

Büyüme faktörlerinin kordon kanı kök hücre içeriği üzerine etkisinin hücrelerde Rodamin123 birikimi ile belirlenmesi

Faruk SUZERGOZ^{1,2}, Ali Osman GÜROL¹, Serap ERDEM³

¹İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL.

²Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ŞANLIURFA,

³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Özet:

Amaç: Mitokondri zarında toplanan rodamin123 (Rd123), hücrede mitokondri sayısı veya aktivitesi hakkında bilgi vermekte ve kök hücreyi fonksiyonel açıdan tanımlamada bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Kök hücreler metabolik olarak inaktif veya uyku fazında olduklarından, bu hücrelerde Rd123 birikimi oldukça düşük düzeydedir. Çalışmamızda, büyüme faktörlerinin kordon kanı (KK) kök hücre içeriği üzerine etkisini araştırmak için, in vitro kültür periyodunda hücrelerin Rd123 alımını belirlemeyi amaçladık.

Gereç Ve Yöntem: Sağlıklı ve zamanında doğum yapan 15 gönüllüden KK örnekleri alındı. Mononükleer hücreler ayrıldıktan sonra interlökin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, stem cell faktör (SCF), flt3/flk2 ligand (FL) ve trombopoetin (TPO) ile 14 gün inkübe edildi. Kültür öncesi, kültürün 7. ve 14. günlerinde hücreler alınarak Rd123 alım düzeyleri flow sitometride analiz edildi.

Sonuçlar: Kök hücre üzerine etkili büyüme faktörleri ile yapılan kısa süreli kültürün 7. gününde, hücrelerin Rd123 alımında istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi ($p<0.05$). Kültür sürecinin 14. gününde alınan örneklerde ise hücrelerin Rd123 alımında kültür öncesi değerleri aşan artış gözlemlendi.

Tartışma: Kültürün 7. gününde hücrelerin Rd123 alımındaki düşüş, büyüme faktörlerinin etkisi ile KK' nin kök hücre içeriğindeki zenginleşmeye işaret olabilmektedir. Bu nedenle, IL-3, IL-6, IL-11, SCF, FL ve TPO gibi büyüme faktörleriyle kısa süreli kültürlerinin hemopoetik kök hücre çalışmaları öncesi yararlı olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca, AC133 ve Hoechst 33342 gibi kök hücre belirteçleri yönünden detaylı flow sitometrik analizlerin de yapılmasının yararlı olacağına inanmaktayız.

Anahtar kelimeler; Kordon kanı, kök hücre, Rodamin123, büyüme faktörleri

Summary:

Determining Effects Of The Growth Factors On Stem Cell Content Of Cord Blood By Rhodamine123 Uptake Of The Cells

Objective: Rhodamine 123 (Rh123) that accumulate in mitochondrial membran is given information about mitochondrium counts and their activities and it is used for identify for stem cells the methabolic aspects. Due to the stem cells are inactive or dormant, Rh123 accumulation is very low in these cells. In this study, we aimed to investigate the effects of growth factors on stem cell content of cord blood (CB) by determinig Rh123 uptake by these cells during in vitro culture period.

Materials Ve Methods: CB samples obtained from 15 healthy volunteers delivering in term. After separation, mononuclear cells incubated for 14 day presence of interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11 stem cell faktör (SCF), flt3/flk2 ligand (FL) ve trombopoetin (TPO). Cells from before, day 7 and day 14 of cultures were analysed for Rh123 uptake by flow cytometry.

Results: At day 7 of short term cultures initiated with growth factors known to be effective on stem cells, statistically significant ($p<0.05$) decrease were observed in Rh123 uptake by the cells. At day 14 of cultures, Rh123 uptake by these cells was higher levels than starting cells.

Conclusions: A decrease in Rh123 uptake by the cells at day 7 of culture may be evidence for an increase of stem cell content of CB samples under influence of the growth factors. For that reason, we can conclude that short-term cultures initiated by IL-3, IL-6, IL-11, SCF, FL ve TPO may be benefical before hematopoietic stem cell researches. Nevertheless, we believe some additional flow cytometric analyses for stem cell markers such as AC133 and Hoechst 33342 will be benefical.

Key words; Cord blood, stem cell, Rhodamin123, growth factors

Giriş

Kordon kanı (KK) kemik iliği naklinden, yapay organ üretimine kadar değişen birçok alanda kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Özellikle kemik iliğine alternatif olarak ilik nakillerinde başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmektedir [1-

2]. 1988' de Glukman ve ark.' nın [3] Fankoni anemili bir pediatrik hastaya yapmış olduğu ilik nakliyle dikkat çekmeye başlayan KK' na, günümüzde yeni doğan bebeklerin ya da aile fertlerinin gelecek sigortası olarak bakılmakta ve KK bankaları kurulmaktadır.

KK' kök hücreleri ile ilgili araştırmalar dünya çapında sürdürülmektedir. Günümüzde kök

hücre araştırmalarındaki temel amaç, kök hücreyi kesin olarak tanımlamada kullanılabilir hücre belirteçlerini bulabilmektir. Civin ve ark. (4) CD34 molekülünü ilk defa kök hücre belirteci olarak özellikle hemopoetik kök hücreler için tanımlamışlardır. Fakat yapılan araştırmalarda, daha ilkel yapılı kök hücrelerin olduğu ve bunların özellikle CD34 taşımayan hücrelerden oluştuğu bildirilmiştir (5-7). Zanjani ve ark. (8) CD34 ve yönlenmiş hücre belirteci (CD38, HLA-DR vb.) taşımayan hücrelerin daha ilkel yapılı olduğunu ve bu hücrelerin hem kendini yenileyebildiği hem de diğer hücrelere dönüşebildiğini göstermişlerdir.

Kök hücreyi tanımlayabilmek için flow sitometride hücre yüzey antijenlerinin belirlenmesinin yanı sıra, hücre sel fonksiyonların analizleri de önem taşımaktadır. Araştırmalarda, değişik kaynaklardan alınan ve aynı yüzey antijenini taşıyan hücrelerin farklı özellikler gösterebileceği ortaya konulmaktadır. Hao ve ark. (9) kemik iliği ve KK' ndan almış oldukları CD34+ CD38- hücrelerin önemli fonksiyonel farklılıklar gösterdiğini belirlemişlerdir.

Spangrude ve ark. (10) çalışmalarında Rd123 birikiminin hücrelerdeki mitokondri sayısını ve/veya aktivitesini yansıttığını göstermişlerdir. Daha ilkel kök hücrelerin muhtemelen metabolik olarak inaktif veya uyku halinde olduğunu ve bu hücrelerin Go/G1 fazında sessizce beklediklerini düşünen Leemhuis ve ark. (11) DNA spesifik bir boya olan Hoechst 33342 ile hücre siklusu aşamalarını, mitokondri zarında biriken Rd123 ile de hücrelerin metabolik aktivitesini inceleyerek, kemik iliği öncü hücrelerini belirlemeye çalışmışlardır.

Çalışmamızda, bir kök hücre belirteci olarak hücrelerin Rd123 birikim düzeylerindeki değişimlerden yararlanarak, büyüme faktörlerinin KK kök hücre içeriği üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç Ve Yöntem

Kordon kanı örnekleri

KK örnekleri sağlıklı ve zamanında normal doğum yapan 15 gönüllüden alındı. KK alınma işleminin öncesinde gönüllüye, "Hasta Bilgilendirme Formu" okunarak yapılacak işlemler hakkında bilgilendirildi. Bu işlemler İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Etik Kurul' u onayı ile gerçekleştirildi. KK örnekleri heparin içeren 10 ml steril tüplere

alındı. Örnekler alındıktan sonra en geç 4 saat içerisinde çalışılmaya başlandı.

Mononükleer hücrelerin ayrımı

Mononükleer hücreler dansite gradiyentine göre Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; d = 1077 g/ml) kullanılarak ayrıldı. İki defa yıkamadan sonra hücrelerin canlılık kontrolü Tripkan Mavis (Sigma) ile yapıldı. Tüm örneklerde hücrelerin canlılık oranı % 96' dan yüksek bulundu.

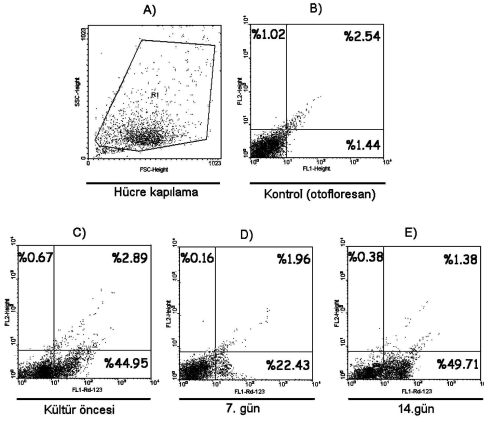
Süspansiyon kültürler

Mononükleer hücreler % 10 Föetal dana serumu içeren IMDM içerisinde 1x10⁶/ml hücre olacak şekilde seyreltildi. Hücre süspansiyonu 5 ml hacimde 25 cm²' lik kültür flasklarına aktarılarak üzerine her bir büyüme faktöründen 20 ng/mL olmak üzere interlökin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, stem cell faktör (SCF), flt3/flk2 ligand (FL) ve trombopoetin (Tpo) (büyüme faktörleri; Pepro Tech EC, Ltd. NJ. USA) eklendi. Kültür flaskları 37 oC' de % 5 CO₂' li nemli ortamda 14 gün inkübe edildi. Kültürün 7. gününde flaskların yarısı boşaltılarak, taze medyum ve büyüme faktörleri yukarıda belirtilen dozda yeniden eklendi.

Flow sitometride Rd123 analizi

Kültür öncesi, kültürün 7. ve 14. günlerinde alınan örneklerde hücrelerin Rd123 alımı incelendi. Flow sitometrik inceleme için hücre örneklerinden 0.5x10⁶ mL/hücre olacak şekilde 2 tüp hazırlandı. 1. tüp kontrol, 2. tüp test olarak işaretlendi. Test tüpüne 0.1 µg/mL Rd123 eklendikten sonra kontrol ve test tüpleri 37 oC' de 60 dak. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüplere 2,5 ml PBS eklenerek 1800 devirde 10 dak. santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak üzerine 0.5 ml PBS eklendi. Tüpler çalkalandıktan sonra flow sitometri cihazında (FACS Calibur, Becton-Dickinson Immunocytometry System, USA) analize alındı. Öncelikle cihazdan test tüpü geçirilerek, canlı hücrelerle ölü hücreler ve debrisin ayrılması için cihazın kalibrasyonu yapıldı. Bu işlem esnasında analiz için tercih edilen hücre grubu kapı içerisine alındı (Şekil 1A). Daha sonra hücrelerin göstereceği otofloresanın tespiti amacıyla cihazda FL1 ve FL2 histogramlarındaki floresan değerleri %1 ile 2 arasında bir değere ulaşıncaya kadar ayarlama yapıldı (Şekil 1B). Rd123 yeşil floresan verdiği için, test tüpleri cihazdan geçirilirken, FL1 histogramındaki % floresan değerleri okunarak kaydedildi (Şekil 1 C,D,E).

Şekil 1.



Şekil 1. Kordon kanı mononükleer hücrelerinin büyüme faktörleriyle kısa süreli kültür sürecinde Rd123 birikim düzeylerinin flow sitometri ile analizi.

(A) Flow sitometrik analizde dikkate alınacak hücrelerin R1 bölgesinde kapılanması. (B) Rh123 muamele edilmemiş hücrelerin gösterdiği floresan değerleri negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. Burada gözlenen floresan değerleri hücrelerin normalde gösterebileceği otofloresan değerlerinin sınırlarının belirlenmektedir. Rd123 yeşil floresan verdiğinden, FL1 bölgesindeki floresan miktarı dikkate alınmaktadır. Büyüme faktörleri ile kültür öncesi (C), kültürün 7. (D) ve 14. (E) günlerinde alınan kordon kanı örneklerinde hücrelerdeki Rd123 birikim düzeyleri.

İstatistiksel analizler:

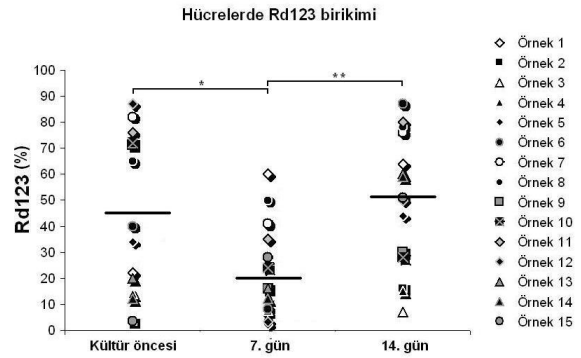
Elde edilen veriler ortalama ve standart hata ortalaması olarak belirtildi. İstatistiksel değerlendirmeler ANOVA testi ile yapıldı. $p < 0.05$ olduğunda farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

KK mononükleer hücrelerinin Rd123 boyasına karşı duyarlılığı üzerine büyüme faktörlerinin etkinliğinin belirlenmesi için yapılan kısa süreli süspansiyon kültürleri sonucunda, hücrelerin Rd123 boyasına karşı duyarlılığında önemli ölçüde farklılıkların meydana geldiği tespit edilmiştir. KK örneklerinin kültür öncesi Rd123 ile flow sitometrik analizlerinde, hücrelerde Rd123 düzeyleri ortalama $44,95 \pm 8,00$ olarak bulundu. Büyüme faktörleriyle sürdürülen kültürlerin 7. gününde alınan örneklerde, Rd123 düzeyleri ortalama $22,43 \pm 4,61$ olarak bulundu ve hücrelerde Rd123 birikimindeki düşüşün ANOVA testinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu

gözlemlendi ($p < 0.05$). Kültürün 7. gününde yarı medyum değişimi ve büyüme faktörlerinin yeniden eklenmesinin ardından sürdürülen kültürlerin 14. gününde alınan örneklerde hücrelerde Rd123 birikimi ortalama $49,71 \pm 6,60$ düzeyinde bulundu. Kültürün 7. gününde oranla 14. gününde alınan örneklerde Rd123 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) bir yükselmenin olduğu gözlenmiştir (Şekil 2).

Şekil 2.



Şekil 2. Kordon kanı mononükleer hücrelerinin büyüme faktörleriyle kültür sürecinde Rodamin123 birikim düzeylerindeki değişim. Kültür öncesi ve büyüme faktörleri ile sürdürülen kültürün 7. ve 14. günlerinde alınan kordon kanı örneklerinin 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Rd123 ile 37 oC' de 60 dak. inkübasyonu sonunda hücrelerde Rd123 birikim düzeyleri. Ortalamalar (—) ile göstermektedir. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Tartışma

KK, başta kemik iliği nakli olmak üzere birçok alanda kullanılmaya elverişli bir kök hücre kaynağıdır (12-14). Bu kaynaktan optimum düzeyde yaralanabilmek için, kök hücre içeriğini iyi tanımlamaya ve bu hücreleri ayırt edebilmeye ihtiyaç vardır. Günümüzde kök hücreyi kesin olarak belirleyebilecek herhangi bir belirteç bulunabilmiş değildir. Bazı yaklaşımlar kök hücreyi tanımlamaya katkıda bulunmakta ve onları saf olarak elde edebilmeyi kapılarını aralamaktadır. Günümüzde genel kanı olarak kök hücre, fonksiyonları minimuma inmiş, küçük boyutta ve metabolik olarak inaktif olarak düşünülmektedir (15-17). Dunvald ve ark. (18) en küçük ve en az granüler yapıya sahip olan, AC133 pozitif ve Hoechst 33342 boyası ile

boyanan fare epidermal hücrelerini saf olarak izole ettikten sonra, Liang ve ark. (19) bu hücreleri fare embriyosuna transfer etmişler ve bu hücrelerin bütün hücre tiplerine dönüşerek bütün dokuların yapılarına katıldıklarını göstermişlerdir. Leemhuis ve ark. (11) KK üzerinde yaptıkları çalışmada, Hoechst 33342 ile boyanan hücrelerin, mitokondri zarında biriken ve metabolik aktiviteyi gösteren Rd123' e karşı negatif olduğu ve bu boyanın hücrenin dışına pompalandığını gözlemlemişlerdir.

Cicutini ve ark. (20) CD34+ hücreleri Rd123 ile boyanma düzeyine göre KK hücrelerini CD34+ Rd123(güçlü) ve CD34+ Rd123(zayıf) olarak ayırdıktan sonra koloni kültürleri yaptıklarında, Rd123 ile güçlü boyanan gruptaki hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin daha güçlü olduğunu fakat süspanسیون kültürlerinde ise, Rd123 zayıf boyanan gruptaki hücrelerin 37.5 kat daha fazla çoğalabildiklerini göstermiştir. Bu çalışma ile, kendini yenileme kapasitesi yüksek olan primitif kök hücrelerin RD123 zayıf boyanan hücreler arasında olduğu ortaya konulmaktadır. Burada, CD34+ Rd123(güçlü) hücrelerin çoğu yeni hücreleri oluşturmak için farklılaşırken, CD34+ Rd123(zayıf) hücreler hem kendilerini yenilemiş hem de olgun hücrelere dönüşme yeteneği sergilemiştir. Çalışmamızda, kültürün 7. gününde alınan örneklerin flow sitometrik analizinde, hem Rd123 ile floresan veren hücrelerin sayısında hem de hücrelerin verdiği floresan miktarında anlamlı bir azalma gözlenmektedir (Şekil 1). Kültürde büyüme faktörlerinin uyarımları ile primitif kök hücre fraksiyonunda hızlı bir kendini yenilemenin ve bunun sonucu bu hücrelerin sayısında artış olduğundan sözü edilebilir.

Kültürün 2. haftasında hücrelerde Rd123 birikimindeki artış, progenitör hücrelere hızlı bir yönelmenin olduğunun göstergesidir. Kültür ortamına katılan büyüme faktörlerinin kısa sürede KK kök hücrelerinde kendini yenileme kapasitesini artırırken, bir taraftanda hücrelerde progenitör hücrelere yönelmeyi teşvik ettiği düşünülmektedir. Projenitör hücrelere dönüşüm ile birlikte hücrelerin aktiviteleri artmakta ve sonuçta mitokondri sayısında ve dolayısıyla RD123 birikiminde artış meydana gelmektedir. Bu nedenle Kök hücre içeriğinin artırılmasına yönelik çalışmalarda kültür süresinin kısa tutulması gerektiğini inanmaktayız.

KK, bireyler arasında oldukça farklılıklar gösterebilmektedir. 1., 2. ve 15. örneklerde (Şekil 2) Rd123' karşı duyarlılık, diğer örneklerden farklı olarak, kültür öncesinde daha düşük bulunmuştur. Bu örnekler, diğer örneklerde kültür sürecinin 7 gününden sonra gözlenen davranışı, kültürün ilk haftasında göstermişlerdir. Fritsch ve ark. (21) benzer olarak CD34+ hücre sayısının, KK örnekleri arasında büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Buda, KK' nın diğer kök hücre kaynaklarına oranla daha geniş çapta bireysel farklılıklara sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, kısa süreli kültürlerde kullandığımız büyüme faktörlerinin, hücrelerde Rd123 birikiminde düşüşe ve dolayısıyla KK kök hücre içeriğinde zenginleşmeye neden olduğunu söyleyebiliriz. Özellikle hematopoetik kök hücre çalışmalarında, içeriğin kök hücre yönünden zenginleştirilmesi amacıyla IL-3, IL-6, IL-11, SCF, FL ve TPO gibi sitokinler kısa süreli kültürler denenebilir. Ayrıca, kök hücre çalışmalarında, AC133 ve Hoechst 33342 gibi kök hücre belirteçleri ile birlikte hücrelerde Rd123 birikiminin de edilmesinin, kök hücre içeriğinin belirlenmesine yardımcı bir parametre olabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. Springer Semin Immunopathol 2004; 26:143-54.
2. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor haematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? Blood 2003; 101:4233-44.
3. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321:1174-8.
4. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. J Immunol. 1984; 133:157-65.
5. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-

repopulating activity. *Nat Med.* 1998; 4:1038-45.

6. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996; 273:242-5.

7. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med.* 1997; 3:1337-45.

8. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol.* 1998; 26:353-60.

9. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood.* 1995; 86:3745-53.

10. Spangrude GJ, Johnson GR. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87:7433-7.

11. Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, et al. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol.* 1996; 24:1215-24.

12. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321:1174-8.

13. Gluckman E, Rocha V Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 26:143-54.

14. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor haematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003; 101:4233-44.

15. Orlic D, Fischer R, Nishikawa S, Nienhuis AW, Bodine DM. Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. *Blood.* 1993; 82:762-70.

16. Sogo S, Inaba M, Ogata H, et al. Induction of c-kit molecules on human

CD34+/c-kit < low cells: evidence for CD34+/c-kit < low cells as primitive hematopoietic stem cells. *Stem Cells.* 1997; 15:420-9.

17. de Wynter EA, Buck D, Hart C, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells.* 1998; 16:387-96.

18. Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, Fishbaugh J, Bickenbach JR. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol.* 2001; 10:45-54

19. Liang L, Bickenbach JR. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells.* 2002; 20:21-31.

20. Cicuttini FM, Welch KL, Boyd AW. The effect of cytokines on CD34+ Rh-123high and low progenitor cells from human umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 1994; 22:1244-51.

21. Fritsch G, Stimpfl M, Buchinger P, et al. Does cord blood contain enough progenitor cells for transplantation? *J Hematother.* 1994; 3:291-8.

Yazışma Adresi;

Dr. Faruk Suzergoz (PhD)

Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Osmanbey Kampüsü, 63300,
ŞANLIURFA

Tel :04143440020-1232

GSM :05335146132

Faks :04143440051

E-mail: suzergoz@harran.edu.tr