

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Sağlık
Proje No : 10B0216001
Proje Yöneticisi : Prof. Dr. A. Rüçhan AKAR
Proje Konusu : Sağlık

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

Proje herhangi bir dergide yayınlandıktan sonra e-kütüphanede yayınlanabilir.

06.03.2014

Prof. Dr. A. Rüçhan AKAR

1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

**Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Anjiyojenik Etkilerini Etkilerinin
Akut Bacak İskemisinde Araştırılması**

Yürütücü

Prof. Dr. A. Rüçhan AKAR

Yardımcı Araştırmacılar

Prof. Dr. Alp CAN

Prof. Dr. Murat ELÇİN

Doç. Dr. M. Serkan Durdu

Doktora Öğrencisi Mohammad Reza DASTOURİ

Dr. Deniz BALCI

Proje Numarası

10B0216001

Başlama Tarihi

26.11.2010

Bitiş Tarihi

26.11.2014

Rapor Tarihi

06.03.2014

RAPOR FORMATI

Bilgisayarda 12 punto büyüklüğünde karakterler ile, tercihan "Times New Roman" stili kullanılarak yazılacak ve aşağıdaki kesimlerden (alt kesimler de dahildir) oluşacaktır.

Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Amaç ve Kapsam

Materyal ve Yöntem

Analiz ve Bulgular

Sonuç ve Öneriler

Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkıları

Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Kaynaklar

Ekler

- a. Mali Bilanço ve Açıklamaları
- b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar
- c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsın Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)
- d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**
- e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslararası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

1946

1.Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Anjiyojenik Etkilerinin Akut Bacak İskemisinde Araştırılması

Endotelial öncül hücreler, kemik iliğinden köken alarak kana geçen ve yüksek derecede farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler anjiyogenezde, tümör büyümesinde rol oynamaktadır. Çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonların etkisi ile harekete geçerek, yerleştiği bölgelerde kan damarı oluşumunu sağlarlar. Bu hücrelerin hasar görmüş dokuların onarımında rol oynadıkları bilinmektedir. Endotelial progenitör hücreler miyokard infarktüs gibi kalp ve damar hastalıkları sonrasında harekete geçerek, kalp krizinden zarar gören kan damarlarının onarımını sağlarlar. Bu hücreler anjiyogenezis ve vaskülogenez de büyük bir rol oynamaktadırlar. Endotelial progenitör hücreleri farklı kaynaklardan elde edilmesi ve bu hücreleri rejeneratif tıp alanında kullanması birçok bilim insanının ilgisini çekmiştir. Embriyonik kök hücrelerden endotelial progenitör hücre elde etmek son yılların önemli projelerinde yer almıştır. 2006 yılında Yamanaka ve arkadaşları tarafından bilim dünyasına sunulan uyarılmış pluripotent kök hücreler, rejeneratif tıp ve kök hücre biyolojisinde yeni bakış açısı yaratmıştır. Bu hücreler avantajlarından dolayı birçok araştırmacı tarafından farklı amaçlarla araştırılmıştır.

Tamamlanan bu projede, son dönemde geliştirilen *uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler* kullanılarak ilk aşamada, Flk1⁺ öncül hücreler elde edildi. İzole edilen hücreler iki farklı hücre gurubuna yani endotelial öncül hücrelere (CD31⁺, AC133⁺) ve düz kas hücrelerine (α SMA⁺) farklılaştırıldı. Bu projede damar oluşumunda (anjiogenezis ve revaskülarizasyon) önemli rol oynayan iki hücre grubu in vitro koşullarda üretildi ve bu hücrelerin endotelial ve düz kas hücrelerine dönüştükleri günümüzün gelişmiş teknolojik metotlarıyla (immün boyama, qRT-PCR ve MACS) karakterize edildi.

ANAHTAR SÖZCÜKLER Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPK), endotelial öncül hücreler (EÖH), kritik bacak iskemisi

Investigation Of Angiogenic Effects Of Induced Pluripotent Stem Cells In Acute Hindlimb Ischemia

Endothelial progenitor cells (EPC) are bone marrow-derived stem cells that circulate in the blood with high differentiation potential. These cells are important in tumor growth and angiogenesis. Various cytokines, growth factors, and hormones cause hematopoietic cells, and by association endothelial progenitor cells, to be mobilized into the peripheral circulation, ultimately homing to regions of blood vessel formation. These cells are known to play a role in the repair of damaged tissues. After cardiovascular diseases such as myocardial infarction, endothelial progenitor cells mobilized and provide to repair of damaged blood vessels. These cells play a key role in angiogenesis and vasculogenesis. Obtained endothelial progenitor cells from different sources and use in filed regenerative medicine studied by many scientists. To achieve endothelial progenitor cells from embryonic stem cells has been involved in major projects in recent years. In 2006 Yamanaka and colleagues presented induced pluripotent stem cells (iPSc) to the scientific world and has created a new perspective in regenerative medicine and stem cell biology. Some advantages of these cells encouraged many scientists to use of these cells in their researches.

In this study, in the first stage we differentiated iPS cells to Flk-1⁺ progenitor cells. In the next stage we were able to differentiate Flk-1⁺ cells to two different cell types (CD31⁺, AC133⁺ endothelial progenitor cells and α SMA⁺ smooth muscle cells) successfully. We concluded that optimal time for harvesting Flk-1⁺ cells on by MACS was is day 5 of initial differentiation. Following isolation of Flk-1⁺ progenitor cells they were further matured into CD31⁺/CD133⁺ cells within 2-3 days of induction. We characterized two different cell types that have important role in angiogenesis and revascularization with high technology methods and validation with immunostaining, qRT-PCR and MACS methods. In conclusion, we showed that early EPC cells could be successfully derived from mouse fibroblast-driven iPS cells. We suggest that those iPS cell-derived EPC cells may be used in the treatment of heart failure, ischemic heart disease, and critical limb ischemia by remodeling the blood vessels and could be considered for an in vivo model for the translational research.

Key words: Induced pluripotent stem cells (iPSc), endothelial progenitor cells (EPCc), acute hindlimb ischemia

2.AMAÇ VE KAPSAM

2.1. AMAÇ

Endotelyal öncül hücreler (EÖH) son zamanlarda yenileyici tıpta özellikle periferik damar hastalıklarında kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu hücrelerin kaynağı kemik iliği veya periferik kandır. Günümüzdeki teknoloji ile *bu hücreler hastanın kendi kemik iliğinden veya kanından istenilen terapötik düzeylerde elde edilememektedir. Projenin bu adımı, uPKH hattından kritik bacak iskemi modelinde kullanmak üzere in vitro koşullarda endotelyal öncül hücreler (EÖH) ve düz kas hücrelerin üretilmesi amaçlanmıştır.*

2.2. KAPSAM

2.2.1. Giriş

1981 yılında Martin Evans ve Matthew Kaufman ve ark. tarafından sıçan embriyonik kök hücrelerinin ilk defa izole edilmesi bilim dünyasında çok büyük ilgi görmüştü. [1,2] Bundan 18 yıl sonra Thomson, insan blastosist embriyolarından, insan embriyonik kök hücreleri izole etmiş ve bu hücreleri kültüre almıştır. Bu gelişmelerin ışığında, araştırmacılar kök hücreleri birçok hastalıkta tedavi amacıyla kullanmayı tasarlamış ve kök hücre araştırmalarına büyük umutlar bağlamışlardır. [3] Sahip oldukları plastisite ve limitsiz olarak kendilerini yenileyebilme özelliklerinden dolayı, embriyonik kök hücreler yenileyici tıp uygulamalarında ve doku replasman çalışmalarında büyük önem kazanmıştır. Tüm bu olumlu özelliklerine rağmen *insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımını kısıtlayan iki önemli problem bulunmaktadır. Etik Problemler:* Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu sırasında insan embriyolarının yok edilmesi. **İmmün Rejeksiyon:** Kanağa aktarılan greftin konak savunması tarafından tanınması ve yabancı olarak algılanıp savunma hücrelerinin saldırısına uğraması. Embriyonik kök hücrelerin klinikteki uygulamaları arasında;

- 1- Kardiyovasküler hastalıklar
- 2- Genetik hastalıklar
- 3- Diyabet
- 4- Parkinson
- 5- Körlük
- 6- Dejeneratif retinal hastalıklar

7- Spinal kord hasarları gibi hastalıklar başta gelmektedir.

İnsan embriyonik kök hücrelerinin klinikte kullanılmasını kısıtlayan bu tür problemlerin bulunması, araştırmacıları farklı hücre tipleri ile çalışmaya ve kök hücre üretiminde farklı geliştirmeye yönlendirmiştir. Şimdiye kadar kök hücre üretiminde kullanılan şöyle sıralanabilir;

- 1- Hücre füzyonu
- 2- Yeniden programlama
- 3- Somatik hücre nükleer transferi
- 4- Direk yeniden programlama

2.2.2.Arteriyel damar hastalıkları

Kalp ve beyin dışındaki damarlar periferik damarlar olarak adlandırılmakla birlikte periferik arter hastalığı dendiğinde sıklıkla bacaklardaki atardamar hastalığı anlaşılır. Bu damarlarda kanın geçişini engelleyecek daralma veya tıkanma durumunda periferik arter hastalığından bahsedilir. Bacak atardamar hastalarına beyin ve koroner arter hastalığı sıklıkla eşlik ettiğinden bu hastalarda kalp krizi ve felç riski normal popülasyona göre daha fazladır.

2.2.3.Kritik bacak iskemisi

Kritik bacak iskemisi (KBİ), Periferik Arteriyel Oklusif Hastalık (PAOH) gibi terimler altında da incelenebilen klinik tablo; multidisipliner yaklaşım gerektiren bir periferik arter hastalığıdır. Etkilenen bölge genellikle bacaklardır. PAOH ve Periferik Arter Hastalığı, ekstremitte arterlerinde stenoz (daralma) veya oklüzyon (tıkanma) nedeni ile meydana gelen, genellikle ateroskleroz kökenli hastalığı ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Hastaların yaklaşık %95'in de etiyolojik faktör aterosklerozdur. Diğer önemli nedenler; tomboemboli, tromboanjitis obliterans (Buerger hastalığı), adventisyal kist hastalığı, arterit ve bası yapan tümörlerdir. PAOH ve özellikle KBİ epidemiyolojisine yönelik çok az veri vardır. 40–60 yaş arası erkeklerde PAOH prevalansı %5 olarak bildirilmiştir. Sıklığın 55 yaş üstü erkeklerde %11 gibi yüksek oranlarda bildirildiği epidemiyolojik araştırmalar da vardır (İskandinavya-1989). Aynı araştırmada 70 yaş üstü erkeklerde görülme sıklığı %20 olarak bulunmuştur. Hastaların %40–50'sinde tabloya eşlik eden hafif ya da şiddetli koroner arter hastalığı %15–20 sinde arteria karotis hastalıkları bulunur. Bu patolojilerin tedavi edilmesinde geleneksel ilaç ve cerrahi uygulamalara ilaveten kök hücre temelli yaklaşımlar da uygulanmaya çalışılmıştır. Özellikle periferik damar hastalıklarının tedavisinde farklı özellikte kök hücrelerin kullanılması gündeme gelmiştir. Bu hücrelerden aşağıda bahsedilmiştir.

2.2.4. Endotelial Öncül Hücreler (EÖH)

Günümüzde kardiyovasküler hastalıkların tedavi yöntemlerini artırmada ve gelişimlerini önlemede önemli bir şans olarak görülmektedir. Yaşamın postnatal döneminde de var olan mononükleer hücrelerdir. Erişkin sağlıklı vasküler sisteminde endotel hücrelerin bölünme hızları göreceli olarak düşüktür ($t_{1/2} \sim 3$ yıl) . Normal koşullarda dolaşımda bulunan dolaşımda bulunan tüm hücrelerin $\sim \%0,01$ 'i kadardır. Sağlıklı bir erişkinde belirli oranlarda endotel hücre bütünlüğünün restorasyonuna katkıda bulunabilmektedirler. Kemik iliğinin vasküler bölgesinde depolanırlar ve sabit bir hızda dolaşıma katılırlar. Dolaşıma katılmalarını körükleyen birçok patolojik ve fizyolojik olay mevcuttur. Bu olaylar içinde dolaşıma katılmalarını arttıran en önemli sebep doku iskemisi ve hasarıdır.

İskemi modelleri yaratılan sıçanlarda (arka bacak iskemisi, miyokardiyal iskemisi) transplantasyonu sonrasında transplante edilen olgun endotel hücrelere dönüşerek iskemik bölgelerinde neovaskülarizasyonu anlamlı derecede artırdığı gözlenmiştir [22].

3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri yani statinler, insanlardaki kolesterol düzeyini düşürmek için kullanılan ilaçlardır. Statinlerin aynı zamanda vasküler hastalık riskini önledikleri de düşünülmektedir. Statinlerin bunu, kemik iliğinden mobilize ederek gerçekleştirdikleri tahmin edilmektedir. Ancak insanlarda uzun süre statin kullanımının etkileri ile ilgili pek fazla bilgi yoktur. Buradan yola çıkarak Davani ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada, uzun süreli statin kullanan bireylerde belirlenmesini ve karakterize edilip edilemeyeceğini araştırmışlardır. Statin kullanan ve kullanmayan bireylerden elde edilen tüm mononükleer hücreler akım sitometresi yardımıyla ayrılmış ve bu hücreler özel koşullarda kültüre alınmıştır. Sonuçlar, statin kullanan grupta dolaşımdaki CD34⁺ ve CD34⁺/CD144⁺ öncül hücrelerin statin kullanmayan gruba göre çok daha fazla olduğunu göstermiştir. Tüm bu sonuçlar, uzun süreli statin tedavisinin dolaşımdaki CD34⁺/CD144⁺ fenotipteki sayısını artırdığını göstermektedir [5].

2.2.5. Uyarılmış Pluripotent (uPK) hücreler

2006 yılında ilk defa Yamanaka ve ark. tarafından geliştirilen bir, sıçan fibroblast hücrelerinden pluripotent hücreler elde edildi. Bu çalışmada belirli genlerin viral transfeksiyonla aktarılmasıyla, fibroblast somatik hücrelere embriyonik kök hücrelere benzer özellikler kazandırıldı. OCT4, SOX2, Klf4 ve c-Myc genlerinin aktarımıyla pluripotent özelliği kazanan bu hücrelere uPK (induced pluripotent stem) hücreleri adı verildi [4].

uPK hücreler, pluripotent olmayan hücrelerden, çoğunlukla da somatik hücrelerden, belirli genlerin ifade edilmesiyle geri yönde farklılaştırılarak üretilmektedir. Geri yönde farklılaşan somatik hücreler pluripotent özelliği kazanmaktadır. uPK genellikle pluripotent olmayan hücrelere, kök hücre ile ilgili

olan genlerin transfeksiyon yoluyla aktarımı ile oluşturulmaktadır. Genellikle bu transfeksiyon viral vektörlerle (retrovirüs gibi) gerçekleşmektedir [4].

2007 yılında insan somatik hücrelerinden de bu hücreler üretildi. İnsan somatik hücrelerinden uPK üretimi yönteminde Oct-3/4, SOX2, c-Myc, ve Klf4 genlerinin aktarımı ve ifadesiyle uPK elde edilmiştir. Zamanla bu hücrelerin farklı hastalıklarda kullanılması büyük bir önem kazanmıştır [6].

uPK, belirli genlerin ekspresyonu, proteinler, kromatin metilasyon paterni, embriyoid, teratoma yaşayabilir kimera gibi yönlerden embriyonik kök hücrelere benzerlik göstermektedir. Ancak bu hücrelerin pluripotent kök hücrelerle ilişkisi tam olarak açıklanmamıştır.

uPK hücrelerin geliştirilmesi bilim dünyasında büyük bir heyecan yaratmıştır. Bunun en önemli sebebi **embriyonik kök hücrelerin kullanımını sınırlayan iki temel problemin ortadan kalkmış olmasıdır**. uPK hücreler kök hücre araştırmalarına büyük avantajlar getirmiştir. Bunlar:

1. İnsan embriyosundan köken almaması ve böylelikle etik problemlerin çözülmesi sonucunda bu hücrelerin pek çok araştırmada rahatça kullanılmasının sağlanmış olması,
2. Hastanın kendi hücresinden uPK hücre hattı üretimi mümkün olması ve bu nedenle immünorejeksiyon problemi ortadan kalkması ile her hastaya kendine özgü uPK üretilmesi mümkün hale gelmiş olmasıdır.

2.2.6. uPK Hücrelerin Klinikte Kullanımı

2010 yılında Hollanda'da yapılan bir çalışmada önce 2 sağlıklı ve bir herediter hemorajik telenjektasia (HHT) hastası olan bireylerden uPK hücre hattı üretilmiş bu hücrelerin embriyonik kök hücreleri gibi belirli eksprese ettikleri tespit edilmiştir. In vitro koşullarda bu uPK hücrelerden embriyonik süreçte 3 tabakalı yapı oluşturulmuştur. Ayrıca bu hücrelerden yine in vitro koşullarda kardiyomiyositler ve vasküler hücreler oluşturmuşlardır. Bu araştırmada kullanılan tekniğin bu hastalıklarla çalışabilme potansiyelinin yüksek olduğu açıklanmıştır [16].

2009 yılında Zhang ve ark. yaptığı bir çalışmada, önce *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* ve *Lin28* genlerinin aktarımıyla uPK hücre elde etmişler ve bu hücrelerin fonksiyonunu ES hücreleriyle karşılaştırmışlar. Bir sonraki aşamada her iki hücreden kardiyomiyosit elde ettikten sonra RT-PCR yardımıyla her iki hücrede aynı kardiyak ifade paterni gözlemişlerdir. Pluripotenside rol alan *OCT4* ve *NANOG*'un kardiyak farklılaşma sırasında ekspresyonları azalmaktadır. Ancak uPK hücrelerinde transgenik rezidülerin ekspresyonu nedeniyle bu azalma engellenmektedir. 5-bromo deoksiuridinle işaretlenmiş olan uPKH ve embriyonik kök hücrelerinden elde edilmiş kardiyomiyositlerin proliferasyonunun

aynı olduğu gösterilmiştir. Elektrofizyolojik çalışmalar, uPK hücrelerin embriyonik kök hücreleri gibi nodal, arterial ve ventriküler fenotiplere farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Sonuçta bu araştırmada uPK hücrelerin fonksiyonel kardiyomiyosit hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca bu uPK hücrelerinin otolog hücre kaynağı olarak, kardiyak onarımda ve kardiyovasküler araştırmalarda da kullanılabilirler gösterilmiştir [17].

2008 yılında Narazaki ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan uPK hücreleri in vitro koşullarda kardiyovasküler hücrelere diferansiyasyon edilmişlerdir. Bu çalışmada iki grupta embriyonik kök hücreler ve uPK hücreler karşılaştırılarak incelenmiştir. İlk aşamada Flk-1⁺ olan hücreler elde edilmiş ve bu hücreler sonra endotelial ve mural hücreler elde edilmiştir. Bir sonraki aşamada arterial, venöz ve lenfatik endotelial hücrelerin diferansiyasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Belirli koşullarda OP9 stroma hücreleri Flk-1⁺ hücrelerle kültüre edildiğinde kardiyomiyositler elde edilmiştir. Tüm aşamalarda yüzeysel kullanılmış ve RT-PCR ile. Sonuç olarak uPKH ve ES hücrelerin kardiyovasküler hücrelere diferansiyasyon açısından farklılık göstermediği tespit edilmiştir [18].

Waltenberg ve ark. tarafından 2002 yılında yapılan bir araştırmada, mononükleer hücreler insan umbilikal kord kanından CD34 yüzey belirteçlerine göre yoğunluk gradient santrifugasyon tekniği ile izole edilmiştir. İzole edilen hücreler, 9 gün süresince kültüre edilmiştir. Kültürde flasklara ve olmayan CD34⁺ hücreler ayrı ayrı 4 hafta süresince kültüre edilmişlerdir. Daha sonra bu hücrelerin yüzey belirteçleri immünofloresan boyama ve FACS yöntemiyle analiz edilmiştir. CD34 yüzey belirteçlerine göre seçilmeyen hücrelerde endotelial progenitor kök hücreye spesifik yüzey belirteçleri olan VEGF-R2 ve VE-kaderin ekspresyonu 6. güne kadar artmıştır. CD45 ve CD14 yüzey belirteçlerinin ekspresyonları zamanla azalmıştır. CD133 ve CD34 ekspresyonları artmıştır. CD34⁺-CD45⁻ (Culture dish adherent cell)'de VEGFR-2, CD133, CD34 ve vWF ekspresyonlarında artış olurken, CD14 de azalma olmuştur. CD45 ise değişmemiştir. Sonuç olarak, umbilikal kord kanından elde edilebileceği, CD34 yüzey belirteçlerine göre seçildiklerinde, hücrelerin kültür ortamında olgun endotelial hücre belirteçlerini ekspresyon ederek diferansiyasyon olabilecekleri gösterilmiştir [23].

Yamamoto ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada, kandan veya kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerde (EÖH) spesifik moleküllerin mRNA'larının ekspresyonu (Flk-1, Flt1, CD133 ve VE-Kaderin) qRT-PCR yardımıyla analiz edilmiştir. EÖH belirteçleri mRNA ekspresyon düzeyi, hastalarda normal bireylere oranla daha azdır. Ancak otolog kemik iliği implantasyonu yapıldığında, hasta kanında EÖH'lerin sayısı artmıştır. Buna ek olarak transplantasyon potansiyeline sahip olan kök hücre kaynakları, örneğin normal kemik iliği, kan, uyarıcı faktörlere maruz bırakılmış donör kanı ve umbilikal kord kanının ekspresyon paternleri

farklıdır. Sonuç olarak, obstrüktif arterial hastalığı olan bireylerde anjiyogenez potansiyeli azdır. Çünkü EÖH spesifik moleküllerin ekspresyonu kemik iliğinde ve kanda azalmıştır. Otolog kemik iliği mononükleer hücre transplantasyonu, sirkülasyonda olan EÖH'lerin hasta bireylerde çoğalmasını indükleyerek iskemi semptomlarının azalmasını sağlamaktadır [19].

2008 yılında Mauritz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, standart embrioid - temelli farklılaşma protokolüne göre, uPK hücrelerin embriyonik kök hücreler gibi 24 günde farklılaştığı belirlenmiştir. Farklılaşma sonucunda, kendiliğinden yapabilen uPK hücre embrioid gerçekleşmiştir. Moleküler, yapısal ve analizler sonucunda uPK hücrelerden üretilen kardiyomiyositlerin embriyonik kök hücrelerden üretilen kardiyomiyositlerle benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. RT-PCR analizleri sonucunda, kardiyomiyosit, kardiyak ve genlerin ekspresyonları tespit edilmiştir. İmmünohistolojik çalışmalarla, sarkomerik alfa-aktin, titin, kardiyak troponin T, MLC2v ve konneksin gibi kardiyomiyosit proteinler tespit edilmiştir. Ayrıca elektrofizyolojik çalışmalar da, bu hücrelerde beta-adrenerjik ve muskarinik sinyal yollarının bulunduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, embriyonik kök hücrelerin aksine uPK hücrelerin hücresele kardiyomiyoplasti ve miyokardial doku mühendisliği için otolog fonksiyonel kardiyomiyosit oluşumunda kullanılabileceği ileri sürülmüştür [24].

Örneğin, 2008 yılında Hu ve arkadaşları EÖH'i, statin grubu bir kolesterol düşürücü ilaç olan simvastatinle birlikte bacak iskemisi modelinde uygulamışlar. Bu denemede 4 farklı grupta ve farklı kombinasyonlarda EÖH ve simvastatin, bacak iskemisine uğrayan farelere transplante edilmiştir. Transplantasyondan sonra iskemik dokuda islet kas hücrelerin apoptozunda anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Hücrelerde apoptozu indükleyen *Bax* geninin ekspresyonunda azalma ve anti-apoptotik bir gen olan *Bcl-2*'nin ekspresyonunda artma gerçekleşmiştir. EÖH'lerin simvastatinle kombine halde kullanılması, kritik bacak iskemisine uğrayan sıçanlarda güçlü anjiyogenezise neden olmuştur [25].

Takahashi ve ark. 2000 yılında yaptıkları çalışmada insan progenitor hücrelerini kritik bacak iskemisine uğrayan sıçanlarda kullanmışlar ve transplantasyondan sonra iskemik dokuda kan hızlandığını ve kapiller artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, bacak kaybı EÖH uygulanan grupta önemli ölçüde azalmıştır [26].

Shintani ve ark. tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada tavşan bacak iskemisi modelinde kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücreler (MNC) kullanılarak neovaskülerizasyon incelenmiştir. Florasan işaretli BM-MNC'ler iskemi bölgesine enjekte edilmiştir. İnjeksiyondan 4 hafta sonra transplante edilen grupta anjiyografik olarak belirlenen kollateral damarlar tespit edilmiştir. Sonuç

olarak direk otolog BM-MNC transplante edilen grupta, ergin iskemik dokuda neovaskülarizasyon gözlenmiştir [20].

2010 yılında Lian ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, insan uPK hücrelerinin mezenkimal kök hücrelerine (MSC) farklılaşmasının klinik olarak mümkün olduğu gösterilmiştir. Üç monoklonal, stabil karyotipli ve fonksiyonel MSC kültürlerinden CD24⁺ ve CD105⁺ hücreler kombine sorting ile başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Bu hücrelerin pluripotent ortak yoktur ancak MSC yüzey antijenleri göstermekle birlikte adipoz, osteosit ve kondrosit hücrelerine farklılaşabilmektedirler. Arka bacak iskemisine uğrayan, uPK hücrelerinden elde edilen MSC hücreleri transplante edildiğinde damar oluşumu ve kas rejenerasyonu göstermişlerdir. uPK hücrelerinden elde edilen MSC hücrelerinin en önemli potansiyeli sağkalım oranlarının yüksek olması, transplantasyon yeteneklerinin yüksek olması, vasküler indüksiyon, kas rejenerasyonu, de novo farklılaşma ve parakrin mekanizmalardır. Sonuç olarak, fonksiyonel MSC'ler, tek hücre düzeyinden başlayarak klonal olarak insan uPK hücrelerinden üretilebilirler. Hastaya özel uPK-MSC hücreleri hazırlanıp, doku iskemilerinin tedavilerinde kullanılabilir [21].

Hasta fibroblastından uPK hücrelerin üretimi:

- **Parkinson hastalığı** (Wernig and Jaenisch, 2008, Maehr and Melton PNAS 2009) [7].
- **Amiyopatik lateral sklerozis**, (Dimos and Eggan Science 2008) [9].
- **Tip 1 diabetes** (Maehr and Melton PNAS 2009) [8].
- **ADA-SCID, SBDS, Gaucher hastalığı, Duchenne and Becker Muscular, Huntington hastalığı, JDM, Down sendromu, Lesch-Nyhan sendromu** (Park and Daley Cell 2008) [10].

Farklı hücre tipinden uPK hücresi elde edilmesi:

- **Kan hücrelerinden** (Loh and Daley 2009), B-cells (Hanna and Jaenisch Cell 2008) [11].
- **Hematopoietik kök hücrelerden** (Emiinli and Hochedlinger Nat Genet 2009) [12].
- **Pankreatik β hücrelerinden** (Stadtfield and Hochedlinger Cell Stem Cell 2008) [13].
- **Hepatik ve gastrik endoderm hücrelerinden** (Aoi and Yamanaka Science 2008) [14].
- **Nöral kök hücrelerden** (Kim and Scholar, Nature 2008) [15].

İncelenen literatürlere göre, uPK hücreler otolog olarak üretilebilen ve pratik kullanıma en uygun kök hücrelerdir. uPK hücrelerden in vitro koşullarda üretilen sıçanlarda oluşturulan kritik bacak

iskemisinde kullanımıyla ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, uPK hücrelerin vasküler iskemi modelinde kullanılması bu araştırmanın konusunu oluşturmaktadır.

Kritik bacak iskemi modeli periferik damar hastalıklarının araştırılmasında en fazla kullanılan iskemi modelidir. Bu çalışmada in vitro olarak uPK hücrelerinden farklılaşan EÖ hücrelerinin pratikte kullanımı ve bunun sonucunda da kliniğe uygulanma potansiyelleri hakkında önemli veriler elde edilecektir. Yapacağımız bu çalışmadan elde edilecek bilgiler uPK hücrelerin periferik arterial damar hastalıklarında özellikle de kritik bacak iskemisinde kullanılmasıyla ilgili literatür eksikliğini kapatacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Çalışmamızda aşağıda belirtilen hücre serileri kullanılmıştır:

- Fare fibroblastlarından üretilen iPS-MEF-Ng- 20D-17 hücre serisi
- Fare kardiyomiyosit hücrelerinden elde edilen H9c2 –iPS hücre serisi
- Besleyici hücre olarak MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) hücreleri kullanılmıştır.

Hücre ismi	Hücre kaynağı	Bilimsel adı	Özellikleri
Yamanaka uPKH	Fare fibroblastlarından	iPS-MEF-Ng- 20D-17	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog-GFP-IRES-Puro ^r genleri MEF hücrelerine aktarılmıştır
Singla uPKH	Fare kardiyomiyosit hücrelerinden	H9c2 –iPS	kardiyoventriküler spesifik hücre hattına transdüksiyon metoduyla Yamanaka faktörleri (Oct3/4, Sox2, Klf4, ve c-Myc) aktarılmıştır
Mouse Embriyonik Fibroblast (MEF)	13.5 günlük fare embriyosudan	MEF	Bu hücreler inaktif edilip besleyici hücre olarak uPK hücrelerin kültüründe kullanılır

3.2. METOD

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. MEF hücreleri

A. MEF hücreleri için besiyeri hazırlaması

MEF hücrelerinin kültüründe özelliği olduğu için DMEM high glucose besiyeri kullanıldı. DMEM high glucose besiyeri içinde içerisinde 2 mM L-glutamin, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM nonessential amino acids, %10 FBS (fetal sıgır serumu), 100 U/ml penisilin ve 100 µM streptomisin, amfoterisin eklenerek hücrelerin içerisinde yaşayacağı ve çoğalacağı ortam hazırlandı. Hücreler bu ortam içerisinde, %5 CO₂'in bulunduğu, %95 oranında neme sahip olan 37°C'deki etüvde kültür edildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaşıncaya kadar 2 günde bir besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi.

B. MEF hücrelerinin izolasyonu ve kültürü:

Mouse embriyonik fibroblast hücrelerin izolasyonu için 13,5 günlük hamile farenin embriyoları kullanıldı. Bu farenin uterusundan elde edilen embriyolar steril koşullarda laboratuvara taşındıktan sonra kafa bacak ve kuyruk bölgeleri vücudundan disekte edildi. Ayrıca embriyoların karaciğeri çıkarıldıktan sonra geriye kalan bölgeleri iki bisturi yardımıyla parçalandı. Elde edilen parçalar 50'lik falkon'a aktarıldı ve her embriyo başına 1 ml tripsin EDTA eklendi. Su banyosunda 37°C'de 20 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkarttıktan sonra üzerine embriyo başına 2 ml besiyeri eklendi. 180 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatan altılarak kalan pelet üzerine besiyerleklendi. 75 'lik flasklarda kültüre edildi. Elde edilen MEF hücreleri, yüksek proliferasyona sahip oldukları için her iki günde bir pasajlandı ve 4. Pasajda bu hücrelerin inaktif edilmesi için mitomisin C kullanıldı (2.5 saat 38°C). Bu hücrelerden mitomisin C uzaklaştırdıktan sonra elde edilen hücreler dondurularak azot tankına kaldırıldı.

C. MEF hücrelerinin pasajlanması

- 1) Hücreler %90 yoğunlukta (Konfluent) olduğu zaman pasajları yapılarak çoğaltıldı.
- 2) Flasklar üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- 3) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı.
- 4) PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı. Flaska Tripsin EDTA eklendi. Hücreler inkübatörde tripsinle 3-5 dakika inkübe edildi. T75'lik flask için 3 ml tripsin, T25'lik flask için 1,5 ml tripsin uygulandı.

***Farklı hücre tiplerinin tripsine duyarlılığı farklıdır. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede flask/petri yüzeyinden ayrılabilir. Mikroskopta aralıklarla kontrol edilmelidir.

- 5) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edildi. T75'lik flask için 10 ml besiyeri, T25'lik flask için 5 ml besiyeri eklendi.
- 6) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarıldı.
- 7) 1 ml hücre Vi-cell cihazında hücre sayımı için kullanıldı.
- 8) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (130 rcf 7 dak.), süpernatant uzaklaştırıldı.
- 9) Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırıldı.
- 10) Flask veya petrilere ekim yapıldı.
- 11) Hücreler inkübatör içerisinde, %5 CO₂, %95 oranında neme ve 37°C'de kültür edildi.

3.2.1.2.uPK hücreleri

A. Jelatin kaplı flaskların hazırlanması

Jelatin hazırlaması (%1'lik jelatin sigma)

- 1) 250 mg jelatin, 50 ml 1x PBS ile çözüldü.
- 2) 2-3 dakika mikrodalgada yüksek sıcaklıkta ısıtıldı.
- 3) Sterilize edildikten sonra -20C'de muhafaza edildi.
- 4) 25 ml'lik flask için 3 ml ve 75 flaska 5 ml jelatin kullanıldı.
- 5) En az 20 dakika jelatin flasklarda inkübe edildi.
- 6) Geriye kalan jelatin çekildikten sonra 20–25 dakika steril kabinde (flaskların kurumasına kadar) beklendi.

	Petri Büyüklüğü	Jelatin Miktarı
1	35 mm	1 ml den az
2	60mm	1ml
3	100mm	2ml

B. H9C2-iPS hücreleri için besiyeri hazırlaması:

H9C2-iPS hücrelerinin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Malzeme	Hacim
ES-FBS	93.75ml
Penisilin /Streptomisin	6.25
L-Glutamine-200 mM (100X), liquid	6.25
MEM Sodium Pyruvate Solution 100 mM (100X), liquid	6.25
Non-essential amino acid	6.25
2-Mercaptoethanol	4.4ul in 6.25ml 1x PBS
Leukemia inhibitory factor 107 U/ml	62.5ul
DMEM	500
PBS 10X	
Toplam hacim	625

uPKH hücrelerin besiyeri hazırlamak için elde ettiğimiz besiyerine (DMEM) 10 ng/ml β -FGF ve 10ng/ml activin A eklendi. Tüm malzemeler DMEM'e eklendikten sonra elde edilen besiyeri 0.2- μ m bottle filtre yardımıyla steril edildi, stoklanıp +4°C muhafaza edildi.

C. iPS-MEF-Ng- 20D-17 için besiyeri hazırlaması:

iPS-MEF-Ng-20D-17 hücrelerinin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Malzeme	Miktar
DMEM(high glucose, without Sodium pyruvate)	
FBS	15%
NEAA(Non Essential Amino Acid)	0.1mM
2-Mercaptoethanol	0.1mM
mouse LIF	1000U/ml

D. Fare uPK hücrelerin dondurulması için kullanılan 2x besiyeri

- 1) 60 ml DMEM
- 2) 20 ml ES - FBS
- 3) 20 ml DMSO
- 4) Besiyerinin filtre etmek için (0.22 µm pore size, low protein-binding) filtre kullanıldı.

Fare uPK hücre dondurması için kullanılan 2x besiyeri taze bir şekilde hazırlanır ve buzdaki saklanır.

E. uPKH hücrelerin kültürü ve pasajlanması:

uPKH hücrelerinin pasajlanabilir duruma gelebilmesi için kolonilerin büyüyerek birbirine yaklaşmaları gerekmektedir. Bu aşamadan sonra hücrelerin pasajlanması gerekmektedir. Bu hücrelerin kültürü için, dondularak stok yapılan inaktif MEF hücreleri çözülür ve uPK hücrelerin pasajlanmasından 1 gün önce flask'lara ekildi. Bir gece inkübasyondan sonra besiyeri aspire edilip, PBS'le bir kere yıkandı. uPK hücreleri, bir gece önceden hazırlanmış olduğumuz MEF hücrelerin üzerine ekildi. Bu aşamalar:

- 1) Pasajlanması gereken uPK hücrelerin flasklarından besiyeri uzaklaştırıldı.

- 2) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı.
- 3) PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- 4) Hücreler inkübatörde tripsinle 3-5 dakika inkübe edildi.
- 5) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edildi (uPKH besiyeri ile).
- 6) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi (en az 10 kere pipetaj yapılır) ve bir falkon tüpe aktarıldı.
- 7) 1ml hücre Vi-cell cihazında hücre sayımı için kullanıldı.
- 8) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (200 ref 5 dak.), süpernatant uzaklaştırıldı.
- 9) Hücreler istenilen konsantrasyonda besiyerinde sulandırıldı.
- 10) Önceden hazırlanan MEF hücrelerinin ekilmiş olduğu flasklara ekim yapıldı.
- 11) Hücreler inkübatör içerisinde, %5 CO₂, %95 oranında nem ve 37°C'de kültür edildi.

F. uPK Hücrelerin Dondurulması:

- 1) Flask/Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- 2) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı,
- 3) PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edildi.
- 4) Tripsin, hacminin 10 ml serumlu besiyeriyle inhibe edildi.
- 5) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarıldı.
- 6) 1ml hücre Vi-cell hücre sayımı için ayrıldı
- 7) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (130g 7 dakika), süpernatant uzaklaştırıldı.
- 8) Pelet 1,5 ml besiyerinde sulandırıldı.
- 9) Dondurma tüpleri içerisine 1.5 ml hücre ve 150 µ DMSO (%10luk DMSO) yavaş yavaş eklendi.
- 10) Viallerin kapağını sıkıca kapatıp, oda ısısında "isopropanol freezing container" taşındı.
- 11) İsoopropanol freezing container -80 derin dondurucuya kondu (-80°C'de içerisinde bu özel taşıyıcı'da muhafaza edilerek sıcaklığın dakikada 1°C düşmesi sağlanır).

12) 24 saat sonra dondurma tüpleri sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

G. uPKH Hücrelerin Çözülmesi

- 1) -196°C'den alınan kriyovial 37°C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritildi.
- 2) Tamamen erimeden önce (içinde hala kristal buz varken)Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 10 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı. (Hücreler DMSO içerisinde oldukları için manipülasyonlar nazik olmalıdır.)
- 3) Tüp 200 g'de 7 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pelete 1 ml besiyeri eklendi.
- 4) Hücreler 1 ml içinde iyice çözüldükten sonra besiyerine eklendi.
- 5) Ertesi günden itibaren hergün besiyeri değiştirilir. Kültür kabı her gün inverted mikroskop ile kontrol edildi hücreler pasajlanabilecek duruma gelince hücreler kaldırıldı.

3.2.2. Hücre farklılaştırma çalışmaları

3.2.2.1. uPKH hücrelerin farklılaşması:

A. Farklılaşma ortamının hazırlanması:

uPKH hücrelerini Flk1⁺ hücrelere farklılaştırmak için farklılaştırma besiyerleri denilen özel besiyeri kullanılmaktadır. uPKH bu besiyeriyile kültüre edildiğinde yavaş yavaş farklılaşmaya başlamaktadır. Farklılaştırma besiyeri içeriği aşağıdaki gibi hazırladı:

- 1) α -minimum essential medium
- 2) % 10 fetal calf serum and
- 3) 5×10^5 mol/L 2-mercaptoethanol
- 4) Penisilin/streptomisin

B. Kollajen kaplı 24 kuyucuklu platelerin hazırlanması:

Farklılaşmayı gerçekleştirmek için kollajen kaplı petri ve yuvarlak lameller gerekmektedir. Bu nedenle kollajen kaplı petri temin edildikten sonra yuvarlak lamellerin hazırlanması için kollajen tip IV solüsyonu hazırlandı ve 24 kuyucuklu petri atında koymuş olduğumuz yuvarlak lamellerin üzerine 200 uL kollajen tip IV eklenerek laminer kabin içinde ve UV ışığı altında oda ısısında inkübe edildi. 2 saat sonra lamellerin üzerinde kalan kollajen, pipet ile çekilerek tekrar bir gece boyu aynı

koşullar altında kurumaya bırakıldı. Bu yuvarlak lameller 24 kuyucuklu plateler ve özel poşet içinde +4C de kullanım gerçekleşene kadar muhafaza edildi.

C. Saf uPKH Kollajen kaplı petrielerde kültürü:

Promisin ve mikroeadler yardımıyla elde ettiğimiz saf uPKH hücrelerini, kollajen tip IV platelerde ve farklılaşma besiyeri ile kültüre edildi. Ayrıca konfokal mikroskopu ile hücreleri takip etmek için yuvarlak lamellerlerin üzerine de hücre aktarıldı ve farklılaşma besiyeri ile kültürü edildi. uPKH hücreler farklılaşma besiyeride 1. günden itibaren farklılaşmaya başlamaktadır ve FLK1 geni 2. günde ifadesi artmıştır. 4-5 gün sonra ise maksimuma ulaşmaktadır. Bu nedenle örnekler 2.5 günden, 7.5 güne kadar devam edildi. 2.5, 3.5, ...,7.5 günlerde RT-PCR için trizol yardım ile örnek alımı hızlı bir şekilde -80C aktarıldı. Bununla paralel olarak yuvarlak lameller üzerinde farklılaştırılan hücreler PFA (Paraformaldeid) ile fiske edip +4°C'e kaldırıldı. Bu örnekler immün boyama deneylerinde kullanıldı.

3.2.3. Saf uPKH ve Farklılaştırılmış hücre izolasyonu

3.2.3.1. Promisin yardımıyla saf uPKH hücrelerin elde edilmesi

3.2.10. uPKH hücrelerinin MEF hücrelerinden saflaştırılması:

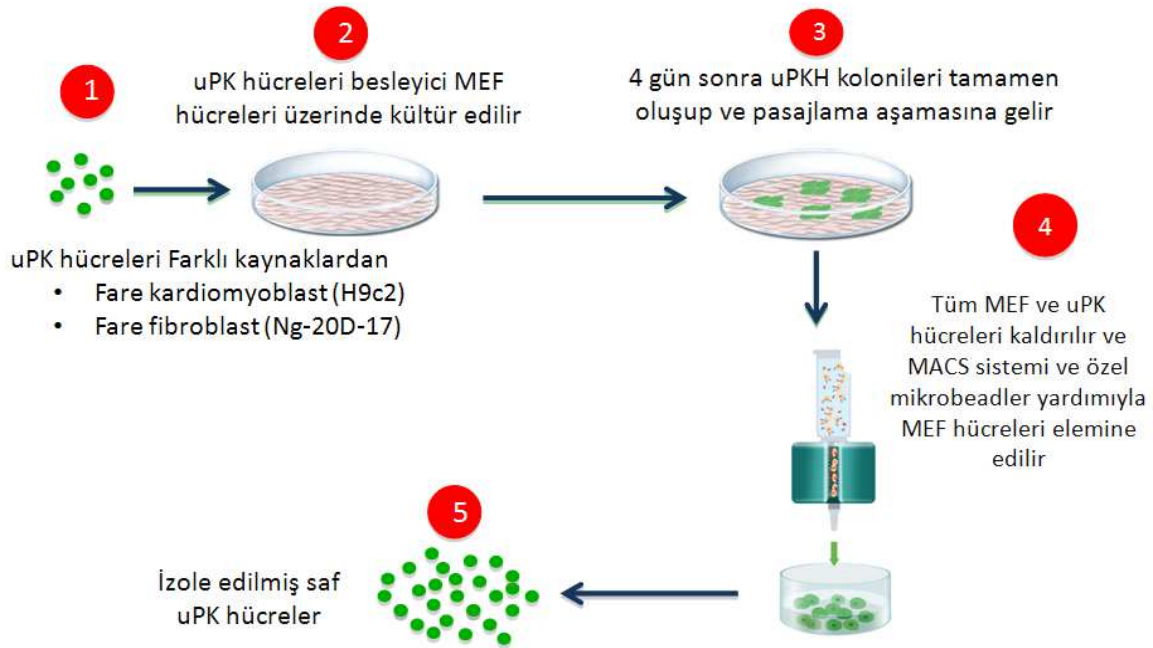
Öncelikli olarak uPKH hücrelerinin farklılaştırılması için bu hücreleri besleyici hücrelerden ayrılması hedeflendi. uPKH ve besleyici hücre topluluğu birlikte plate'in tabanından tripsin ile kaldırıldı. Japonya Ricken hücre bankasından elde edilen Yamanaka uPKH (iPS-MEF-Ng-20D-17) hücrelerinde Puromisin direnç geni olduğu için ortamda Puromisin antibiyotiği olduğunda MEF hücrelerinin eliminasyonu kolaylıkla başarılıydı. MEF hücrelerini elimine etmek için konsantrasyon optimizasyonunda Puromisin kültür ortamına ilave edildi ve etkisi mikroskop altında incelenerek görüntülendi (tablo 1 ve şekil 3). Konsantrasyon oranları 1, 1.5, 2 µg/ml olarak uygulandı. En iyi sonuç 2 µg/ml ve 3. günde elde edildi. Puromisin uygulamasından sonra kalan uPKH hücreleri pasaj yapılarak MEF hücrelerinden uzaklaştırıldı.

Böylelikle saf uPKH hücresi elde edildi. Florida Üniversitesinden alınan uPKH hücrelerinde Puromisin direnç geni olmadığı için MEF hücreleri ile mikroead'ler ve MACS sistemi ile yapıldı.

3.2.3.2. MACS sistemi ile hücre izolasyonu

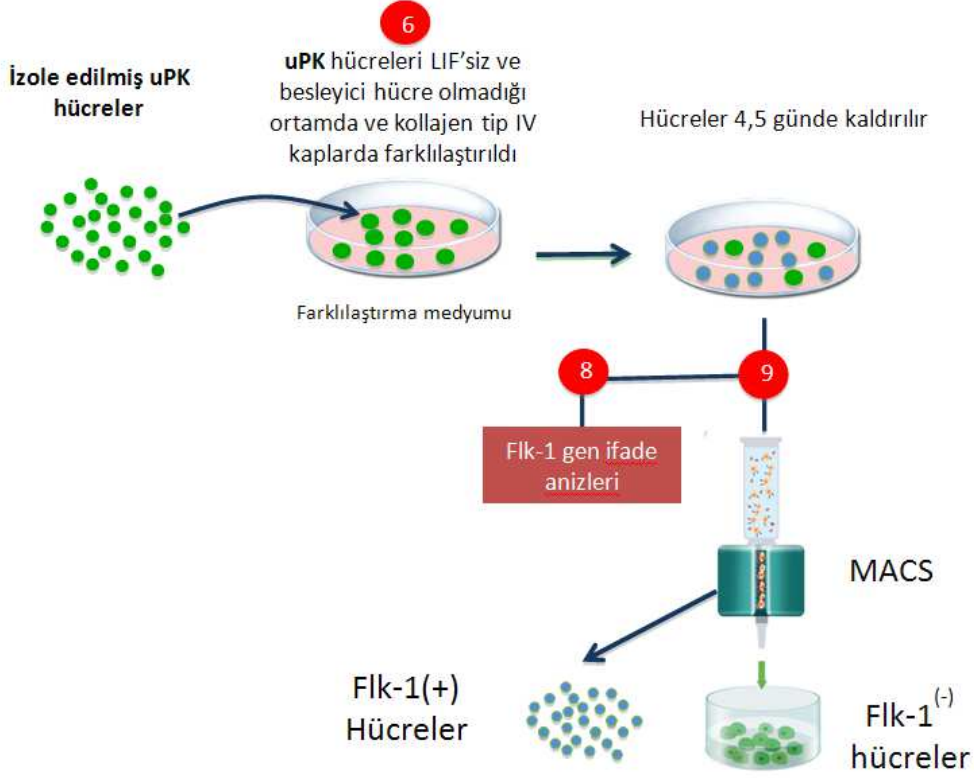
H9C2-iPS (Florida) hücrelerini MEF hücrelerinden saflaştırılması, MACS sisteminde ve Feeder Removal MicroBead'ler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu nedenle hücreleri tripsin ETDA ile

kaldırdıktan sonra kitin protokolünü kullanarak başarılı şekilde saf H9C2-iPS hücreleri elde edildi (Şekil 1).



Şekil 1: uPKH'lerin besleyici MEF hücrelerinden izolasyonu

İkinci aşamada elde ettiğimiz saf uPK hücrelerini kolajen tip IV kaplı petrielerde kültür edildi. Bu kültürde MEF hücresi kullanılmıyor. Ayrıca bu hücrelerin kültürü için farklılaşma besiyeri (DM) kullanıldı. 4.5 gün sonra bu hücreler kaldırıldı ve MACS sistemi yardımıyla ve Flk-1⁺ hücrelerini izolasyonunda kullanılan özel mikrobead'lerle, uPK hücrelerinden Flk-1⁺ hücreye farklılaşan hücreler izole edildi. Bu deneyin sonucunda Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler ayrılmış oldu (Şekil 2).



Şekil 2: uPKH'leri, Flk-1⁺ hücelere farklılaştırması ve izolasyonu

3.2.4. İmmün boyama ile hücrelerin karakterizasyonu

Her aşamada elde edilen hücrelerin immün karakterizasyonu için bu hücreler asıl deneye paralel olarak yuvarlak lameller üzerinde de kültüre edildi. Belirlenen zamanlarda bu lamelerin üzerinde olan hücrelerin morfolojik ve immün karakterizasyonu için önce bu hücreleri fiske edildi. Sonraki aşamada fikse edilmiş hücreleri lameler üzerinde özel antikorlarla boyandı ve konfokal mikroskop altında inceledi.

3.2.4.1. Hücre fiksasyonu

- 1) 4 kuyucuklu kültür kabına alınan lameller 250µl %3.5lik PFA içinde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 2) PFA alındıktan sonra 2 kez 1ml PBS ile hücreler yıkandı.
- 3) Daha sonra lameller Azitli PBS içinde +4°C'e kaldırıldı.

uPKH hücrelerin fiksasyonundan sonra örnekler görüntülemek için hazırlandı.

3.2.4.2. İmmün boyaması ile Hücrelerinin Karakterizasyonu:

Yurt-dışı kaynaklardan edinilen iki farklı kökenli uPKH hücrelerini (Yamanaka ve ark. ve Singla ve ark.) farklı antikorlarla boyayarak görüntüleri konfokal mikroskop altında inceledi. Ancak çalışma öncesinde edinilen hücrelerin kimliklerini doğrulamak amacıyla SSEA1 ve OCT4 antikorları ile boyayarak doğrulandı.

Çalışmamızın ikinci aşamasında uPK hücrelerini Flk1 hücre yönünde farklılaştırdıktan sonra elde edilen hücrelerin immün karakterizasyonu için Anti-VEGF-receptor 2 antikorunu kullanıldı. Projenin 3. aşamasında Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ izole edilen hücreler özel besiyeri kullanılarak, CD31⁺ ve αSMA⁺ hücrelere farklılaştırılmıştır. Farklılaşmanın belirteci olarak Anti-CD 31 ve Anti-alpha smooth muscle Actin antikorları ile boyama yapıldı.

3.2.4.2. İmmün boyama ve görüntüleme

Bu deneyde kullanılan antikorlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Tablo 1. Deneylerde kullanılan antikorlar ve özellikleri			
Hücre tipi	Antikor ismi	Açıklama	İLGİLİ GEN
uPK'ler	Oct4	Oct-4 Rabbit Monoclonal Antibody, clone C30A3	POU class 5 homeobox 1
uPK'ler	SSEA-1	stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1 embryonic stem (ES) cells marker)	CD15 is a carbohydrate adhesion molecule (not a protein)
Flk-1	VEGF-2	Anti-VEGF-receptor 2 antibody	Kinase insert domain protein receptor
Smooth muscle cells	alpha smooth muscle Actin	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody	alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)
EPC	CD31 veya Pecam-1	Anti- CD 31	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1

Hücrelerin görüntülemesi için:

1. uPK hücreleri 4 gün kültür edildi, PFA fiksasyonundan sonra immün boyama yapıldı:

a) Sulandırılmış SSEA1 (primer) ile 1 saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.

- b) PBS ile yıkandı.
- c) FITC (sekonder) ile bir saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.
- d) PBS ile yıkandı.
- e) 7-AAD (çekirdek boyası) 0,5 saat 37⁰C'de inkübe edildi.
- f) PBS ile yıkandı.
- g) Hoechst içeren kapatma medyumu ile lam üzerinde kapatıldı.

2. uPK hücreleri 4 gün kültür edildi, PFA fiksasyonu yapıldıktan sonra bu şekilde immün boyama yapıldı:

- a) Sulandırılmış Oct3/4 (primer) ile 1 saat 37⁰C'de inkübasyona bırakıldı.
- b) PBS ile yıkandı.
- c) FITC (sekonder) ile bir saat 37⁰C'de inkübasyona bırakıldı.
- d) PBS ile yıkandı.
- e) 7-AAD (çekirdek boyası) 0,5 saat 37⁰C'de inkübe edildi.
- f) PBS ile yıkandı.
- g) Hoechst içeren kapatma medyumu ile lam üzerinde kapatıldı.

Flk1 antikoru 2.5, 3.5,....., 7.5 günlerde alınan örnekler (yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılan ve fikse edilen hücreler) immün boyamada kullanıldı. Sekonder antikor kullandıktan sonra kofakal mikroskop'ta görüntüledi. Flk1 hücreleri görüntülemek için:

- a) Sulandırılmış Flk1 (primer) ile 1 saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.
- b) PBS ile yıkandı.
- c) FITC (sekonder) ile bir saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.
- d) PBS ile yıkandı.
- e) 7-AAD (çekirdekboyası) 0,5 saat 37⁰C inkübe edildi.
- f) PBS ile yıkandı.

g) Hoechst içeren kapatma medyumu ile lam üzerinde kapatıldı.

Ayrıca projenin ikinci aşamasında FLk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücrelerinden elde edilen CD31⁺, SMA⁺ aynı şekilde fikse edilip, immün boyama yapılarak görüntülendi. CD31 ve SMA⁺ hücrelerini görüntülemek için:

1. Flk-1⁺ hücreler VEGF içeren besiyeri ile 2 gün boyunca tekrar kültür edildi, PFA fiksasyonu yapıldıktan sonra bu şekilde immün boyama yapıldı:

a) Sulandırılmış CD31 (primer) ile 1 saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.

b) PBS ile yıkandı.

c) FITC (sekonder) ile bir saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.

d) PBS ile yıkandı.

e) 7AAD(çekirdekboyası) 0,5 saat 37⁰C inkübe edildi.

f) PBS ile yıkandı.

g) Hoechst içeren kapatma medyumu ile lam üzerinde kapatıldı.

2. Flk-1⁻ ve Flk-1⁺ hücreler PDGF içeren besi yerinde 2 gün boyunca tekrar kültür edildi, her iki grubun örneklerine PFA fiksasyonu yapıldıktan sonra bu şekilde immün boyama yapıldı:

a) Sulandırılmış αSMA (primer) ile 1 saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.

b) PBS ile yıkandı.

c) FITC (sekonder) ile bir saat 37⁰C inkübasyona bırakıldı.

d) PBS ile yıkandı.

e) 7-AAD (çekirdekboyası) 0,5 saat 37⁰C inkübe edildi.

f) PBS ile yıkandı.

g) Hoechst içeren kapatma medyumu ile lam üzerinde kapatıldı

3.2.5. qRT-PCR ile hücrelerin karakterizasyonu

uPK, Flk-1⁺, CD31⁺ ve αSMA⁺ hücrelerin immün boyama ile tespitinden sonra elde edilen verilerin doğrulaması için qRT-PCR yöntemi ile bahsedilen genlerin ifade seviyeleri analiz edildi. Genetik

analizler için tasarlanan primerler kullanılarak bu hücrelerin gerçekten karakterizasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca projemizde yer almayan ama analizleri sonuçlarımızı güçlendiren bazı genler örneğin arteriyel venöz yönünde farklılaşma berliteçi olan bazı genlerin analizi yapıldı. Buna ek olarak hücrelerin düz kas hücrelerine farklılaştığını gösteren bazı genler incelendi. Ayrıca gen ifade seviyelerinin değişimi farklılaşmanın ilerleyen günlerinde (2.5 günden 7.5 güne kadar her gün) kontrol edildi. Bu analiz projede yer almayan ancak elde edilen verilere dayanarak hangi gün izolasyon için uygun olduğunun öğrenmek için yapılmıştır.

3.2.5.1.RNA izolasyonu

Hücrelere değişen ifade seviyelerini göstermek için RNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyonu için gerekli solüsyonlar:

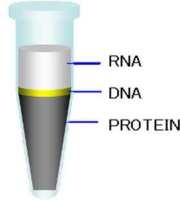
1. Trizol reagent
2. Kloroform
3. İzopropanol (+4°C'de saklanır)
4. %75'lik EtOH (DEPC'li)
5. DEPC'li su (RNase free)

Aşağıdaki sırayla RNA izolasyonu gerçekleştirildi:

1. Platelerin için 1 ml trizol eklendi.
2. Bir kaç defa pipetaj yaparak hücreleri kaldırıp ependorf'a toplandı.
3. Elde edilen örnekler hızlı bir şekilde -80'e kaldırıldı.

Elde ettiğimiz örneklerden RNA izolasyonu yapmak için aşağıdaki aşamalar izlendi:

1. Trizol içeren örneği -80°C'den çıkardıktan sonra oda ısısında çözülmesi beklendi.
2. Eriyen örneklere 200 µl kloroform eklendi ve tüpler hafifçe çalkalandı.
3. Tüpler oda ısısında 10 dk bekletildi.
4. 10dk sonra tüpler +4°C'de 12000 rcf'te 13-15dk santrifüj edildi.



5. Santrifüj sonrası tüplerde 3 katman oluştuğu gözlemlendi.
6. En üstteki RNA kısmı 1000 µl'lik pipetle çekilerek yeni ependorf tüplere aktarıldı.
7. Tüplere 500 µl izopropanol eklendi ve tüpler 1dk kadar hafifçe aşağı yukarı çalkalandı.
8. Tüpler oda ısısında 10 dk bekletildi.
9. 10dk sonra tüpler +4°C'de 12000 rcf'te 8dk santrifüj edildi. Dipte beyaz RNA peleti oluştu.
10. Pelete dikkat edilerek izopropanol uzaklaştırıldı.
11. Tüplere 1ml %75'lik EtOH eklenerek pelet kaldırıldı. (alkol yıkama amaçlı)
12. Tüpler 4°C'de 7500 rcf'te 5dk santrifüj edildi. Dipte beyaz pelet oluştu.
13. Pelete dikkat edilerek etil alkol uzaklaştırıldı. (pipetle veya dökülerek)
14. Tüpler kapağı açık bir şekilde temiz bir yüzey üzerinde kurumaya bırakıldı.



15. Alkol uçunca tüplere içindeki peletin büyüklüğüne göre 35-50 µl RNA'se serbest su eklendi ve pelet çözüldü.
16. 2 µl RNA ölçüm için, 2 µl RNA jelde yürütmek için PCR tüplerine alınarak geriye kalan RNA stoğu -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.5.2. Elde edilen RNAlardan cDNA sentezi:

İzole edilen RNAların ölçümü yapıldı. Nanodrop yardımıyla ve spektrofotomerik yöntem ile örneklerin RNA miktarları ölçüldü. Deneyelere devam etmek için örneklerin konsantrasyonu 500ng olarak eşitlendi.

cDNA sentezi için 20 µl reaksiyon kuruldu. Tüm örneklerin 11 µl'sinde 500 ng RNA olması için örnekler eşitlendi. cDNA sentezi için Roche First Transcriptor cDNA syntesis kit kullanıldı:

✓ **RNA denatürasyonu**

1. Kit solüsyonları çözüldü
2. Denatörasyon miksi şu şekilde hazırlandı:
(değişken) RNA kalıbı + (2 µl) random hexamer + (değişken) Su
3. Bu mix 65°C'de 10 dk denatüre edildi

✓ **Master mix hazırlandı:**

- buffer 4 µl
- RNase inhibitör 0.5 µl
- 10 mM dNTP mix 2 µl
- RT Enzim 0.5 µl

Toplam hacim 7 µl ayarlandı

Bu miks denatüre edilen RNA'ya (11 µl) eklenir ve toplam hacim 20 µl tamamlandı.

cDNA sentez reaksiyonu bu şekilde kuruldu:

- 25 °C 10'
- 55°C 30'
- 85°C 5'

- Bu reaksiyon tamamlandıktan sonra her tüpüzlerine 80 µl nuclease free eklenir 100 µl'ye dilue edilir
- Tüm örnekler -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.5.3. qRT-PCR

A. qRT-PCR reaksiyonu optimizasyonu

Öncelikle optimizasyon deneyleri yapıldı ve aşağıdaki tabloda reaksiyon sonuçlarına göre cDNA miktarı 2 µl olmasına karar verildi.

	Miks	Forward	Reverse	cDNA	Su	Toplam
Non Template	5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0 µl	4 µl	10 µl
Örnek 1-1	5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	3.5 µl	10 µl
Örnek1-2	5 µl	0.5 µl	0.5 µl	1 µl	3 µl	10 µl
Örnek1-3	5 µl	0.5 µl	0.5 µl	2 µl	2 µl	10 µl

Ayrıca primerlerin hangi sıcaklıkta ve hangi primer konsantrasyonunda daha iyi çalışıldığı için optimizasyon deneyler kuruldu ve sonuçta primerlerin çalışma koşulları aşağıda tablodaki özetlediğimiz gibi ayarlandı.

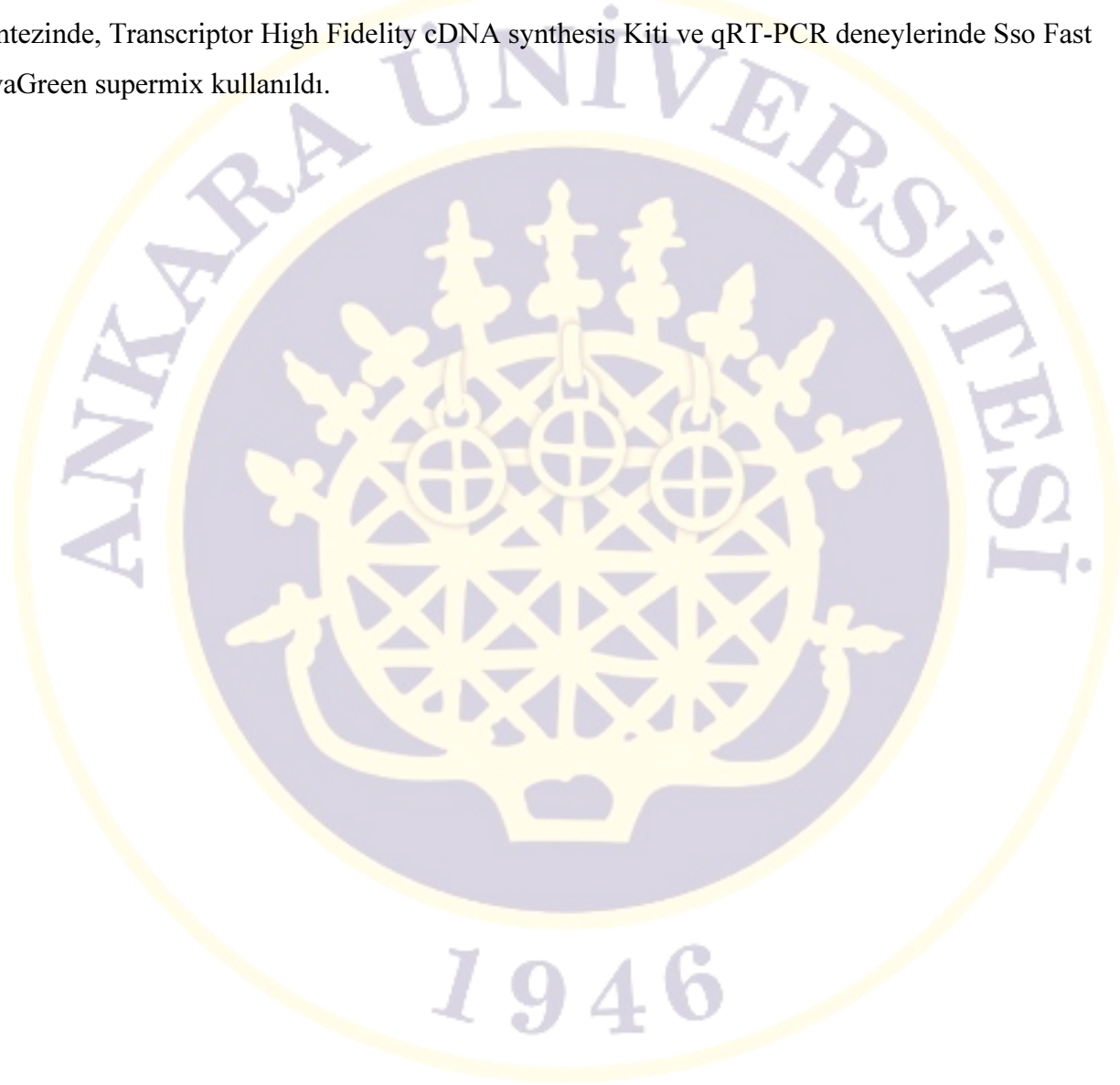
Tablo 3. qRT-PCR deneylerinde kullanılan Primerlerin özellikleri ve çalışma sıcaklıkları

No	Primer adı	Opt sıcaklık	Kullanılan miktar	Kullanılan cDNA miktarı	Ait olduğu gen
1	Klf4	60	0.5 µl	2 µl	Kruppel-like factor 4
2	C-myc	60	0.5 µl	2 µl	myelocytomatosis oncogene
3	HPRT	60	0.5 µl	2 µl	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
4	H2 afz	60	0.5 µl	2 µl	H2A histone family, member Z
5	αSMA	60	0.5 µl	2 µl	alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)
6	SMMHC	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle (Myh11)
7	Desmin	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus desmin (Des)
8	calponin	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus calponin 1 (Cnn1)
9	Ve cadherin	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus cadherin 5 (Cdh5)
10	AC 133	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus prominin 1 (Prom1)
11	CD31	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (Pecam1)

EK-11 Sonuç Raporu Formatı

12	Ephrin B2	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus ephrin B2 (Efnb2)
13	Vcam	62	0.5 µl	2 µl	Mus musculus vascular cell adhesion molecule 1
14	Flk1	60	0.5 µl	2 µl	Mus musculus kinase insert domain protein receptor (Kdr)

Deneyley roche Light Cycler 480 cihazında 3 biyolojik tekrar ve 3 örnekle çalışıldı. Ayrıca cDNA sentezinde, Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Kiti ve qRT-PCR deneyleylerinde Sso Fast EvaGreen supermix kullanıldı.

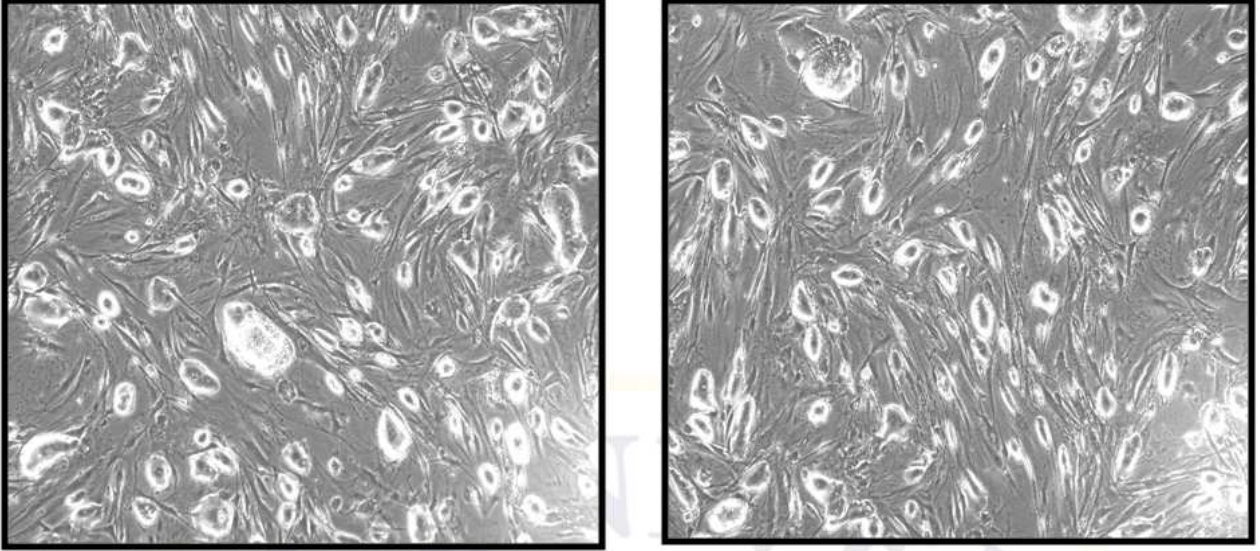


4. ANALİZ VE BULGULAR

4.1. ELDE EDİLEN HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU

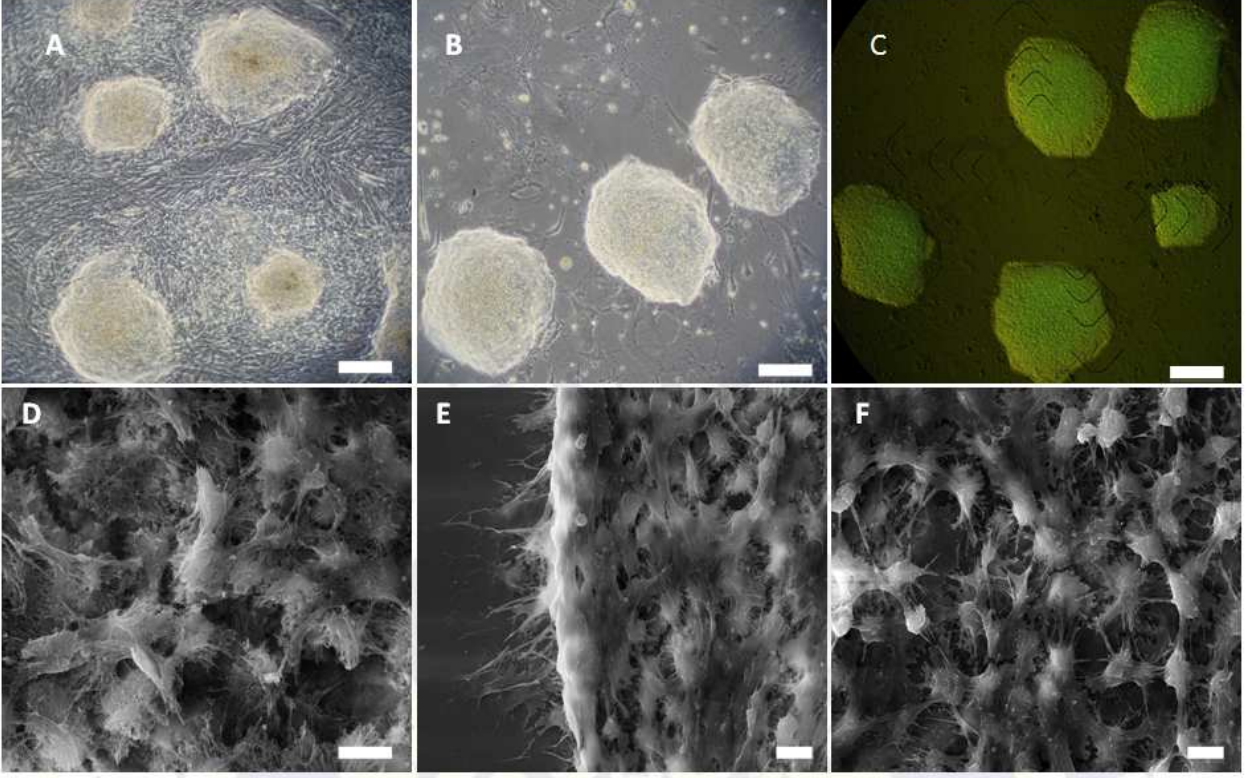
4.1.1. uPK hücrelerinin Morfolojik Karakterizasyonu

uPK hücreleri bahsi edilen metotlarla yeterli miktarda çoğaltıldı. Bu hücreler farklı günlerde invert mikroskop altında incelendi. Ayrıca bu hücrelerin koloni oluşturduğu ve bu şekilde çoğaldıkları gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 3. H9C2 uPKH hücrelerin 14. pasaj görüntüleri (x20)(MEF hücrelerinin üzerinde koloni oluşturan uPKH hücreleri)

uPK hücrelerini MEF hücrelerinden elemine etmek için ortama puromisin eklendi. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan puromisinle en etkili olan konsantrasyon belirlendi (Şekil 4). Puromisin uygulanan kültürlerde MEF hücreleri tamamen elemine olmuştur. Puromisin dirençli olan hücreler aynı zamanda GFP geni ifade ettikleri için floresan mikroskop altında bu hücreleri görüntülemek mümkün olmuştur. Yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılan hücreler fikse edildikten sonra elektron mikroskopla görüntüler alındı (Şekil 4).



Şekil 4. (A) uPK kolonileri besleyici hücrelerin üzerinde(MEF hücreleri) (B)puromisin dirençli uPK hücrelerin besiyerine MEF hücreleri elemine etmek için puromisin eklendi ve MEF hücreleri elemine edildi. (C) GFP+ olan uPK hücreleri (Ng-20D-17) D, E ve F) SEM (taramalı elektron mikroskop) Ölçek A-C=200 µm, D-F=5µm

4.1.1 Flk-1⁺ hücrelerinin morfolojik karakterizasyonu

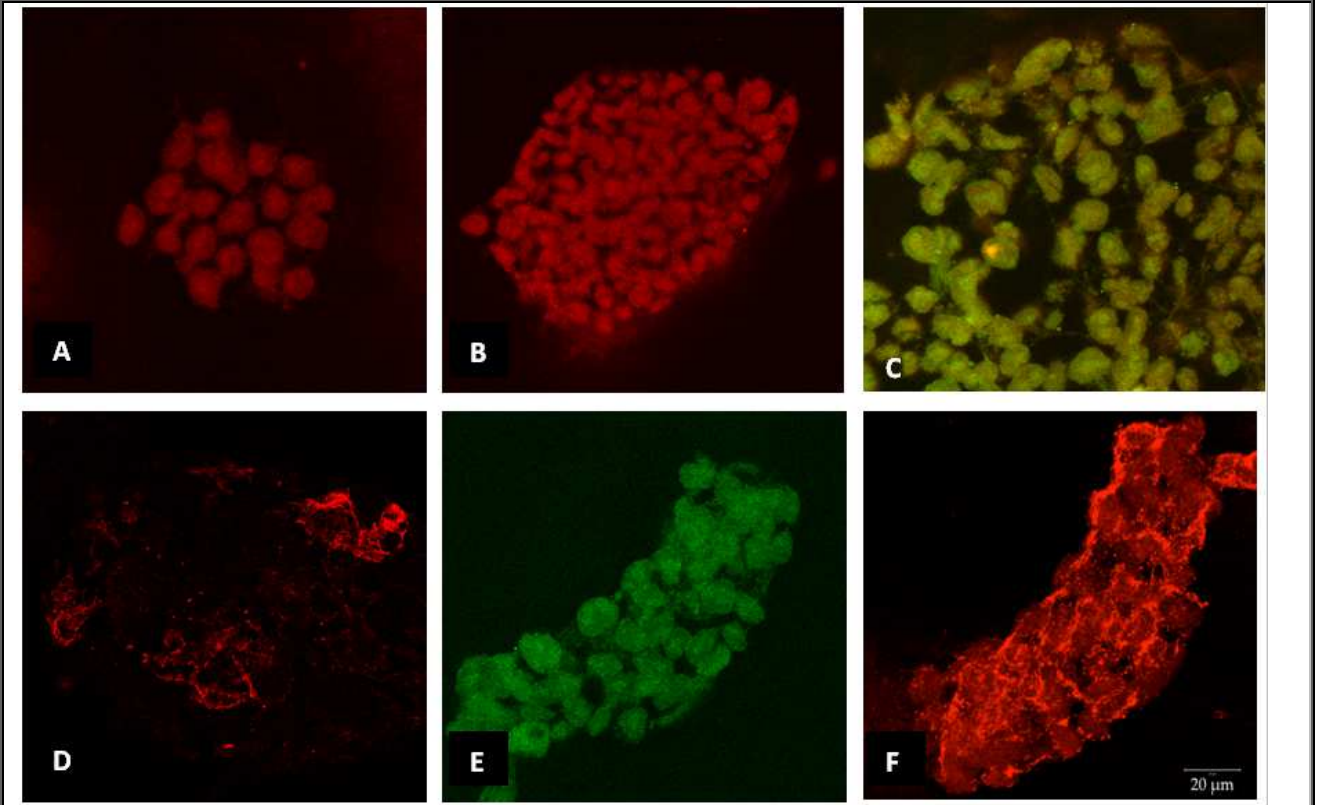
İkinci aşamada elde edilen saf uPK hücrelerini kolajen tip IV kaplı petrilerde kültüre edildi. Ayrıca bu hücrelerin kültürü için farklılaşma besiyeri (DM) kullanıldı. Bu süreçte hücrelerin morfolojik farklılaşması takip edildi. Bu aşamada hücreler kültür kaplarına tutunduktan sonra morfolojik değişiklik (yıldız şeklide) ortaya çıktı (şekil 5) Bu hücreler belirli bir konsantrasyonda (1.7×10^3 hücre/cm²) kültür edildi ve bu sürecin sonunda hücreler tamamen kültür kabını kapladı.



Şekil 5. Farklılaşmış uPKH hücrelerinin iki gün kültürden sonra inverted mikroskop görüntüsü (40X)

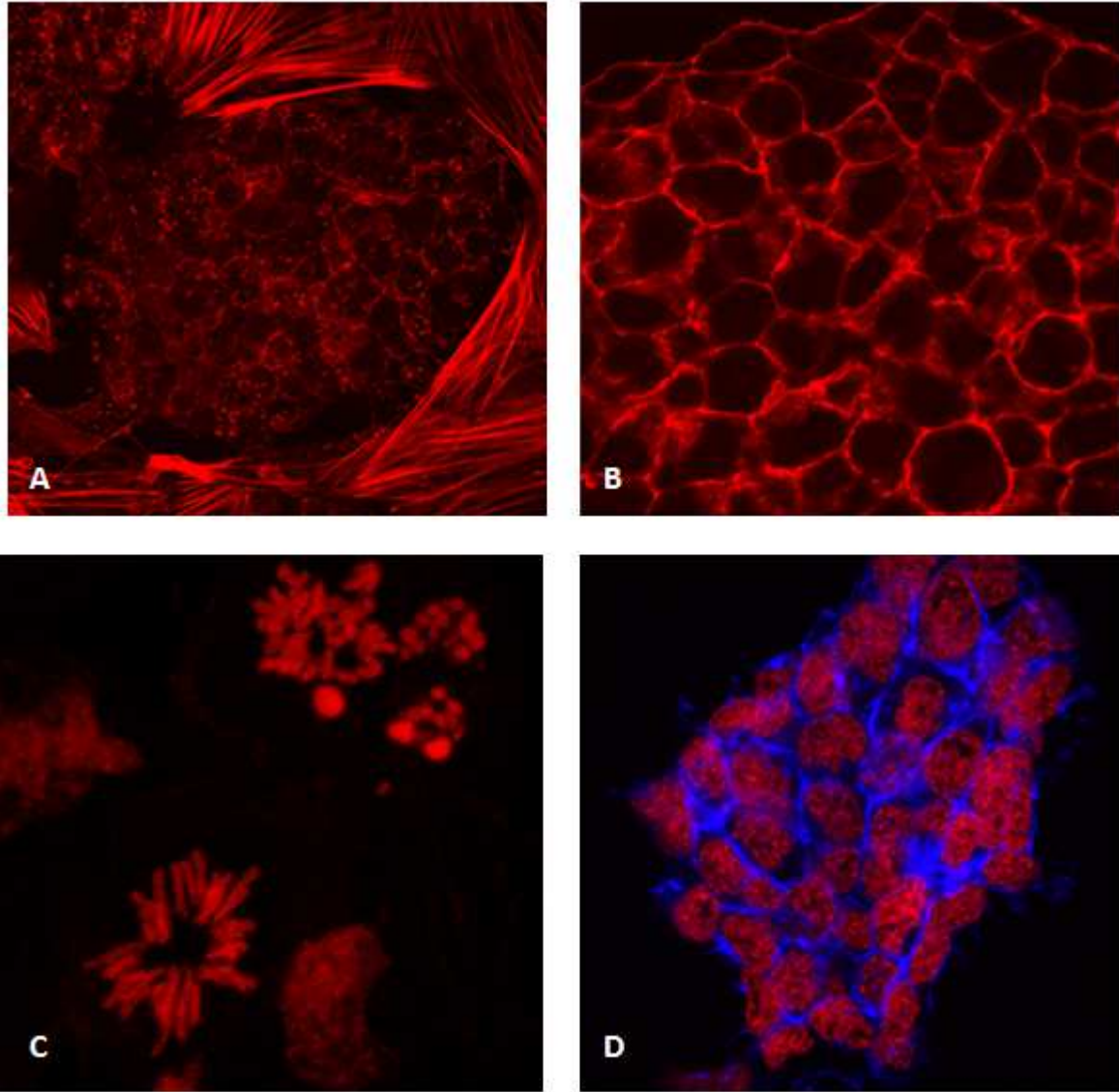
4.1.2.ELDE EDİLEN HÜCRELERİN İMMÜN KARAKTERİZASYON

uPK hücre hatlarının pluripotensi'si immün boyama sistemi ile karakterize edildi. Bu nedenle Oct3/4 ve SSEA1 primer antikoru ile boyama yapıldı ve sekonder antikor kullanarak bu hücreleri konfokal mikroskop altında görünür hale getirildi. Bu metotla hücrelerin uPK hücre özeliği gösterdikleri immün boyama ile doğrulandı. (Şekil 6)



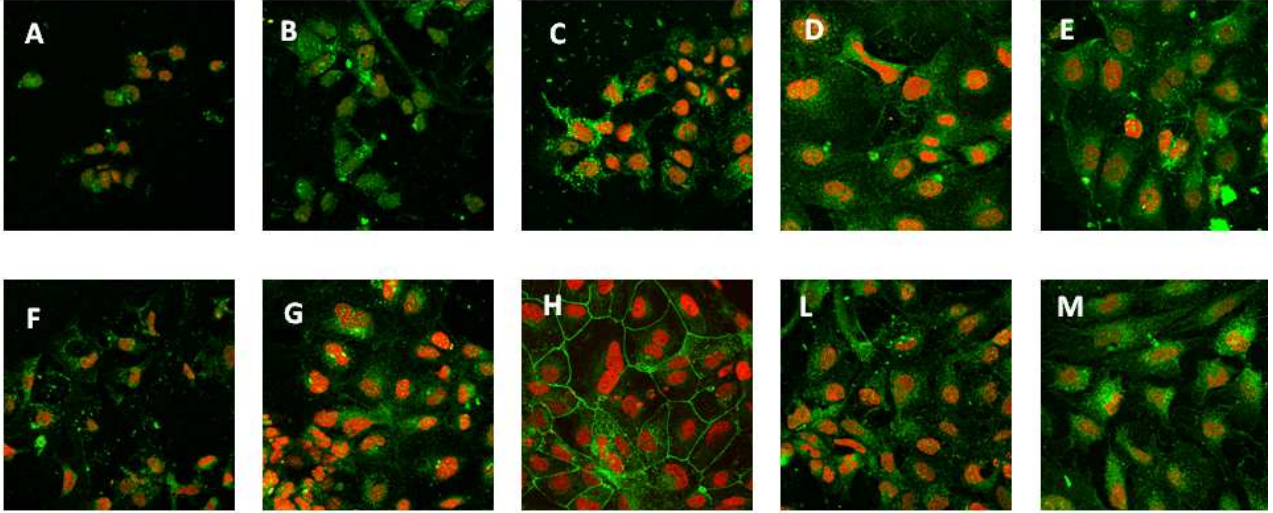
Şekil 6. uPKH 'lerin immün boyama yöntemiyle konfokal mikroskobu altında görüntüleri ve karakterizasyonu. A ve B) Oct4+ uPKH'ler (Singla-uPKH) C) Oct4+ ve GFP+ uPKH'ler (Yamanaka-uPKH) D) SSEA1+ uPKH'ler (Singla-uPKH)E)GFP+ uPKH'ler Yamanaka F) SSEA1+ uPKH'ler (Yamanaka-uPKH)

Ayrıca uPK hücrelerin ve bu hücrelerin oluşturduğu kolonilerin yapısını incelemek amacıyla Falloidin, cy5 ve 7-AAD kullanıp ve konfokal mikroskop altında incelendi (Şekil 6).



Şekil 7. uPKH 'lerin immün boyama yöntemiyle konfokal mikroskopu altında görüntüleri ve karakterizasyonu A-B) Falloidin-cy5 boyanmış uPKH'ler (Singla-uPKH) C)7-AAD çekirdek boyası ile boyanmış uPKH'ler (Singla-uPKH) D) Falloidin-cy5 ve 7-AAD çekirdek boyasının birlikte görüntüsü (20x)

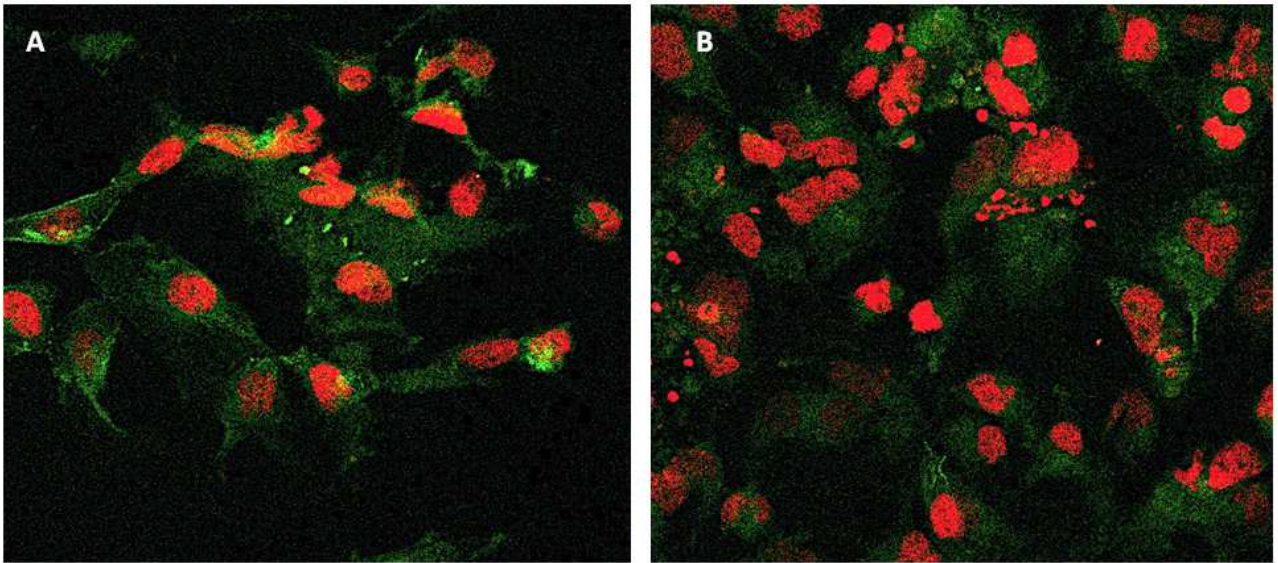
uPK hücrelerini Flk-1⁺ hücelere farklılaştırma sürecini incelemek amacıyla jelatin tip IV yuvarlak lammeler üzerinde ve farklılaştırma besiyeri ile saf uPK hücreleri kültür edildi ve 3.5 ta 7.5 günler arasında fikse edilen hücreler ve Flk1 antikoruna immün boyama karakterizasyonu yapıldı. Bu karakterizasyonda ilerleyen günlerde flk1 ifadesi (şekil 8 yeşil sinyal) çoğalmaya başladığını ve 5.5 günde pike ulaştığını tespit ettik. Bu deney paralel olarak her iki uPK hücre hattında yapıldı. Ayrıca bu deneyler sonucunda Flk1 hücre izolasyonu için 5.5 gün farklılaşmadan sonra en uygun gün olduğu tespit edildi.



Şekil 8. uPK hücrelerini Flk-1+ hücreleri farklılaştırmasının ilerleyen günlerde görüntüsü (yeşil signal hücreler ve kırmızı signal=DNA). 40 x with oil

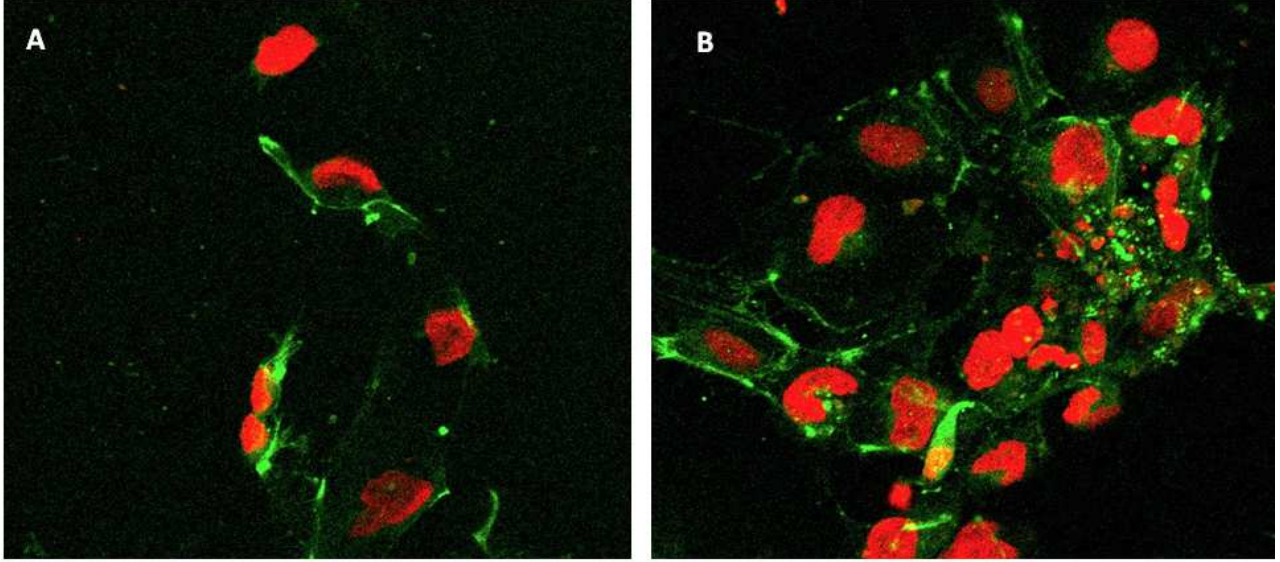
uPK hücrelerinin Flk1 hücrelerine farklılaşma aşamasında (farklılaşmanın 4.5 gününde) izole edilen Flk1+ hücreler kollajen tip IV kaplı kültür kaplarına aktarıldı ve tekrar VEGF veya PDGF içeren farklılaşma besiyerinde kültür edildi. Ayrıca flk1- hücrelerde PDGF içeren farklılaşma besiyerinde 2 gün boyu kültür edildi. İki gün sonunda tüm guruplardan örnekleri PFA fiksasyonu yaparak CD31 ve α SMA hücreleri görüntülemek için immün boyama yapıldı.

Şekil 9'de elde ettiğimiz CD31 hücreleri yeşil sinyalle görünmektedir. Bu deneyin sonucunda Flk1 hücrelerden VEGF içeren farklılaşma besiyeri kullanarak başarıyla CD31+ hücreler elde edildi.

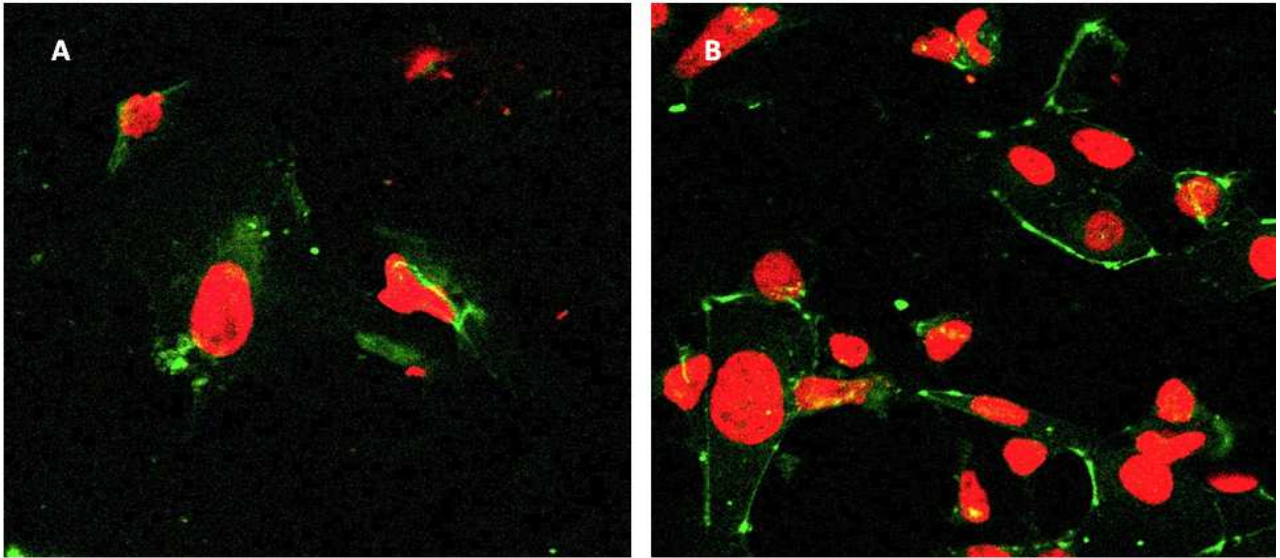


Şekil 9: Flk1+ hücreleri izole ettikten sonra 2 gün VEGF içeren besiyeri ile kültür edildikten sonra CD31+ hücrelere farklılaşır.

Şekil 10 da PDGF içeren farklılaşma besiyerini Flk1⁺ ve Flk1⁻ hücrelerde uygularken SMA⁺ hücrelerin elde edilmesi görüntülenmiştir. Her iki farklı hücre (Flk1⁻ ve Flk1⁺ hücreler) SMA⁺ hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir ancak Flk1⁺ hücrelerden elde edilen SMA⁺ hücrelerin yeşil sinyalinin fazla olması bu hücrelerin SMA⁺ hücrelere farklılaşma potansiyelinin daha yüksek olduğunu bir göstergesidir.



Şekil 10: Flk1⁺ hücreleri izole ettikten sonra 2 gün PDGF içeren besiyeri ile kültür edildikten sonra α SMA⁺ hücrelere farklılaşır



Şekil 11: Flk1⁻ hücreleri izole ettikten sonra 2 gün PDGF içeren besiyeri ile kültür edildikten sonra α SMA⁺ hücrelere farklılaşır

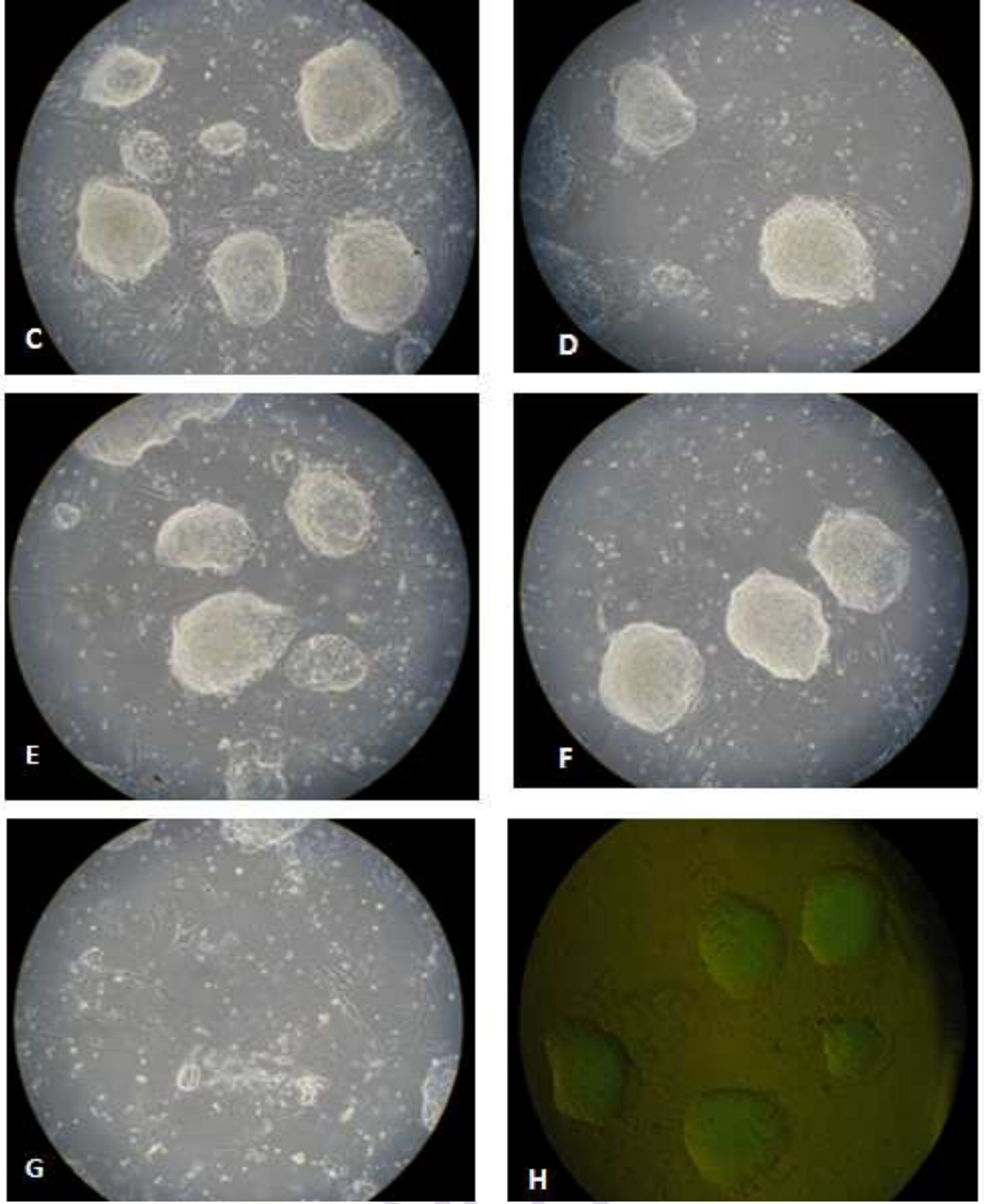
4.1.3. Elde edilen hücrelerin qRT-PCR Karakterizasyonu

4.2. Hücre izolasyonu

MEF hücrelerini elimine etmek için konsantrasyon optimizasyonunda Puromisin kültür ortamına ilave edildi ve etkisi mikroskop altında incelenerek görüntülenmiştir (tablo 4 ve şekil 12). Konsantrasyon oranları 1, 1.5, 2 $\mu\text{g/ml}$ olarak uygulandı. En iyi sonuç 2 $\mu\text{g/ml}$ ve 3. günde elde edildi. Puromisin uygulamasından sonra kalan uPKH hücreleri pasaj yapılarak MEF hücrelerinden uzaklaştırıldı. Böylelikle saf uPKH hücresi elde edilmiştir. Florida Üniversitesinden alınan uPKH hücrelerinde Puromisin direnç geni olmadığı için MEF hücreleri ile mikroeadler ve MACS sistemi ile yapılmıştır.

Tablo 4. puromisin-C uygulaması için (hücre izolasyonu) uygun konsantrasyon ve uygulama sürecinin ayarlaması

konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$ Zaman	Kontrol	1	1.5	2	2.5
1.gün	Normal çoğalma	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Etkili
2.gün	Normal çoğalma	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Etkili
3.gün	Normal çoğalma	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Etkili	Etkili



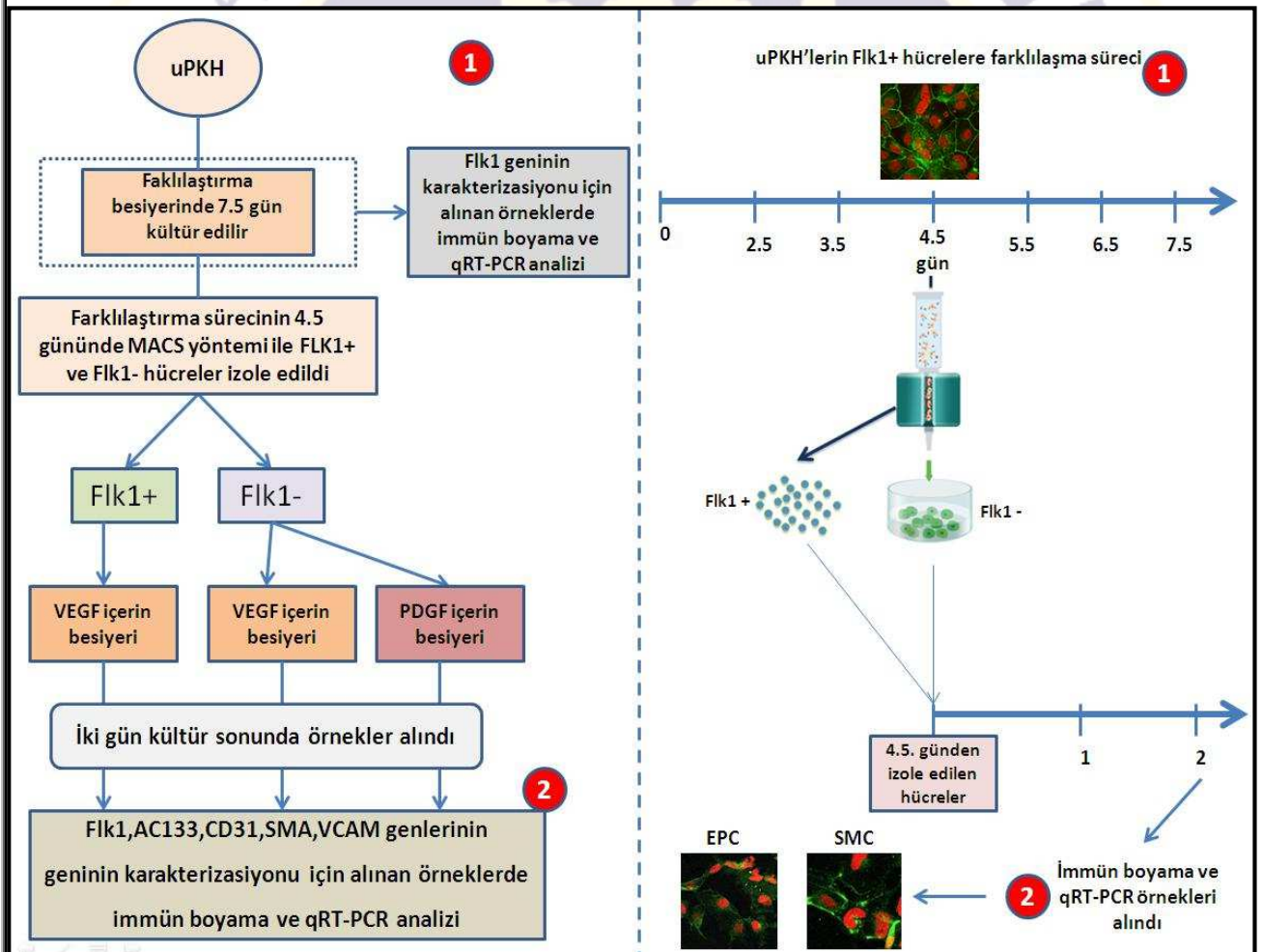
Şekil 12. Farklı konsantrasyonlar ve zamanlarda Puromisin uygulamalarından uPKH hücre ortamlarından görüntüler. A) Puromisin 0 ($\mu\text{g/ml}$) 3, gün (kontrol) B) Puromisin 1 ($\mu\text{g/ml}$) 3, gün (kontrol) C) Puromisin 1.5 ($\mu\text{g/ml}$) 3, gün (kontrol) D) Puromisin 2 ($\mu\text{g/ml}$) 3, gün (kontrol) E, F, G ve H) Puromisin 2.5 ($\mu\text{g/ml}$) 3, gün (kontrol)

4.5. Flk 1⁺ hücrelerinin gen ifade analiz sonuçları

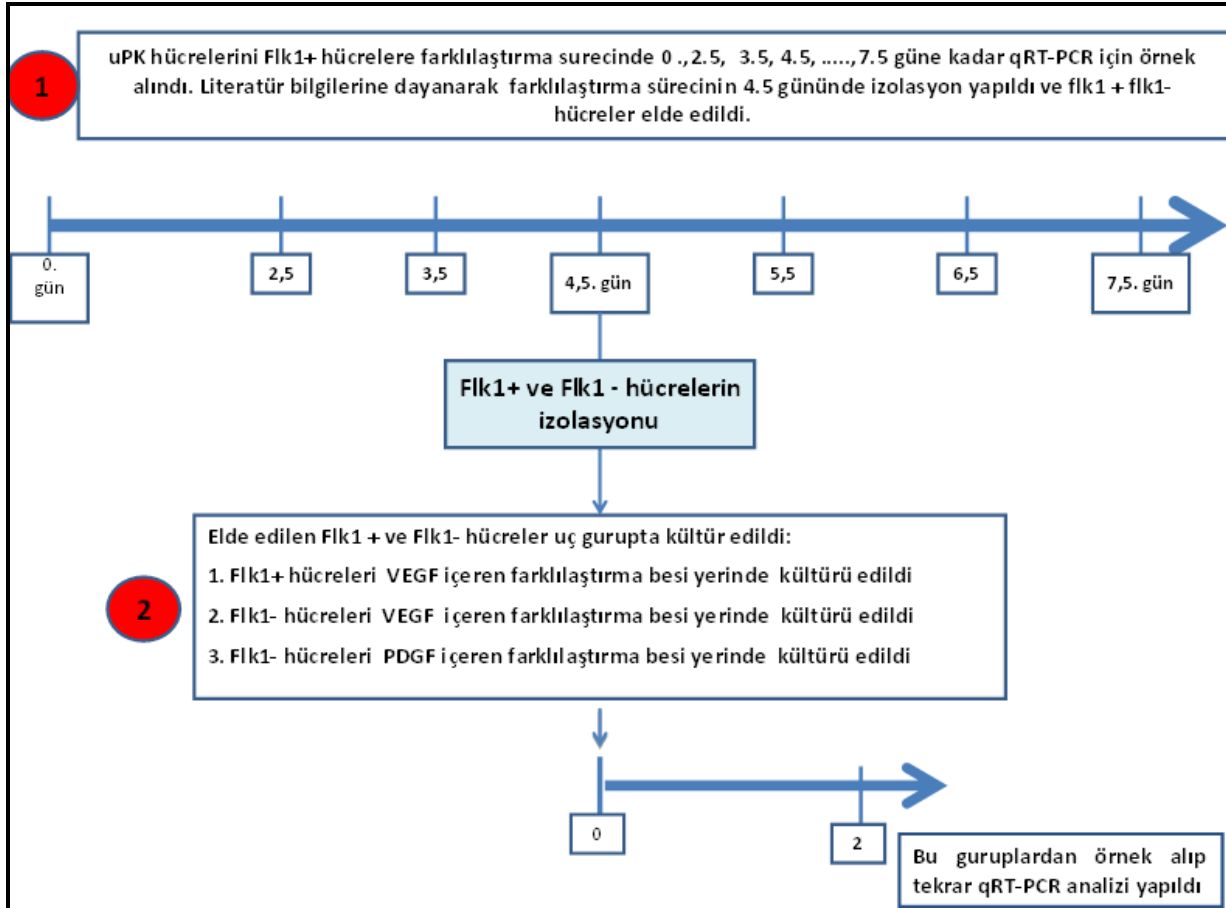
Şekil 13'e göre iki aşamada qRT-PCR örnekleri alındı.

-Birinci aşama uPKH'lerin Flk1⁺ hücelere farklılaşma sürecinde diğeri ise 4.5 günde izole edilen hüceleri tekrar farklı besiyerlerinde kültür ettikten sonra örnekler alındı ve RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar qRT-PCR analizlerinde kullanıldı.

- qRT-PCR sonuçların analizinde, kontrol gurup olarak ilk aşamada Saf uPKH'lerin gen ifade seviyeleri kullanıldı ve ikinci aşamada kontrol olarak 4,5 günün gen ifadesi seviyeleri kullanıldı. Ayrıca elde edilen verilerin güvenilirliği açısından literatüre dayanarak 2 farklı Housekeeping gen (**HPRT ve H2afz**) seçildi ve analizler yapıldı.



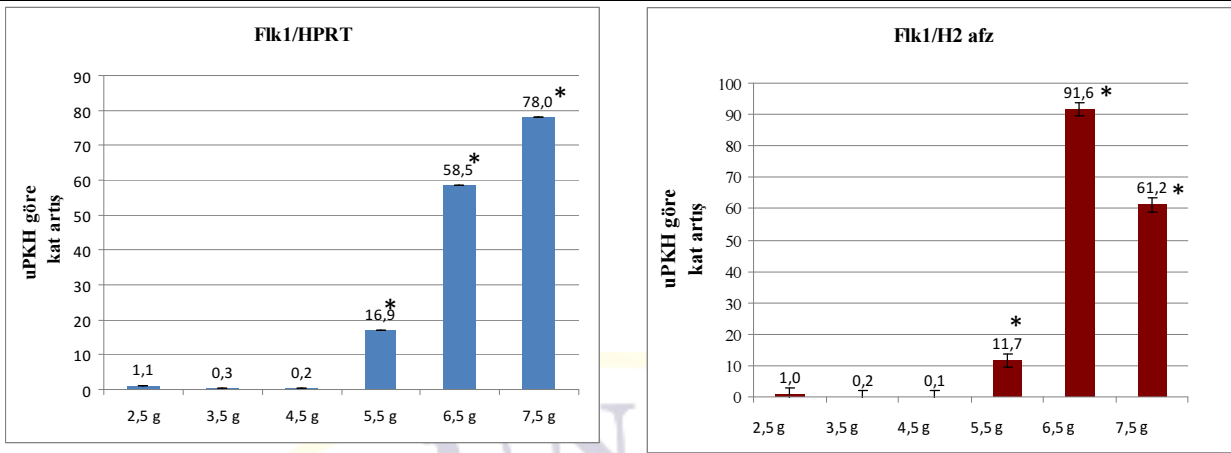
uPKH'lerin hücrelerin farklılaşması sürecinde gen ifade seviyeleri qRT-PCR ile tespit edildi. Belirlenen günlerde bakılan gen ifade sonuçları SPSS ve R programı ile analiz edildi. Bu analizlerin sonucunda Flk1⁺ hücrelerin farklılaşması sürecinde günler arasında anlamlı olan gen ifade seviyeleri tespit edildi.



Şekil 13. Projenin iki farklı aşamasında qRT-PCR deney akış sırası

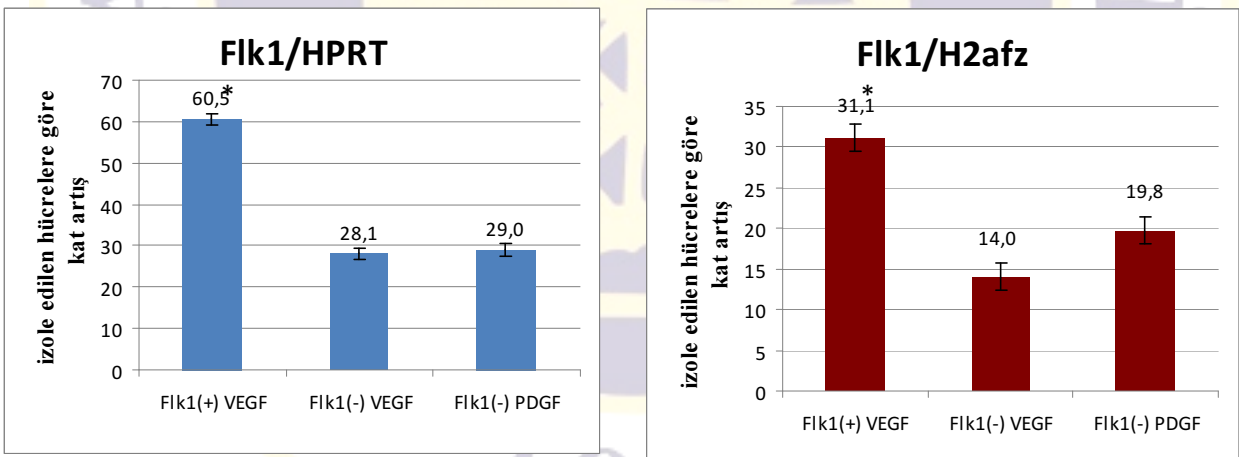
Farklılaşma sürecinde Flk1 geninin ifade seviyeleri

Bu verilere göre farklılaşan hücrelerde farklılaşmanın 4.5 günden itibaren flk1 geninin ifade seviyesi anlamlı olarak artmaya başlamış olup ve 6.5 günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 7.5 gün sonra ise azalmaya başlamıştır (Şekil 14).



Şekil 14. Farklılaşma sürecinde Flk1 geninin ifade seviyeleri

Farklılaştırmanın 4.5 gününde MACS sistemi ile izole edilen Flk1⁺ ve Flk1⁻ hücreler, 2 gün boyunca VEGF ve PDGF içeren besi yerlerinde kültüre edildi. VEGF ve PDGF içeren ortamlarda kültüre edilen bu hücrelerde Flk1 gen ifade seviyeleri tekrar analiz edildi. Sonuçlara göre Flk1⁺ hücreler, VEGF içeren besi yerinde kültüre edildiğinde, diğer iki guruba göre anlamlı derecede artış göstermektedir. Fakat Flk1⁻ hücreler VEGF ve PDGF içeren besiyerinde kültüre edildiğinde bu gen ifade seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 15).



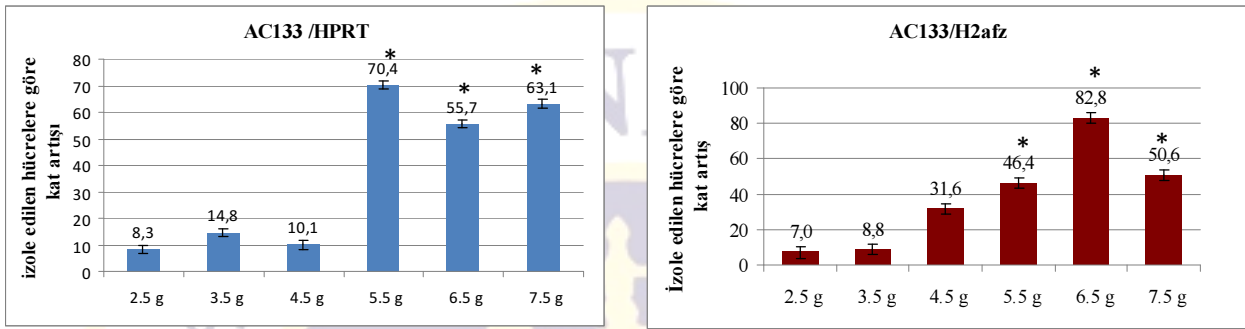
Şekil 15. Farklılaşmanın 4.5 gününde izole edilen Flk1⁺ ve Flk⁻ hücreler VEGF ve PDGF içeren besiyerinde 2 gün boyunca kültür ettikten sonraki Flk1 gen ifade analiz sonuçları

4.5. EPC HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

Endotelial öncül hücrelerin karakterizasyonu için CD31 ve Ac133 genlerinin ifade seviyeleri analiz edildi. Bu iki genin ifade seviyeleri iki aşamada yani, uPKH' den Flk1⁺ hücre geçiş sürecinde ve ikincisi Flk1 hücrelerden endotelial öncül hücrelere geçiş sürecinde incelendi.

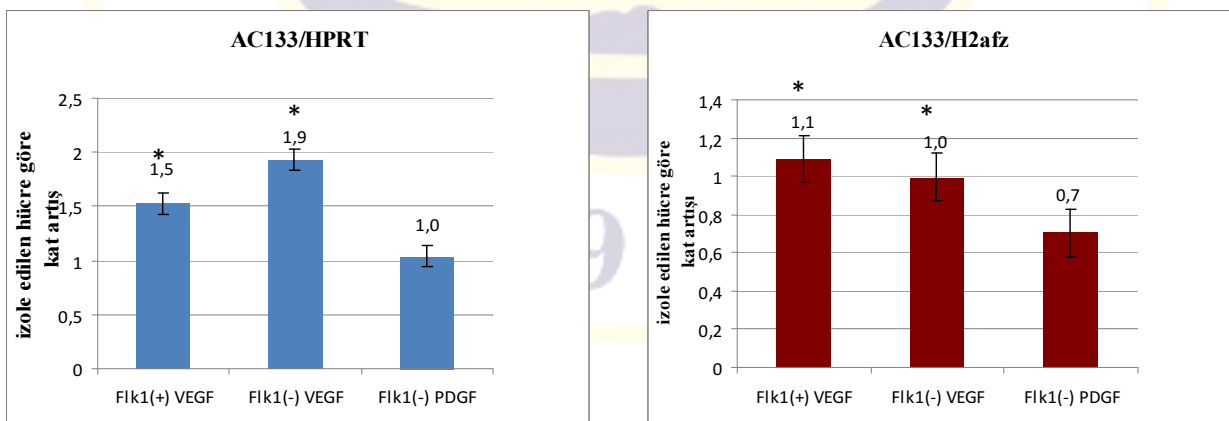
Farklılaşma sürecinde AC133 geninin ifade seviyeleri

Ac133 geninin ifade seviyesi uPKHden Flk1⁺ hücre geçiş sürecinde olan değişiklikler şekil 15 de özetlenmiştir. Şekil 16' da görüldüğü gibi AC133 gen ifade seviyesi 2.5 günde başlamakta ve 5.5 günde en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. 5.5, 6.5 ve 7.5 günlerde bu genin ifadesi anlamlı şekilde farklılık göstermektedir. AC 133 geninin ifade seviyesi uPKH' lere göre 70 kat artış göstermektedir.



Şekil 16. Farklılaşma sürecinde AC133 geninin ifade seviyeleri

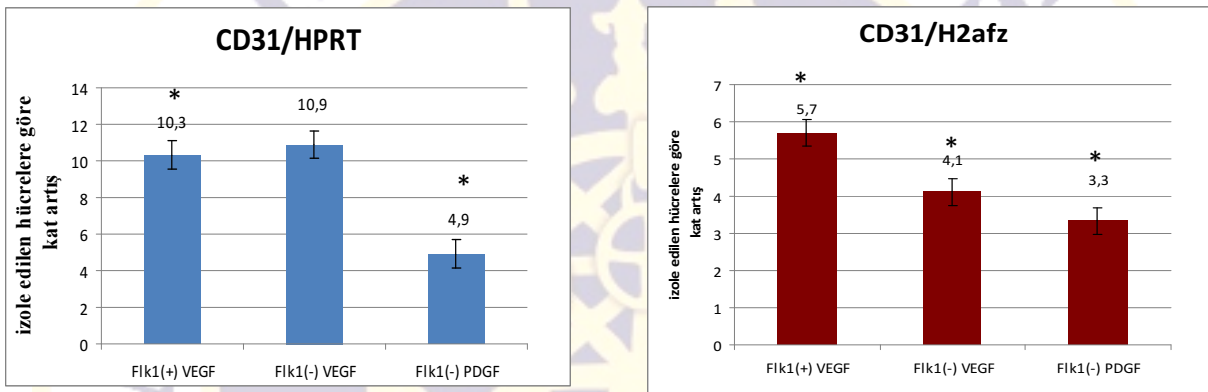
VEGF ve PDGF içeren ortamlarda kültüre edilen bu hücrelerde Flk1 gen ifade seviyeleri tekrar analiz edildi. 4.5 günde İzole edilen, Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler, 2 gün boyunca VEGF ve PDGF içeren besiyerlerinde kültüre edildi. AC133 gen ifade sonuçlarına göre, Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler, VEGF içeren besiyeri ile kültüre edildiğinde, bu genin ifadesi izole edilen güne göre (4.5 güne göre) sırayla 1.5 ve 2 kat daha artmıştır. Ayrıca Flk-1⁻ hücreler PDGF içeren besiyerinde kültür ettiğimizde gen ifade seviyesi farklılık göstermektedir ancak bu farklılık istatistik olarak anlamlı değildir. Bu genin ifade seviyeleri Şekil 17 de özetlenmiştir.



Şekil 17. Farklılaşmanın 4.5 gününde izole edilen Flk1⁺ ve Flk⁻ hücreleri VEGF ve PDGF içeren besiyerinde 2 gün boyunca kültür ettikten sonra AC133 gen ifade analiz sonuçları

Farklılaşma sürecinde CD31 geninin ifade seviyeleri

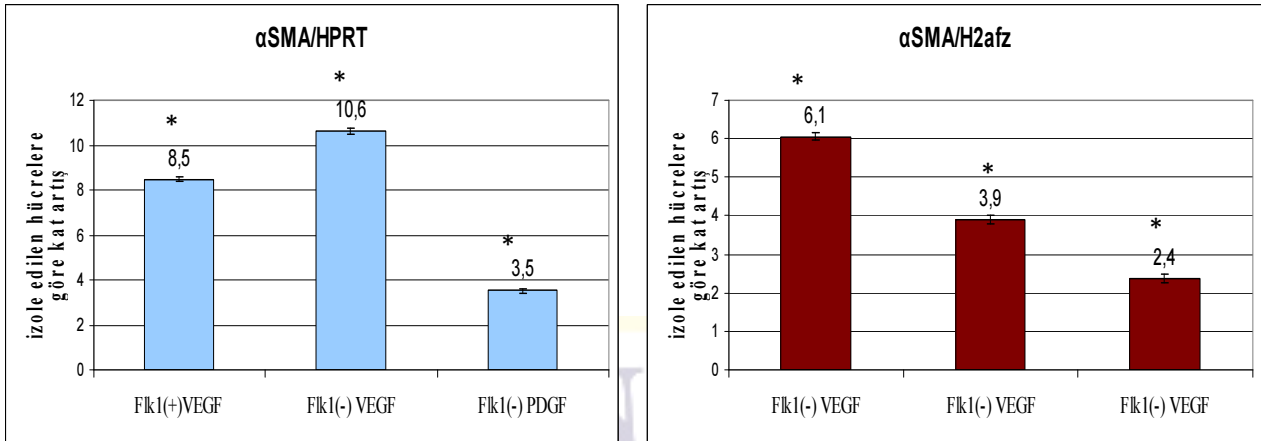
uPKHden Flk-1⁺ hücre geçiş sürecinde, CD31 geninin ifade seviyesinde değişiklik gözlenmemiştir. Fakat 4.5 günde izole edilen Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler VEGF ve PDGF içeren besiyerlerinde kültüre edildiğinde CD31 gen ifade seviyeleri farklılık göstermektedir. Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreleri izole ettikten sonra VEGF içeren besiyeri ile kültür ettiğimizde bu genin ifadesi 4.5 güne göre (izole edilen güne göre) sırayla 10 ve 11 kat artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca Flk-1⁻ hücreler PDGF içeren besiyerinde kültüre edildiğinde gen ifade seviyesi 4,5 güne göre anlamlı olarak farklılık göstermiştir. Bu genin ifade seviyeleri Şekil 18 de özetlenmiştir.



Şekil 18. Farklılaşmanın 4.5 gününde izole edilen Flk1⁺ ve Flk1⁻ hücreleri VEGF ve PDGF içeren besiyerinde 2 gün boyunca kültüre edildikten sonra CD31 gen ifade analiz sonuçları

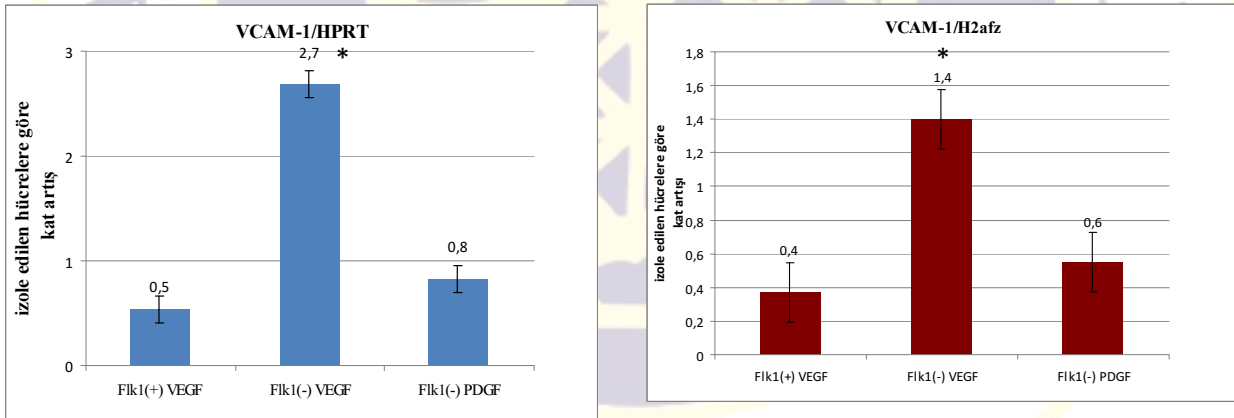
4.6. SMA⁺ (Düz kas hücreleri) HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

SMA⁺ hücrelerin karakterizasyonu için iki farklı genin ifade seviyeleri (α SMA ve VCAM) analiz edildi. 4.5 günden izole edilen Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler farklı besiyerlerinde (VEGF ve PDGF içeren) α SMA gen ifade seviyeleri farklılık göstermektedir. Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreleri izole ettikten sonra VEGF içeren besiyeri ile kültüre edildiğinde bu genin ifadesi 4.5 güne göre (izole edilen güne göre) sırayla 8.5 ve 10.5 kat artmıştır. Ayrıca Flk-1⁻ hücreler PDGF içeren besiyerinde kültüre edildiğinde gen ifade seviyesinde 4,5 güne göre anlamlı farklılık göstermiştir. Bu genin ifade seviyeleri Şekil 19'da özetlenmiştir.



Şekil 19. Farklılaşmanın 4.5 gününde izole edilen Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler VEGF ve PDGF içeren besiyerinde 2 gün boyunca kültüre edildikten sonra αSMA gen ifade analiz sonuçları

Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreleri izole ettikten sonra VEGF içeren besiyeri ile kültür ettiğimizde bu genin ifadesi 4.5 güne göre (izole edilen güne göre) VCAM gen ifade seviyeleri sadece Flk-1⁻ hücrelerde anlamlı olarak artmış ve 4.5 güne göre yaklaşık 3 kat artış göstermektedir. Ayrıca Flk-1⁻ hücreler PDGF içeren besiyerinde kültüre edildiğinde 4,5 güne göre gen ifade seviyesi farklılık anlamlı olarak bulunmamıştır. Bu genin ifade seviyeleri Şekil 20'de özetlenmiştir.



Şekil 20. Farklılaşmanın 4.5 gününde izole edilen Flk1⁺ ve Flk1⁻ hücreler VEGF ve PDGF içeren besiyerinde 2 gün boyunca kültüre edildikten sonra VCAM gen ifade analiz sonuçları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

uPKH hattından kritik bacak iskemi modelinde kullanmak üzere in vitro koşullarda endotelial öncül hücrelerin (EÖH) ve düz kas hücrelerinin üretilmesi amaçlanan bu projede,

Projenin ilk aşamasında yeterli miktarda uPKH elde edildi. İkinci aşamada bu hücrelerin karakterizasyonu (SSEA-1, OCT3/4 ve GFP sinyali ile) yapıldı. Üçüncü aşamada peromisin C ve MACS sistemi yardımı ile yeterli miktarda saf uPKH elde edildi. Bir sonraki aşamada elde edilen bu

hücreler farklılaşma besiyeri kullanarak Flk-1⁺ hücreler elde edildi. Bu aşamada MACS sistemi kullanarak başarıyla Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücre izole edildi. Farklılaştırma sürecinde her gün qRT-PCR ve immün boyama örnekleri alındı ve analiz edildi. Literatüre dayanarak farklılaştırmanın 4.5 gününde Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler izole edildi. İzole edilen bu iki tip hücre VEGF içeren ve PDGF içeren besiyerlerinde iki gün boyunca kültüre edildi. İki gün sonra tüm guruplardan immün boyama ve qRT-PCR için örnekler alındı. Bu aşamalar bildikten sonra elde edilen veriler istatistik analizler tabi tutuldu.

Sonuçlara göre uPKH'lerden başarıyla (Flk1⁺, CD31⁺, AC133⁺) endotelial öncül hücreler elde edildi. Bu hücrelerin karakterizasyonu için immün boyama ve qRT-PCR deneyleri yapıldı. Ayrıca projemizde planlanan düz kas hücreleri farklı aşamalarda elde edildi. Bu hücrelerin düz kas hücre oldukları (α SMA⁺, VCAM⁺) immün boyama ve qRT-PCR deneyleri ile tespit edildi. **Bu proje kapsamında anjiogenez ve revaskülarizasyonda en önemli rol oynayan endotelial öncül hücre ve düz kas hücreleri, fare uPKH'lerinden farklılaştırılarak elde edilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin izolasyonu için farklılaşma sürecinde en uygun gün, farklı yöntemler ile tespit edilip ve bu konularda da literatürlere katkıda bulunulmuştur.**

Elde edilen EÖH'in ve düz kas hücrelerinin sıçanlarda oluşturulan bacak iskemisi modeline uygulanmasıyla bu hücrelerin onarım etkilerinin incelenmesi mümkün olacaktır. Böylelikle, EÖH'in in vivo olarak pratikte kullanım potansiyelleri ve iskemi modelinde anjiyogenezdeki etkinlikleri tespit edilecektir.

Proje aşağıda belirtilen aşamalarda planlanmıştır:

- 1) uPK hücrelerin çoğaltılması ve karakterizasyonu,
- 2) uPK hücrelerin in vitro koşullarda Flk-1⁺ hücrelere farklılaştırılması,
- 3) Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücrelerin izolasyonu
- 4) Elde edilen hücreleri EPC ve SMA hücrelerine farklılaştırılması
- 5) Elde edilen hücrelerin fare bacak iskemisi modelinde uygulaması

Projenin 1., 2., 3. ve 4. aşamaları başarıyla gerçekleştirildi. Ancak aşağıda belirtilen nedenlerden dolayı 5. aşaması gerçekleştirilememiştir:

- Projemizin 4. aşamasında hücre izolasyonu için FACS sistemi ön görülmüştür ancak bu metodla hücre izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle hücrelerin izolasyonu için MACS sistemi ve özel mikrobeadler kullanılmıştır. Bu sistemin kullanılması da ek malzeme kullanımı gerektirmiştir.

- Bu metodla elde edilen hücreler EPC ve SMA hücrelere farklılaştırılmıştır. Ancak projenin 5. aşamasının gerçekleştirilebilmesi için daha fazla MACS kitine ihtiyaç duyulmuştur.
- Elde edilen Flk-1⁺ hücre sayısı % 25'e ulaşmıştır. Bu oran dikkate alındığında fare bacak iskemisi modelinde kullanılmak üzere yeterli hücre sayısını elde edebilmek için ek malzeme gereği ortaya çıkmıştır. Bu malzemelerin temini için bir ek liste ve dilekçe (2560 numaralı) hazırlanarak 26 Aralık 2011 tarihinde BAP'a sunulmuştur. Ancak önerilen ek malzeme talebi kabul görmemiştir. Bu nedenle projenin 5. ve son aşaması gerekli malzemelerin sağlanamaması nedeniyle gerçekleştirilememiştir.



6. GELECEĞE İLİŞKİN ÖNGÖRÜLEN KATKILAR

Son on beş yıl içerisinde kök hücre ve hücrel tedavilerin giderek yaygınlaşması ve erken dönem sonuçlarının gözlemleri, bu teknolojinin gelecekte kardiyovasküler sistemde uygulanabileceği görüşünün benimsemesine yol açmıştır. Kök hücre teknolojisi uygulamalarının, günümüzde çözüm bekleyen kas hasarının veya hastalık süreçlerinin doğal tabiatını değiştirme potansiyeli vardır. Bu amaçla şimdi ve gelecekte yapılacak çalışmalar arasında, uPKH'lerinden üretilmiş EÖH ve düz kas hücrelerin kardiyak yenilenmede fonksiyonel ve moleküler olarak özelliklerinin araştırılması hedeflenmektedir.

7. SAĞLANAN ALTYAPI OLANAKLARI İLE VARSA GERÇEKLEŞTİRİLEN PROJELER

Projede alt yapı destek alınmamıştır.

8. SAĞLANAN ALT YAPI İLE VARSA BİLİM/HİZMET VE EĞİTİM ALANLARINDAKİ KARAKTERLERİ

Projede alt yapı destek alınmamıştır.

9. KAYNAKLAR

1. MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292(5819):154–156.
2. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981; 78(12):7634–7638.
3. Thomson, J. Itskovitz-eldor, s. S. Shapiro et al., Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, Science 1998, 282, 1145-1147; G. VOGEL, Harnessing the Power of Stem Cells, Science 1999, 283, 1432-1434.
4. Takahashi, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. (2006). Cell 126, 663–676.
5. Frederic Deschaseaux, Zohair Selmani, Pierre-Emmanuel Falcoz, Nursen Mersin, Nicolas Meneveau, Alfred Penfornis, Colette Kleinclauss, Sidney Chocron, Joseph-Philippe Etievent, Pierre Tiberghien, Jean-Pierre Kantelip, Siamak Davan, Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors, European Journal of Pharmacology 562 (2007) 111–11
6. Junying Yu, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane,1Shulan Tian,3JeffNie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, James

- A. Thomson. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *SCIENCE*: 318, 1917-1920
7. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(15):5856-61.
8. René Maehr, Shuibing Chen, Melinda Snitow, Thomas Ludwig^b, Lisa Yagasaki, Robin Goland, Rudolph L. Leibel, Douglas A. Melton. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. 2009, *PNAS*: 106, 15768–15773.
9. John T. Dimos, Kit T. Rodolfa, Kathy K. Niakan, Laurin M. Weisenthal, Hiroshi Mitsumoto, Wendy Chung, Gist F. Croft, Genevieve Saphier, Rudy Leibel, Robin Goland, Hynek Wichterle, Christopher E. Henderson, Kevin Eggen.
10. In-Hyun Park, Natasha Arora, Hongguang Huo, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Akiko Shimamura, M. William Lensch, Chad Cowan, Konrad Hochedlinger, and George Q. Daley. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. 2008, *Cell* 134, 877–886
11. Jacob Hanna, Styliani Markoulaki, Patrick Schorderet, Bryce W. Carey, Caroline Beard, Marius Wernig, Menno P. Creighton, Eveline J. Steine, John P. Cassidy, Ruth Foreman, Christopher J. Lengner, Jessica A. Dausman and Rudolf Jaenisch. Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes to Pluripotency. 2008, *Cell* 133, 250–264
12. Eminli Sarah; Foudi Adlen; Stadtfeld Matthias; Maherali Nimet; Ahfeldt Tim; Mostoslavsky Gustavo; Hock Hanno; Hochedlinger Konrad. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. 2009: *Nature genetics* 41(9):968-76.
13. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*. 18(12):890-4
14. Takashi Aoi, Kojiro Yae, Masato Nakagawa, Tomoko Ichisaka, Keisuke Okita, Kazutoshi Takahashi, Tsutomu Chiba, Shinya Yamanaka. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. (2008), *Science* 321, 699-702
15. Jeong Beom Kim, Holm Zaehres, Guangming Wu, Luca Gentile, Kinarm Ko, Vittorio Sebastiano, Marcos J. Araúzo-Bravo, David Ruau, Dong Wook Han, Martin Zenke & Hans R. Schöler. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. 2008, *Nature* 454, 646-650
16. C. Freund, R.P. Davis, K. Gkatzis, D. Ward-van Oostwaard, and C.L. Mummery. The first reported generation of human induced pluripotent stem cells (iPS cells) and iPS cell-derived cardiomyocytes in the Netherlands. *Neth Heart J*. 2010, 18(1): 51–5

17. Jianhua Zhang, Gisela F. Wilson, Andrew G. Soerens, Chad H. Koonce, Junying Yu, Sean P. Palecek, James A. Thomson, Timothy J. Kamp. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res.* 2009; 104:e30-e41.
18. Genta Narazaki, Hideki Uosaki, Mizue Teranishi, Keisuke Okita, Bongju Kim, Satoshi Matsuoka, Shinya Yamanaka, Jun K. Yamashita, Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation.* 2008; 118:498-506.
19. Koji Yamamoto, Takahisa Kondo, Satoshi Suzuki, Hideo Izawa, Masayoshi Kobayashi, Nobuhiko Emi, Kimihiro Komori, Tomoki Naoe, Junki Takamatsu, Toyoaki Murohara. Molecular Evaluation of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Ischemic Limbs Therapeutic Effect by Stem Cell Transplantation. 2004, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;24:e192– e196
20. Satoshi Shintani, Toyoaki Murohara, Hisao Ikeda, Takafumi Ueno, Ken-ichiro Sasaki, Junli Duan, Tsutomu Imaizumi. Augmentation of Postnatal Neovascularization With Autologous Bone Marrow Transplantation. 2001, *Circulation*; 103: 897-903.
21. Qizhou Lian, Yuelin Zhang, Jinqiu Zhang, Hua Kun Zhang, Xingang Wu, Yang Zhang, Francis Fu-Yuen Lam, Sarang Kang, Jian Chuan Xia, Wing-Hong Lai, Ka-Wing Au, Yen Yen Chow, Chung-Wah Siu, Chuen-Neng Lee, Hung-Fat Tse. Functional Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Limb Ischemia in Mice. 2010, *Circulation.* 121:1113-1123.
22. Atike Tekeli, Selim Isbir, Koray Ak, Ali Civelek, Yasar Birkan, Taylan Adademir, Nazan Atalan, Sinan Arsan. Aneurysm of the popliteal artery: case report. 2007. *Marmara Medical Journal*;20(2);114-117
23. Juliane Eggermann, Stefanie Kliche, Gergely Jarmy , Karin Hoffmann , Ulrike Mayr- Beyrle, Klaus-Michael Debatin, Johannes Waltenberger, Christian Beltinger. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro:
24. Christina Mauritz; Kristin Schwanke; Michael Reppel; Stefan Neef; Katherina Katsirntaki; Lars S. Maier; Filomain Nguemo; Sandra Menke; Moritz Haustein; Juergen Hescheler; Gerd Hasenfuss; Ulrich Martin. Generation of Functional Murine Cardiac Myocytes From Induced Pluripotent Stem Cells. 2008;*Circulation.* 118:507-517.)
25. Zhengli Hu; Fumin Zhang; Zhijian Yang; Naiquan Yang; Dingguo Zhang; Jinying Zhang; Kejiang Cao. Combination of simvastatin administration and EPC transplantation enhances angiogenesis and protects against apoptosis for hindlimb ischemia. 2008; *J Biomed Sci* 15.509–517
26. Tomono Takahashi, Christoph Kalka, Haruchika Masuda, Donghui Chen, Marcy Silver, Marianne Kearney, Meredith Magner, Jeffrey M. Isner & Takayuki Asahara. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. 1999; *Nature Medicine* 5, 434 - 438

- a. Mali Bilanço ve Açıklamaları
- b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar
- c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar (varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)
- d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

1. **TERMIS –AM conference 10-13novamner 2013 atlanta.** Mohammad Reza Dastouri, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Alp Can, Ahmet Rüçhan Akar. In Vitro Generation of endothelial progenitor cells differentiated from mouse Induced Pluripotent Stem Cells. (Poster presentation)
2. **14th Congress of Asian Society for Vascular surgery, Istanbul, Turkey on October 26-29, 2013.** Mohammad Reza Dastouri, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Alp Can, Ahmet Rüçhan Akar Endothelial Progenitor Cell Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells in vitro for critical limb ischemia. (Poster presentation)
3. **Second Symposium on Stem Cells. 29 November 2012.** Mohammad Reza Dastouri, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Ahmet Rüçhan Akar, Alp Can. Characterization of Flk1+ cells derived from ips cells. (Oral presentation)
4. **XII Turkish National Congress of Cardiovascular Surgery, 27-31 October 2012 Antalya / Turkey.** Mohammad Reza Dastouri, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Alp Can, Ahmet Rüçhan Akar. Flk1+ cells derived from ips cells as a endothelial progenitor cells (oral presentation)

- e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı Projeleri için uygulanmaz)**

Tez konusu: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Anjiyojenik Etkilerini Etkilerinin Akut Bacak İskemisinde Araştırılması

1946