodamine (Santa Cruz Biotechnology, sc-2091) karışımı içeren sekonder antikor ilave edildi ve 30 dk oda ısısında inkübe edildi. Tekrar yıkama aşamasından sonra, çekirdek boyaması DAPI (Cell Signaling Technology 40835) ile 20 dk oda ısısında bekletildi. Süre sonunda floresan boyamaya uygun kapatma mediumu (Calbiochem, JA1750) ile kapatılarak, immunfloresans ataçmanlı mikroskop (Olympus IX71) incelendi.

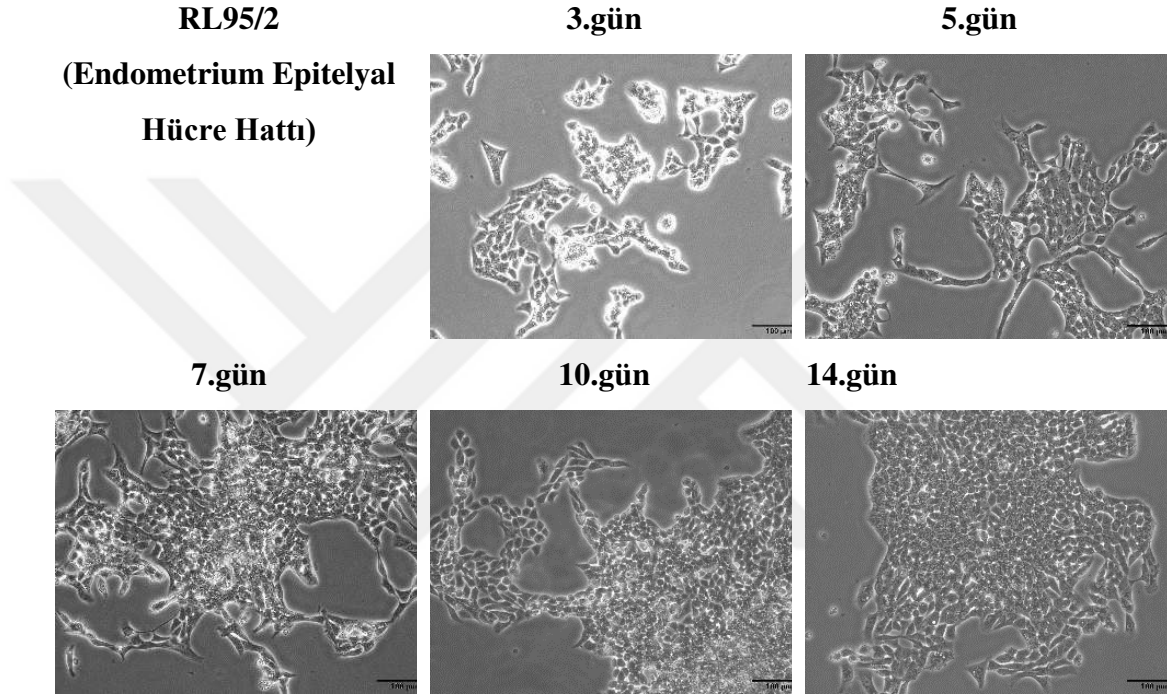
5.12. İMMUNOREAKTİVİTENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İmmunositokimya ve immunofloresan boyamalarındaki yoğunluklar boyanmanın olduğu yere göre negatif (-), zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) ve şiddetli (++++) pozitif olmak üzere iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirildi.

6.BULGULAR

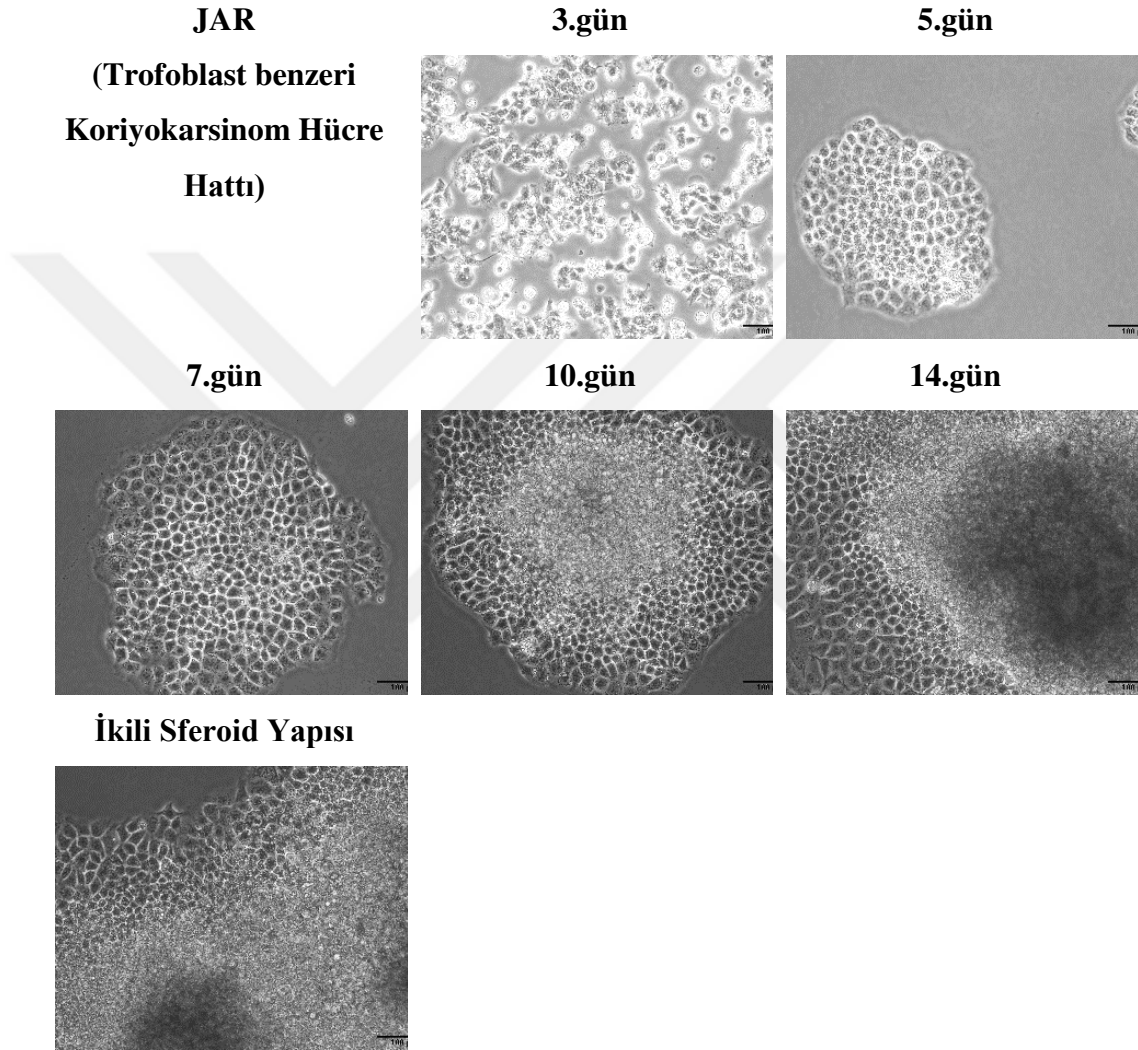
6.1. İKİ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ BULGULARI

2D kültür ortamında, fusiform yapıdaki RL95-2 hücrelerinin tek tabakalı halde çoğalma eğilimi gösterdiği görüldü. Kültürün 3. gününde kültür kabının %35-40 civarını kaplarken kültüre devam edildiğinde 5.günde %80 konfluent olduktan sonra pasaj yapıldı (Resim 2).



Resim 2: RL95-2 hücrelerinin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

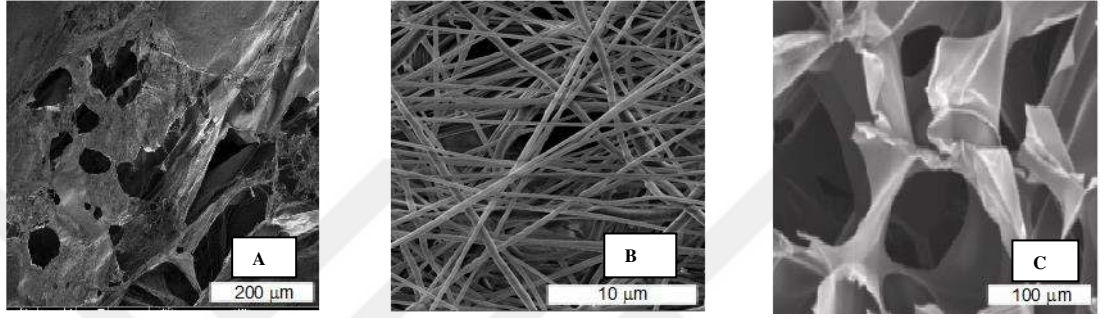
Yuvarlak epitelioid karakterde olan JAR hücreleri kültürün 3. gününde tek tek hücreler şeklinde iken kültüre devam edildiğinde kümeleşme eğilimi göstererek sferoid yapı oluşturdular, kimi hücre grubunda bu kümeleşmenin tekli olduğu kimi hücre grubunda ise ikili gruplar halinde olduğu görüldü (Resim 3). Sferoid yapı oluşturan gruplarda hücrelerin sferoid yapısının üst kısmından çoğalmaya devam ettiği, sferoidin periferinde olan çoğalmanın daha az olduğu izlendi.



Resim 3: JAR hücrelerinin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerindeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

6.2. DOKU İSKELELERİNİN SEM ile KARAKTERİZASYON BULGULARI

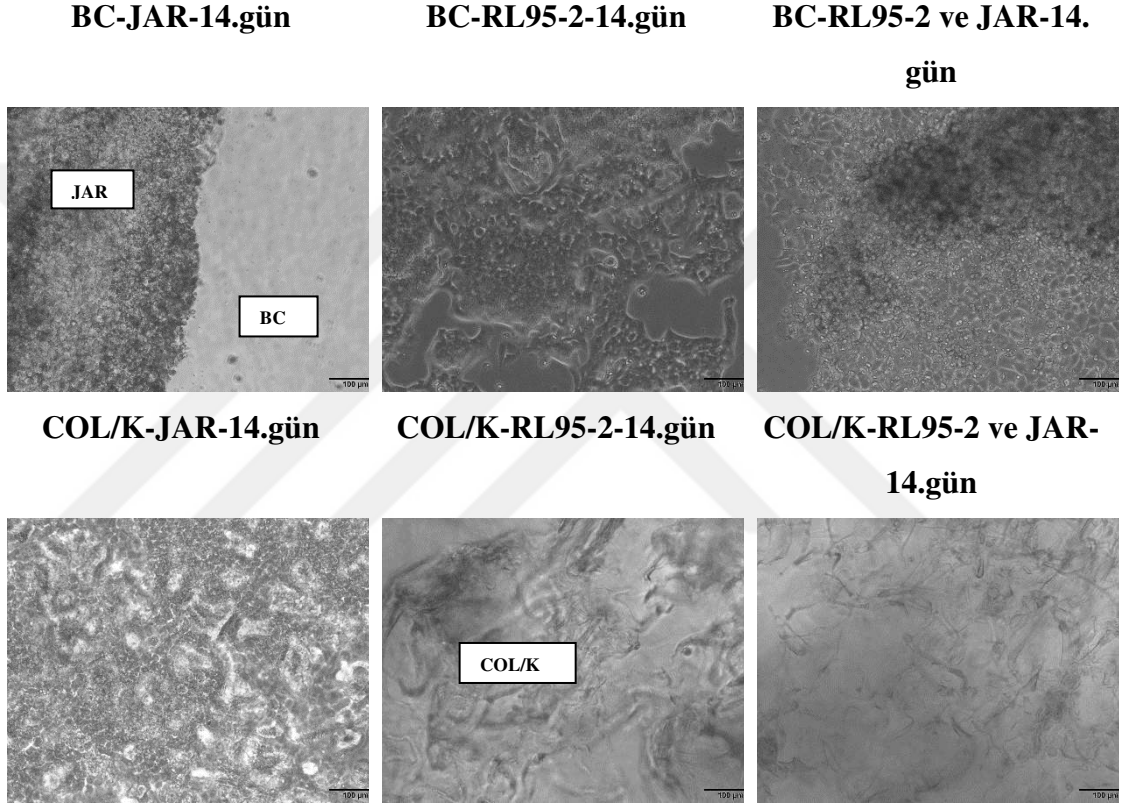
Üretilen doku iskelelerinin yüzey yapıları ve por çapların taramalı elektron mikroskop ile görüntülendi. SEM görüntülerinden ImageJ programı ile görüntü analizi yapılarak; poröz BC doku iskelelerinin ortalama gözenek büyüklüğü $97 \pm 28 \mu\text{m}$, kollajen fiber doku iskelelerinin fiber çapları $0,67 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ve kollajen köpük doku iskelelerinin ortalama gözenek büyüklüğü ise $109 \pm 21 \mu\text{m}$ bulundu (Resim 4).



Resim 4: Doku iskelelerinin SEM ile elde edilen mikro yapı görüntüleri. A) Poröz BC doku iskelesi, B) Kollajen fiber doku iskelesi optik mikroskop görüntüsü, C) Kollajen köpük doku iskelesi. Ölçek: 200 µm (A), 10 µm (B), 100 µm (C).

6.3. ÜÇ BOYUTLU KÜLTÜR MODELİ BULGULARI

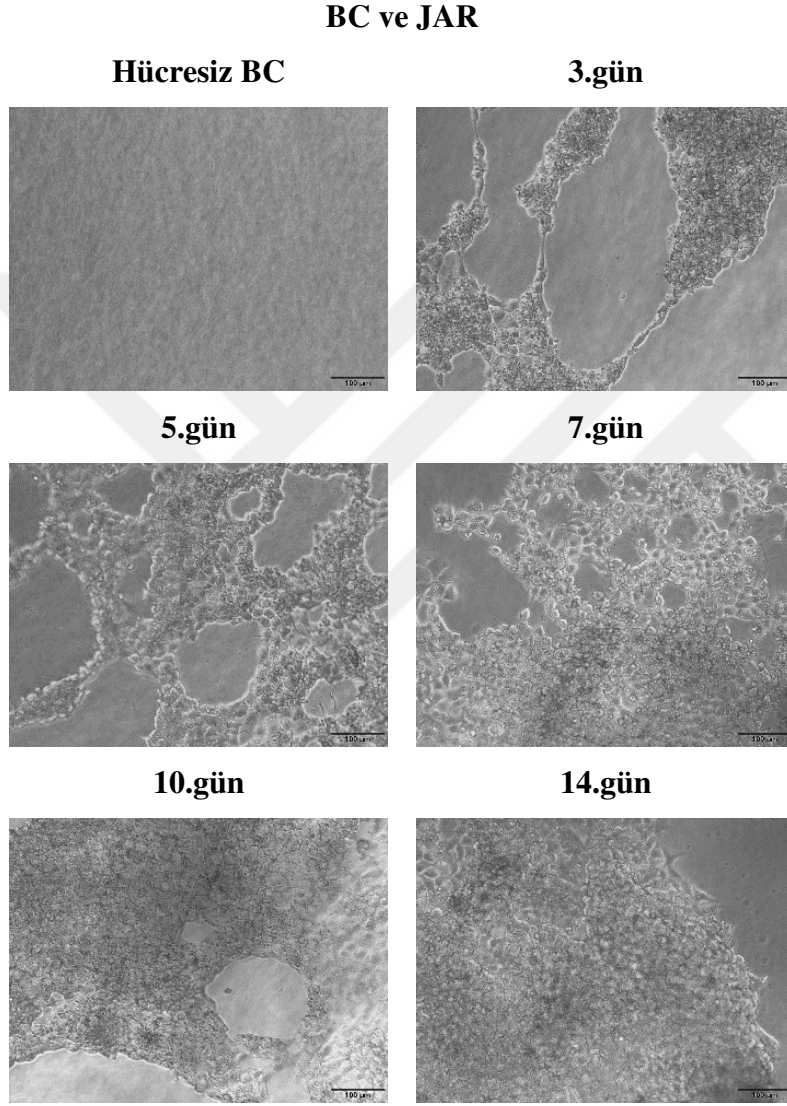
Poröz bakteriyal selüloz, kollajen fiber ve kollajen köpük doku iskeleleri DMEM:F12 kültür besiyeri ile 24 saat, 37 C° %5 CO₂ li ortamında hücre ekiminden 24 saat önce kültür vasatına alınarak şartlandırılmaları sağlandı. Şartlandırma ve 14 günlük kültür süreleri boyunca doku iskelelerinde herhangi bir bozunma görülmedi (Resim 5). Kollajen fiber doku iskelesi cam lamel üzerinde olduğundan, bozunma değerlendirilmesi dışında tutuldu.



Resim 5: JAR, RL95-2, RL95-2 ve JAR kombine hücrelerinin BC ve COL/K doku iskeleleri ile 14. gün kültürü. Ölçek: 100 µm.

6.3.1. PORÖZ BAKTERİYAL SELÜLOZ DOKU İSKELESİ BULGULARI

JAR hücrelerinin bakteriyal selüloz ile kültüründe; 3. ve 5. günlerde hücrelerin heterojen bir yayılım gösterirken, 7.günde hücrelerin bir araya toplandığı, 10. günden itibaren kümeleşme eğilimi göstererek, 14.günde sferoid yapısını oluşturduğu görüldü (Resim 6).



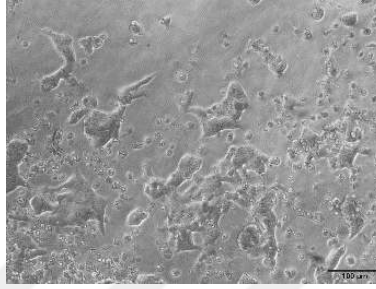
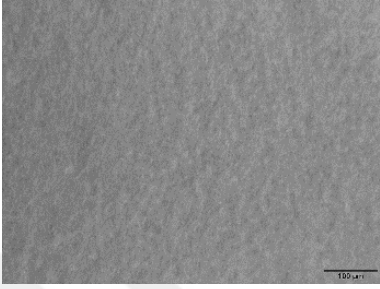
Resim 6: JAR hücrelerinin BC ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü.
Ölçek: 100 µm.

RL95-2 hücrelerinin bakteriyal selüloz ile kültüründe; hücrelerin kültürün ilk gününden itibaren iskele üzerinde yapıştıkları ve çoğalmaya devam ettikleri gözlemlendi. Kültüre devam edildiğinde hücrelerin çoğaldıkları, iskele üzerinde ve aralarında hücrelerin olduğu izlendi (Resim 7).

BC ve RL95-2

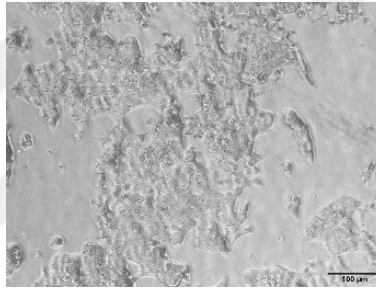
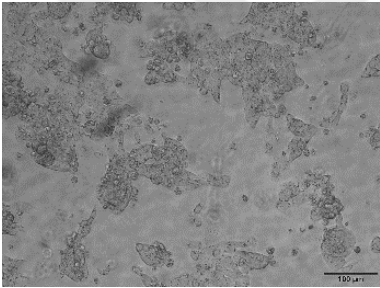
Hücresiz BC

3.gün



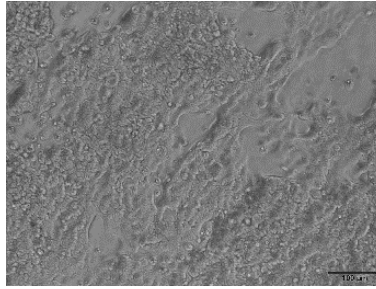
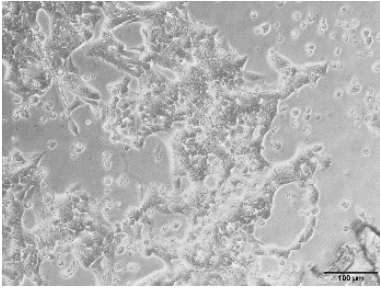
5.gün

7.gün



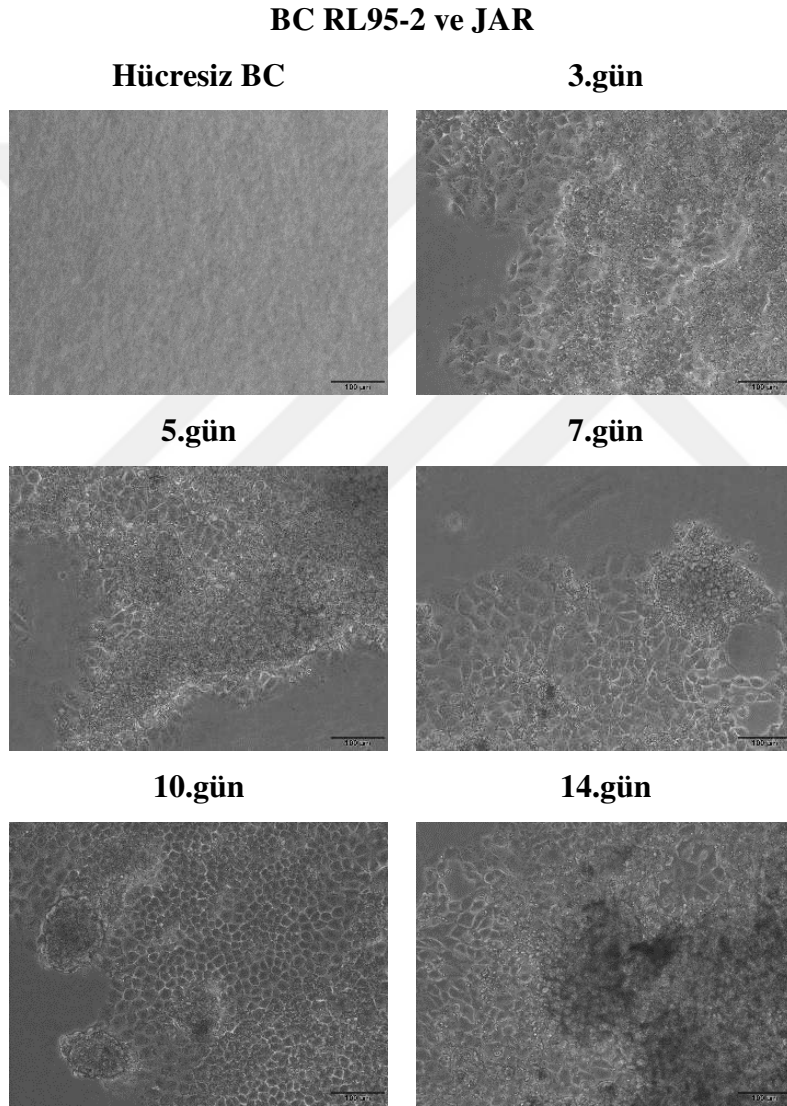
10.gün

14.gün



Resim 7: RL95-2 hücrelerinin BC ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde bakteriyal selüloz ile kültüründe ise; iskele yüzeyinde endometrium epitel hücrelerinin 2.günde geniş yayılım sergiledikleri görüldü ve JAR hücrelerinin ekimi bugünde gerçekleştirildi. JAR hücrelerinin, endometrium epitel hücreleri üzerindeki kültüründe 3.günden itibaren hücrelerin homojen bir büyüme eğilimi gösterdikleri, 5.günde ise JAR hücrelerinin sferoid yapısı oluşumuna benzer büyüme eğilimi sergiledikleri görüldü. İlk sferoid oluşumu ise 7.günde görülür iken, kültürün 10. ve 14.günlerinde sferoid sayılarının arttığı görüldü (Resim 8).

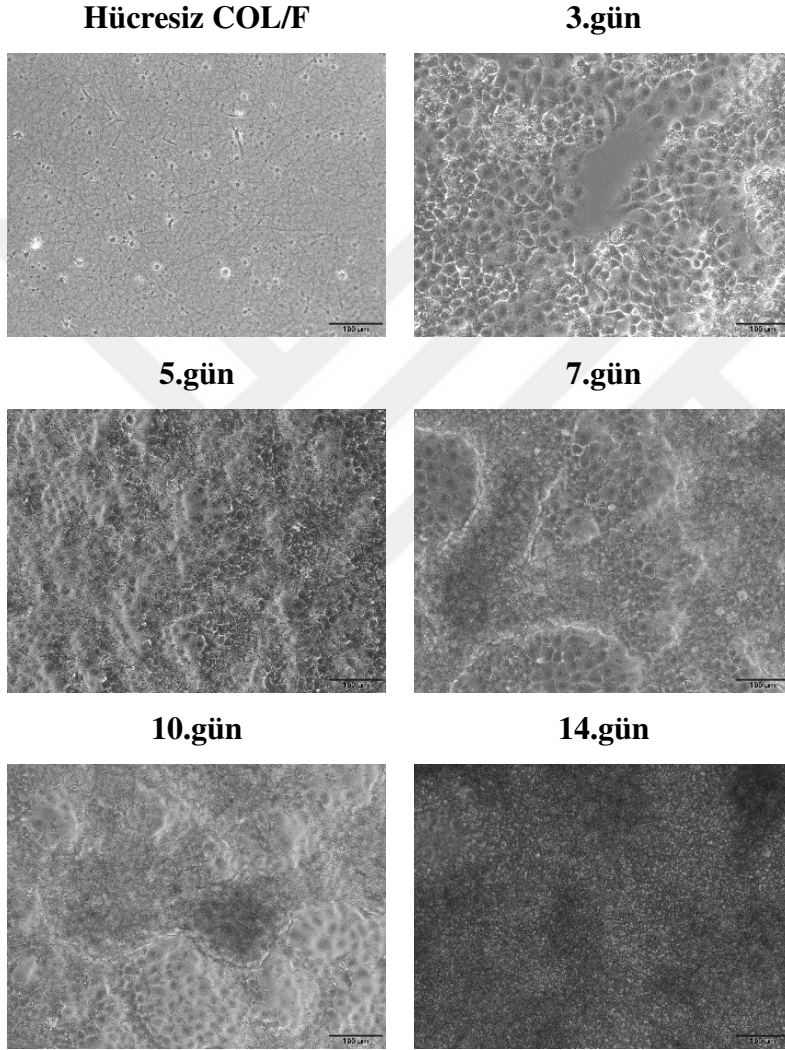


Resim 8: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC doku iskelesinde 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde kültürü. Ölçek: 100 µm.

6.3.2. KOLLAJEN FİBER DOKU İSKELESİ BULGULARI

JAR hücrelerinin kollajen fiber ile kültüründe; 3. ve 5. günlerde hücrelerin homojen bir dağılım göstererek çoğaldıkları, 7. günde kümeleşme eğilimine gittikleri ve 10. günden itibaren sferoid yapısını oluştukları ve 14. günde kümeleşmeyle birlikte sferoid sayısında artış olduğu görüldü (Resim 9).

COL/F ve JAR



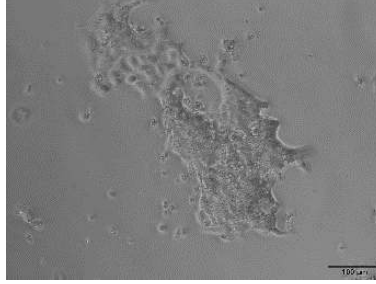
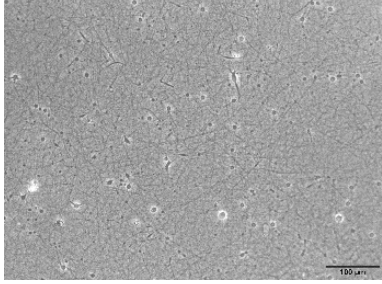
Resim 9: JAR hücrelerinin COL/F ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü.
Ölçek: 100 µm.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber ile kültüründe; hücrelerin iskele ile uyumlu olarak tüm günlerde çoğaldıkları, hem de fiber yapıları üzerinde hücrelerin olduğu görüldü (Resim 10).

COL/F ve RL95-2

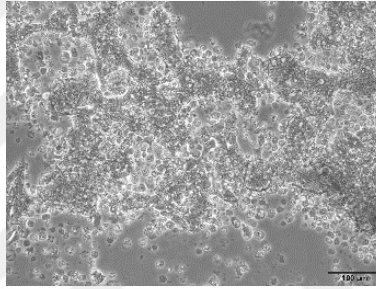
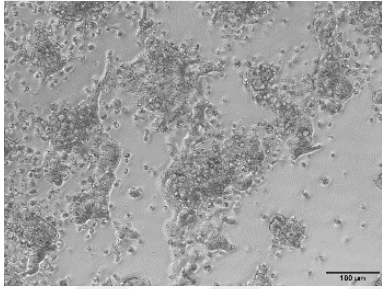
Hücresiz COL/F

3.gün



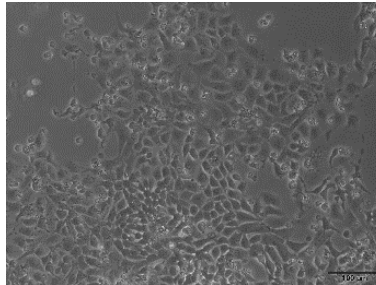
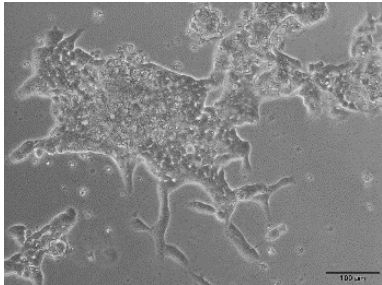
5.gün

7.gün



10.gün

14.gün



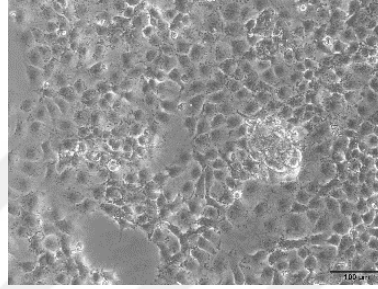
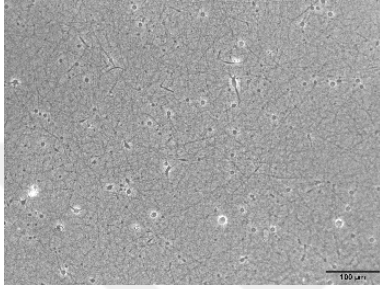
Resim 10: RL95-2 hücrelerinin COL/F ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 μ m.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen fiber ile kültüründe ise; iskele yüzeyinde endometrium epitel hücrelerinin 2.günde geniş yayılım sergiledikleri görüldü ve JAR hücrelerinin ekimi bugünde gerçekleştirildi. JAR hücrelerinin, endometrium epitel hücreleri üzerindeki kültüründe, 3.günde hücrelerin sferoid yapısı oluşumu sergiledikleri, 5.günden itibaren ise 7., 10. ve 14. günlerde sferoid sayısının arttığı görüldü (Resim 11).

COL/F RL95-2 ve JAR

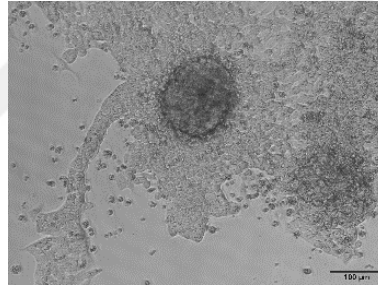
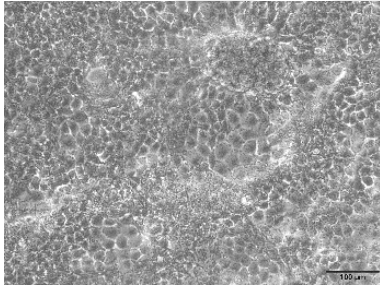
Hücresiz COL/F

3.gün



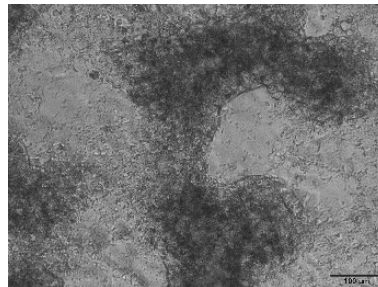
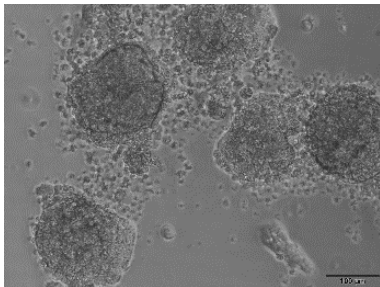
5.gün

7.gün



10.gün

14.gün



Resim 11: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/F ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

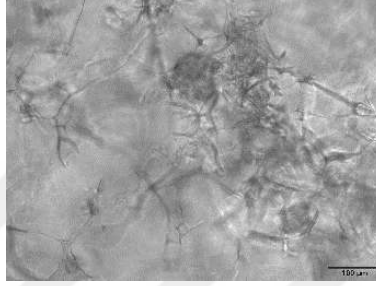
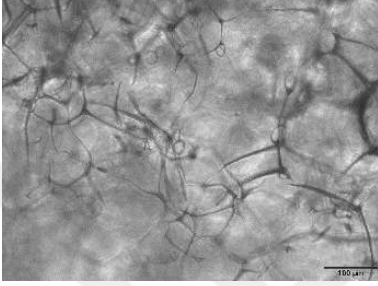
6.3.3. KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELESİ BULGULARI

JAR hücrelerinin kollajen köpük ile kültüründe; hücrelerin iskele ile birlikte tüm günlerde çoğaldıkları, hem köpük üzerinde hem de sferoid yapının içlerinde hücrelerin olduğu, kültürün 14.gününde hücrelerin %90 konfluent ulaşarak yüzeyi tamamen kapladıkları görüldü (Resim 12).

COL/K ve JAR

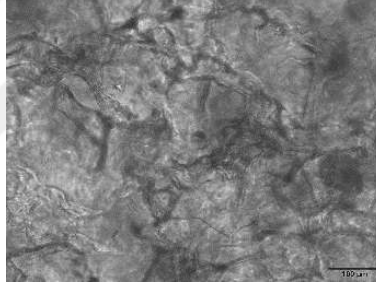
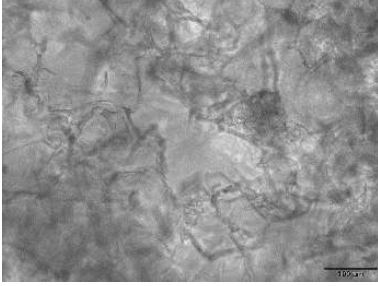
Hücresiz COL/K

3.gün



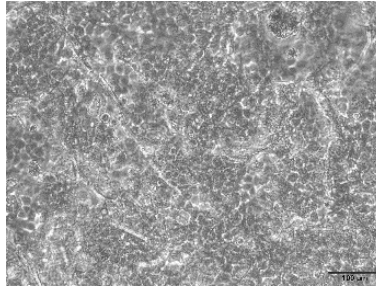
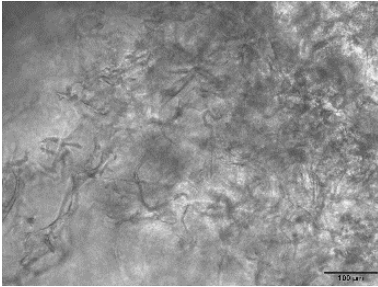
5.gün

7.gün



10.gün

14.gün



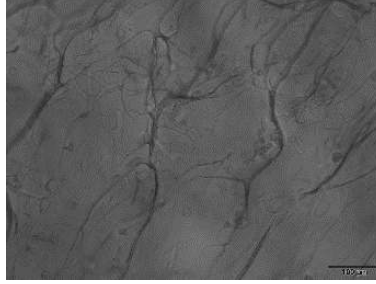
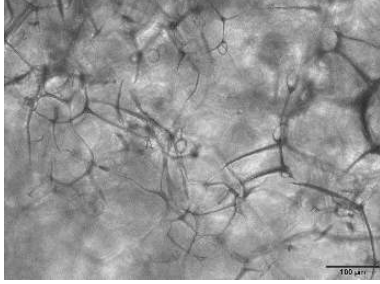
Resim 12: JAR hücrelerinin COL/K ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

RL95-2 hücrelerinin kollajen köpük ile kültüründe; hücrelerin kültürün 3., 5. ve 7. günlerinde iskelenin aralarında iken, kültürün 10. ve 14. günlerinde yüzeyde de hücrelerin olduğu görüldü (Resim 13).

COL/K ve RL95-2

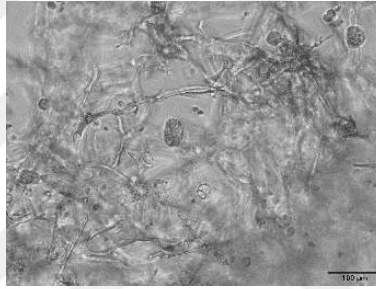
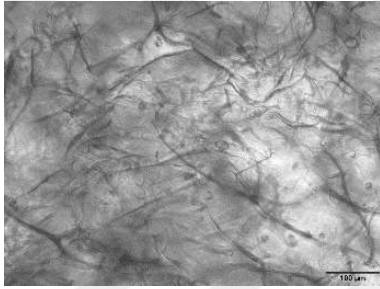
Hücresiz COL/K

3.gün



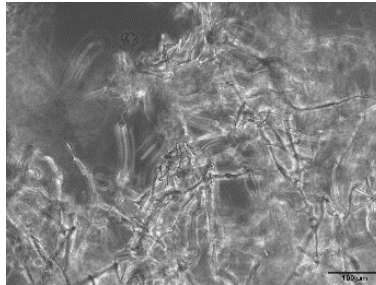
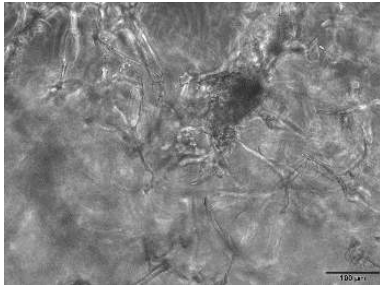
5.gün

7.gün



10.gün

14.gün



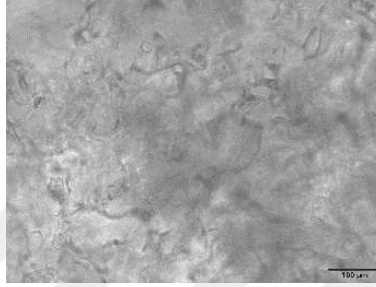
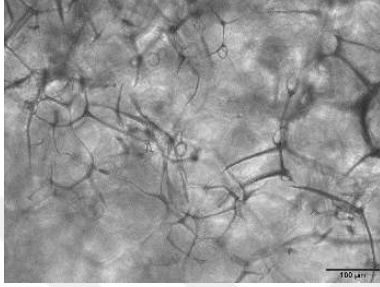
Resim 13: RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen köpük ile kültüründe ise; iskele yüzeyinde endometrium epitel hücrelerinin esas olarak köpük lifleri arasında olduğu görüldü. JAR hücrelerinin ekimi ile birlikte, endometrium epitel hücreleri üzerindeki kültürde 7. günde yüzeyde sferoid yapılarının oluştuğu, kültürün 10. ve 14. günlerinde sferoid yapılarının arttığı izlendi (Resim 14).

COL/K RL95-2 ve JAR

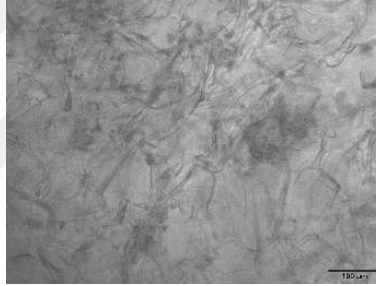
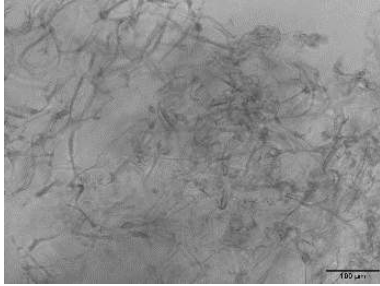
Hücresiz COL/K

3.gün



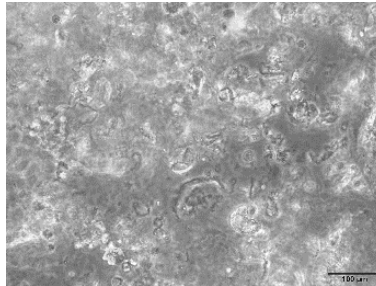
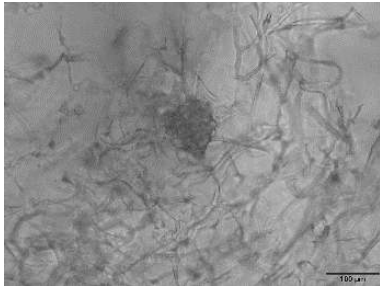
5.gün

7.gün



10.gün

14.gün



Resim 14: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerdeki hücre kültürü. Ölçek: 100 µm.

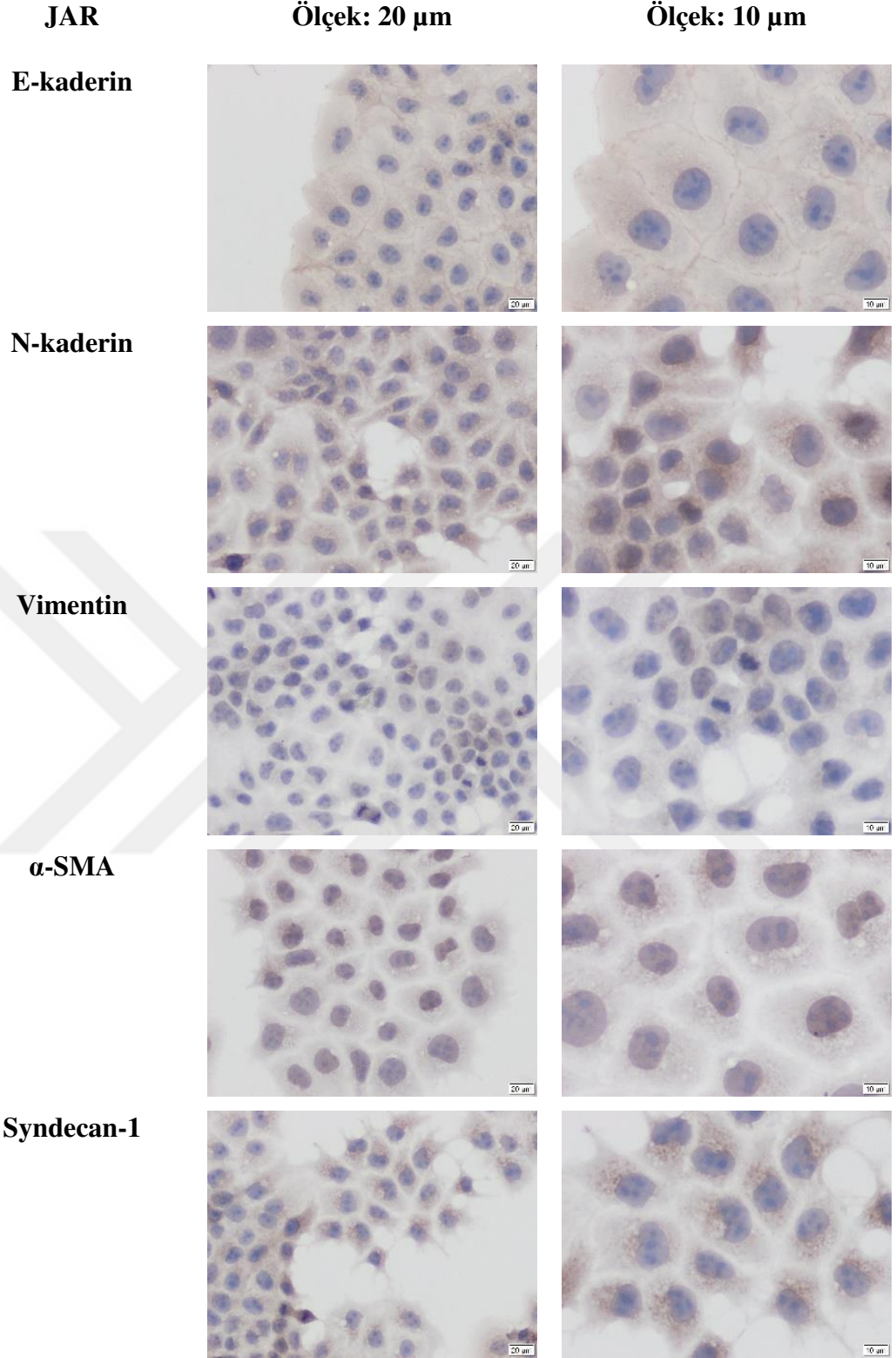
6.4. HÜCRELERİN İMMUNOSİTOKİMYA BOYANMA BULGULARI

E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 dağılımlarının, çalışmada kullanılan JAR ve RL95-2 hücrelerindeki dağılımları indirekt immunohistokimyasal analiz yöntemi ile incelendi.

JAR hücrelerinde N-kaderin immunoreaktivitesi kuvvetli pozitif (+++) iken, E-kaderin ve Syndecan-1 immunoreaktivitelerinin orta şiddette pozitif (++), α -SMA zayıf şiddetli pozitif (+), Vimentin' in ise yer yer zayıf şiddette (-/+) olduğu görüldü (Resim 15).

RL95-2 hücrelerinde E-kaderin immunoreaktivitesi kuvvetli pozitif (+++) iken, N-kaderin, Vimentin ve α -SMA immunoreaktivitelerinin orta şiddette pozitif olduğu (++) ve Syndecan-1 immunoreaktivitesinin ise orta şiddette (++) fakat yer yer kuvvetli pozitif (+++) olduğu saptandı (Resim 16).

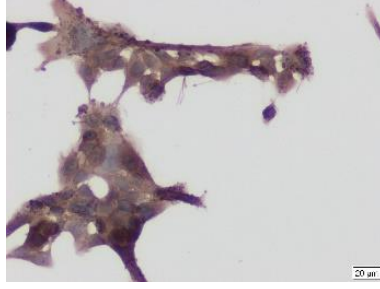
JAR ve RL95-2 hücrelerindeki immunohistokimyasal dağılımlar Tablo 11 de toplu olarak verilmiştir. İmmunohistokimya tekniğinin kontrolü amacıyla yapılan boyamalar tüm antikorlar için negatiftir (Resim 17).



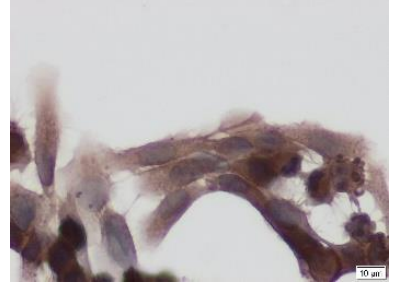
Resim 15: JAR hücrelerinin immunositokimya boyanma bulguları

RL95-2
E-kaderin

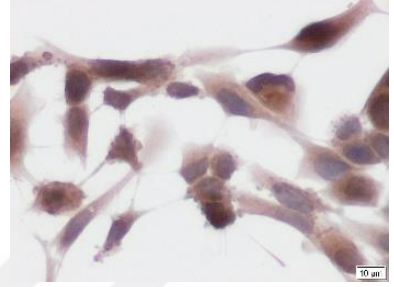
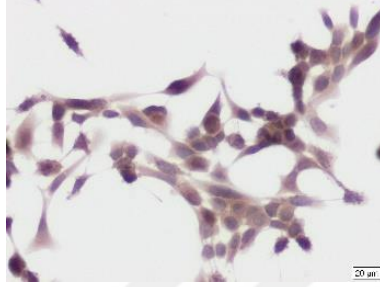
Ölçek: 20 µm



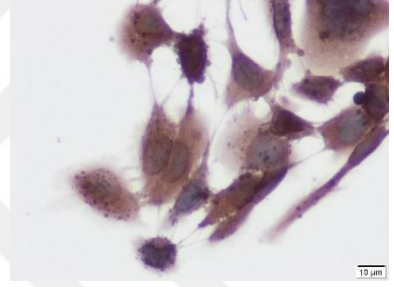
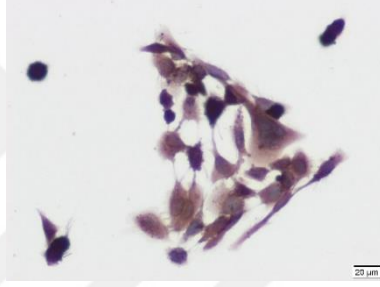
Ölçek: 10 µm



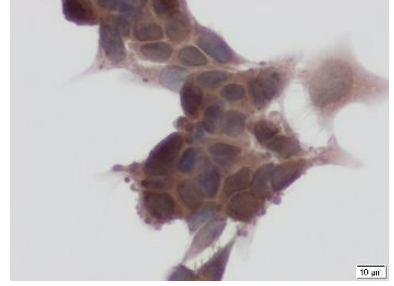
N-kaderin



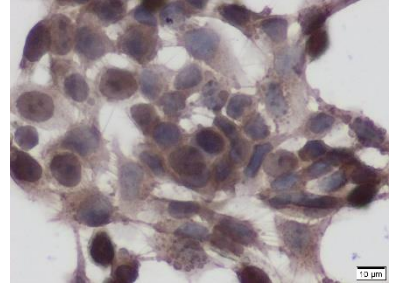
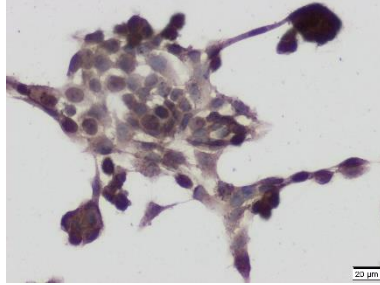
Vimentin



α -SMA



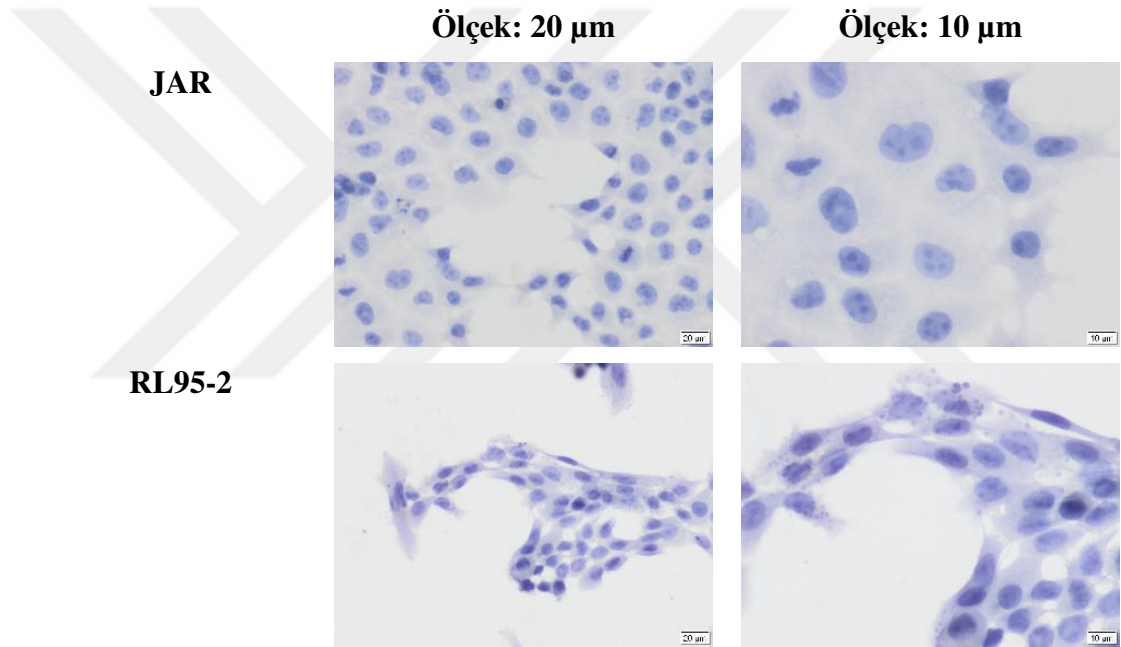
Syndecan-1



Resim 16: RL95-2 hücrelerinin immunositokimya boyanma bulguları

Tablo 11: JAR ve RL95-2 hücrelerinin immunoreaktivite değerlendirilmesi

	E-kaderin	N-kaderin	Vimentin	α -SMA	Syndecan-1
JAR	++	+++	$\pm$	+	++
RL95-2	+++	++	++	++	++/+++

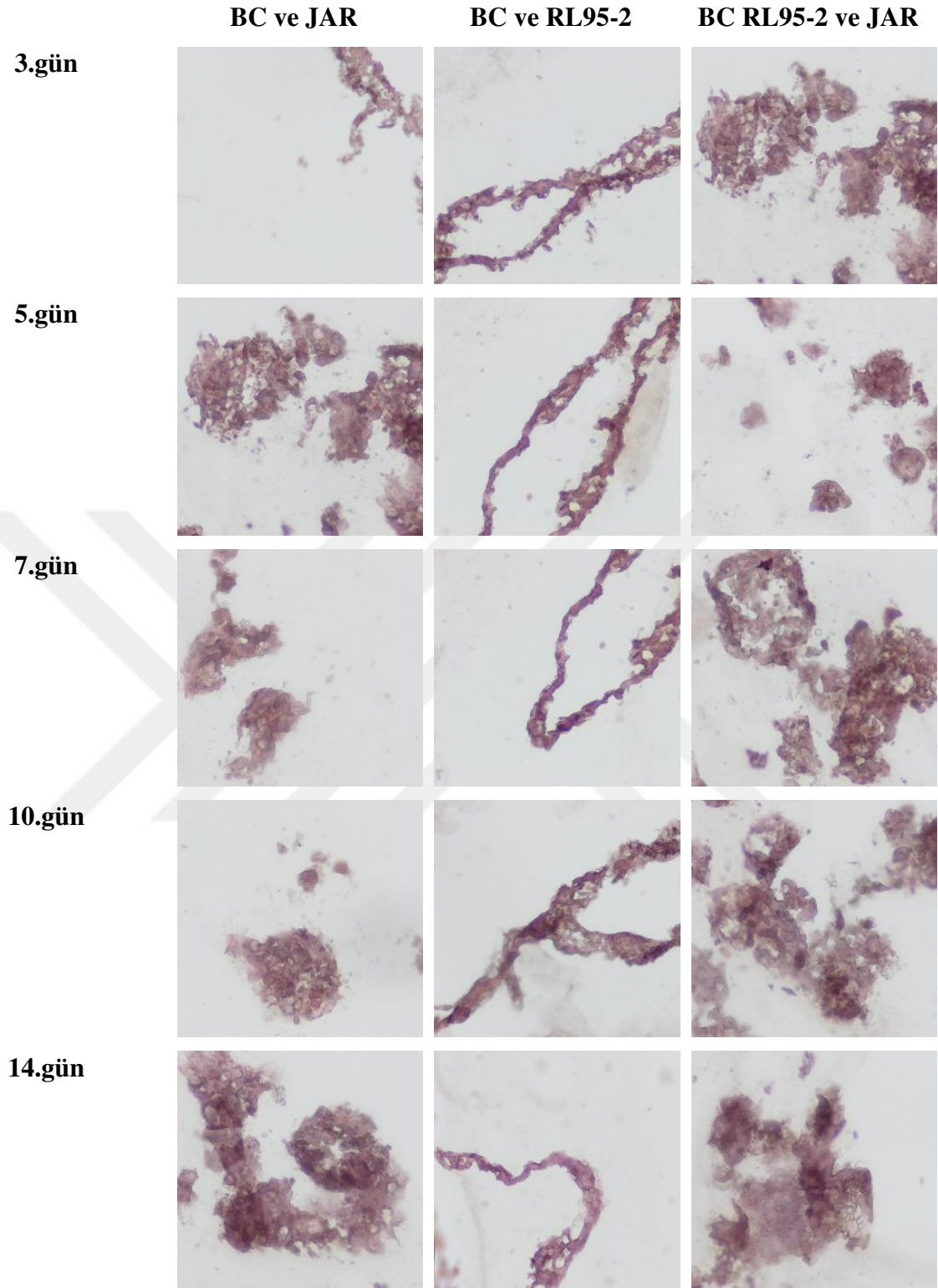


Resim 17: JAR ve RL95-2 hücrelerinde immunohistokimya tekniğinin kontrolü amacıyla yapılan negatif kontrol boyamaları

6.5. BAKTERİYAL SELÜLOZ ve KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELELERİNİN HÜCRELER İLE KÜLTÜRÜ SONRASINDA HİSTOKİMYASAL ANALİZİ

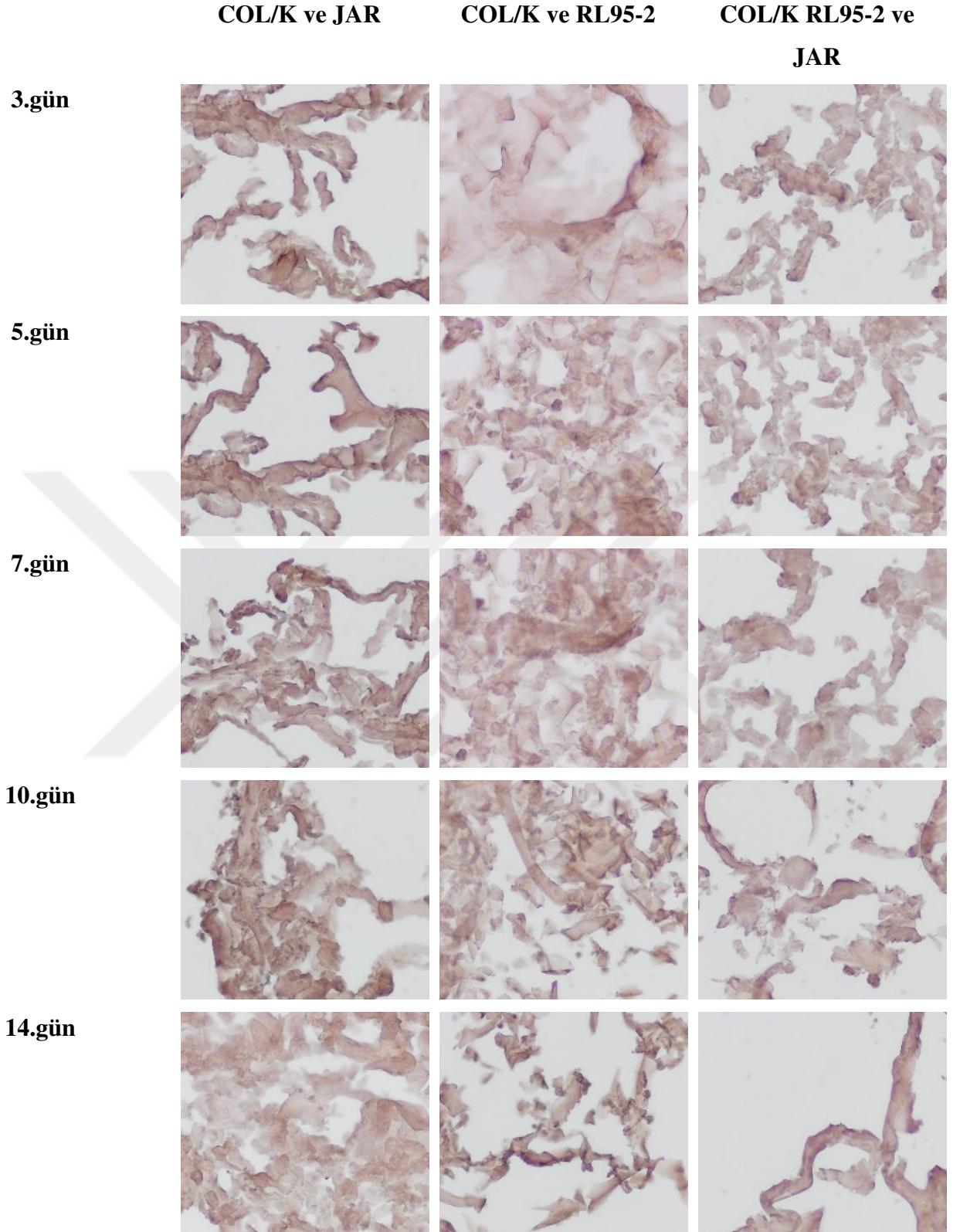
JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerinin birlikte BC ve COL/K doku iskeleleri üzerinde yapılan kültürde örnekler 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde inkübe edildikten sonra, her analiz gününde örnekler toplanarak frozen gömme için hazırlandılar. İskele üzerine hücre yerleşiminin analizi için frozen kesitler hematoxilen eozin ile boyandı.

BC grubunda; hematoxilen eozin boyaması sonrasında BC'a ait köprüler net olarak seçilemez iken, JAR ve RL95-2 hücrelerinin olduğu gruplarda iskeleler üzerinde eozinofilik sitoplazmalı, bazofilik çekirdekli hücreler analiz yapılan tüm günlerde görüldü. JAR hücrelerinin BC üzerinde kültüründe, kültürün 5. gününde yer yer sferoid yapıların varlığı tespit edilir iken, kültüre devam edildiğinde artan sferoid yapılarının varlığı izlendi. RL95-2 hücrelerinin BC üzerindeki kültürü sonrasında hücrelerin esas olarak iskele köprüleri üzerinde devam ettiği, iskeleler arasında hücrelerin olmadığı gözlemlendi. Bu bulgular analiz yapılan tüm günler için benzer idi. JAR ve RL95-2 hücrelerinin birlikte kültüre edildiği BC iskeleleri üzerinde, hücrelerin tek tek ekimi sonucunda görülen bulgulara benzer bulgular olduğu, RL95-2 hücrelerinin esas olarak köprüler üzerinde olduğu, JAR hücrelerinin ise RL95-2 hücreleri üzerinde ve etrafında yerleşim gösterdiği saptandı. JAR sferoidleri ise kültürün 3. gününden itibaren görüldü ve tüm analiz günlerinde sferoid yapıların olduğu, fakat büyüklüklerinin benzer olduğu saptandı (Resim 18).



Resim 18: BC doku iskelesi üzerinde JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerin kültürü sonrasında 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde H-E analizi. Ölçek: 20 µm.

COL/K grubunda; hematoksilin eozin boyaması sonrasında JAR ve RL95-2 hücrelerinin tek tek ekildiği gruplarda kültürün 3. gününde köpük iskelelerinin üzerinde yer yer hücreler gözlenir iken, iskelelerin boşluklarında hücreler gözlenmedi. Kültürün 5. gününde JAR hücrelerinin yine sadece köpük iskeleleri üzerinde yer yer olduğu gözlenir iken, RL95-2 hücrelerinin köpük iskeleleri üzerinde JAR hücrelerine nazaran daha fazla olduğu saptandı. Bu analiz gününde iskelelerin boşluklarında hala hücrelere rastlanmadı. JAR hücrelerinin COL/K üzerindeki kültür sonuçlarının kültürün 7. ve 10. günlerindeki analizlerinin 3. ve 5. günler ile benzer olduğu, kültürün 14. gününde ise JAR hücrelerinin köpük iskeleleri üzerinde daha fazla olduğu izlendi. JAR hücrelerinin COL/K üzerindeki kültürü sonrasında tüm analiz günlerinde sferoid yapılarına rastlanmadı. RL95-2 hücrelerinin 7. 10. ve 14. günlerdeki COL/K üzerindeki kültür sonuçlarının 5. gündeki sonuçlar ile benzer olduğu, hücre yerleşimi ve sayısında bir değişiklik olmadığı görüldü. COL/K iskele üzerinde RL95-2 ve JAR hücrelerinin birlikte kültürü sonrası, kültürün 3. gününde hücrelerin esas olarak iskele köprüleri üzerinde olduğu, kültüre devam edildiğinde küçük sferoid yapıların köprüler üzerinde olduğu ve sferoid yapılarının kültüre devam edilmesi ile büyüklüğünün değişmediği gözlemlendi (Resim 19).



Resim 19: COL/K doku iskelesi üzerinde JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerin kültürü sonrasında 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde H-E analizi. Ölçek: 20 µm.

6.6. BAKTERİYAL SELÜLOZ ve KOLLAJEN KÖPÜK DOKU İSKELELERİNİN HÜCRELER ile KÜLTÜRÜ SONRASINDA İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerinin kombine halde, BC doku iskelesine ekimi ile E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 ifadelerinde farklı şiddetlerde immunoreaktivite izlendi (Tablo 12).

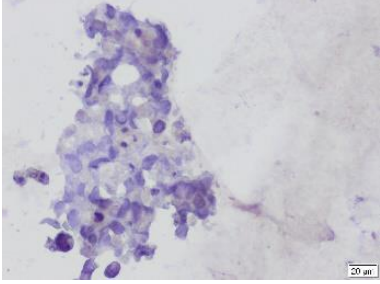
JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerinin kombine halde, COL/K doku iskelesine ekimi ile E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 ifadelerinde farklı şiddetlerde immunoreaktivite izlendi (Tablo 13).



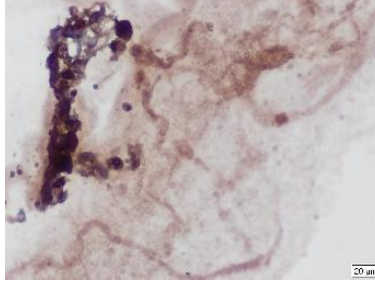
JAR hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1, Vimentin, E-kaderin immunoreaktivitelerinin şiddetli pozitif (++++), α -SMA ve N-kaderin immunoreaktivitelerinin ise kuvvetli pozitif (+++) olduğu görüldü (Resim 20).

BC ve JAR 3.gün

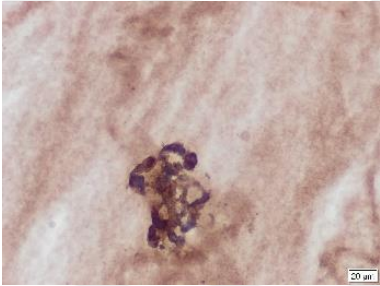
Kontrol İmmün Boyama



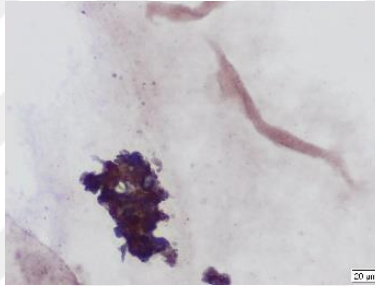
E-kaderin



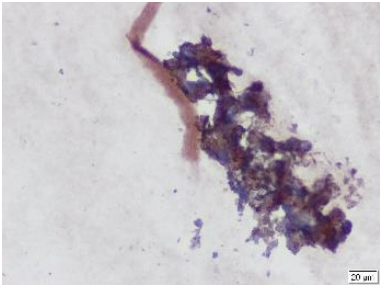
N-kaderin



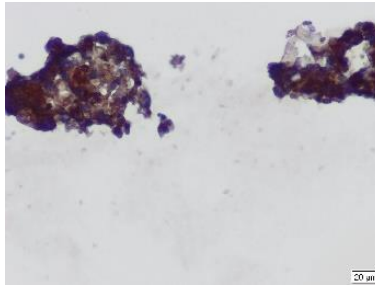
Vimentin



α -SMA

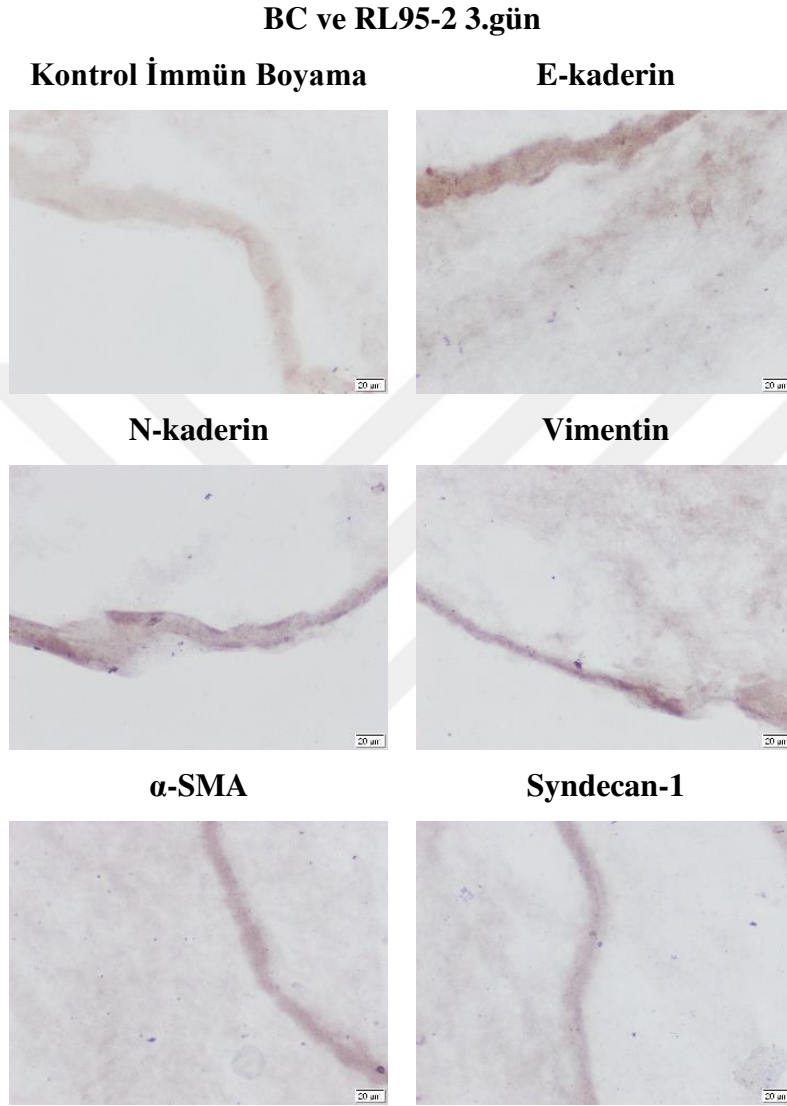


Syndecan-1



Resim 20: JAR hücrelerinin BC ile kültürünün 3. gününde, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite Syndecan-1, Vimentin, E-kaderin de görülmüştür.

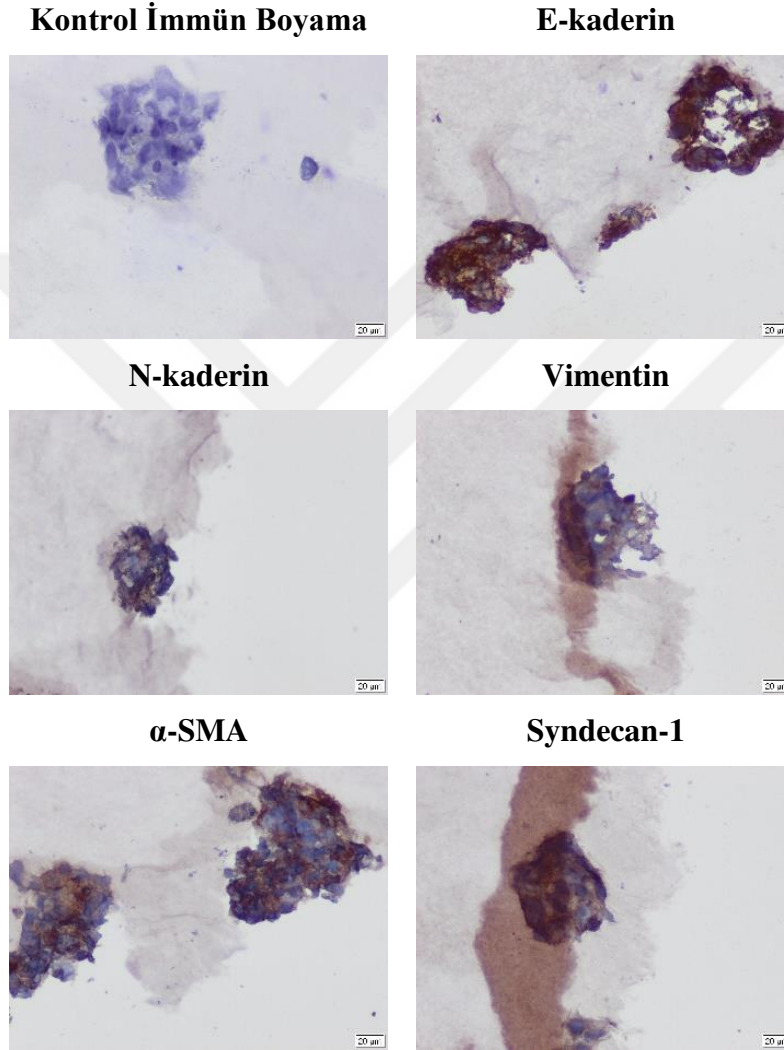
RL95-2 hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), N-kaderin ve Vimentin de orta şiddetli pozitif (++), α -SMA ve Syndecan-1 de ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite görüldü (Resim 21).



Resim 21: RL95-2 hücrelerinin BC ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; JAR hücrelerinin sferoid yapı oluşturdıkları ve E-kaderin immunoreaktivitesinin şiddetli pozitif (++++), α -SMA ve Syndecan-1 immunoreaktivitelerinin kuvvetli pozitif (+++), N-kaderin ve Vimentin de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivitenin olduğu görüldü (Resim 22).

BC RL95-2 ve JAR 3.gün

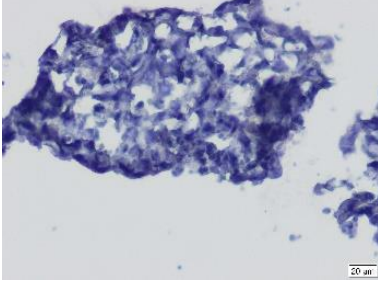


Resim 22: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 µm. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

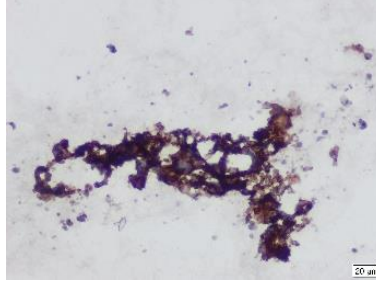
JAR hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin de şiddetli pozitif (++++), N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü (Resim 23).

BC ve JAR 5.gün

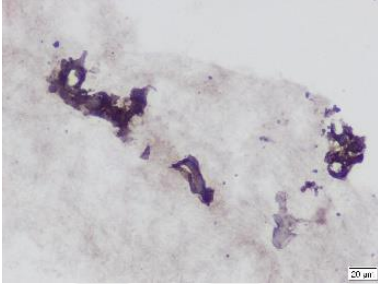
Kontrol İmmün Boyama



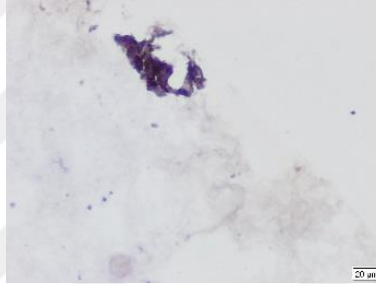
E-kaderin



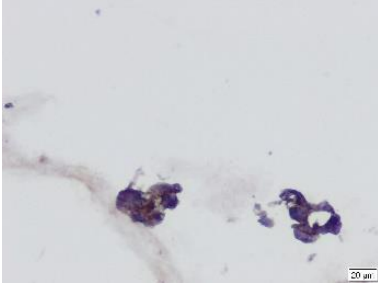
N-kaderin



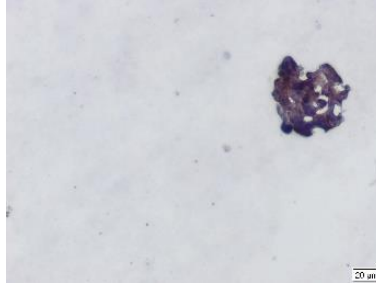
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

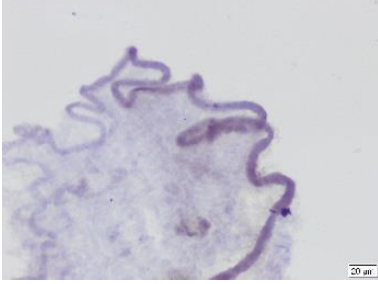


Resim 23: JAR hücrelerinin BC ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

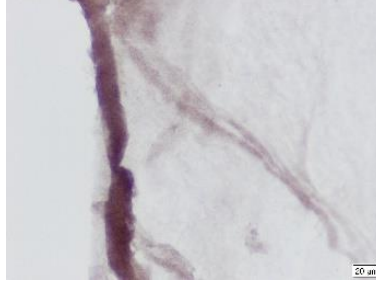
RL95-2 hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++), Vimentin ve α -SMA da ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü (Resim 24).

BC ve RL95-2 5.gün

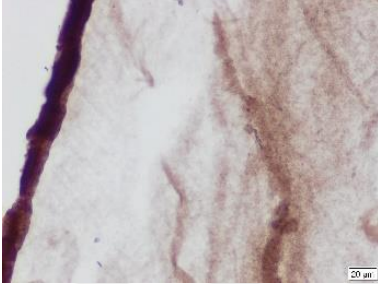
Kontrol İmmün Boyama



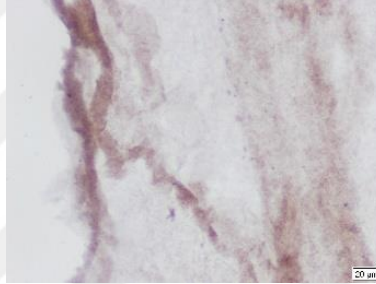
E-kaderin



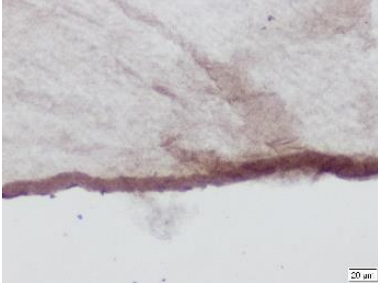
N-kaderin



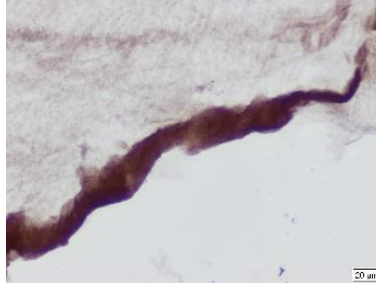
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

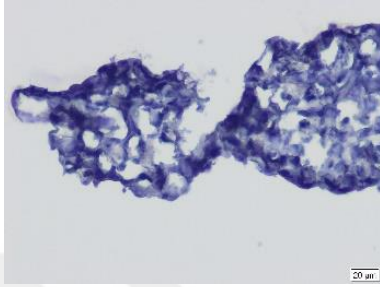


Resim 24: RL95-2 hücrelerinin BC ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin ve Syndecan-1 de görülmüştür.

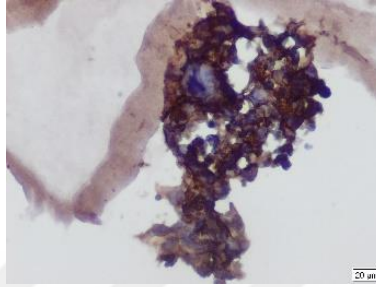
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin de şiddetli pozitif (++++), Vimentin ve Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++), N-kaderin ve α -SMA da ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite görüldü (Resim 25).

BC RL95-2 ve JAR 5.gün

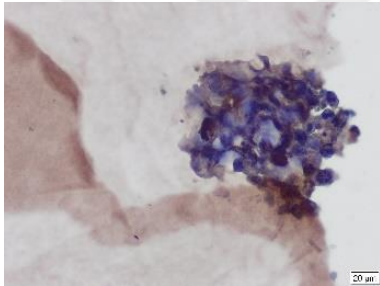
Kontrol İmmün Boyama



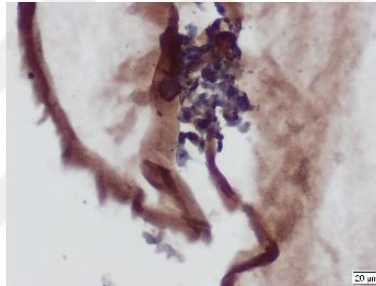
E-kaderin



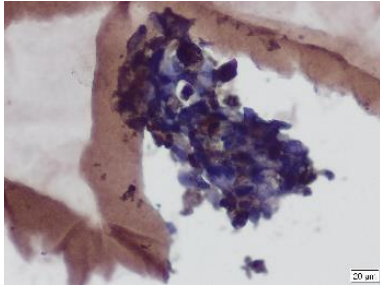
N-kaderin



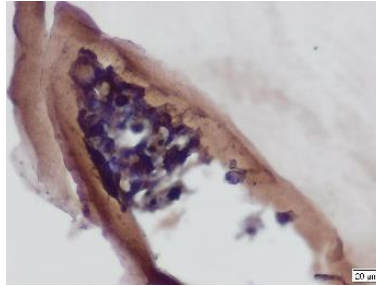
Vimentin



α -SMA



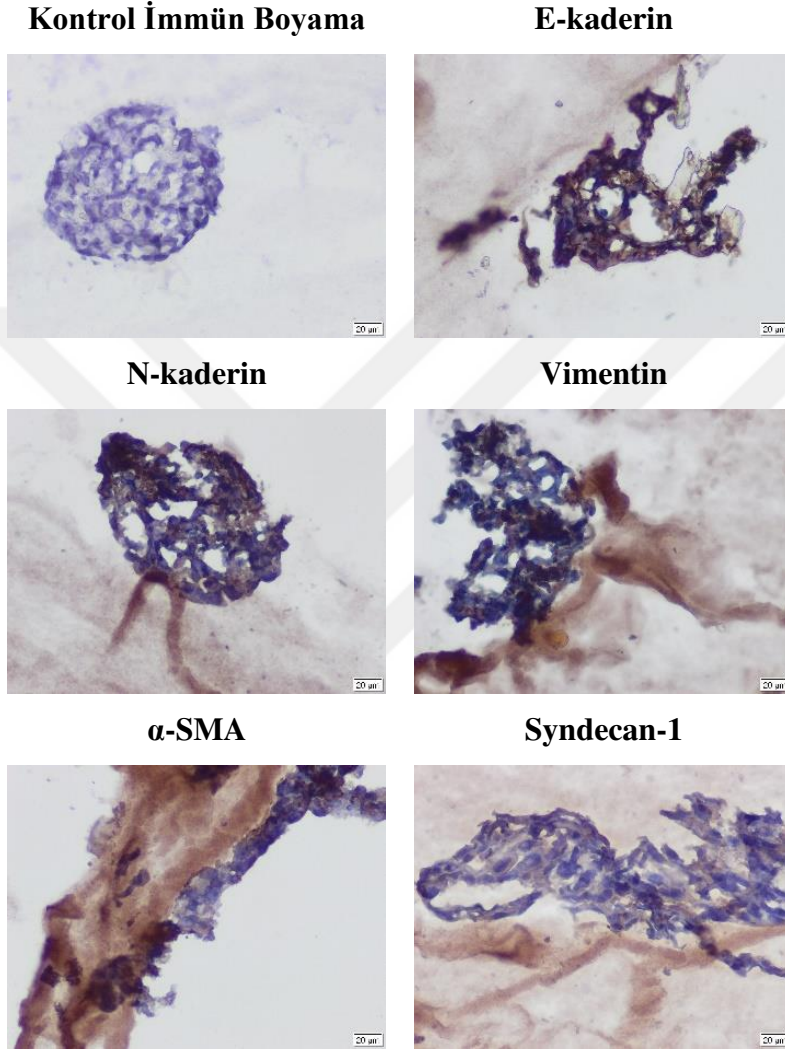
Syndecan-1



Resim 25: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 µm. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

JAR hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), N-kaderin ve Vimentin de orta şiddetli pozitif (++), α -SMA da zayıf şiddetli pozitif (+), Syndecan-1 de ise yer yer zayıf şiddetli pozitif (+/-) immunoreaktivite görüldü (Resim 26).

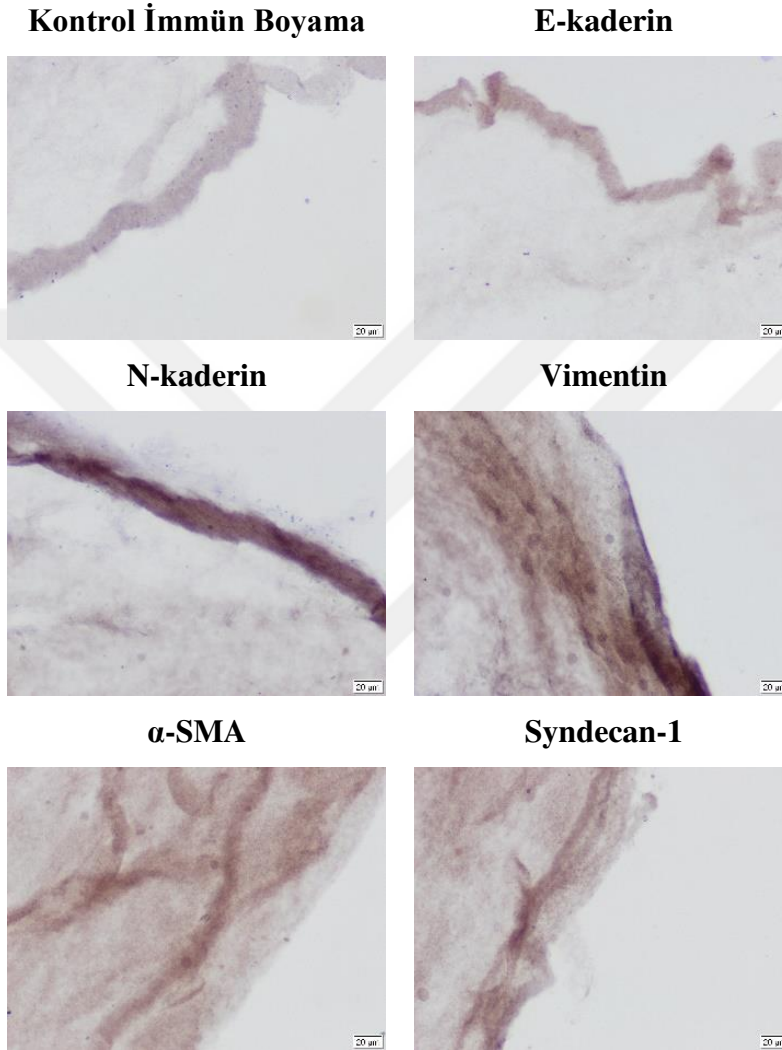
BC ve JAR 7.gün



Resim 26: JAR hücrelerinin BC ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin de şiddetli pozitif (++++), Vimentin de kuvvetli pozitif (+++), E-kaderin, α -SMA ve Syndecan-1 de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite görüldü (Resim 27).

BC ve RL95-2 7.gün

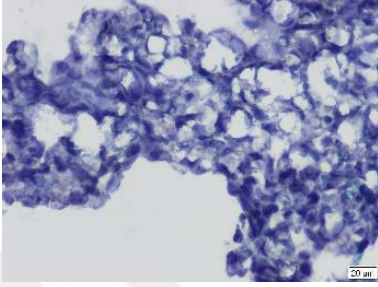


Resim 27: RL95-2 hücrelerinin BC ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

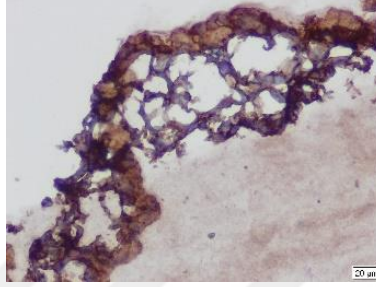
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde bakteriyel selüloz doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++), Vimentin ve Syndecan-1 de ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü (Resim 28).

BC RL95-2 ve JAR 7.gün

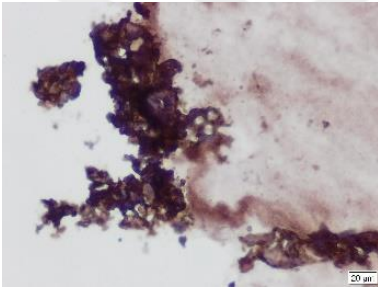
Kontrol İmmün Boyama



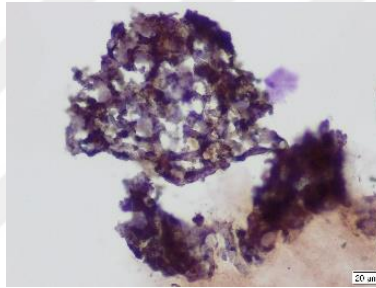
E-kaderin



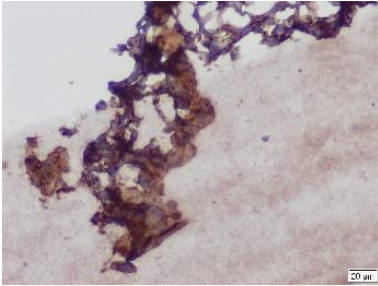
N-kaderin



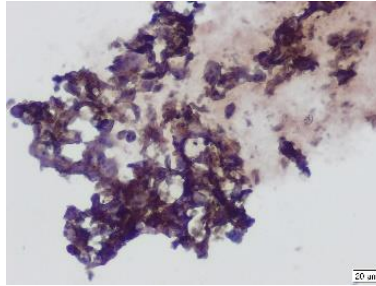
Vimentin



α -SMA



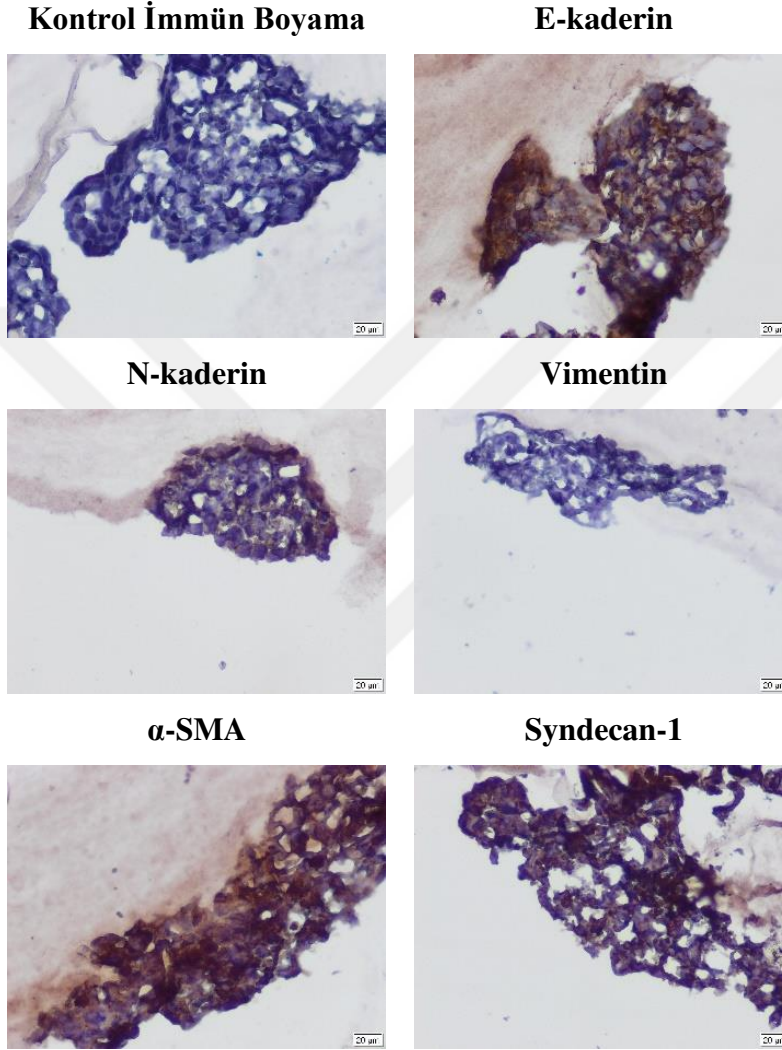
Syndecan-1



Resim 28: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 µm. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin ve α -SMA de görülmüştür.

JAR hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++), Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++), N-kaderin de orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite görüldü. Vimentin de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 29).

BC ve JAR 10.gün



Resim 29: JAR hücrelerinin BC ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin ve α -SMA de görülmüştür.

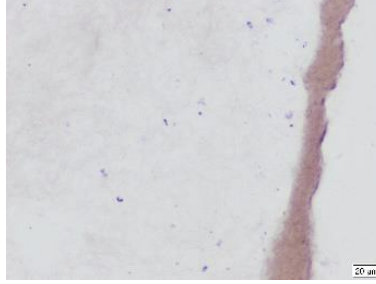
RL95-2 hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Vimentin ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++), E-kaderin, N-kaderin ve Syndecan-1 de ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü (Resim 30).

BC ve RL95-2 10.gün

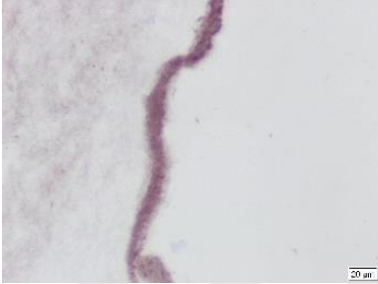
Kontrol İmmün Boyama



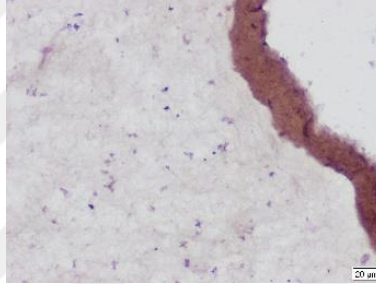
E-kaderin



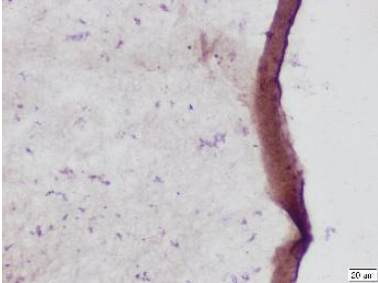
N-kaderin



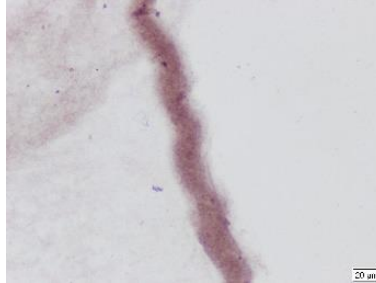
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

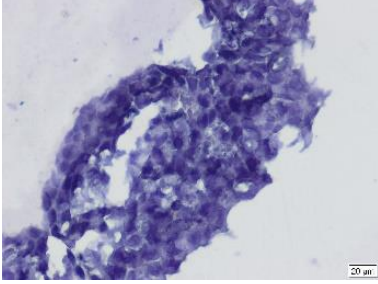


Resim 30: RL95-2 hücrelerinin BC ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite Vimentin ve α -SMA de görülmüştür.

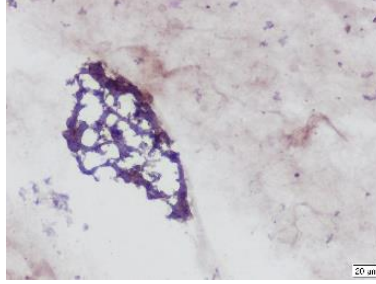
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++), E-kaderin de ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü (Resim 31).

BC RL95-2 ve JAR 10.gün

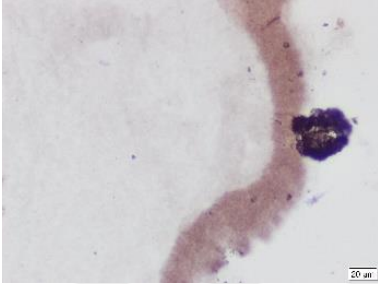
Kontrol İmmün Boyama



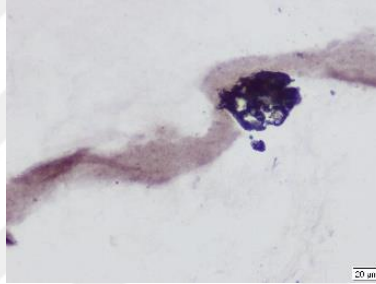
E-kaderin



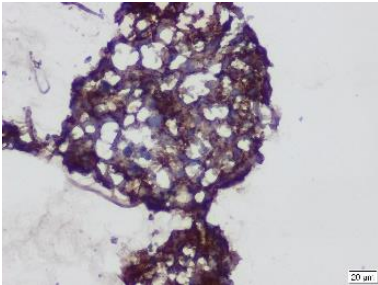
N-kaderin



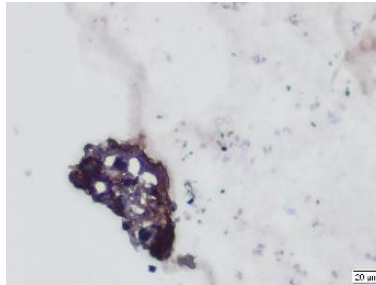
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

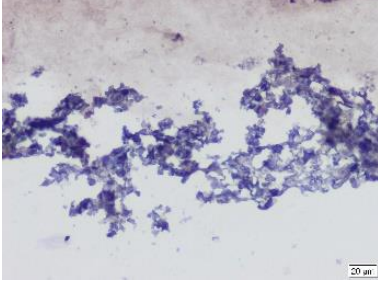


Resim 31: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

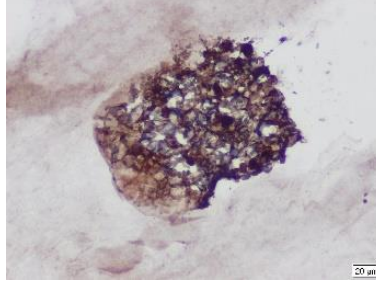
JAR hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++), N-kaderin ve Syndecan-1 de orta şiddetli pozitif (++) , Vimentin de ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite görüldü (Resim 32).

BC ve JAR 14.gün

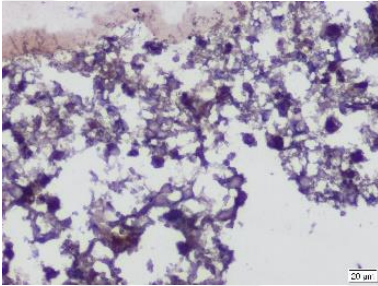
Kontrol İmmün Boyama



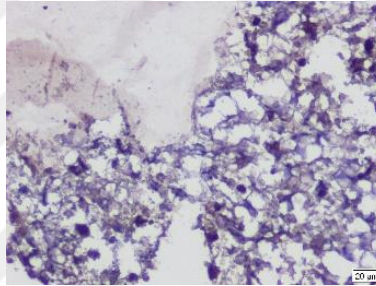
E-kaderin



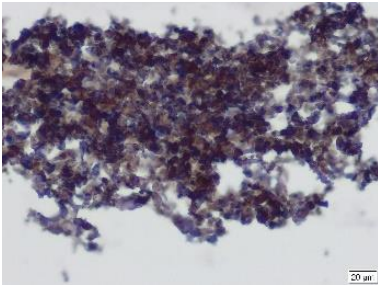
N-kaderin



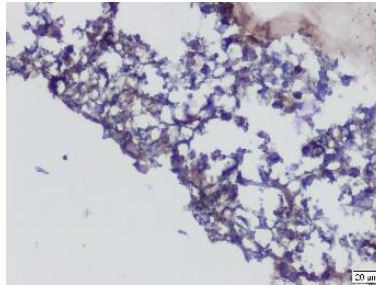
Vimentin



α -SMA



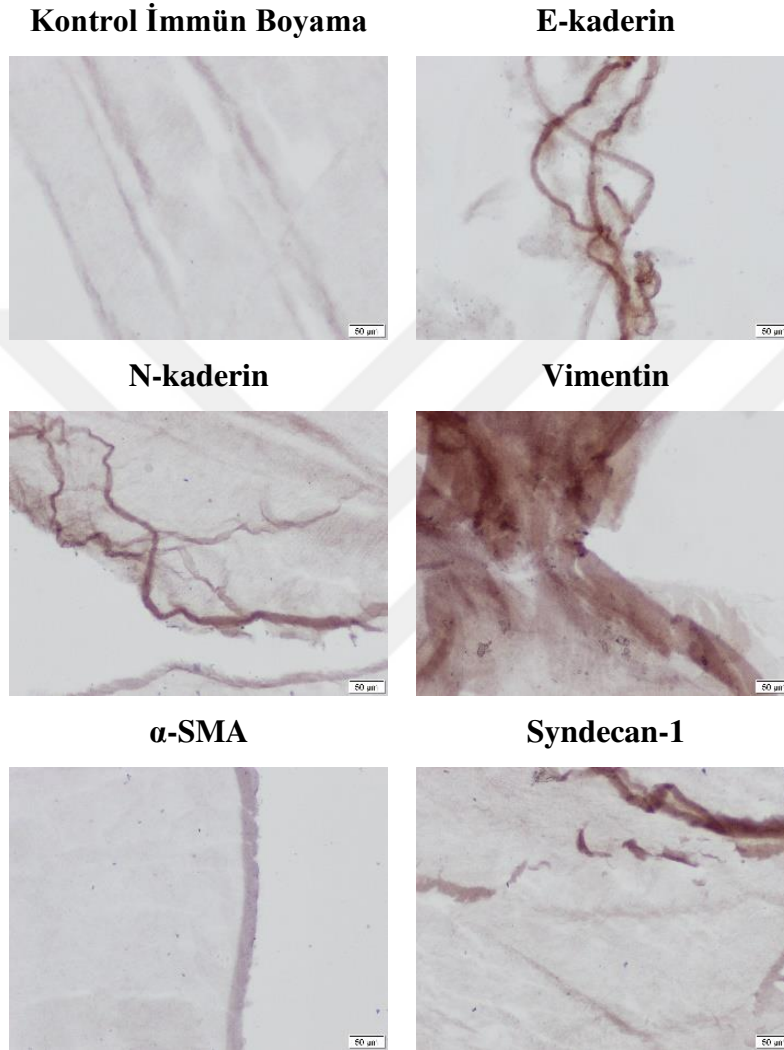
Syndecan-1



Resim 32: JAR hücrelerinin BC ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin ve α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin bakteriyal selüloz doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin, Vimentin ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++), N-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite görüldü (Resim 33).

BC ve RL95-2 14.gün

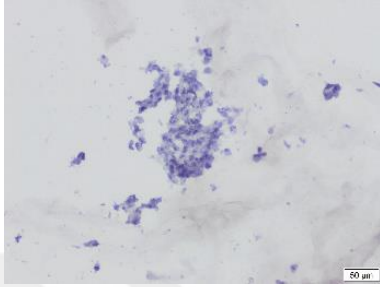


Resim 33: RL95-2 hücrelerinin BC ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, Vimentin ve Syndecan-1 de görülmüştür.

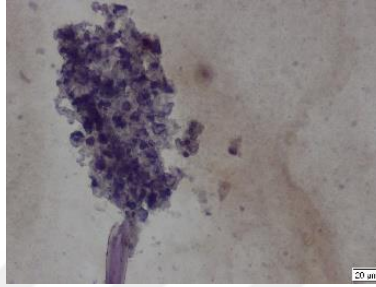
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde bakteriyel selüloz doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Vimentin de şiddetli pozitif (++++), α -SMA da kuvvetli pozitif (+++), E-kaderin, N-kaderin ve Syndecan-1 de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite görüldü (Resim 34).

BC RL95-2 ve JAR 14.gün

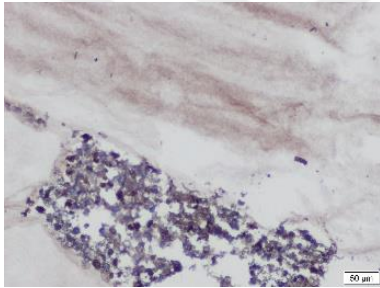
Kontrol İmmün Boyama



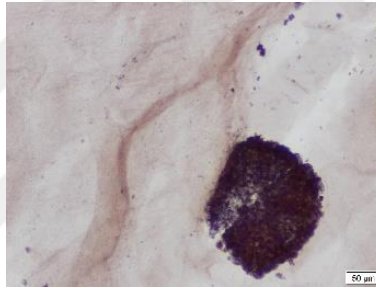
E-kaderin



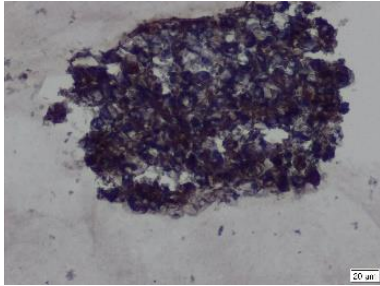
N-kaderin



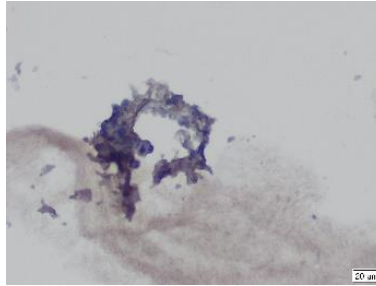
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

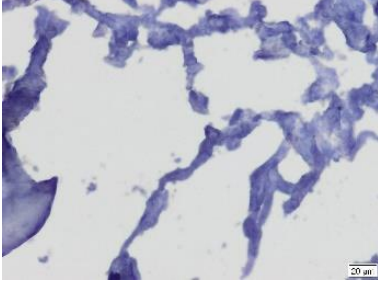


Resim 34: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde BC ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite Vimentin de görülmüştür.

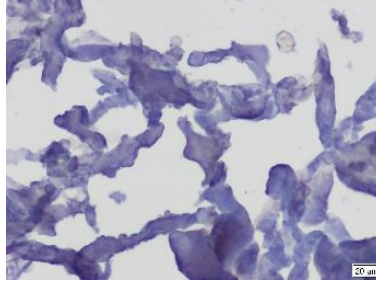
JAR hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin, Vimentin ve α -SMA da zayıf şiddetli pozitif (+), N-kaderin ve Syndecan-1 de ise yer yer zayıf şiddetli pozitif (+/-) immunoreaktivite görüldü (Resim 35).

COL/K ve JAR 3.gün

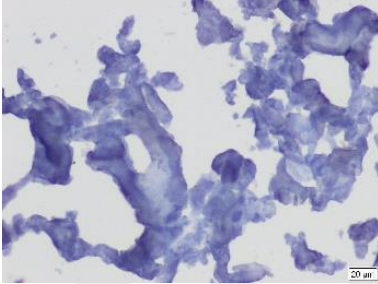
Kontrol İmmün Boyama



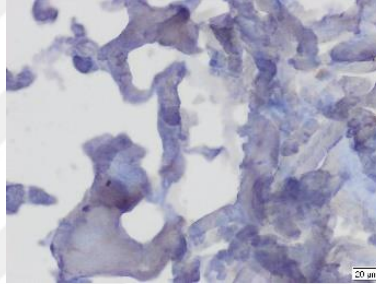
E-kaderin



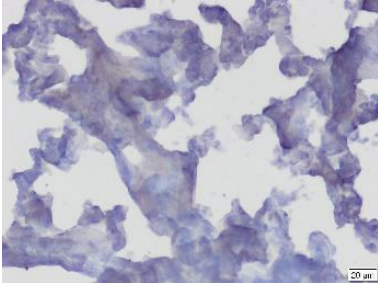
N-kaderin



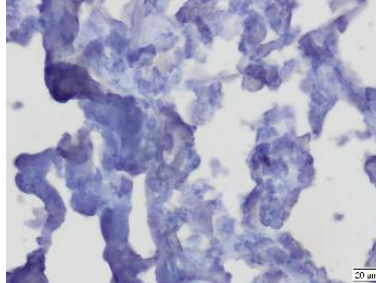
Vimentin



α -SMA



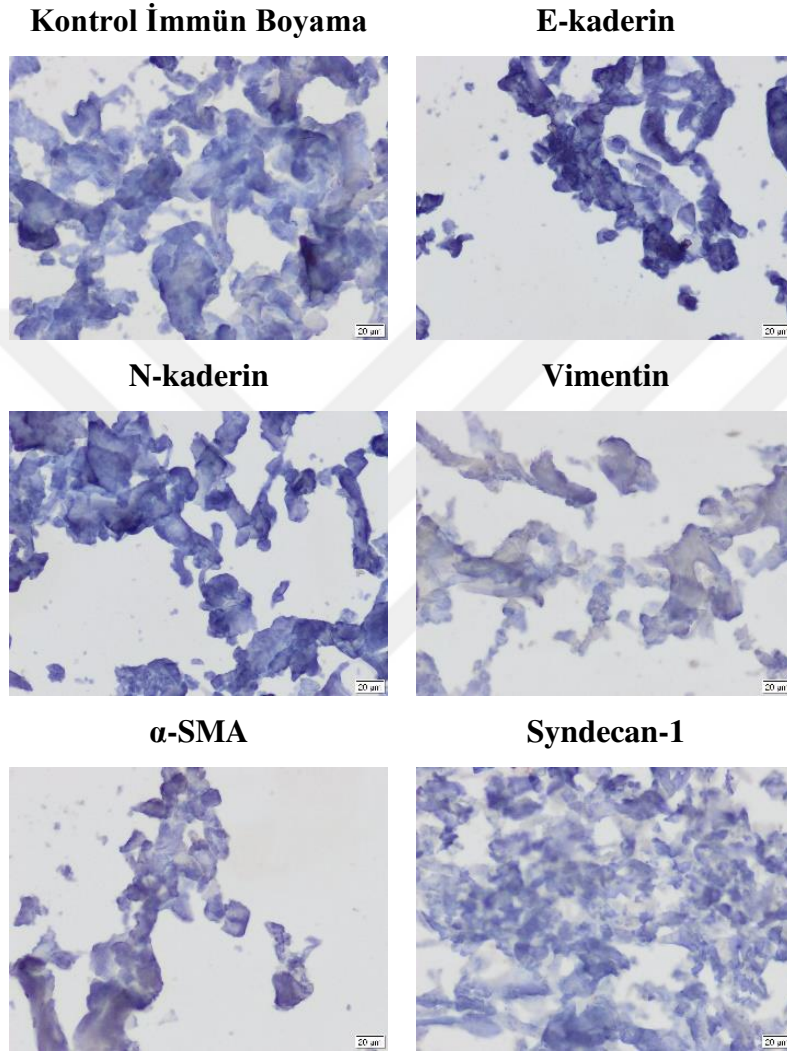
Syndecan-1



Resim 35: JAR hücrelerinin COL/K ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, Vimentin ve α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Vimentin ve α -SMA da zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite görüldü. E-kaderin, N-kaderin ve Syndecan-1 de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 36).

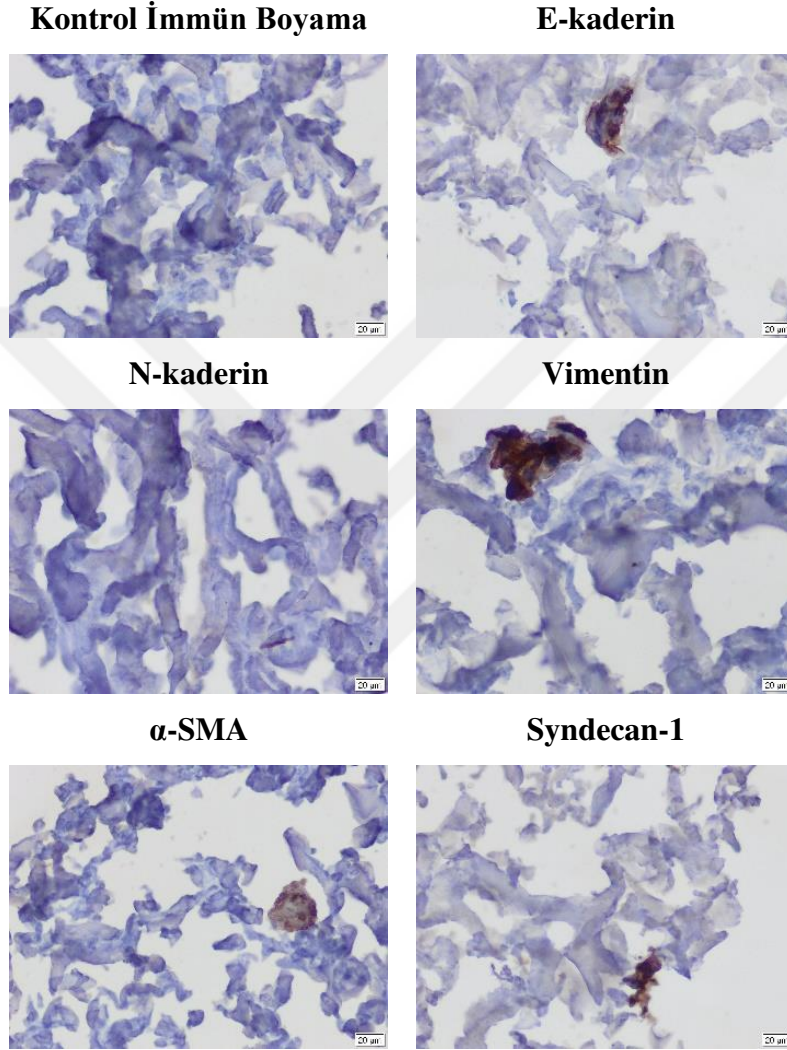
COL/K ve RL95-2 3.gün



Resim 36: RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite Vimentin ve α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen köpük doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Vimentin de şiddetli pozitif (++++), E-kaderin ve Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite görüldü. N-kaderin de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 37).

COL/K RL95-2 ve JAR 3.gün

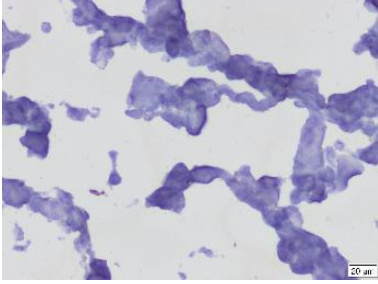


Resim 37: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 3.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite Vimentin de görülmüştür.

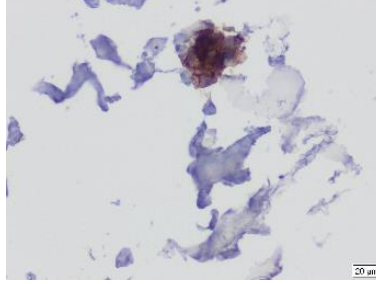
JAR hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin de şiddetli pozitif (++++), α -SMA ve Syndecan-1 de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite görüldü (Resim 38).

COL/K ve JAR 5.gün

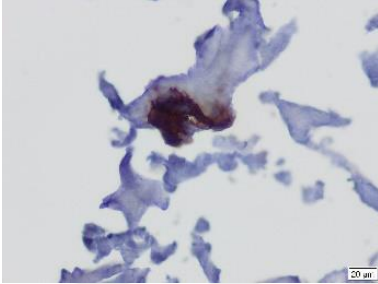
Kontrol İmmün Boyama



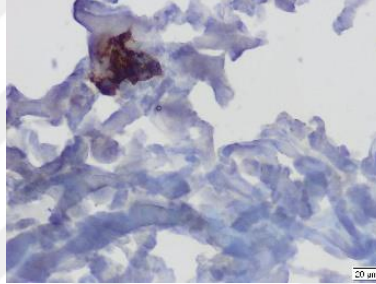
E-kaderin



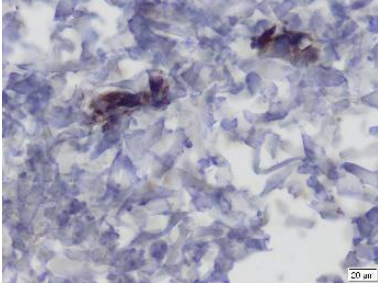
N-kaderin



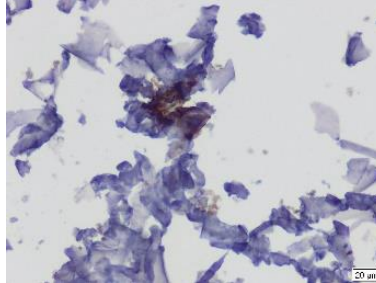
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

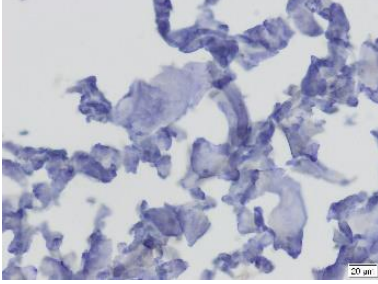


Resim 38: JAR hücrelerinin COL/K ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

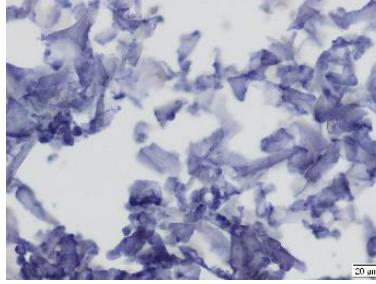
RL95-2 hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 de zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite görüldü. E-kaderin, N-kaderin, Vimentin ve α -SMA da ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 39).

COL/K ve RL95-2 5.gün

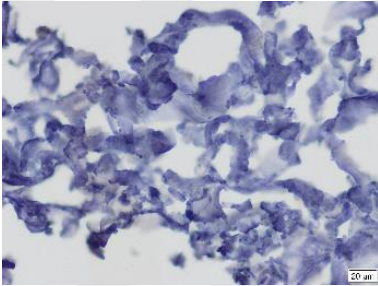
Kontrol İmmün Boyama



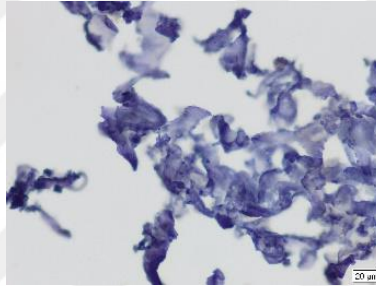
E-kaderin



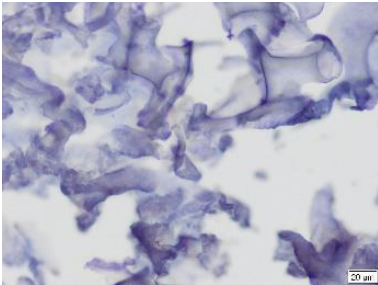
N-kaderin



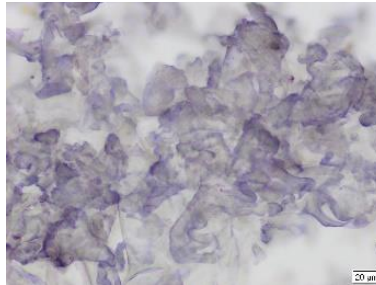
Vimentin



α -SMA



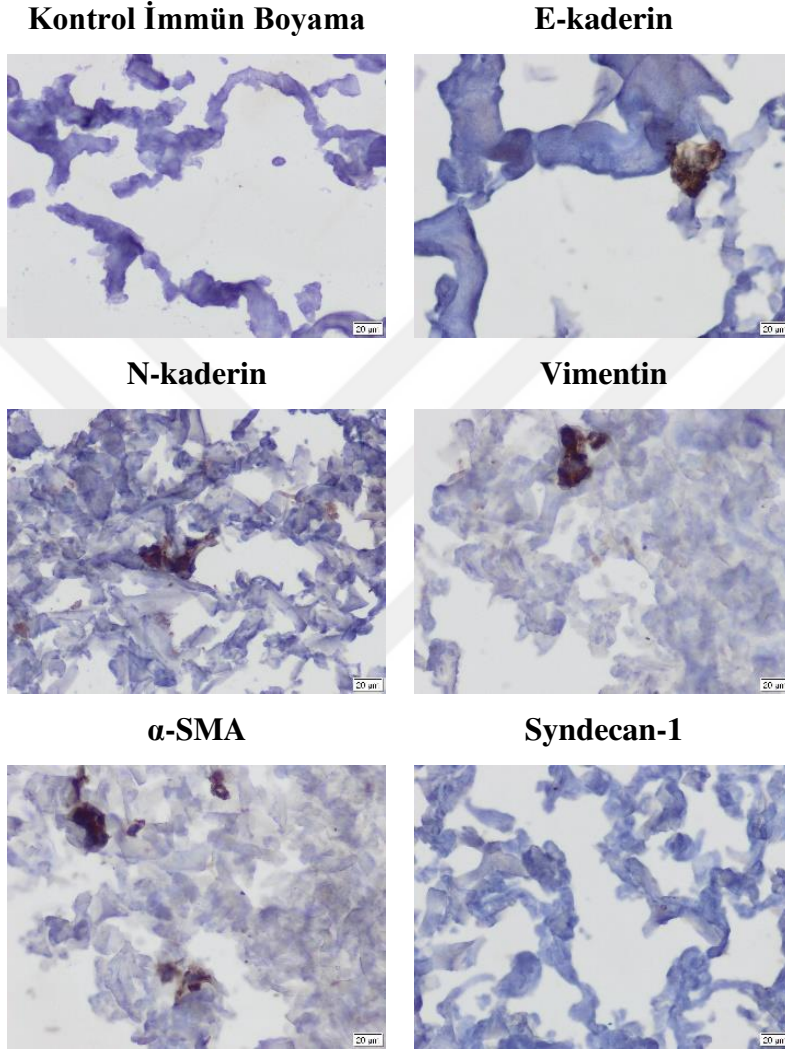
Syndecan-1



Resim 39: RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite Syndecan-1 de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen köpük doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü. Syndecan-1 de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 40).

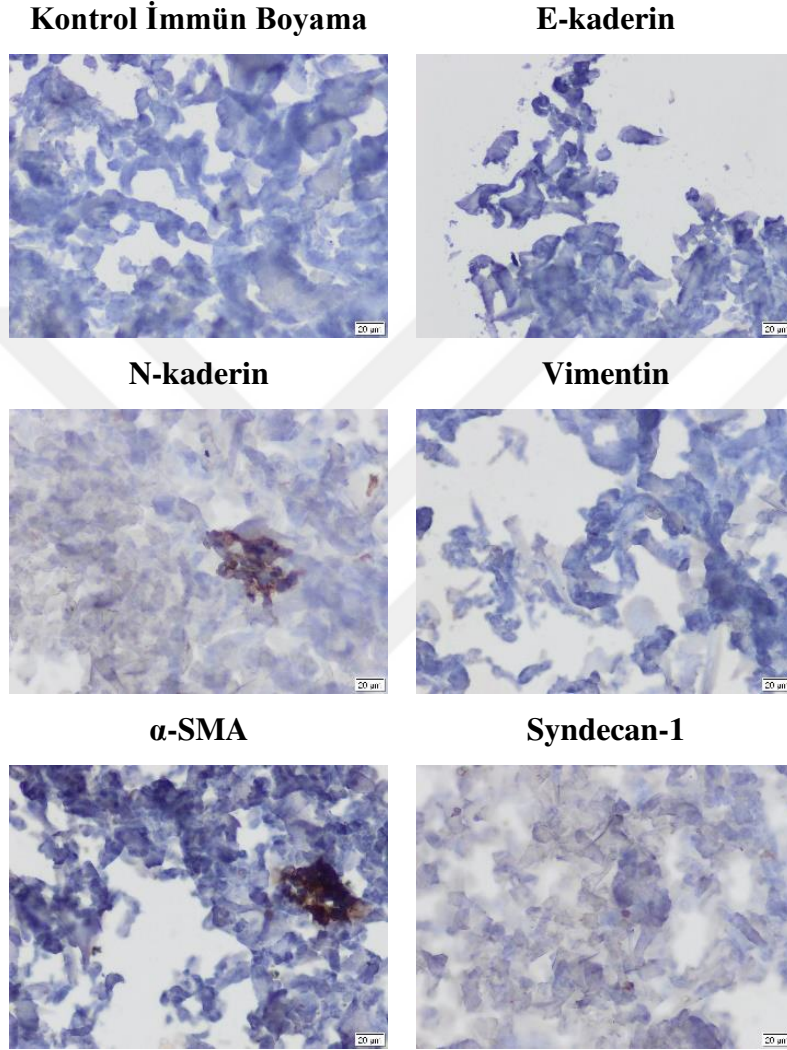
COL/K RL95-2 ve JAR 5.gün



Resim 40: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 5.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin ve α -SMA de görülmüştür.

JAR hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; α -SMA da şiddetli pozitif (++++), N-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), Syndecan-1 de yer yer zayıf şiddetli pozitif (+/-) immunoreaktivite görüldü. E-kaderin ve Vimentin de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 41).

COL/K ve JAR 7.gün

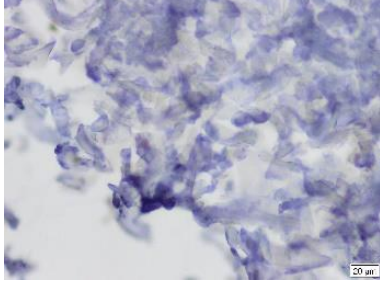


Resim 41: JAR hücrelerinin COL/K ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite α -SMA de görülmüştür.

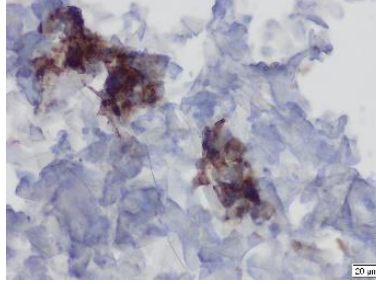
RL95-2 hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü (Resim 42).

COL/K ve RL95-2 7.gün

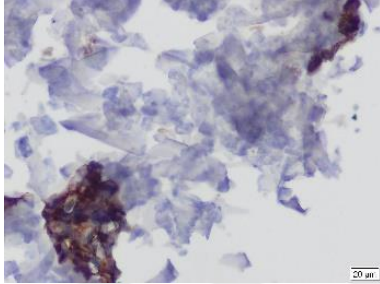
Kontrol İmmün Boyama



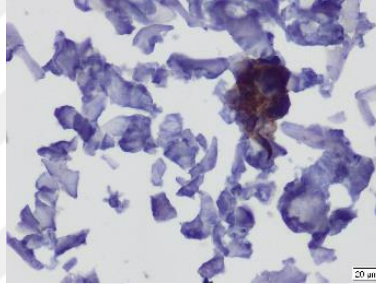
E-kaderin



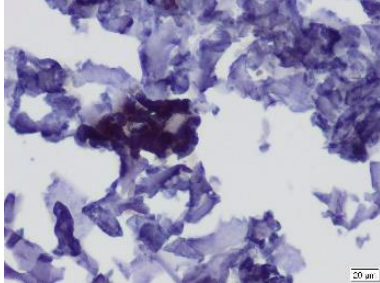
N-kaderin



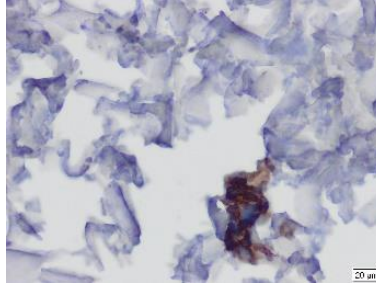
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

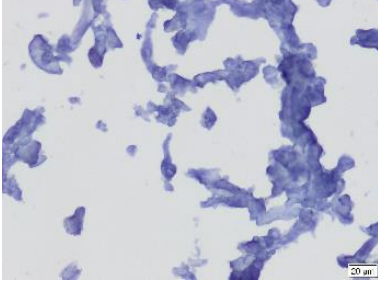


Resim 42: RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

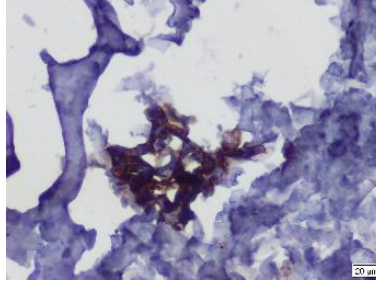
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen köpük doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü (Resim 43).

COL/K RL95-2 ve JAR 7.gün

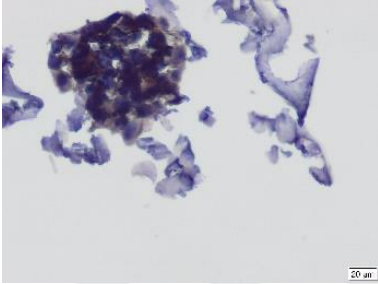
Kontrol İmmün Boyama



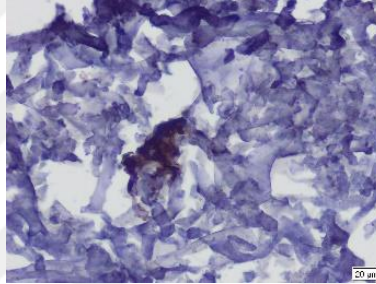
E-kaderin



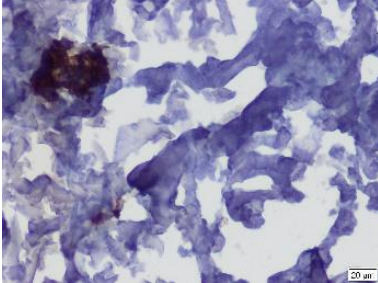
N-kaderin



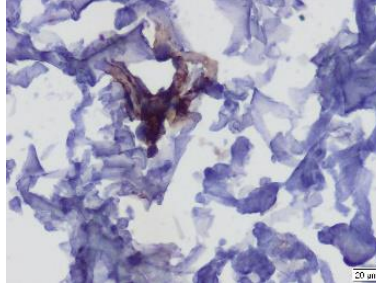
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

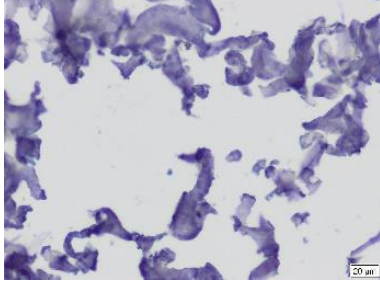


Resim 43: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 7.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

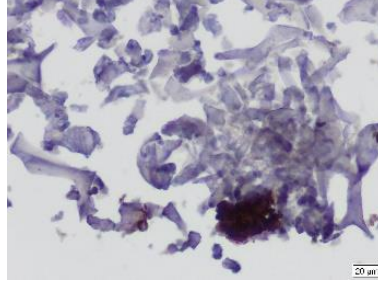
JAR hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü (Resim 44).

COL/K ve JAR 10.gün

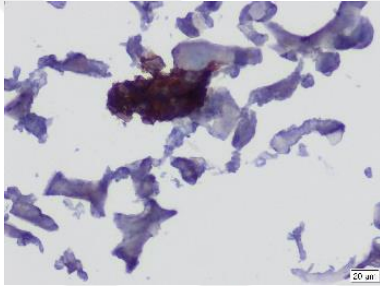
Kontrol İmmün Boyama



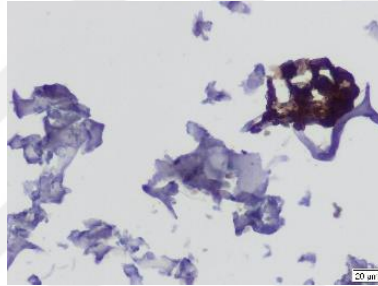
E-kaderin



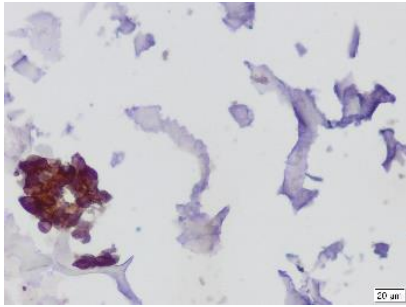
N-kaderin



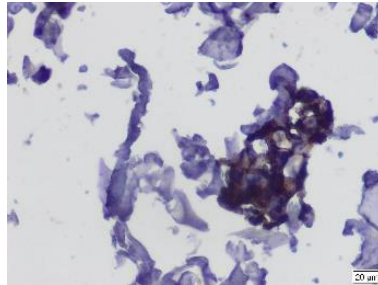
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

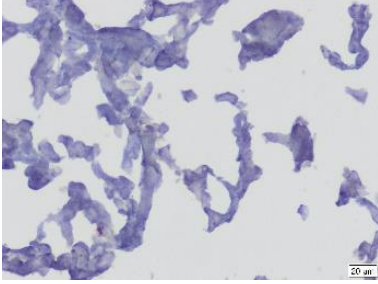


Resim 44: JAR hücrelerinin COL/K ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

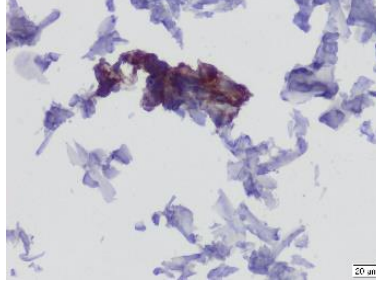
RL95-2 hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA da şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü. Syndecan-1 de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 45).

COL/K ve RL95-2 10.gün

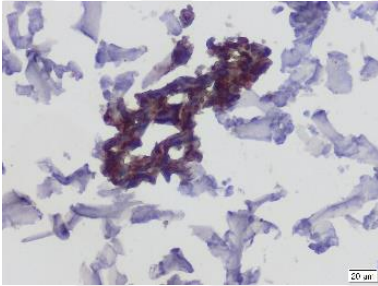
Kontrol İmmün Boyama



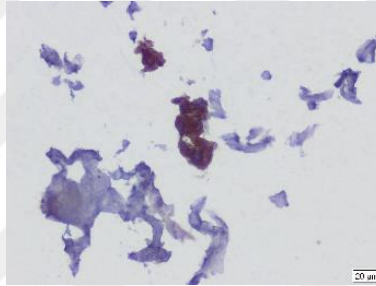
E-kaderin



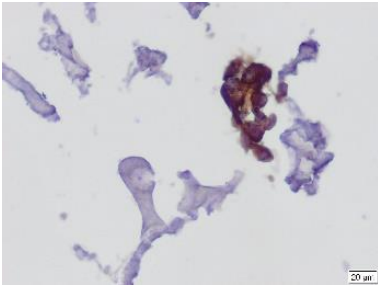
N-kaderin



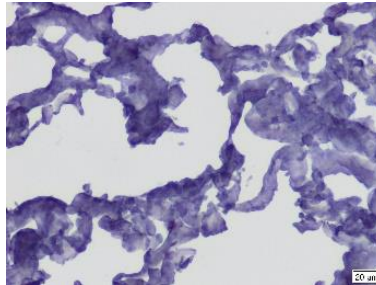
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

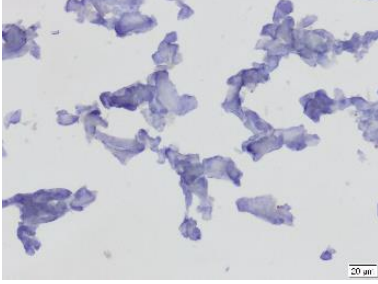


Resim 45: RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin ve Syndecan-1 de görülmüştür.

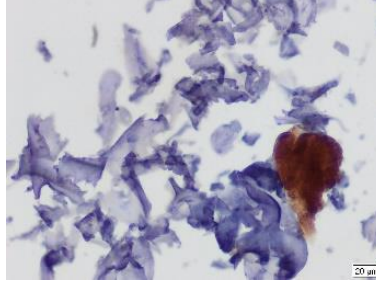
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen köpük doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü (Resim 46).

COL/K RL95-2 ve JAR 10.gün

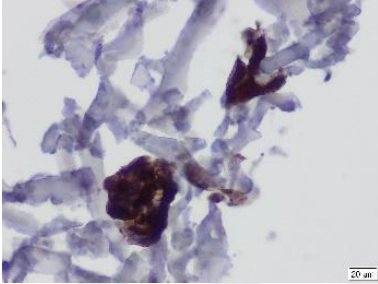
Kontrol İmmün Boyama



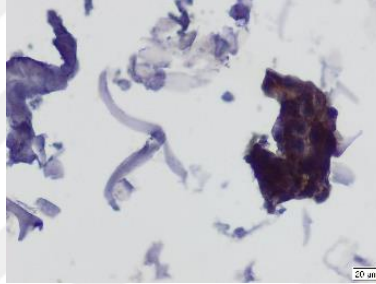
E-kaderin



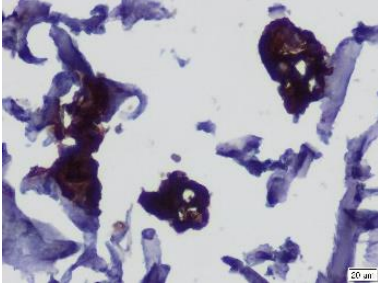
N-kaderin



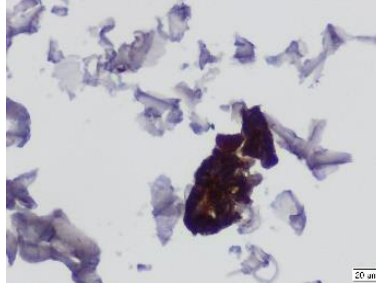
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

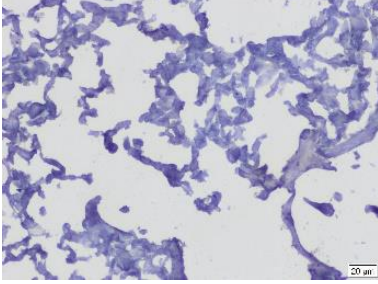


Resim 46: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 10.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

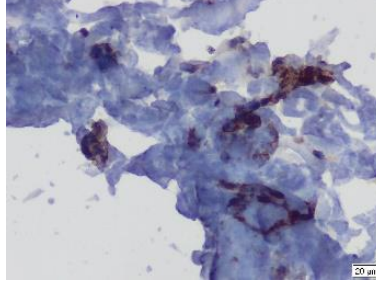
JAR hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve N-kaderin de şiddetli pozitif (++++), Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü (Resim 47).

COL/K ve JAR 14.gün

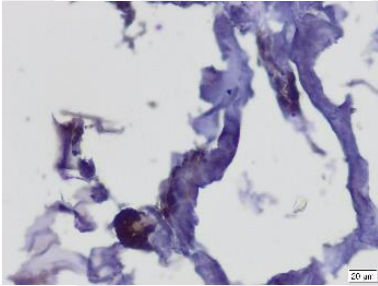
Kontrol İmmün Boyama



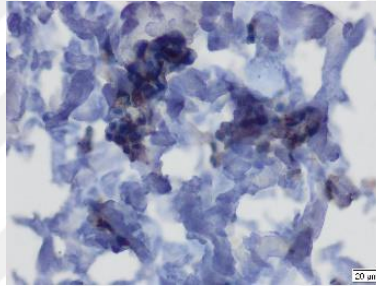
E-kaderin



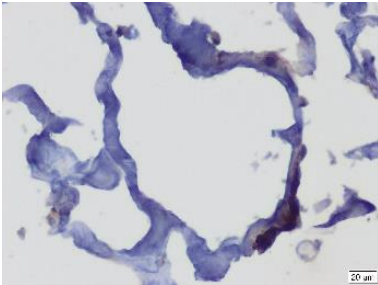
N-kaderin



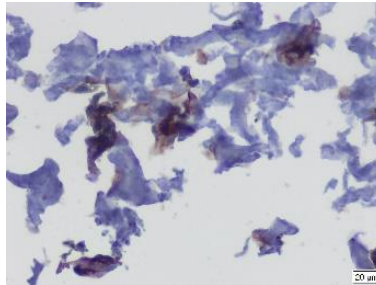
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

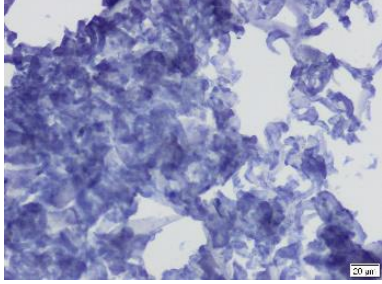


Resim 47: JAR hücrelerinin COL/K ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin ve N-kaderin de görülmüştür.

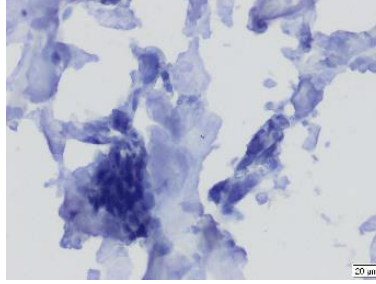
RL95-2 hücrelerinin kollajen köpük doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; α -SMA ve Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite görüldü. E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin de ise immunoreaktivitenin negatif (-) olduğu izlendi (Resim 48).

COL/K ve RL95-2 14.gün

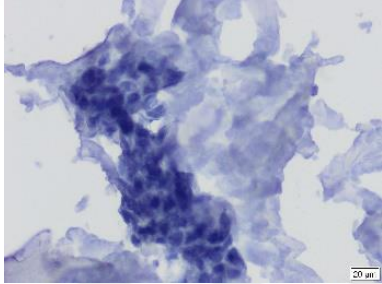
Kontrol İmmün Boyama



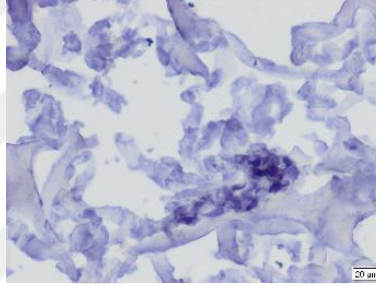
E-kaderin



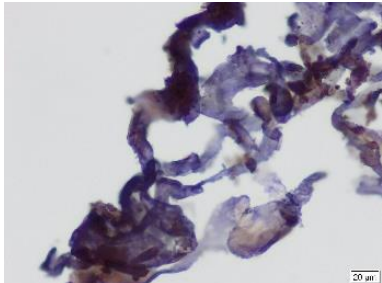
N-kaderin



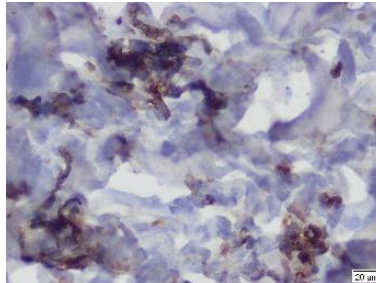
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1

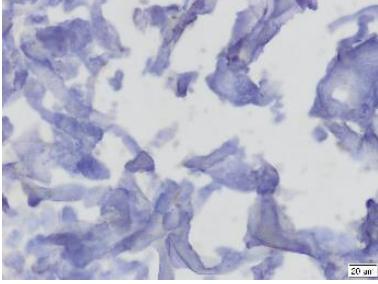


Resim 48: RL95-2 hücrelerinin COL/K ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

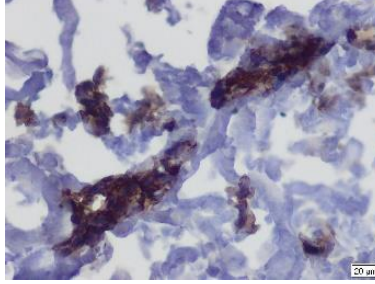
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde kollajen köpük doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite görüldü (Resim 49).

COL/K RL95-2 ve JAR 14.gün

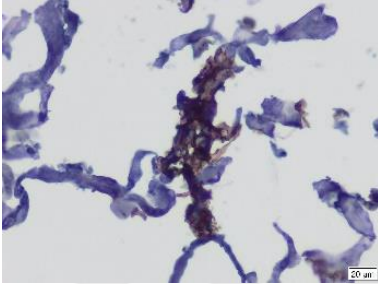
Kontrol İmmün Boyama



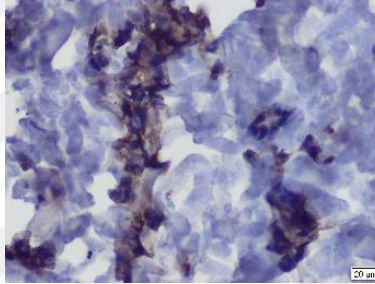
E-kaderin



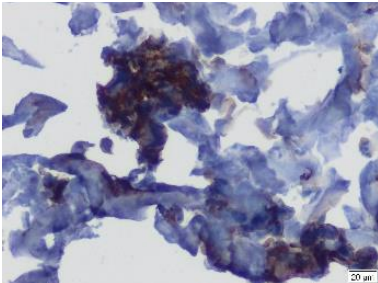
N-kaderin



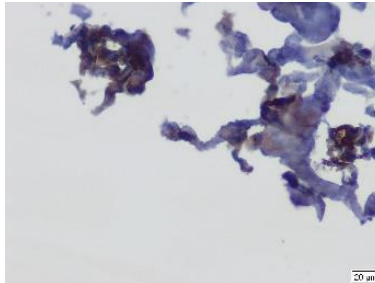
Vimentin



α -SMA



Syndecan-1



Resim 49: RL95-2 ve JAR hücrelerinin kombine halde COL/K ile 14.gün kültürünün, kontrol, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 immunohistokimyasal analizi. Ölçek: 20 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 de görülmüştür.

Tablo 12: JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde BC doku iskelesi ile immunoreaktivite değerlendirilmesi

BC Doku İskelesi		JAR	RL95-2	RL95-2+JAR
E-kaderin	3.gün	++++	+++	++++
	5.gün	++++	++++	++++
	7.gün	+++	++	++++
	10.gün	++++	+++	+++
	14.gün	++++	++++	++
N-kaderin	3.gün	+++	++	++
	5.gün	+++	++++	++
	7.gün	++	++++	++++
	10.gün	++	+++	++++
	14.gün	++	+++	++
Vimentin	3.gün	++++	++	++
	5.gün	+++	+++	+++
	7.gün	++	+++	+++
	10.gün	-	++++	++++
	14.gün	+	++++	++++
α-SMA	3.gün	+++	+	+++
	5.gün	+++	+++	++
	7.gün	+	++	++++
	10.gün	++++	++++	++++
	14.gün	++++	+	+++
Syndecan-1	3.gün	++++	+	+++
	5.gün	+++	++++	+++
	7.gün	+/-	++	+++
	10.gün	+++	+++	++++
	14.gün	++	++++	++

Tablo 13: JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde COL/K doku iskelesi ile immunoreaktivite değerlendirilmesi

COL/K Doku İskelesi		JAR	RL95-2	RL95-2+JAR
E-kaderin	3.gün	+	-	+++
	5.gün	++++	-	++++
	7.gün	-	++++	++++
	10.gün	++++	++++	++++
	14.gün	++++	-	++++
N-kaderin	3.gün	+/-	-	-
	5.gün	++++	-	++++
	7.gün	+++	++++	++++
	10.gün	++++	++++	++++
	14.gün	++++	-	++++
Vimentin	3.gün	+	+	++++
	5.gün	++++	-	++++
	7.gün	-	++++	++++
	10.gün	++++	++++	++++
	14.gün	++++	-	++++
α-SMA	3.gün	+	+	++
	5.gün	++	-	++++
	7.gün	++++	++++	++++
	10.gün	++++	++++	++++
	14.gün	++++	+++	++++
Syndecan-1	3.gün	+/-	-	+++
	5.gün	++	+	-
	7.gün	+/-	++++	++++
	10.gün	++++	-	++++
	14.gün	++++	+++	++++

6.7. KOLLAJEN FİBER DOKU İSKELESİNİN İMMUNOFLORESAN ANALİZİ

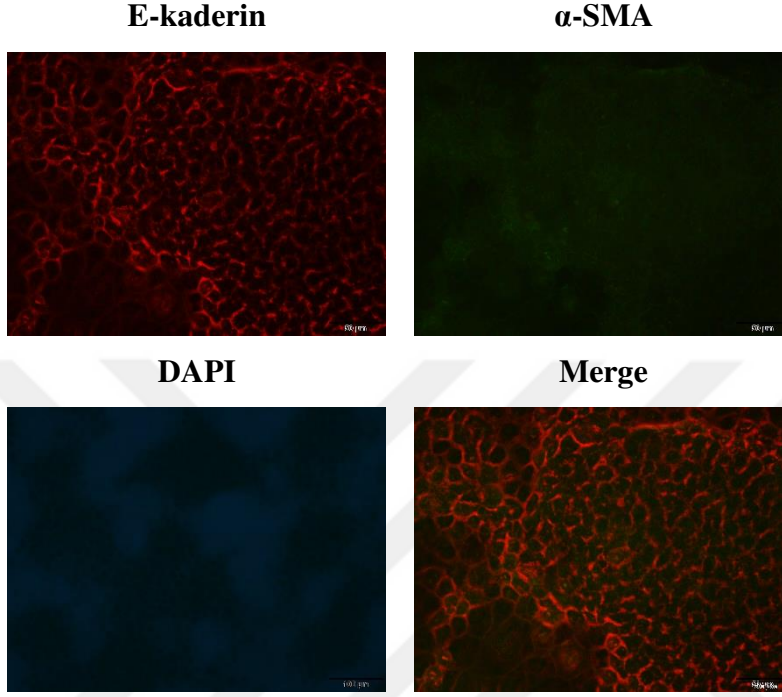
COL/F doku iskelesi cam üzerinde olmasından dolayı hücre ekimlerinden sonra hücre yüzey proteinleri (E-kaderin ve N-kaderin) ile sitoplazmik proteinler (α -SMA ve Vimentin) aynı örnek üzerinde boyanma yapılır iken (sırasıyla), hücre yüzey proteini Syndecan-1 boyanması ayrı olarak gerçekleştirildi. O nedenle sonuçlar verilir iken ikili boyamalar birlikte, tekli boyama ise ayrı olarak verilmiştir.

JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR hücrelerinin kombine halde, COL/F doku iskelesine ekimi ile E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 ifadelerinde farklı şiddetlerde immunoreaktivite izlendi (Tablo 14).



JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile kültürün 3.gününde E-kaderin yoğunluğu şiddetli pozitif (++++) iken, α -SMA yoğunluğunun kuvvetli pozitif (+++) olduğu izlendi (Resim 50).

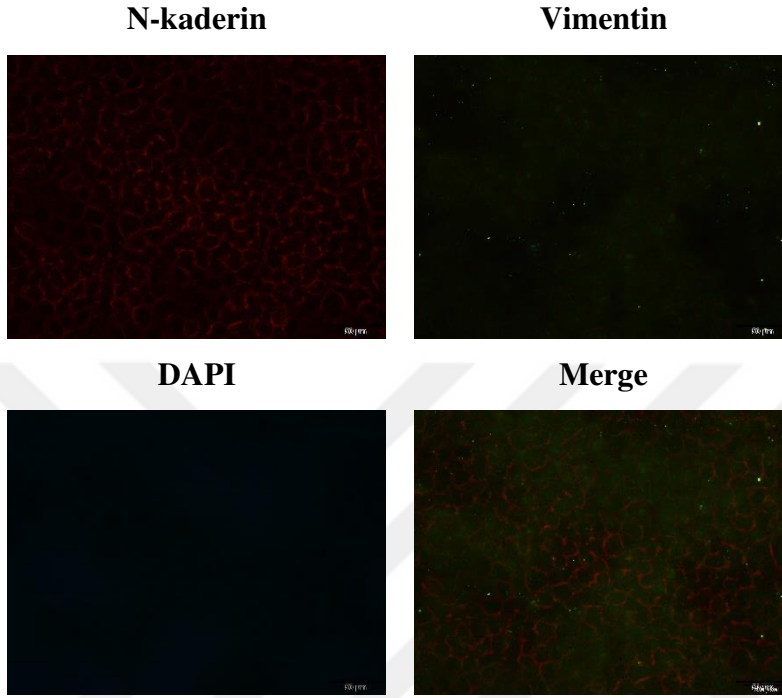
COL/F ve JAR 3.gün



Resim 50: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), Vimentin de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 51).

COL/F ve JAR 3.gün

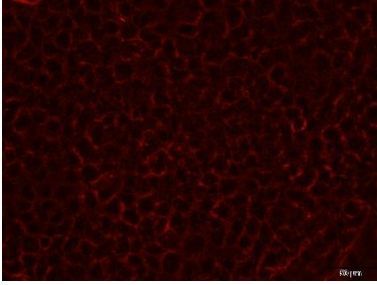


Resim 51: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 de şiddetli pozitif (+++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 52).

COL/F ve JAR 3.gün

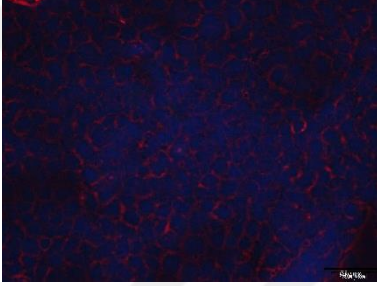
Syndecan-1



DAPI



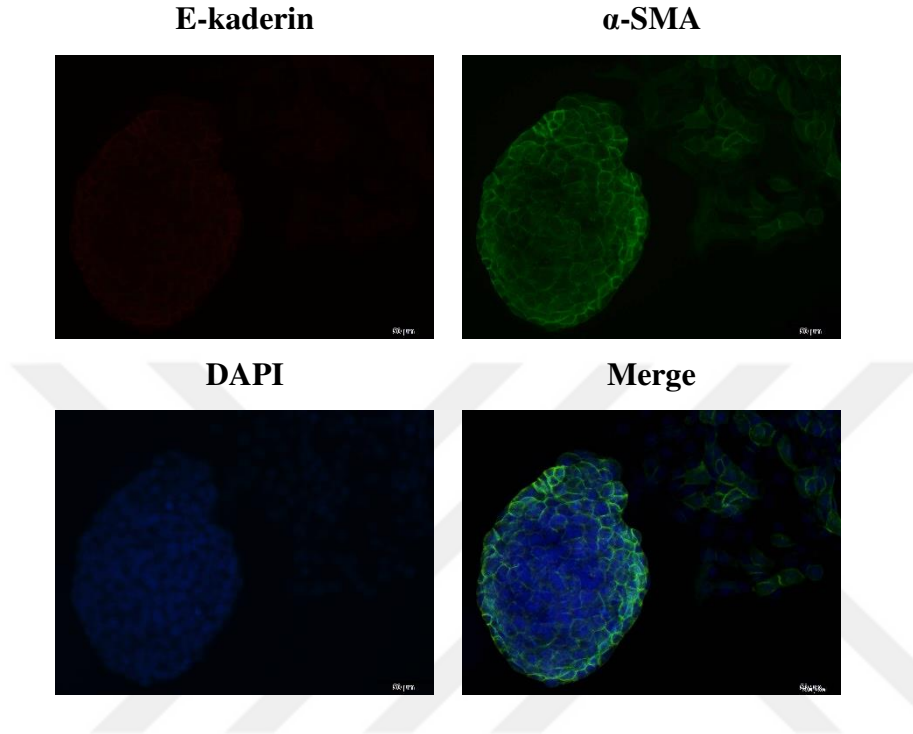
Merge



Resim 52: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin de zayıf şiddetli pozitif (+), α -SMA da ise şiddetli pozitif (++++), immunoreaktivite izlendi (Resim 53).

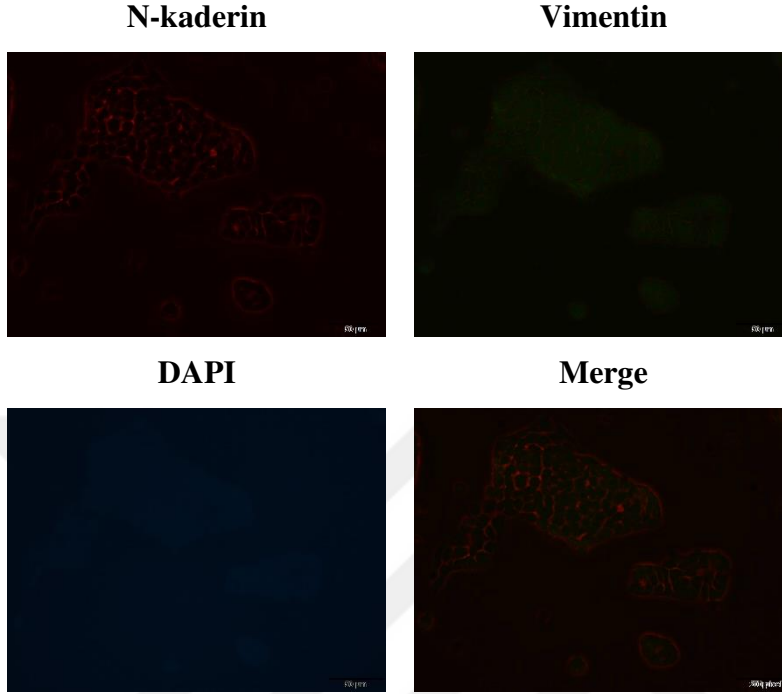
COL/F ve RL95-2 3.gün



Resim 53: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 54).

COL/F ve RL95-2 3.gün

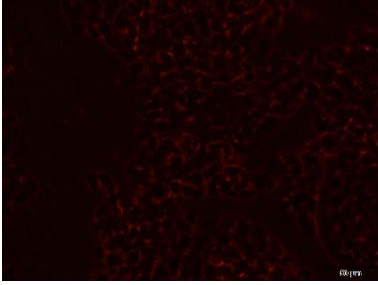


Resim 54: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

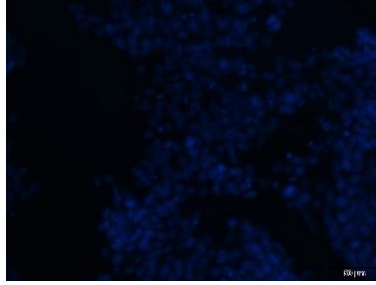
RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 55).

COL/F ve RL95-2 3.gün

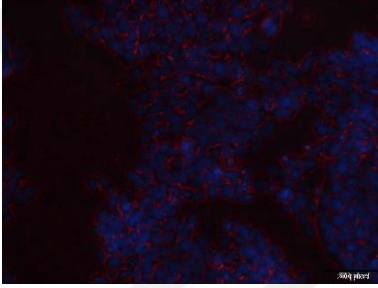
Syndecan-1



DAPI

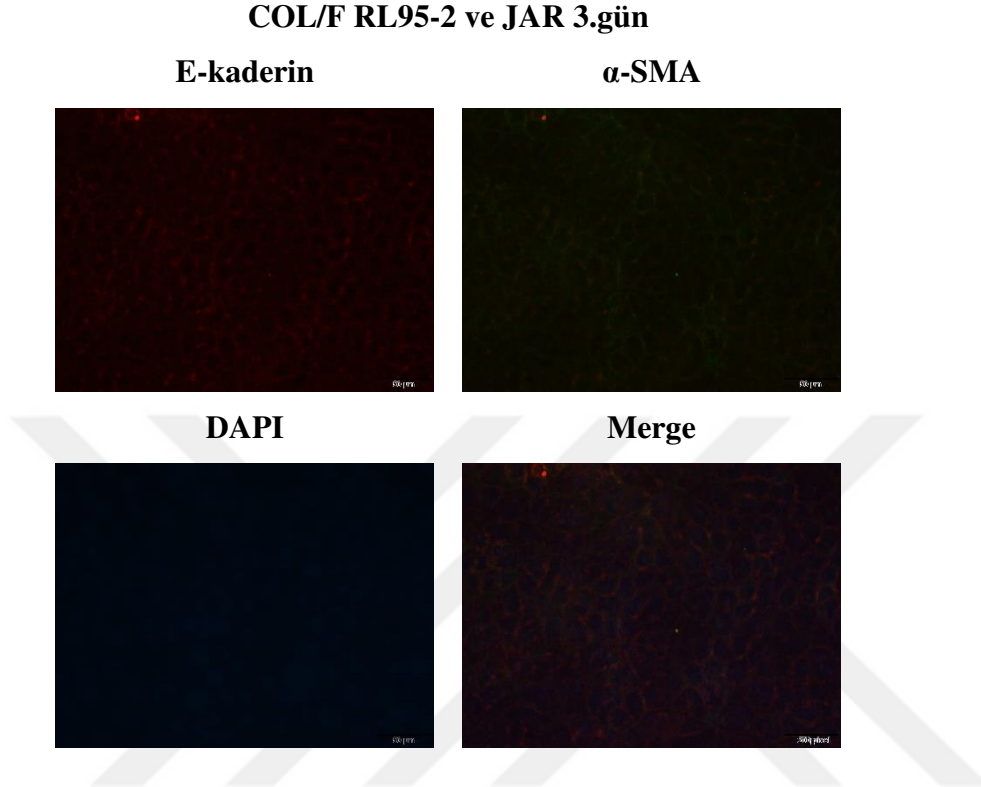


Merge



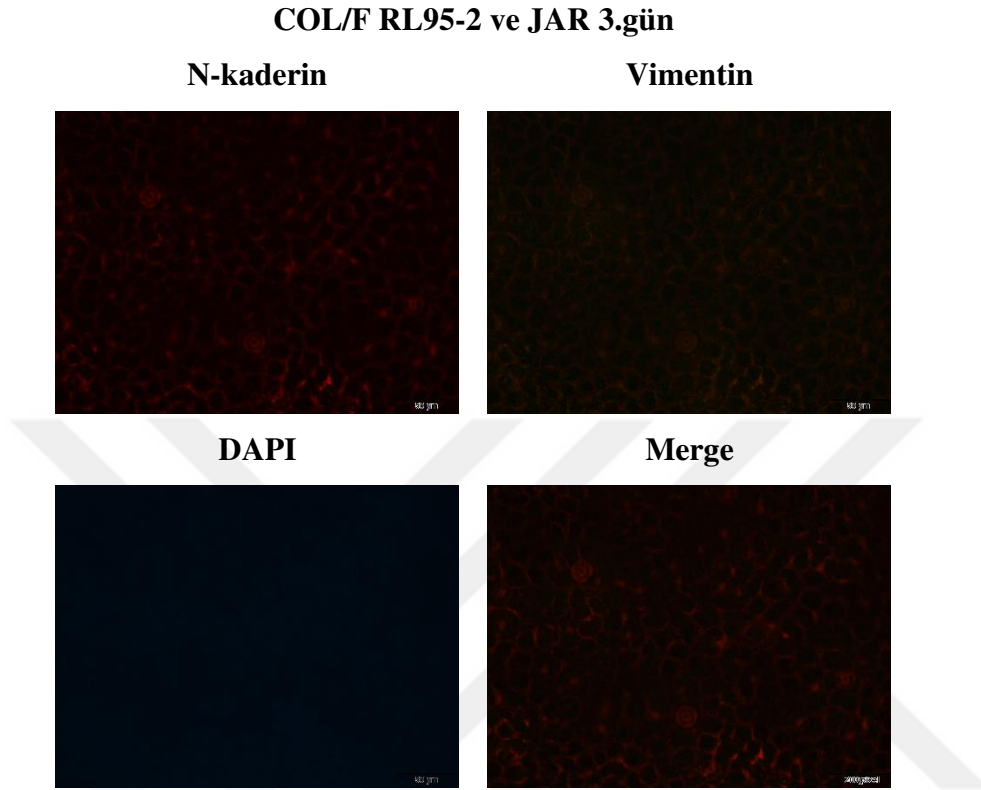
Resim 55: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 56).



Resim 56: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin de ve Vimentin de orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 57).



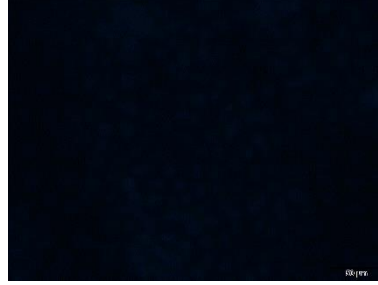
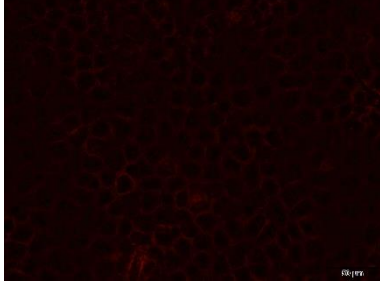
Resim 57: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 de orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 58).

COL/F RL95-2 ve JAR 3.gün

Syndecan-1

DAPI



Merge



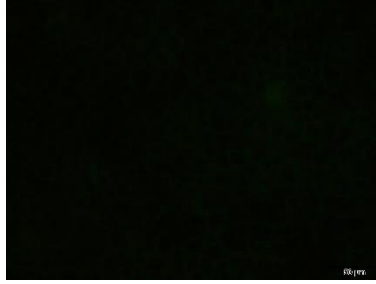
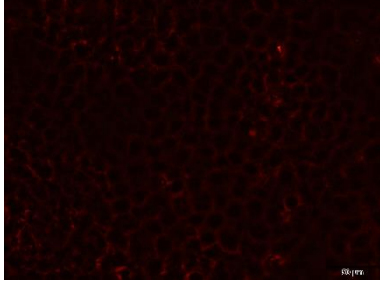
Resim 58: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 3.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 59).

COL/F ve JAR 5.gün

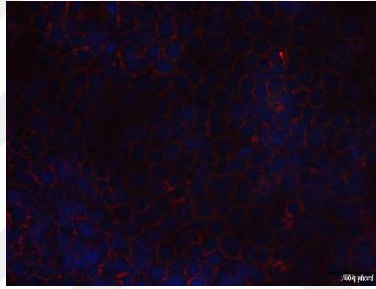
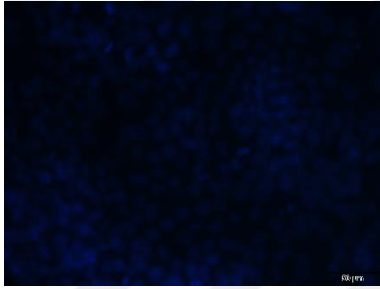
E-kaderin

α -SMA



DAPI

Merge

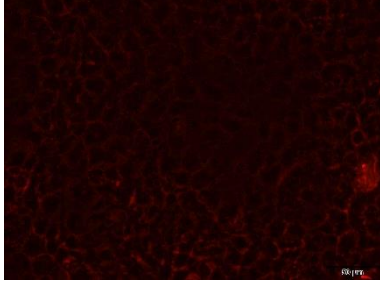


Resim 59: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

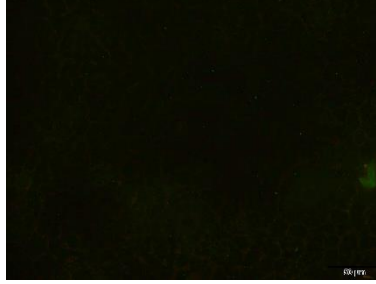
JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), Vimentin de ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 60).

COL/F ve JAR 5.gün

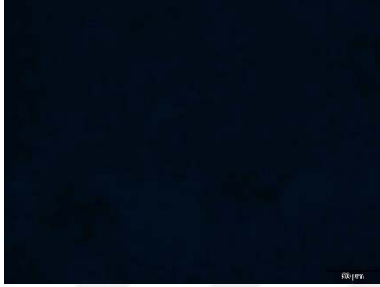
N-kaderin



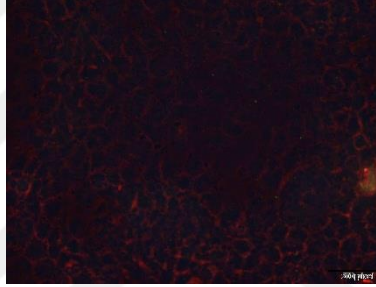
Vimentin



DAPI



Merge



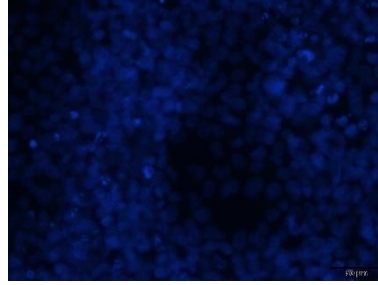
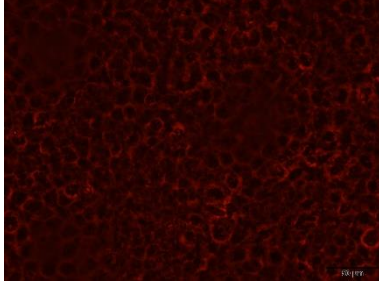
Resim 60: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 de şiddetli pozitif (+++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 61).

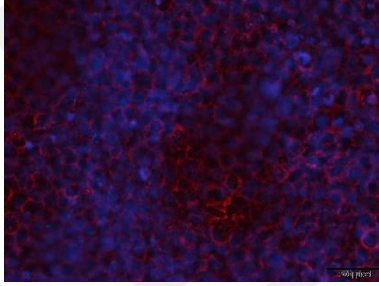
COL/F ve JAR 5.gün

Syndecan-1

DAPI



Merge



Resim 61: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin de zayıf şiddetli pozitif (+), α -SMA da ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 62).

COL/F ve RL95-2 5.gün

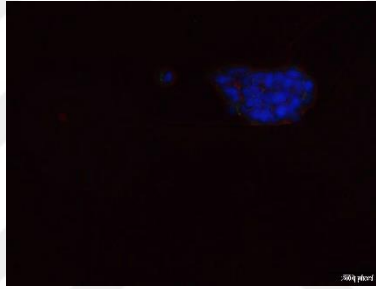
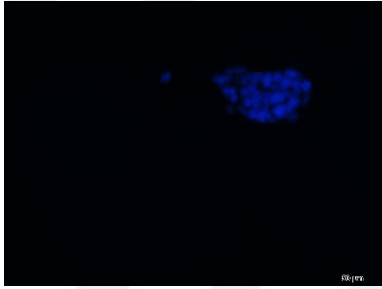
E-kaderin

α -SMA



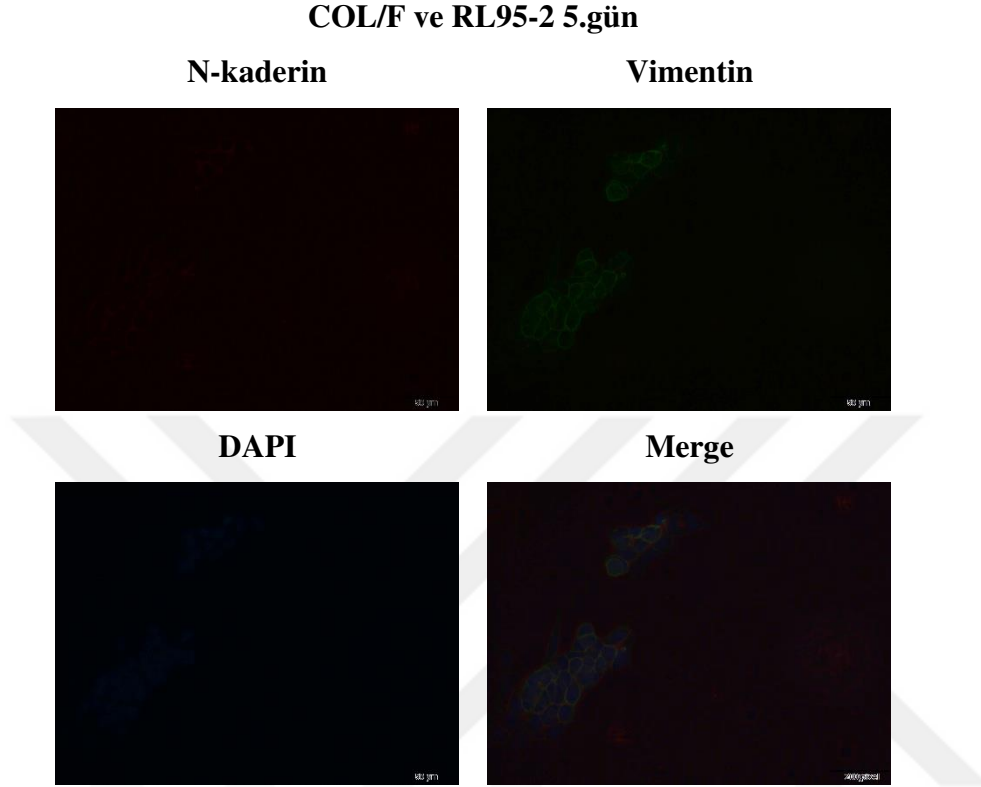
DAPI

Merge



Resim 62: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin de zayıf şiddetli pozitif (+), Vimentin de ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 63).



Resim 63: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite Vimentin de görülmüştür.

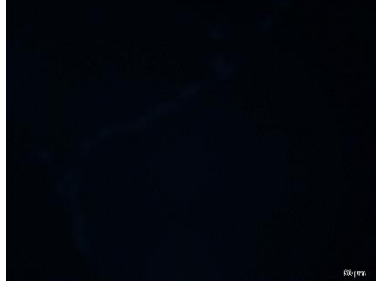
RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 de zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 64).

COL/F ve RL95-2 5.gün

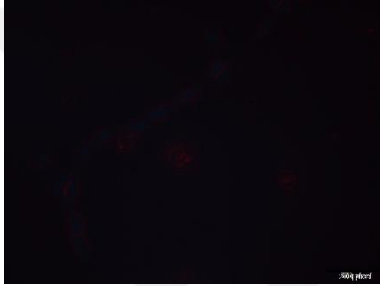
Syndecan-1



DAPI

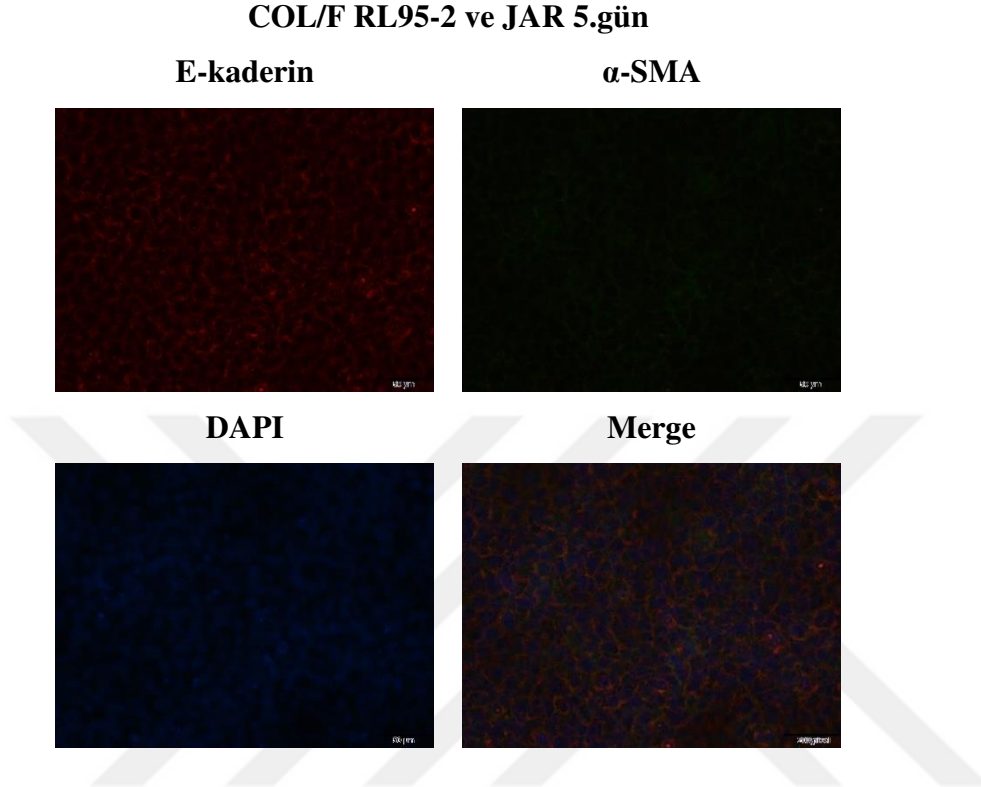


Merge



Resim 64: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 65).

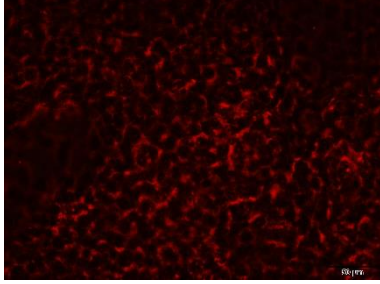


Resim 65: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

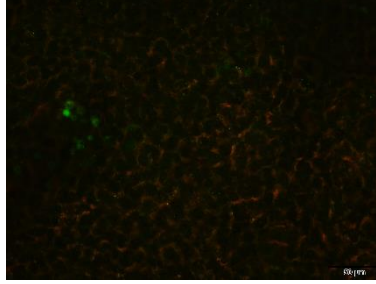
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin de şiddetli pozitif (++++), Vimentin de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 66).

COL/F RL95-2 ve JAR 5.gün

N-kaderin



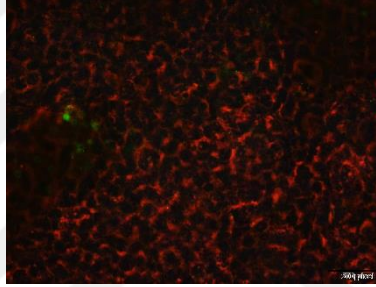
Vimentin



DAPI



Merge

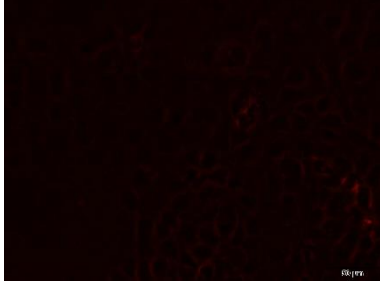


Resim 66: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

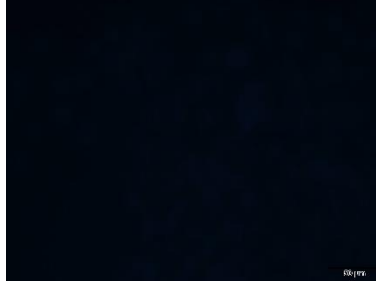
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 de zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 67).

COL/F RL95-2 ve JAR 5.gün

Syndecan-1



DAPI



Merge



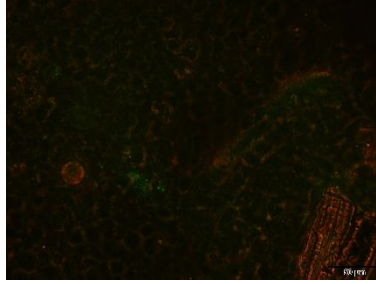
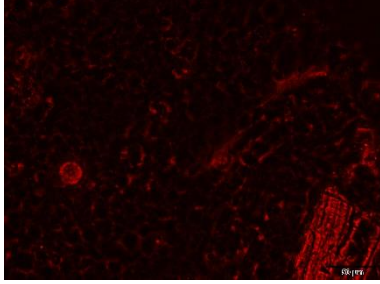
Resim 67: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 5.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 68).

COL/F ve JAR 7.gün

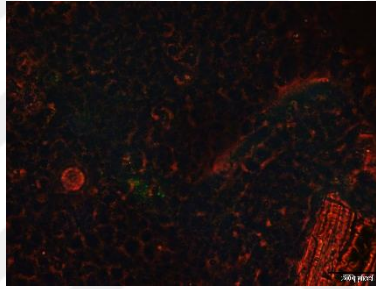
E-kaderin

α -SMA



DAPI

Merge

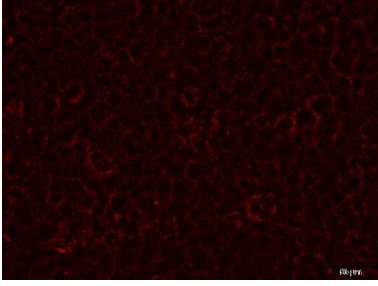


Resim 68: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

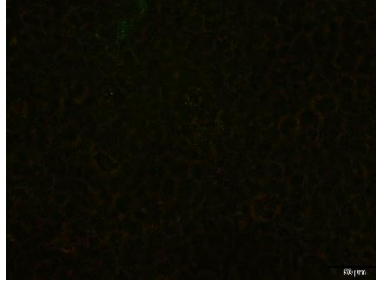
JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), Vimentin de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 69).

COL/F ve JAR 7.gün

N-kaderin



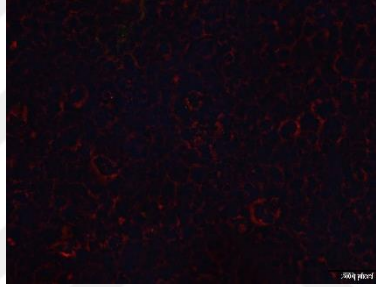
Vimentin



DAPI



Merge

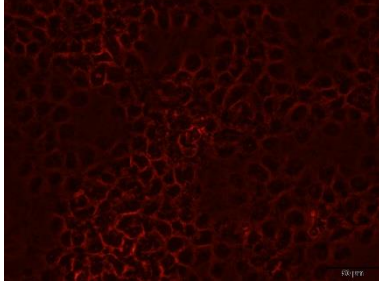


Resim 69: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

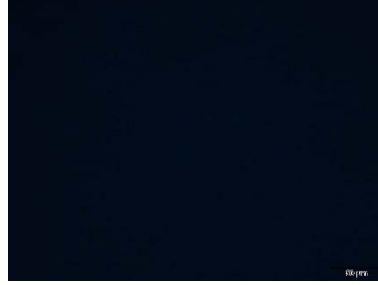
JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 de şiddetli pozitif (+++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 70).

COL/F ve JAR 7.gün

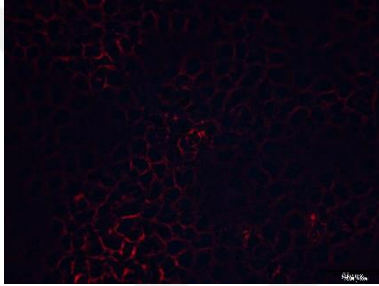
Syndecan-1



DAPI



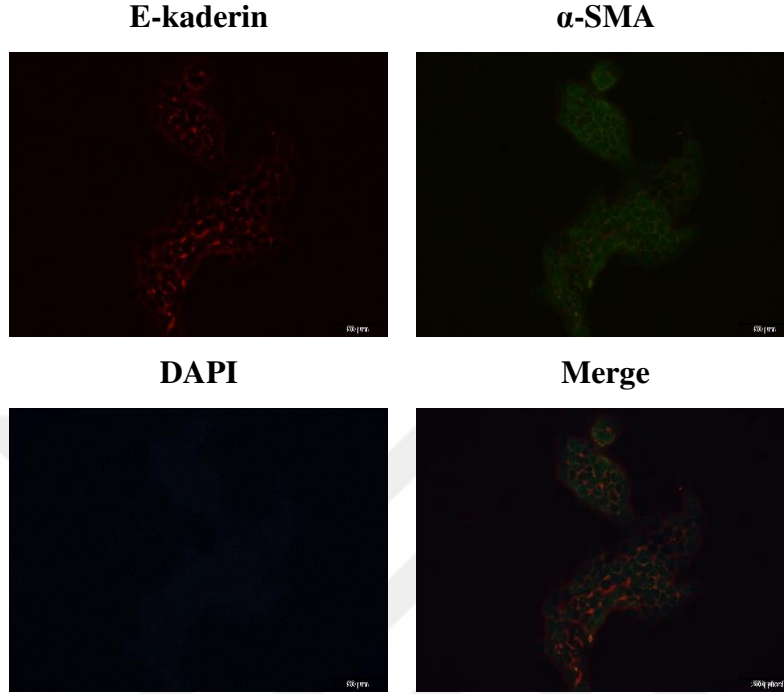
Merge



Resim 70: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 71).

COL/F ve RL95-2 7.gün



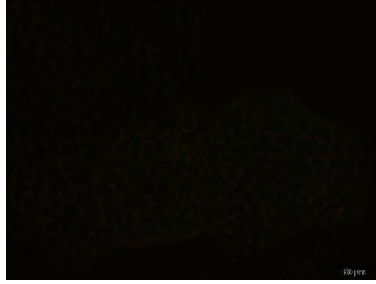
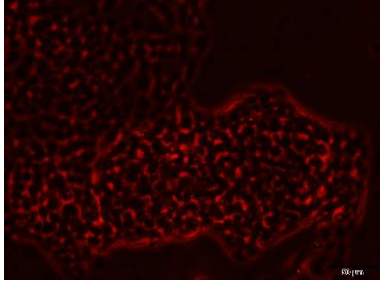
Resim 71: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin ve α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin de şiddetli pozitif (++++), Vimentin de ise yer yer zayıf şiddetli pozitif (+/-) immunoreaktivite izlendi (Resim 72).

COL/F ve RL95-2 7.gün

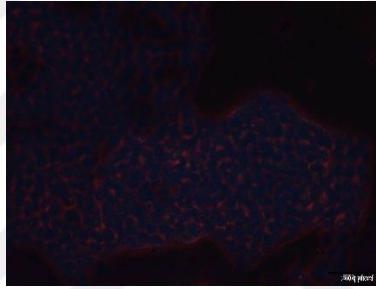
N-kaderin

Vimentin



DAPI

Merge



Resim 72: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

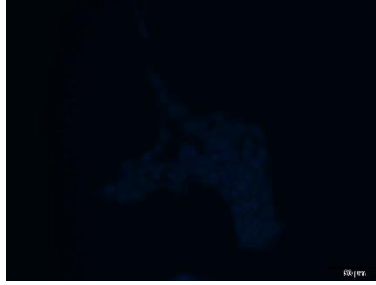
RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 de zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 73).

COL/F ve RL95-2 7.gün

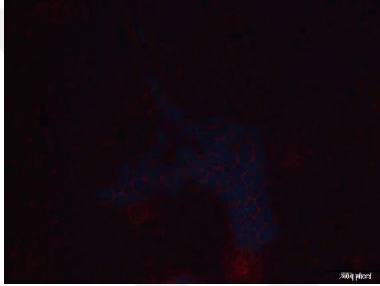
Syndecan-1



DAPI

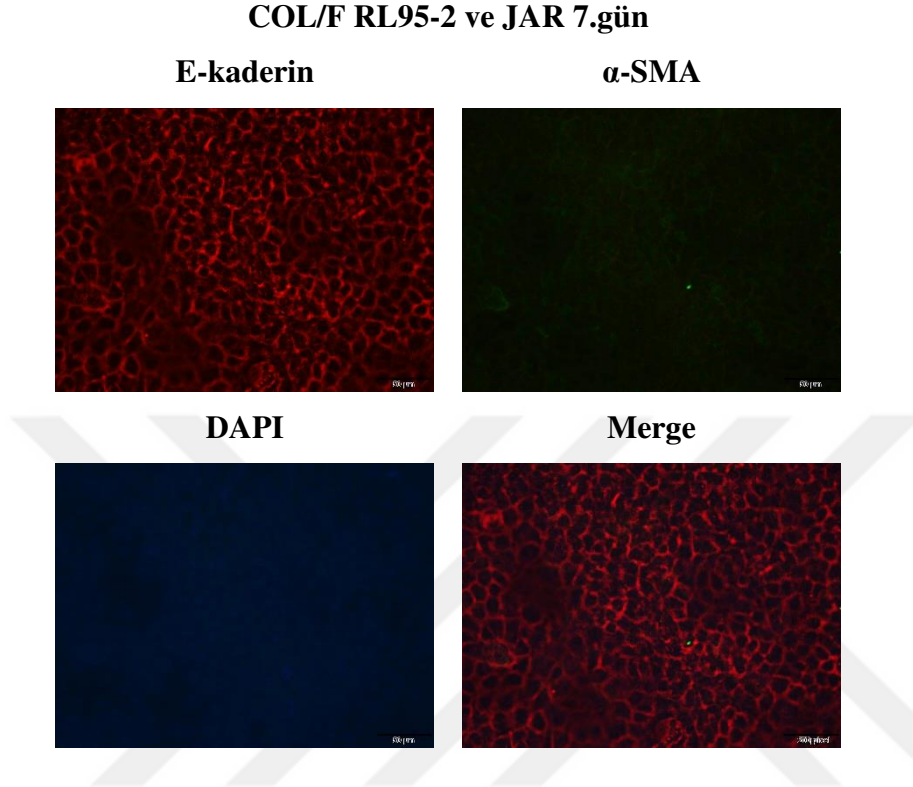


Merge



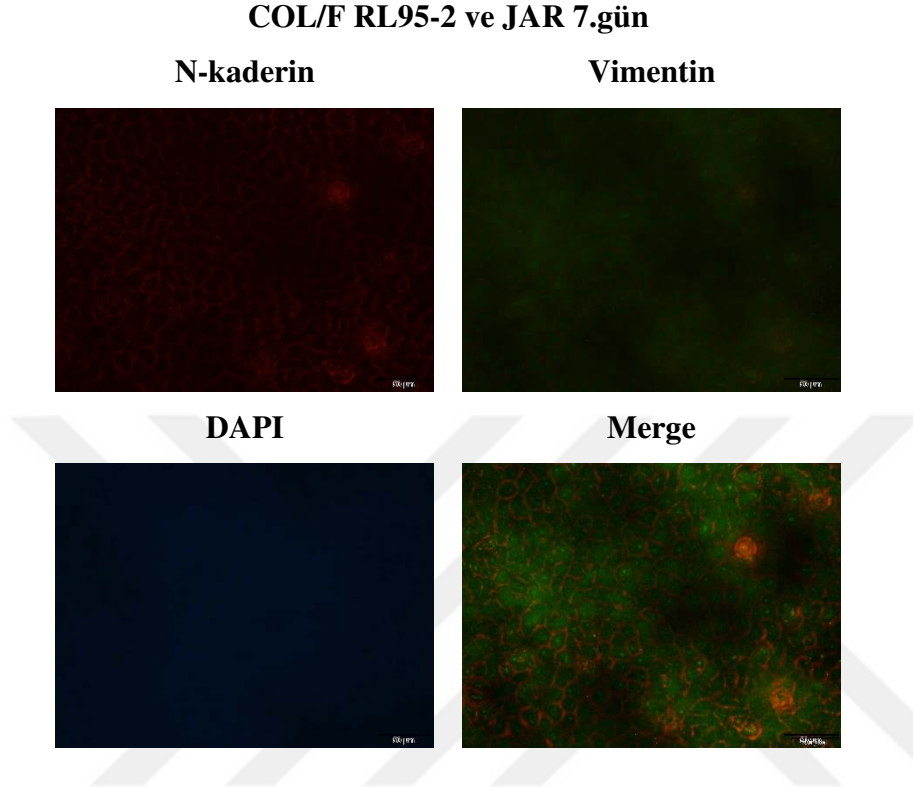
Resim 73: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin de şiddetli pozitif (++++), α -SMA da ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 74).



Resim 74: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin de ve Vimentin de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 75).

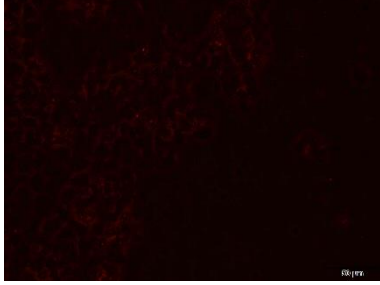


Resim 75: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 de orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 76).

COL/F RL95-2 ve JAR 7.gün

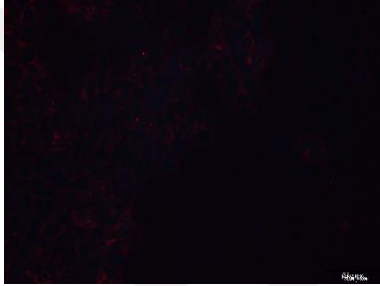
Syndecan-1



DAPI

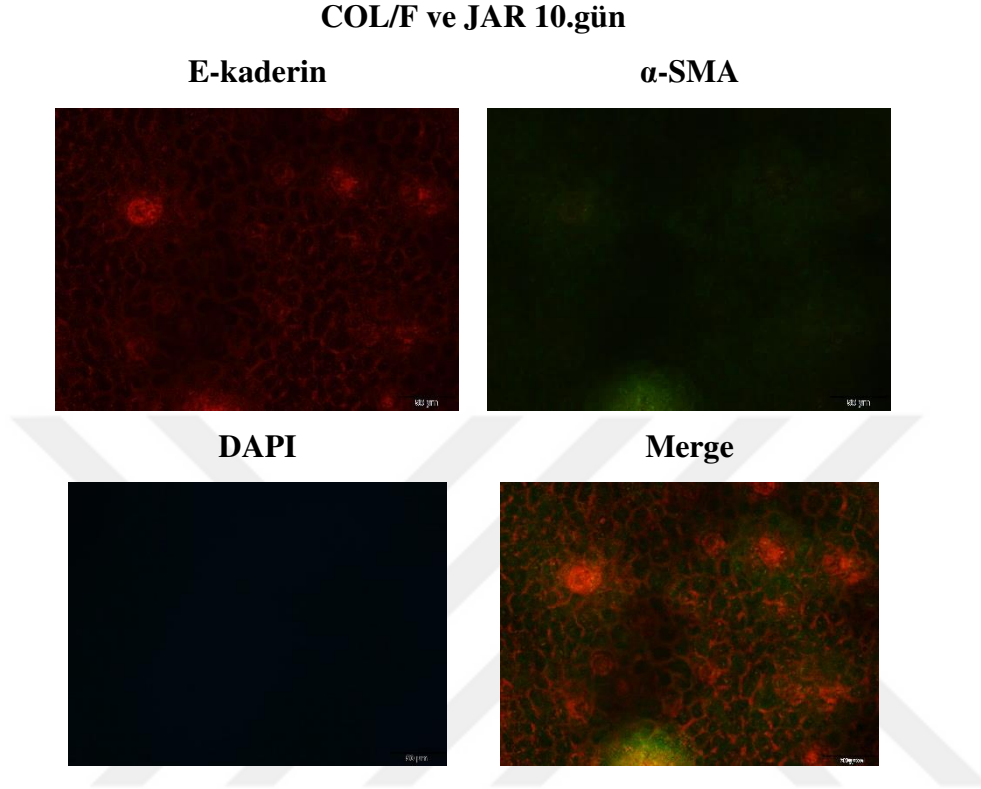


Merge



Resim 76: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 7.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin de şiddetli pozitif (++++), α -SMA da ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 77).

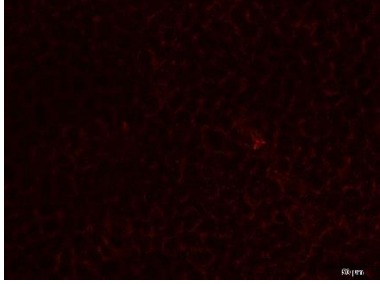


Resim 77: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

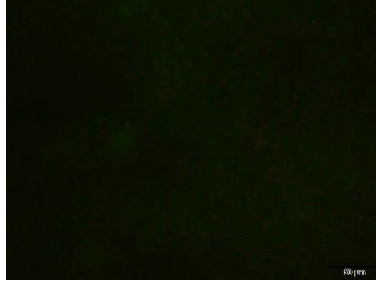
JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin de orta şiddetli pozitif (++), Vimentin de ise zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 78).

COL/F ve JAR 10.gün

N-kaderin



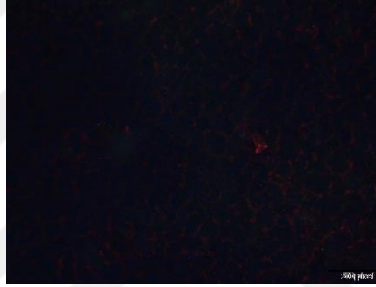
Vimentin



DAPI



Merge



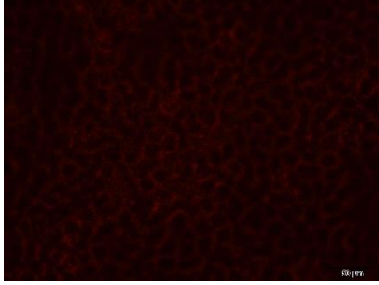
Resim 78: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 79).

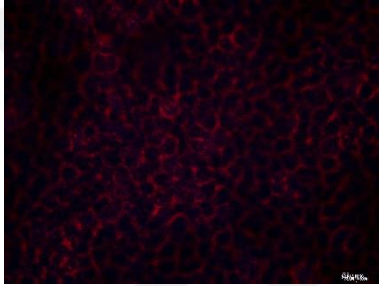
COL/F ve JAR 10.gün

Syndecan-1

DAPI



Merge



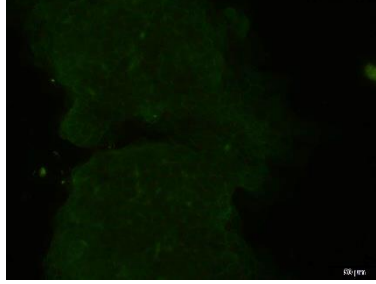
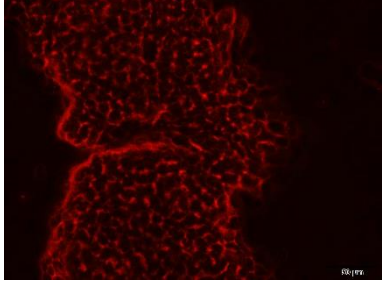
Resim 79: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin de şiddetli pozitif (++++), α -SMA da ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 80).

COL/F ve RL95-2 10.gün

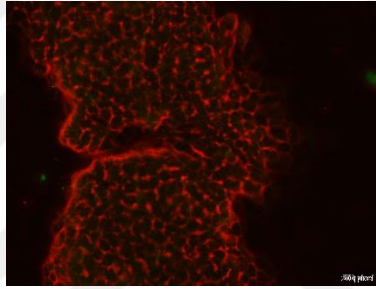
E-kaderin

α -SMA



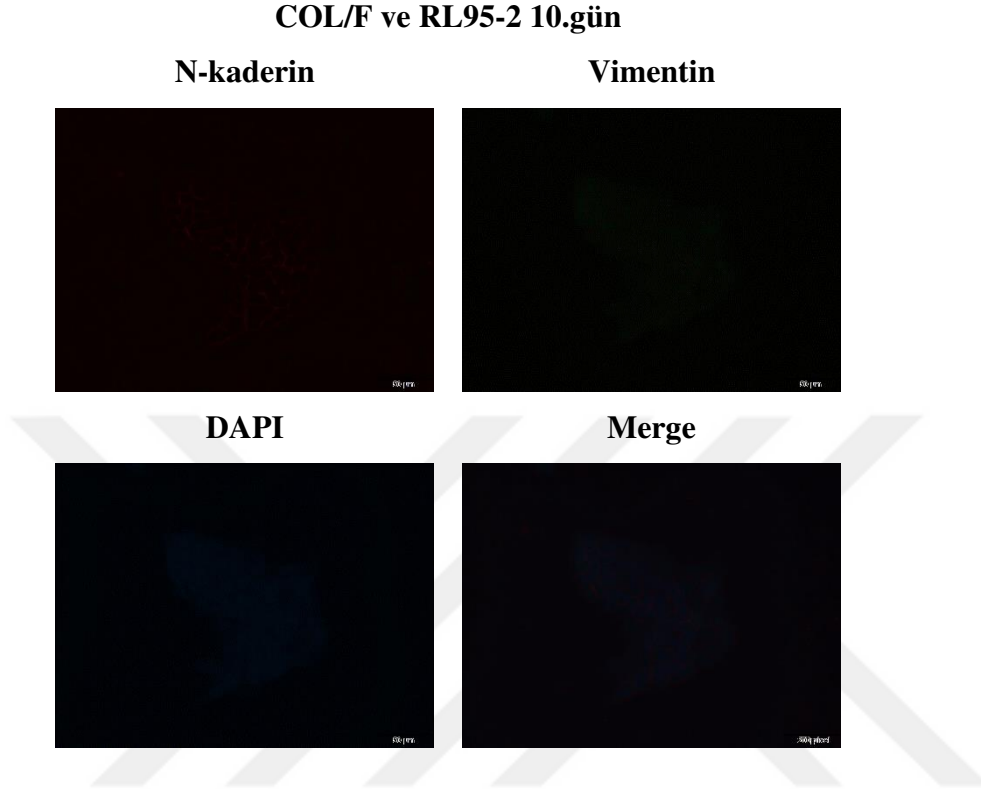
DAPI

Merge



Resim 80: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin de ve Vimentin de yer yer zayıf şiddetli pozitif (+/-) immunoreaktivite izlendi (Resim 81).

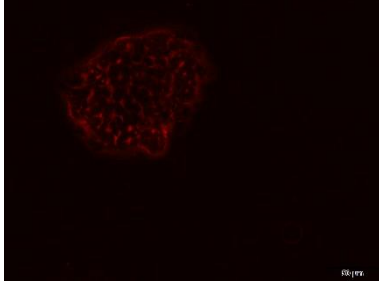


Resim 81: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 82).

COL/F ve RL95-2 10.gün

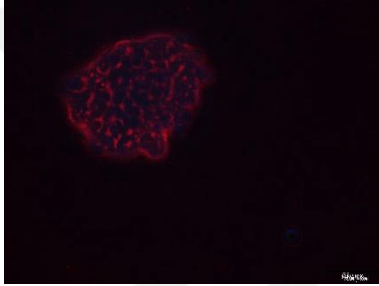
Syndecan-1



DAPI



Merge

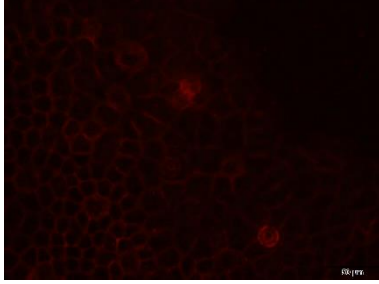


Resim 82: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 83).

COL/F RL95-2 ve JAR 10.gün

E-kaderin



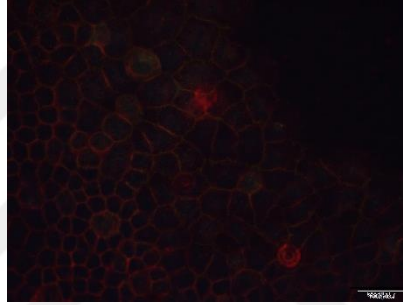
α -SMA



DAPI



Merge

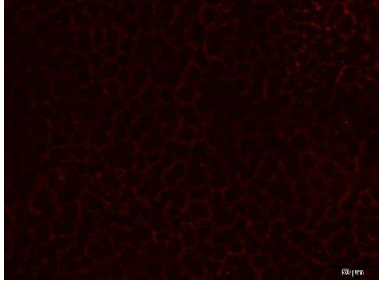


Resim 83: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin de görülmüştür.

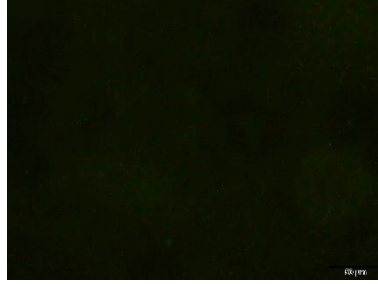
RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), Vimentin de ise orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 84).

COL/F RL95-2 ve JAR 10.gün

N-kaderin



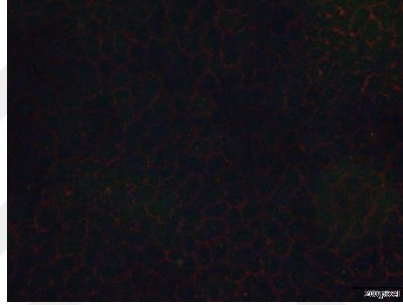
Vimentin



DAPI



Merge

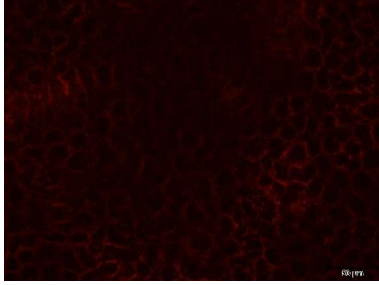


Resim 84: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 85).

COL/F RL95-2 ve JAR 10.gün

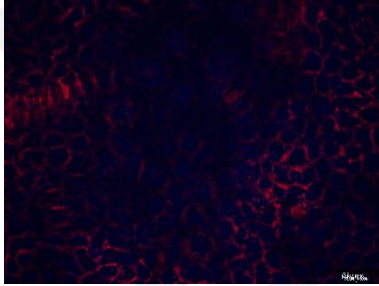
Syndecan-1



DAPI

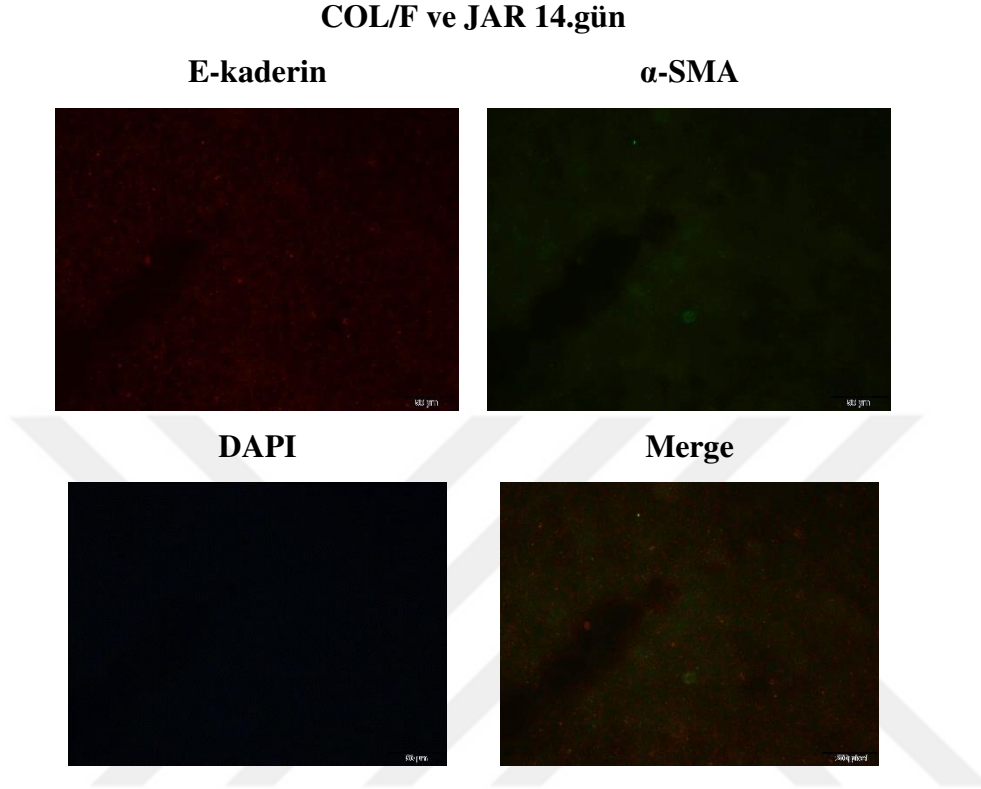


Merge



Resim 85: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 10.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

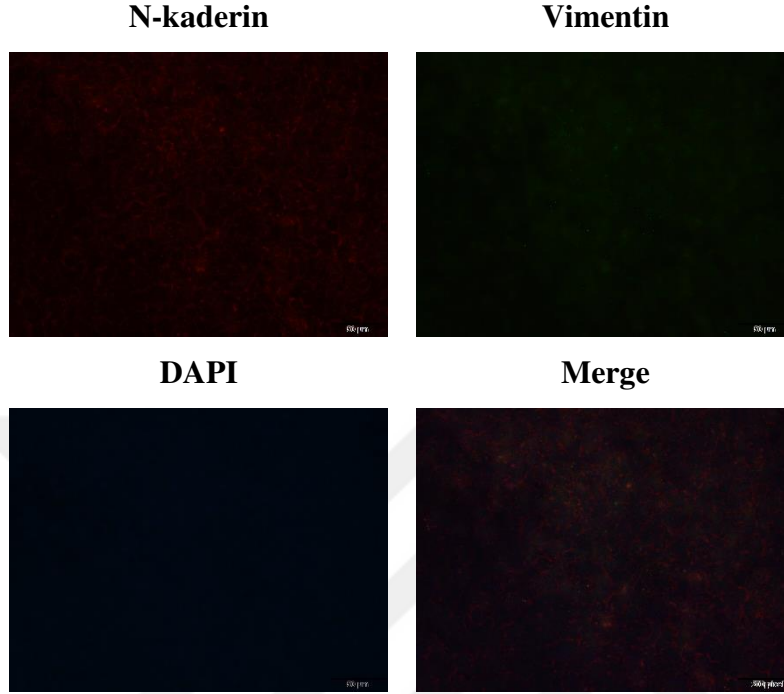
JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin de orta şiddetli pozitif (++), α -SMA da ise kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 86).



Resim 86: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite α -SMA de görülmüştür.

JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin de ve Vimentin de orta şiddetli pozitif (++) immunoreaktivite izlendi (Resim 87).

COL/F ve JAR 14.gün

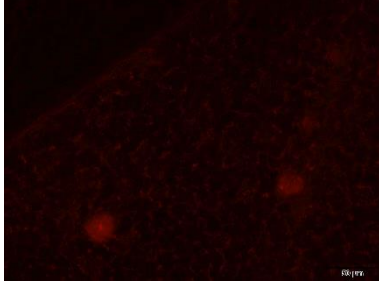


Resim 87: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

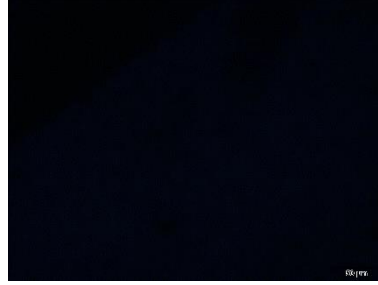
JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 88).

COL/F ve JAR 14.gün

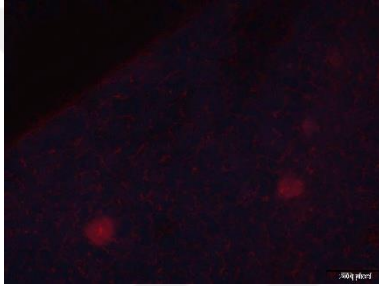
Syndecan-1



DAPI



Merge



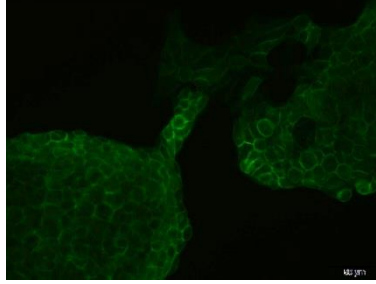
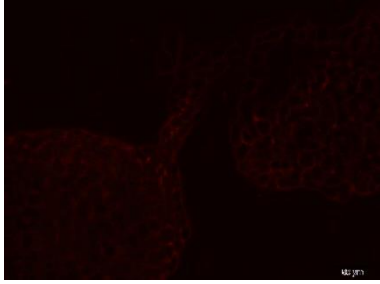
Resim 88: JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin de kuvvetli pozitif (+++), α -SMA da ise şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 89).

COL/F ve RL95-2 14.gün

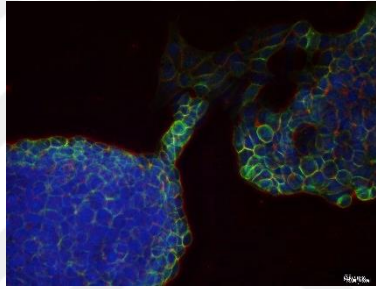
E-kaderin

α -SMA



DAPI

Merge



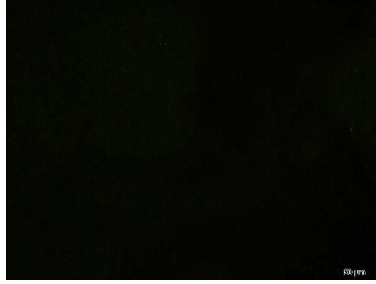
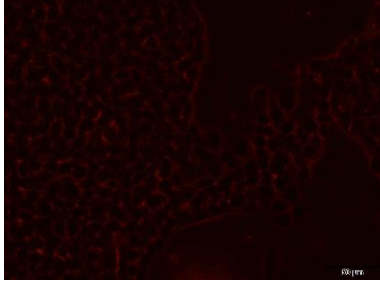
Resim 89: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin de orta şiddetli pozitif (++), Vimentin de ise yer yer zayıf şiddetli pozitif (+/-) immunoreaktivite izlendi (Resim 90).

COL/F ve RL95-2 14.gün

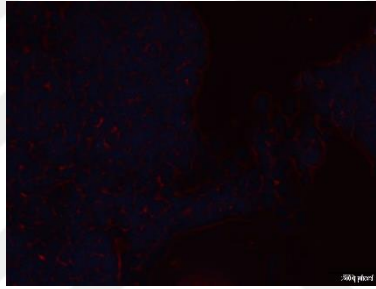
N-kaderin

Vimentin



DAPI

Merge

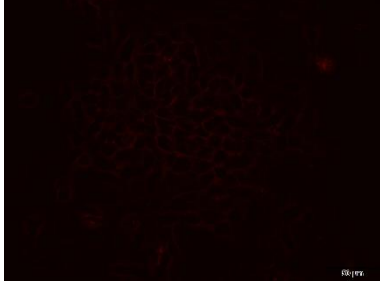


Resim 90: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite N-kaderin de görülmüştür.

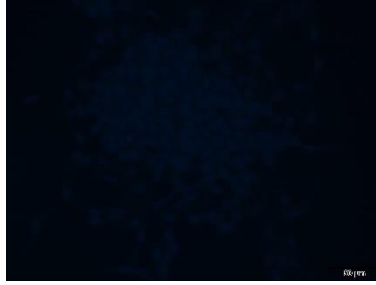
RL95-2 hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 de zayıf şiddetli pozitif (+) immunoreaktivite izlendi (Resim 91).

COL/F ve RL95-2 14.gün

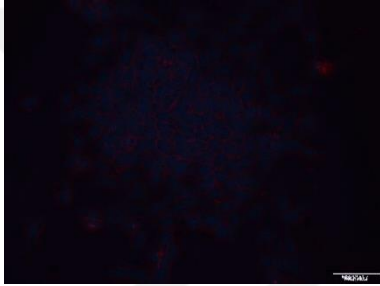
Syndecan-1



DAPI



Merge



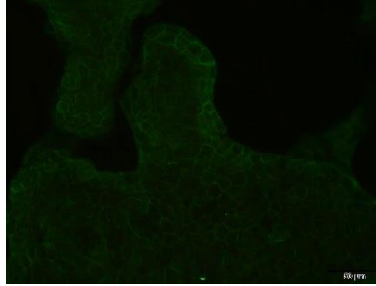
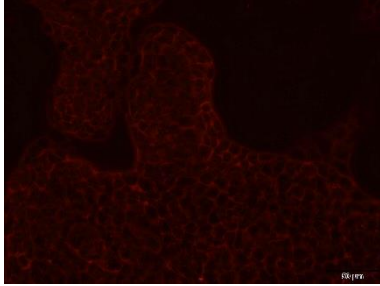
Resim 91: RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin de ve α -SMA da şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 92).

COL/F RL95-2 ve JAR 14.gün

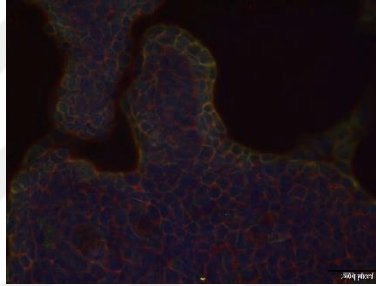
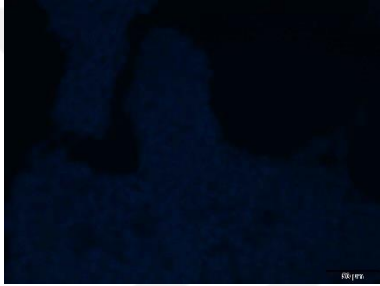
E-kaderin

α -SMA



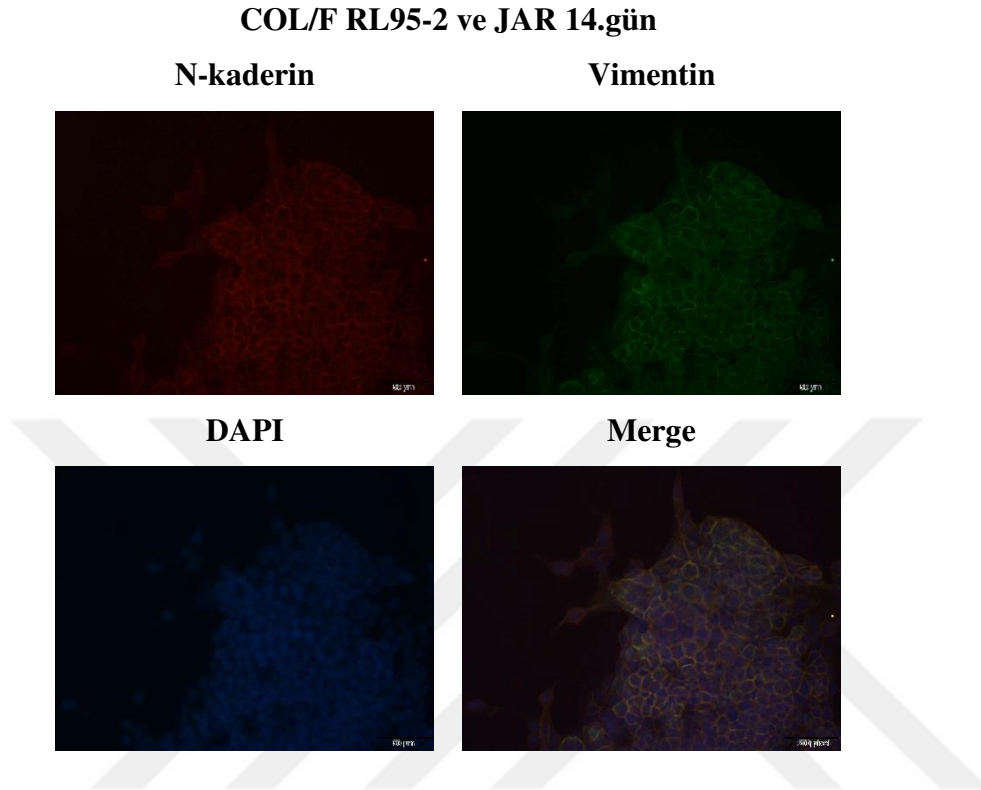
DAPI

Merge



Resim 92: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; E-kaderin ve α -SMA ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 μ m. En fazla immunoreaktivite E-kaderin ve α -SMA de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin de ve Vimentin de şiddetli pozitif (++++) immunoreaktivite izlendi (Resim 93).

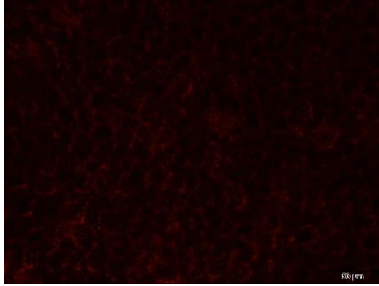


Resim 93: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; N-kaderin ve Vimentin ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm. En fazla immunoreaktivite N-kaderin ve Vimentin de görülmüştür.

RL95-2 ve JAR hücrelerinin kollajen fiber doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 de kuvvetli pozitif (+++) immunoreaktivite izlendi (Resim 94).

COL/F RL95-2 ve JAR 14.gün

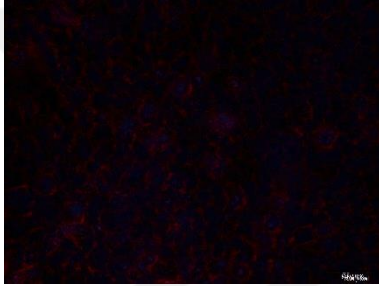
Syndecan-1



DAPI

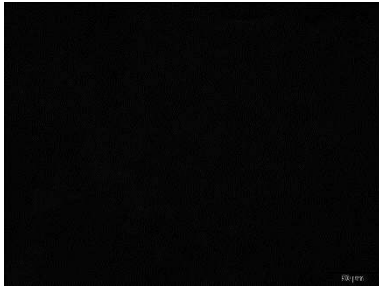


Merge



Resim 94: RL95-2 ve JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile 14.gün kültüründe; Syndecan-1 ile immunfloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

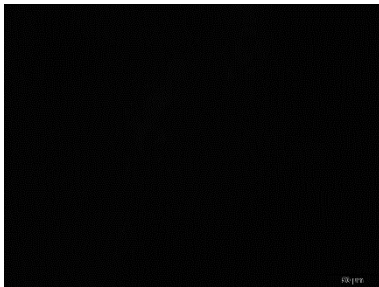
JAR



RL95-2



RL95-2 + JAR



Resim 95: JAR, RL95-2 ve RL95-2 + JAR hücrelerinin COL/F doku iskelesi ile kültürü sonrasında kontrol immunofloresan analizi. Ölçek: 50 µm.

Tablo 14: JAR, RL95-2 ve RL95-2 ile JAR kombine hücrelerin 3., 5., 7., 10. ve 14. günlerde COL/F doku iskelesi ile immunoreaktivite değerlendirilmesi

COL/F Doku İskelesi	JAR	RL95-2	RL95-2+JAR	
E-kaderin	3.gün	++++	+	+++
	5.gün	+++	+	+++
	7.gün	+++	++++	++++
	10.gün	++++	++++	+++
	14.gün	++	+++	++++
N-kaderin	3.gün	+++	+++	++
	5.gün	+++	+	++++
	7.gün	+++	++++	+++
	10.gün	++	+/-	+++
	14.gün	++	++	++++
Vimentin	3.gün	++	+++	++
	5.gün	+	+++	++
	7.gün	++	+/-	+++
	10.gün	+	+/-	++
	14.gün	++	+/-	++++
α -SMA	3.gün	+++	++++	++
	5.gün	+	++	++
	7.gün	++	++++	+
	10.gün	+++	+++	++
	14.gün	+++	++++	++++
Syndecan-1	3.gün	++++	+++	++
	5.gün	++++	+	+
	7.gün	++++	+	++
	10.gün	+++	++++	+++
	14.gün	+++	+	+++

7. TARTIŞMA

İmplantasyon embriyo ve endometriumun reseptif ve adheziv özelliklerinin sonucu gerçekleşen fizyolojik bir olaydır. İmplantasyon sırasında farklı hücrelerin moleküler değişiklikleri sonucunda salgılanan faktörler sayesinde doğru endometrial hücreler ile trofoektoderm hücrelerinin birleşmesi sonucunda epitelden mezenkim dokuya doğru invazyon süreci başlar. Bu süreçte epitelyal hücrelerin gösterdiği değişikliklerin yanısıra, mezenkimal veya stromal hücrelerin de değişiklikleri bu sürecin sorunsuz tamamlanmasını sağlar. Endometrial veya stromal hücrelerden salgılanan faktörlerin değişiklikleri ya da farklı salgı faktörlerinin salgılanması bu süreçte sorunlar ile karşılaşılmasına neden olur (Shahbazi ve ark, 2016). Birçok gebelik komplikasyonu ya da spontan abortus, implantasyonla ilişkili olduğundan implantasyon ve plasental büyüme için endometrium trofoblast ilişkisinin ve trofoblast invazyon mekanizmasının aydınlatılması kurulacak 3D fonksiyonel endometrium benzeri kültür sistemlerine bağlıdır (Parveen ve ark, 2007). Endometrial epitelin döngüsel değişiklikleri sonucunda salgılanan veya doğru döngüde yeterli düzeyde salgılanan faktörler endometriumu implantasyona hazırlar. Bu süreçte özellikle endometrial EPF, progesteron, integrin, MUC1, LIF, EGF-R gibi faktörler erken sekresyon ve/veya sekresyon döneminde salgılanır iken, eş zamanlı olarak trofoektoderm hücrelerinde de IL6, IL1 ve IGF vb. faktörler salgılanır. Salgılanan faktörler dışında bu faktörlerin reseptörlerinin de ekspresyonu implantasyon için kaçınılmazdır (Zeisberg ve ark, 2003). Gebelik komplikasyonları, uygun olmayan trofoblast göçü ve spiral arter dönüşümünün başarısız olması ile de ilişkilendirilmiştir (Aldo ve ark, 2007). Endotel hücrelerinin mekanizması tam anlaşılamamış olmasına rağmen, trofoblast göçünü ve dönüşümünü yönlendirmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Üç boyutlu kültür sistemleri ile endometrium trofoblast etkileşimini ve sinyalleşme mekanizmalarının aydınlatılması ve değerlendirilmesi ile klinikte implantasyon başarısızlığının anlaşılması sağlanabilir (Poli ve ark, 2015).

İmplantasyon sırasında trofoblastların endotel benzeri fenotip özelliği kazanmasının, gebelik komplikasyonlarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. İntrauterin büyüme problemleri ve spontan abortus olgularının yorumlanabilmesi, bir bakıma trofoblast invazyon mekanizmasının aydınlatılmasına da bağlıdır. Çünkü bu süreçte trofoblastların göçüyle endotel hücrelerinin kaderi belirlenmektedir (Horse ve ark, 2004). İmplantasyon, embriyogenez ve organ gelişim süreçlerinde görülen Tip 1

epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının aydınlatılması normal ve anormal gebelik olgularının anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca endometrium epitel ve trofoblast hücrelerinin etkileşimlerinin doğru karakterizasyonu, implantasyon ve normal plasantasyon süreçlerini anlamada da önemlidir (Aldo ve ark,2007).

İmplantasyon sürecine benzer olarak kanser hücrelerinin de dokuya invazyonu veya dolaşan hücrelerin epitelden stromal dokuya geçişi sırasında benzer faktörler salgılanır. Bu nedenle epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere benzer faktörler salgılayarak, invazyon yapıcı özellik kazanmaları metastazın gerçekleştirilmesine neden olur. Bu süreçte özellikle E-kaderin, N-kaderin, Syndecan-1, OB-kaderin, $\alpha 5\beta 1$ -integrin ve $\alpha 5\beta 6$ -integrin gibi hücre yüzey proteinleri ile Vimentin, α -SMA, FSP-1, Sitokeratin ve β -katenin gibi sitoplazmik proteinlerin ekspresyonu veya inhibisyonu gözlenir. Böylelikle epitelyal özelliğini kaybeden hücre kolaylıkla dolaşıma geçebilir, dolaşımda kalabilir ve hatta stromaya yerleşerek çoğalabilmesi için yeni bir ortam oluşturabilir. O nedenle epitelyal kökenli kanserlerin metastazı daha olasıdır (Martin ve ark, 2013).

Hem implantasyon hem de metastaz sürecinde değişen sinyal yolakları, hücresel özellikler ve yeni kazanılan belirteçler/faktörler hala araştırma konularındandır. Bununla beraber kültür sistemlerinin bu süreçleri analiz edebilecek, yeni sinyal yolakları çıkartabilecek ve/veya yeni araştırma modelleri geliştirebilecek düzende olması önemlidir ve de gereklidir (Jiang ve ark, 2015).

Hücre kültürü tekniği kullanılarak; kanser, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalar, çeşitli hastalıkların tanı/tedavi ve araştırmaları, doku ve deri mühendisliği, aşı üretimi, kök hücre çalışmaları, tüp bebek ve infertilite tedavileri, farmasötik proteinlerin üretim çalışmaları yapılabilmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında, deneyin etkisinin hücrenin üzerinde direkt olarak gözlenebilmesi ve hayvan kayıplarına neden olmaması nedeniyle etik olarak uygun bulunmuş ve desteklenmiştir. Bununla beraber hücre kültüründe elde edilen hücrelerden yapılan genetik çalışmalar, ilaç uygulamaları ve hatta *in vitro* fertilizasyon yöntemleri hücre kültüründe çalışılan alanlardır (Vunjak ve Freshney, 2006).

Vücut içinde hücrelerin bulunduğu mikro ortam üç boyutlu olduğu için, en dikkatli ve uyumlu seçilmiş iki boyutlu substrat bile zaman içinde hücrelerin morfolojik

özelliklerini yitirmelerine, doğal doku fizyolojilerinin bozulmasına, hücreler arası etkileşimlerinin azalmasına ve farklılaşmasına neden olur. 2D hücre kültürü yöntemi, hücrelere mekanik destek sağlayan hücre dışı matriksinin, hücre yüzeyinin ve sinyal yollarının ortaya çıktığı fizyolojik hücre ortamının gerçek bir yansıması değildir. Dolayısıyla doku modellemeleri çalışmalarında 2D kültür doğrudan *in vivo* deney sonuçlarını yansıtmayabilir (Zhang ve ark, 2011). Üç boyutlu substratların hazırlanması ek bir çaba ve bilgi gerektirdiği, hem de bu substratlar üzerindeki hücrelerin kültür süresince takibi ve kültür sonrası analizleri zor olduğu için rutin hücre kültürlerinde iki boyutlu substratlar tercih edilir. Ancak özellikle doku mühendisliği çalışmaları için hücrelerin fizyolojik ortamlarını ve kendi ekstraselüler matrikslerini en uygun şekilde taklit etmeleri amacıyla üç boyutlu, biyobozunur doku iskeleleri substrat olarak kullanılır (Yoo ve ark, 2011). Öte yandan en dikkatli seçilmiş iki boyutlu substrat bile, zaman içinde hücrelerin morfolojik özelliklerini yitirmelerine ve hücreler arası farklılaşmalara sebep olabilir. Ancak 3D kültür sistemlerinde doğru iskele seçimi yapılmadığında hücrelere oksijen sağlanmasında, büyüme faktörlerinin dağılımında problemler ortaya çıkarak hücrelerin üreme yetenekleri sınırlanabilir (Tibbitt ve Anseth, 2009).

Hücre göçü ile ilgili yapılan 2D kültür çalışmalarında hücrelerin göç yetenekleri sergiledikleri (Ridley ve ark, 2003) ancak 3D kültür sistemleriyle karşılaştırıldıklarında hücrelerin *in vivo*ya özgü mekanizmaları kullandıkları bildirilmiştir (Timmins ve ark, 2007). İmplantasyon sırasında meydana gelen hücresel ve fonksiyonel değişimleri yansıtacak ve/veya tanımlayacak eş değer bir 2D kültür sistemi henüz bulunmamaktadır. Bununla beraber *in vivo* deneylerde karşılaşılabilecek etik problemler ve sınırlamalarda, implantasyon çalışmalarında kısıtlama getirebilmektedir. Bu amaçla; *in vivo* mekanizmaların anlaşılması ve açıklanabilmesi için *in vivo* ortama uygun, hücreler ile uyumlu, araştırma kapsamına uygun farklı ve/veya yeni *in vitro* 3D kültür sistemlerine ihtiyaç vardır (Reister ve ark, 2001). 3D kültür sistemleri en fazla hücrelerin göç yeteneklerinin sergilenmesi, invazyon mekanizmalarının araştırmalarında kullanılmaktadır. İnsan meme epitel hücrelerinin 2D ve 3D kültür karşılaştırmalarında, hücrelerin 3D kültürde normal büyüme davranışı sergilerken, 2D kültürde tümör oluşumu gösterilmiştir (Petersen ve ark, 1992).

3D hücre kültürü çalışmaları öncelikle kök hücre alanında başlamıştır. İnsan embriyonik kök hücrelerinin 3D kollajen doku iskelesi üzerinde hepatositlere dönüştüğü göstermişlerdir (Baharvand ve ark, 2004). Yapılan başka bir insan embriyonik kök hücre çalışmasında ise 3D kollajen kültür içerisinde hücrelerin yeterli büyüme faktörleriyle desteklendiği taktirde sinir, kıkırdak, karaciğer hücrelerinin karakterlerini sergilediği saptanmıştır (Levenberg ve ark, 2003). Fare embriyonik kök hücreleri ile yapılan 3D kollajen kültür sisteminde ise kondrojenik farklılaşma sağlanmıştır (Tanaka ve ark, 2004).

Bu amaç için özellikle doku mühendisliği alanında üretilen iskeleler hem elde etmesi hem de kullanım kolaylığı açısından en uygun materyallerdir. 3D kültür sistemlerinde iskelelerin hücrelerin tutunmalarına, yayılımlarına ve hücreler arası iletişimlerine olanak sağlayacak gözenekli yapıda olması ve ECM'i taklit eden özellikte olması tercih edilmektedir. Hücre kültüründe kullanılan ve ECM'i taklit eden mikro gözenekli doku iskeleleri hücrelerin bağlanabilmesi için uygun ortam sağlarken, makro gözenekli doku iskeleleri hücre göçüne izin verecek yapıdadır (Teixeira ve ark, 2010). ECM'i taklit eden en önemli iskeleler hidrojel doku iskeleleridir. Bunlar arasında kollajen ve hiyaluronik asit içeren doğal hidrojel iskeleler olduğu gibi, polietilen glikol, polivinil alkol gibi doğal kaynaklı olmayan hidrojeller de bulunmaktadır. Ancak doğal hidrojel iskelelerin biyouyumlulukları ve biyoaktiflikleri daha yüksektir (Tibbitt ve Anseth, 2009). Endometrium epitel hücrelerinin de *in vitro* koşullarda, *in vivo* yu fonksiyonel olarak taklit etmeleri için ekstraselüler matriks bileşenlerini içeren kültür sistemlerine ihtiyaç vardır. Kurulan kültür sistemleri endometrium doğal ana zar yapılarını, laminin ve tip IV kollajeni de içeren epitel hücre bağlanmasını ve farklılaşmasını teşvik edici özellikte olmalıdır (Blauer ve ark, 2005). Bunun için literatürde en fazla çalışılan matrijel üzerine hücre ekimidir. Matrijel, üzerindeki endometrium epitel hücrelerinin tek tabaka halinde polarize olmalarını ve glandüler yapılar oluşturmalarını teşvik ettiği rapor edilmiştir (Alfer ve ark, 2000). Ancak matrijel, laminin, polilizin kaplı kültür plakları da endometriumun fonksiyonel özelliklerinin bir kısmını yansıtmaktadır. Elde edilen sonuçların klinikte de kullanılabilmesi için, sonuçların tam bir fonksiyonel endometrium yapısını yansıtan 3D kültür sistemlerinden elde edilmiş olması gerekmektedir (Blauer ve ark, 2005). Ayrıca uzun süreli kültürde matrijelin endometrium epitel hücrelerinde farklılaşmaya sebep olduğu ve trofoblast göçünü ve dönüşümünü yönlendirmede olumsuz etkilediği

rapor edilmiştir (Aldo ve ark, 2007). Bunun için *In Vitro* yapılacak endometrium çalışmalarında kollajen ve selüloz gibi doku iskeleleri tercih edilmesi önerilebilir.

Çalışmada özellikle implantasyon ve/veya metastaz modellerinde kullanılabilecek kültür ortamının araştırılması/geliştirilmesi planlanmıştır. Çalışmada BC, COL/K ve COL/F 'ın üretim aşamasının kolay, hücrelere toksik etki göstermemeleri, analiz edilebilir olmaları, hücrelerin çoğalması ve/veya farklılaşmalarını destekleyen özellikte olmaları ve en önemlisi 3D kültüre uyumlu olmaları sebebiyle seçilmişlerdir.

BC; doğal ürün olmasından dolayı son yıllarda kullanımı tercih edilmektedir. Ayrıca kollajen, aljinat, hiyaluronik asit, fibrin gibi doğal polimerler yanısıra poliglikolik asit, polilaktik asit, polivinil alkol, chitosan, polihidroksietilmetakrilat ve poli-N-izopropilakrilamid gibi sentetik polimerler ile karşılaştırıldığında hücrelerin canlılık oranlarının bakteriyel selülozda daha çok olduğu, bunun da bakteriyel selülozun yüksek su tutma kapasitine sahip olup, hücrelerin beslenmesini ve büyümesini sağlayan besiyerinden daha fazla yararlanmalarını sağlaması olarak yorumlanmıştır (Svensson ve ark, 2005). Bakteriyel selüloz; agar, gellan ve ksantan gibi biyomalzemelerden farklı olarak üç boyutlu bir nanofiber ağına yapısına sahiptir. Bu ağ yapısı BC'a geniş bir yüzey alanı kazandırarak, küçük moleküllerin taşınması için kanal sistemi ve büyüme faktörlerinin hücreye daha hızlı difüze olmalarını sağlayan iyonların geçişine olanak tanır (Bäckdahl ve ark, 2008). BC, insan vücudunda enzimatik olarak bozunmasada, inflamatuvar süreçlerin aslında selülozu bir dereceye kadar bozabildiği bildirilmiştir. Ancak şu ana kadar yapılan çalışmalarda bu bozunma ürünlerinin hücreye veya dokuya zarar verdiği ya da toksik olduğu bildirilmemiştir (Moreira ve ark, 2009).

Kullanılan kollajen iskelenin por çapı, hücrelerin proliferasyonu ve polarizasyonlarını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Por çapı 50-100 µm arasında ise rejenerasyon kapasitesini analiz etmek için uygundur. Bununla beraber hücrelerin iskeleler üzerine tutunması için ise por çaplarının 200 µm veya daha küçük olması uygundur. Scaffold por çaplarının 10 µm dan daha küçük olanlarında ise hücreler içeriye penetre olmaz ve o nedenle rejeneratif aktivite ve migrasyon özelliği gerçekleşemez (Yannas IV ve ark, 2010). O nedenle iskele por çapı kadar kültür süresi de hücrelerin canlılıklarını devam ettirmesinde önemli bir kriterdir. Çalışmamızda kullanılan BC, COL/K ve COL/F iskelelerinin por çapları sırası ile $97 \pm 28 \mu\text{m}$, $109 \pm$

21 μm ve $0,67 \pm 0,14 \mu\text{m}$ olarak saptandı. JAR ve RL95-2 hücrelerinin BC ve COL/K içerisine migrasyonu gözlenir iken, COL/F grubunda daha çok yüzeyde tutunmuş hücrelerin olması çapın küçük olmasından dolayı olabileceğini düşündürdü. Hücre-iskele bağlantısı optimum bir süre devam etmelidir. Çünkü, biyobozunur olmayan iskele bile zamanla kültür koşulları altında hücrelerin etkileriyle, salgıladıkları ECM proteinleri ve diğer bileşen sayesinde ilk temsil ettikleri durumlardan farklı yanıt oluşturabilirler (Yannas IV ve ark, 2010). Çalışmada farklı analiz günlerinin seçilmesi bu sebepten dolayı yapılmıştır. İskele por çapı seçiminde, taklit edilmesi istenen *in vivo* dokunun yapısının bilinmesi önemlidir. *İn Vitro* oluşturulan ve *in vivoyu* taklit edecek olan kollajen iskele, fonksiyonel olarak *in vivoya* benzemesi için doku boşluklarını dahi temsil etmelidir. Yapılan çalışmalarda *İn Vitro* implantasyondan sonra, kollajen doku iskelesinde yeniden hücre dışı matriks bileşenlerinin olduğu bildirilmiştir. Hücreler deneyin ilk aşamalarında kısmen bozulmuş kollajen demetleri arasında çoğalırken, implantasyondan sonra yeniden kollajen demet oluşumları görülmüştür. Bunun da implantasyondan sonra hücrelerin kendi matriks elemanlarını sentezlediği ve hücrelerin iskelenin yeniden şekillenmesinde karşılıklı rol oynayabileceği yorumu yapılmıştır (Hoerstrup ve ark, 2000).

İn Vitro çalışmalarda insan primer endometrial hücreler ile çalışma zorlukları arasında elde edilme sıkıntıları, yeterli insan örneğinin olmaması ve kültür problemleri sıralanabilir. Bu hücrelerin ölümsüzleştirilmesi, yapılacak *İn Vitro* çalışmalar için kolaylık sağlayacaktır. Fakat ölümsüzleşme süreci de kendi içinde anormal karyotip oranları ve anormal fonksiyonel özellikleri içerebilir. Bu nedenle seçilecek hücre hattı, karyotip analizi tamamlanmış, morfolojik ve fenotipik olarak primer endometrium hücrelerine benzeyen ölümsüzleştirilmiş hücrelerden seçilmelidir (Krikun ve ark, 2004). Çalışmamızda 3D modeli için implantasyona benzer ortam oluşturmak adına RL95-2 endometrium epitelyal hücresi ile JAR trofoblast benzeri koryokarsinom hücreleri seçilmiştir. RL95-2 hücreleri fusiform yapıda tek tabakalı halde çoğalan hücreler iken JAR hücreleri sferoid oluşturan ve adheziv özellik gösteren hücrelerdir. Ticari olarak hazır alınan endometrial hücrelerin en önemli avantajı, elde edilmiş kaynaklarının doğal bölgeden olmaları ve kültür sırasında implantasyon basamağından önce ve sonra hücrelerdeki değişimin gözlenebilir olmasıdır (Liu ve ark, 1999).

3D endometrium kültür sistemleriyle yapılan ilk çalışmalar, sağlıklı insan endometriumunun hormonal cevabı *in vitro* modellemek üzere kurulmuştur (Blauer ve ark, 2005). Normal adet döngüsü sırasında, insan endometriumu, ovaryan steroid hormonlarına yanıt olarak, büyüme ve yeniden biçimlendirmeye maruz kalır. Foliküler östrodiol; endometrial hücre çoğalmasını uyarırken, progesteron; corpus luteum'dan hücre farklılaşmasını ve post ovulatuvar evreyi yönetir. *In vitro* kurulan 3D endometrium benzeri kültür sistemlerinde kullanılan RL95-2 hücrelerine uygun hormonal sinyaller ve stromal-epitel hücre etkileşimleriyle, normal endometriyal büyüme ve yeniden fonksiyonel olarak biçimlendirme görülmüştür (Punyadeera ve ark, 2003). Yapılan başka bir çalışmada ise östrojen ve progesteronun RL95-2 hücresi ve stromal hücre çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir (Pierro ve ark, 2001). Endometriyal stromal hücreler sadece epitel mitojenezinde rol oynamakla kalmayıp aynı zamanda epitelyal hücrelerin işlevsel farklılaşmasını da modüle ederler (Groothuis ve ark, 2007). İnsan endometriumunun proliferatif bozuklukları (hiperplazi, kanser), hiperöstrojenik durumlara ve beklenmedik östrojen replasman tedavilerine bağlı olduğundan, kurulacak *in vitro* 3D endometrium benzeri kültür sistemlerinin araştırılması ve fonksiyonel olarak doğru yapıyı taklit etmesi klinik araştırmalar açısından önemlidir (Bigsby, 2002). *In vitro* yapılacak implantasyon modellerinde, oluşturulan 3D endometrium benzeri kültür sisteminin trofoblast invazyonunun gerçekleşmesi endometriumun sekresyon fazında olmalıdır. Bunun için kültür sistemleri östrojen ve progesteron ile desteklenmelidir (Psychoyos, 1976).

In vitro geliştirilen 3D kültür modellerinde, birçok deney *in vivo* olarak meydana gelen insan embriyosu implantasyonun erken aşamalarını taklit etmek üzere geliştirilmiştir. Bunun için, ECM ile stromal hücre invazyonu deneyleri trofoblast yayılımlarını taklit etmek için, insan trofoblast benzeri hücreler (JAR) ya da blastokist ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. İnsan endometrial hücreler ve blastokistlerin 3D ko-kültürleri de incelenmiştir. Trofoblast/koriyokarsinom hibrid hücreleri ile desidua parietalis doku parçaları ko-kültürü de yapılan çalışmalar arasındadır (Wang ve ark, 2012). İnsan endometrium reseptivitesini ve blastokist implantasyonunu anlama sürecinde, farklı *in vitro* modeller geliştirilmiştir (Meng ve ark, 2009). Oluşturulan hayvan modelinin insan endometrium reseptivitesini ve blastokist invazyonunu anlamada kısıtlamalar getirdiği ve tam olarak ifade etmediği görülmüştür. Örneğin JAR sferoidlerinin, tavşan, fare ve tavuk modellerinde invazyon

basamaklarında farklı yanıtlar verdiği görülmüştür (Gru ve ark, 1994). İskele üzerine insan endometrium stromal ve RL95-2 hücrelerinin ekimi ile sadece endometrium epitel hücrelerinin ekimi ile oluşturulan kollajen 3D iskele modelinde, JAR sferoidlerinin invazyonunda farklılıklar saptanmıştır. Örneğin; stromal hücrelerle kültüre edilen modelde, JAR sferoidlerinin invazyonu sonrasında epitel hücrelerinde nekrotik benzeri yapılar olduğu görülmüştür. Ayrıca JAR sferoidlerinin tekli endometrium epitel hücreleri ile olan iskele modeline invazyonunun daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Stromal ve epitel hücrelerinin birlikte ekimi ile oluşturulan iskele modelinde blastokistin invazyonunda bazı kısıtlılıklar saptanmıştır (Carver ve ark, 2003). Bir başka çalışmada ise matrijel üzerinde kültüre edilen endometrium epitelyal ve stromal hücrelerine JAR sferoidlerinin ekimi sonrasında, stromal hücrelerin muhtemelen ECM'i yeniden yapılanma aşamasında, JAR sferoidlerinin proliferasyonunu kısıtladığı görülmüştür (Arnold ve ark, 2002). Stromal hücrelerin epitelin büyümesini ve farklılaşmasını yönlendirmede önemi de unutulmamalıdır (Ridley ve ark, 2003). Üç farklı insan koriyokarsinom hücre dizisi (BeWo, Jeg-3, JAR) endometrium epitelinde trofoblast davranış modellerinin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Her üç hücre dizisinde morfolojik farklılıklar kaydedilmiştir. BeWo hücrelerinin endometrium epiteline %37 oranında tutunma gösterirken, stromaya invazyon yapmadığı, Jeg-3 hücrelerinin %52 gibi bir oranla en yüksek oranda tutunma sergileyip, stromanın da bir kısmına invaze olduğu, JAR hücrelerinin ise %12 gibi bir oranla en düşük seviyede tutunma gösterip stromaya hiç invaze olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte her üç hücre dizisi de aynı normal trofoblast popülasyonlarında olduğu gibi az sayıda organel ve öncü sitotrofoblast hücrelerinde olduğu gibi düşük yoğunluklu sitoplazma içerdiği tespit edilmiştir (Gru ve Denker, 1994). JAR sferoidlerinde, *in vivo* trofoblast morfolojisine benzeyen, hücrelerin apikal kısımlarında sitotrofoblast benzeri mikrovillus uzantıları görülmüştür (Blackburn ve ark, 1988). *İn vivo* implantasyon bölgesinde mikrovilluslar düzleşmekte daha sonra temas bölgelerinde lokal olarak kaybolmaktadır. Oluşturulan *in vitro* implantasyon modelinde JAR sferoidlerinde benzer oluşumlar görülmüştür (Enders ve Schlafke, 1969).

Çalışmamızda BC' un RL95-2 ve JAR hücreleri ile kültürü sonrasında hücre sayılarında analiz edilen günlerde farklılık olmadığı, JAR hücrelerinde sferoid oluşumu gecikmesine neden olduğu görülmesi üzerine BC' un tek tek hücrelerin kullanımında yeterli olmadığı, JAR ve RL95-2 hücrelerinin BC üzerinde birlikte kültürü sonrasında sferoid oluşumu ve sferoidlerin BC yüzeyine tutunmasını desteklediği görüldü. COL/K iskelesinin kullanımında ise; RL95-2 hücrelerinin iskele üzerinde çok az sayıda olduğu, JAR hücrelerinin ise hem tekli hem de RL95-2 hücreleri ile birlikte kullanımında sferoid yapı oluşumunun gözlenmesi üzerine COL/K doku iskelesinin özellikle JAR hücrelerinin tekli veya RL95-2 hücresi ile kullanımı durumunda verimli olabileceği sonucuna varıldı. COL/F ise cam yüzeyinde olmasından dolayı frozen kesiti yapılamadı ve COL/F'in kesit sonrası ne gibi değişikliklere uğrayacağı analiz edilemedi. Bununla beraber COL/F' ın tekli her iki hücre ile kültüründe hem de JAR ve RL95-2 hücrelerinin birlikte kültüründe hücre çoğalmasını destekleyici ortamı sağladığı düşünüldü.

Hücrelerin metastaz sırasında gösterdikleri hücresel değişikliklerin belirteci olan E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 ekspresyonlarında farklılıkların saptanması hem hücre kültürü analizi hem de hücresel değişikliklerin değerlendirilmesi için önemlidir. JAR hücrelerinin; E-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1 ekspresyonlarının RL95-2 hücrelerine oranla daha az olduğu, N-kaderin ekspresyonunun ise her iki hücrede benzer olduğu saptandı. Epitelyal belirteçlerden E-kaderinin RL95-2 hücrelerinde kuvvetli pozitif salgılanması epitelyal özellikte kullanılabilir hücre olduğunu destekledi. Sitoplazmik ve mezenkimal özellik belirteçler olan Vimentin, α -SMA'nın RL-95-2 hücrelerinde görülmesi, fakat özellikle Vimentin ve α -SMA' nin JAR hücrelerinde negatif veya çok az eksprese olması, epitelyal mezenkimal geçişi kontrol etme adına önemli olduğu düşünüldü. Bu nedenle hem JAR hem de RL95-2 hücrelerinin implantasyon veya metastaz modellerine uygun hücreler olduğu sonucuna varıldı.

Ayrıca implantasyon modeli için özellikle RL95-2 ile JAR hücrelerinin birlikte kültürü, metastaz modeli için ise RL95-2 ve JAR hücrelerinin tekli kültürü seçildi ve analiz edildi. Çalışmanın sonucunda BC ile kültürün erken 3. ve 5. günlerinde E-kaderin ekspresyonunun özellikle JAR hücrelerinde arttığı ve 5. günde ise RL95-2 hücrelerinde normale oranla arttığı gözlemlendi. O nedenle BC' un her iki hücre tipi için

de epitelyal özelliği destekleyici ortam oluşturduğu düşünüldü. N-kaderin ekspresyonu, JAR ve RL95-2 hücrelerinin tekli kültüründe artmış olduğu, birlikte yapılan kültürde ise kültürün 3. ve 5. günlerinde iskele olmadan yapılan grubun sonucunun iskele ile yapılan gruba oranla benzer olduğu fakat kültürün 7. ve 10. günlerinde N-kaderin ekspresyonunun arttığı görüldü. 7. ve 10. günlerde tekli yapılan kültürlerde ise N-kaderin ekspresyonu BC iskelesi olmadan yapılan gruplarla benzer olmasından dolayı BC doku iskelesinin implantasyon modeli için uygun olabileceği düşünüldü. Kültürün 10. ve 14. günlerinde kombine grupta ekspresyon 10. günde daha fazla iken tekli kültürlerde ise iskele olmadan yapılan kültür gruplarıyla benzer olmasının saptanması üzerine, özellikle implantasyon modeli için BC doku iskelesinin kullanılabileceği düşünüldü. Vimentin ekspresyonu, JAR hücrelerinde kültürün 3. gününde en fazla iken, kültüre devam edilmesi ile azaldığı görüldü. Bu nedenle JAR hücreleri metastaz modelinde kullanılacak ise erken dönemde kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Vimentin ekspresyonu, RL95-2 hücrelerinde kültürün 10. ve 14. gününde artmasından dolayı JAR hücreleri ile birlikte yapılan kültürde benzer günlerde ekspresyonun en fazla olması nedeniyle, buradaki ekspresyon artışının RL95-2' den dolayı olduğu ve RL95-2' nin epitelyal özellikten mezenkimal özelliğe dönüştürdüğüne yanısıra implantasyon modeli içinde JAR hücreleri ile birlikte uzun dönem kültürünün uygun olduğu görüldü. α -SMA, JAR hücrelerinde iskele olmadan negatif iken, kültürün 3. gününden itibaren ekspresyonun arttığı gözlenmesi üzerine metastaz çalışması için kullanılabileceği düşünüldü. RL95-2 hücrelerinde α -SMA immunoreaktivitesinin sadece 10. günde artış olduğu diğer günlerde ise kontrol grubuyla benzer olduğu gözlemlendi. Kombine yapılan çalışmada ise α -SMA ekspresyonunun kuvvetli pozitif olmasından dolayı iki hücrenin de implantasyon modeli için kullanımının uygun olabileceği sonucuna varıldı. Syndecan-1, immunoreaktivitesinin JAR hücrelerinde kültürün 3. gününde özellikle en fazla olduğu, bununla birlikte RL95-2 hücrelerinde kültürün 5. gününde arttığı, her iki hücre ile yapılan BC doku iskelesi ile kültürü sonrasında özellikle 10. günde en fazla immunoreaktivitenin gözlenmesi üzerine metastaz modeli için JAR ve RL95-2 hücrelerinin kombine halde, invazyon modeli için ise 10. günde kullanımının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

COL/K doku iskelesinde 3. gün kültürde E-kaderin ekspresyonunun kontrol grup boyamalarının iskele olmadan yapılan kültür ile benzer olduğu fakat kültüre devam edildiğinde E-kaderin ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. JAR hücrelerinde E-kaderin ve Syndecan-1 ekspresyonlarının azaldığı, Vimentin ve α -SMA de bir miktar artış olmasına rağmen çok anlamlı olmadığı görüldü. JAR hücrelerinin devam eden kültüründe özellikle 7. günde E-kaderinin negatif, N-kaderin ve Syndecan-1' in kuvvetli pozitif olmasından dolayı bu hücrelerin kültürün 7. gününde kollajen köpük üzerinde epitelyal özelliğinden ziyade mezenkimal özelliğinin aktif olduğu düşünüldü. Fakat kültürün 5., 10. ve 14. günlerinde hem E-kaderin hem de diğer belirteçlerin ekspresyonlarının fazla olması kollajen köpük doku iskelesinin kültürün bu günlerinde hem epitelyal hem de mezenkimal özelliklerini desteklediğini ve bu desteğin JAR hücrelerinin sferoid yapısı ile ilişkili olabileceği düşünüldü. RL95-2 hücrelerinin 3. gün kültürü sonrasında E-kaderin, N-kaderin ve Syndecan-1 ekspresyonlarının negatif olması, Vimentin ve α -SMA' nın zayıf şiddette pozitif olması epitelyal özelliğin azaldığı ancak mezenkimal özelliğini de desteklemediğini düşündürdü. Kültürün 5. gününde RL95-2 hücrelerinde sadece Syndecan-1' in çok az olmasının yanısıra kültüre devam edilmesi ile 7. ve 10. günlerde tüm analiz edilen belirteçlerde ekspresyonlarının şiddetli pozitif olması, COL/K doku iskelesinin RL95-2 hücreleri için hem epitelyal hem de mezenkimal doku özelliğini korumasını sağladığını düşündürdü. Fakat kültürün 14. gününde RL95-2 hücrelerinde E-kaderin, N-kaderin, Vimentin negatif iken α -SMA ve Syndecan-1' in kuvvetli pozitif olması bu hücrelerin 14. günde, özellikle COL/K doku iskelesinin hücrelerin mezenkimal özelliğini destekleyici yönü olduğu düşünüldü. RL95-2 ve JAR hücrelerinin birlikte kültürü sonrası ise kültürün 3. gününde sadece N-kaderinin negatif olması hem epitelyal hem de mezenkimal hücrelerin olduğunu gösterdi. Kültürün 5. gününde ise kombine yapılan COL/K doku iskelesi kültüründe Syndecan-1 dışında tüm diğer antikorların şiddetli pozitif olması bu sonucun RL95-2 hücrelerinden ziyade JAR hücrelerinden dolayı olduğu sonucuna varıldı. Kültüre devam edildiğinde ise COL/K doku iskelesinin 7., 10. ve 14. günlerde tüm belirteçlerde kuvvetli pozitif olduğu ve özellikle bu ekspresyonların JAR hücrelerinden dolayı olduğu sonucuna varıldı.

COL/F doku iskelesi sonrasında JAR hücrelerinde N-kaderin dışında diğerlerinin ekspresyonlarının bariz bir şekilde arttığı, kültüre devam edildiğinde ise ekspresyonların azaldığı fakat yine COL/K doku iskelesine oranla daha fazla olduğu

görülmesinden dolayı COL/F doku iskelesinin JAR hücrelerinin epitelyal özelliklerini kazanmasını sağladığı, fakat mezenkimal özelliğinin de devam etmesini desteklediğini düşündürdü. RL95-2 hücrelerinin COL/F doku iskelesi üzerinde kültürün 3. ve 5. günlerinde E-kaderin ekspresyonunun iskele olmadan yapılan gruba oranla azalması, bununla beraber hücre sitoplazmik ekspresyonlarının devam etmesi üzerine, kültürün erken dönemlerinde COL/F doku iskelesinin RL95-2 hücrelerinde mezenkimal özelliği desteklediği düşünüldü. Fakat kültüre devam edildiğinde RL95-2 hücrelerinin epitelyal özelliği tekrar kazandığı ve özellikle Vimentin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu görüldü. Bu da por çapının küçük olmasından dolayı hücrelerin kültürün ileri aşamasında fiber üzerinde çoğalma ve epitelyal özelliğini devam etme kapasitesine sahip olduğunu düşündürdü. COL/F doku iskelesinde RL95-2 ile JAR hücrelerinin kombine kültürü sonrasında hem epitelyal hem de mezenkimal hücrelerin görülüyor olması özellikle bu ekspresyonun kültürün 14. gününde en fazla olmasından dolayı COL/F doku iskelesi kültürünün uzun süreli olması sonucuna varıldı.

Sonuç olarak; BC' un özellikle metastatik kurulacak modellerde JAR hücrelerinin kullanılmasında ve erken dönem kültürün yapılmasına uygun olduğu bununla beraber implantasyon modeli için ise 10. gün ve sonrası kültürün uygun olduğu sonucuna varıldı. COL/K doku iskelesinde JAR hücrelerinin 7. günde, RL95-2 hücrelerinin ise 14. günde mezenkimal özelliklerinin daha fazla olmasından dolayı bu günlerdeki kültürün metastaz modellerine uygun olacağı fakat COL/K implantasyon modeli için uygun olmadığı sonucuna varıldı. COL/F doku iskelesi ise, özellikle RL95-2 hücrelerinin erken dönem kültürlerinde epitelyal özellikten mezenkimal özelliğe dönmesini desteklediği, bunun yanı sıra RL95-2 ve JAR hücrelerinin birlikte uzun süreli kültüründe (14. günde) E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, α -SMA ve Syndecan-1' in pozitif olmasından dolayı kurulacak epitelyal-mezenkimal model için kültür süresinin önemli olduğu sonucuna varıldı.

8. KAYNAKLAR

Aldo PB, Krikun G, Visintin I, Lockwood C, Romero R Mor G, A novel three-dimensional *In Vitro* system to study trophoblast-endothelium cell interactions, in Am J Reprod Immunol, 2007; 58: p. 98-110.

Alfer J, Müller Schöttle F, Classen Linke I, Von Rango U, Happel L, Beier Hellwig K, Rath W Beier HM, The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility, in Molecular Human Reproduction, 2000; 6: p. 595-601.

Apparao K, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA Lessey BA, Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome, in Biology of reproduction, 2002; 66: p. 297-304.

Arnold JT, Lessey BA, Seppälä MK Kaufman DG, Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells, in Cancer Research, 2002; 62: p. 79-88.

Bäckdahl H, Esguerra M, Delbro D, Risberg B Gatenholm P, Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds, in Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2008; 2: p. 320-330.

Baharvand H, Hashemi SM, Ashtiani SK, Farrokhi A, Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *In Vitro*, in International Journal of Developmental Biology, 2004; 50: p. 645-652.

Barud H, Ribeiro C, Crespi M, Martines M, Dexpert-Ghys J, Marques R, Messaddeq YRibeiro S, Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes, in Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007; 87: p. 815-818.

Bigsby RM, Control of growth and differentiation of the endometrium: the role of tissue interactions, in Annals of the New York Academy of Sciences, 2002; 955: p. 110-117.

Blackburn DG, Taylor JM Padykula HA, Trophoblast concept as applied to therian mammals, in Journal of morphology, 1988; 196: p. 127-136.

Blauer M, Heinonen PK, Martikainen PM, Tomas EYlikomi T, A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate, in Hum Reprod, 2005; 20: p. 864-71.

Brayman M, Thathiah A Carson DD, MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia, in Reproductive Biology and Endocrinology, 2004; 2: p. 4.

Breslin SO'Driscoll L, Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery, in Drug Discov Today, 2013; 18: p. 240-9.

Can A, Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, 2014.

Cannon RE Anderson SM, Biogenesis of bacterial cellulose, in Critical reviews in microbiology, 1991; 17: p. 435-447.

Carver J, Martin K, Spyropoulou I, Barlow D, Sargent IMardon H, An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst, in Human Reproduction, 2003; 18: p. 283-290.

Çelik Ö, Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar, 2011; 841.

Dimitriadis E, White C, Jones RSalamonsen L, Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation, in Human Reproduction Update, 2005; 11: p. 613-630.

Ding L, Zhang Z, Shang D, Cheng J, Yuan H, Wu Y, Song XJiang H, α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial–mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma, in Journal of Oral Pathology & Medicine, 2014; 43: p. 335-343.

Dominguez F, Pellicer ASimon C, Paracrine dialogue in implantation, in Molecular and cellular endocrinology, 2002; 186: p. 175-181.

Doyle AGriffiths JB, Cell and tissue culture for medical research, 2000; Wiley.

Emiliani S, Delbaere A, Devreker FEnglert Y, Embryo–maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive treatment, in Reproductive biomedicine online, 2005; 10: p. 527-540.

Enders ACSchlafke S, Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation, in Developmental Dynamics, 1969; 125: p. 1-29.

Fidler IJPoste G, The “seed and soil” hypothesis revisited, in The lancet oncology, 2008; 9: p. 808.

Freshney RI, Animal cell culture: a practical approach, 1986; IRL press Oxford.: 8: p.

Gieni RSHendzel MJ, Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place?, in Journal of cellular biochemistry, 2008; 104: p. 1964-1987.

Gipson IKInatomi T, Mucin genes expressed by the ocular surface epithelium, in Progress in Retinal and eye research, 1997; 16: p. 81-98.

Gökçimen ATemel S, İmplantasyon ve moleküler etkileşimler, in SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2004; 11: p.

Groothuis P, Dassen H, Romano APunyadeera C, Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human, in Human reproduction update, 2007; 13: p. 405-417.

Gru R, Hohn H-P, Mareel MDenker H-W, Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system, in Placenta, 1994; 15: p. 411-429.

Hakeri H, Kök Hücre Çalışmaları ve Hukuki Boyutu, in Türkiye Klinikleri Journal of Surgical Medical Sciences, 2006; 2: p. 78-82.

Hanahan DWeinberg RA, The hallmarks of cancer, in cell, 2000; 100: p. 57-70.

Hannan NJSalamonsen LA, CX3CL1 and CCL14 regulate extracellular matrix and adhesion molecules in the trophoblast: potential roles in human embryo implantation, in *Biology of reproduction*, 2008; 79: p. 58-65.

Harrison RG, The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement, in *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 1910; 9: p. 787-846.

Harrison RG, Greenman M, Mall FPJackson C, Observations of the living developing nerve fiber, in *The Anatomical Record*, 1907; 1: p. 116-128.

Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler GLewis D, Good cell culture practice, in *ATLA*, 2002; 30: p. 407-414.

Hoerstrup S, Zund G, Schnell A, Kolb S, Visjager J, Schoeberlein ATurina M, Optimized growth conditions for tissue engineering of human cardiovascular structures, in *The International journal of artificial organs*, 2000; 23: p. 817-823.

Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg RHompes PG, Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology, in *Reproductive biomedicine online*, 2004; 9: p. 692-715.

Iguchi M, Yamanaka SBudhiono A, Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts, in *Journal of Materials Science*, 2000; 35: p. 261-270.

Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, Thompson S, Zollo M, Spano DDhawan P, Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives, in *Seminars in cancer biology*, 2015; Elsevier. 35: p. S244-S275.

Johnson P, Christmas SVince G, Immunological aspects of implantation and implantation failure, in *Human Reproduction*, 1999; 14: p. 26-36.

Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TuJ, Zhang JSalamonsen LA, Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation, in *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004; 89: p. 6155-6167.

Kabir-Salmani M, Hosseini AREzazadeh Valojerdi M, Endometrial receptivity to implantation in humans: biochemical and molecular aspects, in *Yakhteh Med J*, 2008; 10: p. 1-24.

Kalluri RNeilson EG, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, in *The Journal of clinical investigation*, 2003; 112: p. 1776-1784.

Kayışlı UA, Mahutte Ngarıcı A, Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology, in *American Journal of Reproductive Immunology*, 2002; 47: p. 213-221.

Kimber SJ, Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation, in *Seminars in reproductive medicine*, 2000; Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: + 1 (212) 584-4662. 18: p. 237-254.

Kodaman PHTaylor HS, Hormonal regulation of implantation, in Obstetrics and gynecology clinics of North America, 2004; 31: p. 745-766.

Koeppen BMStanton BA, Berne & Levy Physiology, 2009; Elsevier Health Sciences.

Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, Rahman M, Caze R, Qumsiyeh MLockwood CJ, A novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progestational response, in Endocrinology, 2004; 145: p. 2291-6.

Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter FEBner R, The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model, in Journal of biomolecular screening, 2004; 9: p. 273-285.

Lee KYMooney DJ, Hydrogels for tissue engineering, in Chemical reviews, 2001; 101: p. 1869-1880.

Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor JLanger R, Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds, in Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003; 100: p. 12741-12746.

Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RSKo FK, Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering, in Journal of biomedical materials research, 2002; 60: p. 613-621.

Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-JWang Y-K, Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation, in Oncotarget, 2015; 6: p. 15966.

Liu H-C, He Z-Y, Mele CA, Veeck LL, Davis ORosenwaks Z, Human endometrial stromal cells improve embryo quality by enhancing the expression of insulin-like growth factors and their receptors in cocultured human preimplantation embryos, in Fertility and sterility, 1999; 71: p. 361-367.

Lock JG, Hammond LA, Houghton F, Gleeson PASTow JL, E-Cadherin Transport from the trans-Golgi Network in Tubulovesicular Carriers is Selectively Regulated by Golgin-97, in Traffic, 2005; 6: p. 1142-1156.

Maeda M, Tani S, Sano AFujioka K, Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs, in Journal of controlled release, 1999; 62: p. 313-324.

Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane JJiang WG, Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective, 2013.

Meng C-X, Andersson KL, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson KLalitkumar PL, Effect of levonorgestrel and mifepristone on endometrial receptivity markers in a three-dimensional human endometrial cell culture model, in Fertility and sterility, 2009; 91: p. 256-264.

Minas V, Loutradis DMakrigiannakis A, Factors controlling blastocyst implantation, in Reproductive biomedicine online, 2005; 10: p. 205-216.

Moreira S, Silva NB, Almeida-Lima J, Rocha HA, Medeiros SR, Alves C, Jr. Gama FM, BC nanofibres: *In Vitro* study of genotoxicity and cell proliferation, in *Toxicol Lett*, 2009; 189: p. 235-41.

Morton H, Rolfe BE, Cavanagh AC, Early pregnancy factor, in *Seminars in reproductive endocrinology*, 1992; Copyright© 1992 by Thieme Medical Publishers, Inc. 10: p. 72-82.

Naritomi T, Kouda T, Yano H, Yoshinaga F, Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture, in *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998; 85: p. 89-95.

Obermair A, Obruca A, Pöhl M, Kaider A, Vales A, Leodolter S, Wojta J, Feichtinger W, Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility, in *Fertility and sterility*, 1999; 72: p. 269-275.

Ovalle WK, Nahirney PC, *Netter's essential histology*, 2013; Elsevier Health Sciences.

Parr EP, Parr M, Epithelial cell death during rodent embryo implantation, in *Blastocyst Implantation*. Boston: Serono Symposia USA Adams Publishing Group, 1989; 105-115.

Parveen Z, Tongson-Ignacio JE, Fraser CR, Killeen JL, Thompson KS, Placental mesenchymal dysplasia, in *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2007; 131: p. 131-137.

Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta SM, *Handbook of industrial mixing: science and practice*, 2004; John Wiley & Sons.

Pégliou F, Etienne-Manneville S, N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors, in *Cell adhesion & migration*, 2012; 6: p. 327-332.

Pérez-Sala D, Oeste CL, Martínez AE, Carrasco MJ, Garzón B, Vimentin filament organization and stress sensing depend on its single cysteine residue and zinc binding, in *Nature communications*, 2015; 6: p. 7287.

Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ, Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells, in *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992; 89: p. 9064-9068.

Pham QP, Sharma UM, Kosik AG, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review, in *Tissue engineering*, 2006; 12: p. 1197-1211.

Phillips GO, Williams PA, *Handbook of hydrocolloids*, 2009; Elsevier.

Pielarski KN, van Stegen B, Andreyeva A, Nieweg K, Jüngling K, Redies CG, Gottmann K, Asymmetric N-cadherin expression results in synapse dysfunction, synapse elimination, and axon retraction in cultured mouse neurons, in *PLoS One*, 2013; 8: p. e54105.

Pierro E, Minici F, Alesiani O, Miceli F, Proto C, Screpanti I, Mancuso SL, Lanzzone A, Stromal-Epithelial Interactions Modulate Estrogen Responsiveness in Normal Human Endometrium 1, in *Biology of reproduction*, 2001; 64: p. 831-838.

Poli M, Ori A, Child T, Jaroudi S, Spath K, Beck MWells D, Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation, in *EMBO Mol Med*, 2015; 7: p. 1465-79.

Psychoyos A, Hormonal control of uterine receptivity for nidation, in *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 1976; 17.

Punyadeera C, Verboost PGroothuis P, Oestrogen and progestin responses in human endometrium, in *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2003; 84: p. 393-410.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster MFisher SJ, Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface, in *Journal of Clinical Investigation*, 2004; 114: p. 744.

Reister F, Frank H-G, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath WHuppertz B, Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women, in *Laboratory investigation*, 2001; 81: p. 1143-1152.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JTHorwitz AR, Cell migration: integrating signals from front to back, in *Science*, 2003; 302: p. 1704-1709.

Ross MHPawlina W, *Histology*, 2006; Lippincott Williams & Wilkins.

Schmidt SFriedl P, Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms, in *Cell and tissue research*, 2010; 339: p. 83.

Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, Recher G, Hupalowska A, Bolton V, Fogarty NM, Campbell A, Devito LGIllic D, Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues, 2016; Nature Publishing Group.

Shashikanth N, Petrova YI, Park S, Chekan J, Maiden S, Spano M, Ha T, Gumbiner BMLeckband DE, Allosteric regulation of E-cadherin adhesion, in *Journal of Biological Chemistry*, 2015; 290: p. 21749-21761.

Simón C, Moreno C, Remohí JPellicer A, Cytokines and embryo implantation, in *Journal of reproductive immunology*, 1998; 39: p. 117-131.

Standring S, *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*, 2015; Elsevier Health Sciences.

Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg MGatenholm P, Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, in *Biomaterials*, 2005; 26: p. 419-31.

Talbi S, Hamilton A, Vo K, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat C, Kempson RLessey B, Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women, in *Endocrinology*, 2006; 147: p. 1097-1121.

Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai SPolak JM, Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone, in *Journal of cellular biochemistry*, 2004; 93: p. 454-462.

Teixeira S, Yang L, Dijkstra P, Ferraz MMonteiro F, Heparinized hydroxyapatite/collagen three-dimensional scaffolds for tissue engineering, in Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2010; 21: p. 2385-2392.

Teng YH-F, Aquino RSPark PW, Molecular functions of syndecan-1 in disease, in Matrix biology, 2012; 31: p. 3-16.

Tibbitt MWAnseth KS, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, in Biotechnology and bioengineering, 2009; 103: p. 655-663.

Timmins NE, Scherberich A, Früh J-A, Heberer M, Martin IJakob M, Three-dimensional cell culture and tissue engineering in a T-CUP (tissue culture under perfusion), in Tissue engineering, 2007; 13: p. 2021-2028.

Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD Organization WH, Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction: Report of a Meeting on " Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction" Held at WHO Headquarters in Geneva, Switzerland, 17-21 September 2001, 2002.

Vunjak-Novakovic GFreshney RI, Culture of cells for tissue engineering, 2006; John Wiley & Sons. 7: p.

Wallach EEVlahos NF, Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management, in Obstetrics & Gynecology, 2004; 104: p. 393-406.

Wang H, Pilla F, Anderson S, Martinez-Escribano S, Herrero I, Moreno-Moya JM, Musti S, Bocca S, Oehninger SHorcajadas JA, A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids, in Mol Hum Reprod, 2012; 18: p. 33-43.

Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French JGroup RHS, Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study, in Fertility and sterility, 2003; 79: p. 577-584.

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell C, Briand P, Damsky CBissell MJ, Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies, in The Journal of cell biology, 1997; 137: p. 231-245.

Wilcox AJ, Baird DDWeinberg CR, Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy, in New England Journal of Medicine, 1999; 340: p. 1796-1799.

Yannas IV, Tzeranis DS, Harley BASo PT, Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization, in Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2010; 368: p. 2123-39.

Yoo SJ, Kim J, Lee C-SNam Y, Simple and novel three dimensional neuronal cell culture using a micro mesh scaffold, in Experimental neurobiology, 2011; 20: p. 110-115.

Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M Kalluri R, Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition, in Journal of the American Society of Nephrology, 2008; 19: p. 2282-2287.

Zeisberg M, Hanai J-i, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz FKalluri R, BMP-7 counteracts TGF-[beta] 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury, in Nature medicine, 2003; 9: p. 964.

Zeisberg MNeilson EG, Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, in The Journal of clinical investigation, 2009; 119: p. 1429-1437.

Zhang H, Dai S, Bi JLi K-K, Biomimetic three-dimensional microenvironment for controlling stem cell fate, in Interface Focus, 2011; rsfs20110035.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Remziye	Soyadı	KENDİRCİ
Doğum Yeri	ANTALYA	Doğum Tarihi	06.04.1992
Uyruğu	T.C	Tel	0533 6817873
E-mail	adakendirci@gmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı	2017
Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2014