

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

***İN VİTRO* KOŞULLARDA UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERDEN
ENDOTELYAL ÖNCÜL VE DÜZ KAS HÜCRELERİNİN
FARKLILAŞTIRILMASI**

Mohammadreza DASTOURI

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ahmet Rüçhan AKAR

Ocak

2016

i

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Mohammadreza DASTOURI

İmzası

ONAY

Prof. Dr. A. Rūçhan AKAR danışmanlığında Mohammadreza DASTOURI tarafından hazırlanan bu çalışma 03/ 02 /2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ferit AVCU

İmza:

Üye: Prof. Dr. A. Rūçhan AKAR

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Duygu UÇKAN

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

***In vitro* koşullarda Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerden Endotelial Öncül ve Düz Kas Hücrelerinin Farklılaştırılması**

Mohammadreza DASTOURI

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Ahmet Rüçhan AKAR

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. Endotel progenitor 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 progenitor hücreleri farklı kaynaklardan elde edilmesi ve bu hücreleri rejeneratif tıp alanında kullanması birçok bilim insanının ilgisini çekmiştir. Embriyonik kök hücrelerden endotelial progenitor 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.

Bu tezde, son dönemde geliştirilen uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler kullanılarak ilk aşamada, Flk1⁺ öncül hücreler elde edildi. Çalışmamızda bu hücrelerin izolasyonu için en uygun zamanı (5.5. gün) belirlemek amacıyla 10 farklı genin ifade seviyeleri değerlendirildi. İkinci aşamada, izole edilen hücreler iki farklı hücre grubuna yani endotelial öncül hücrelere (CD31⁺, AC133⁺) ve düz kas hücrelerine (α SMA⁺) farklılaştırıldı. Buna ek olarak elde edilen EÖH'lerin Arterial ve venöz endotel hücrelere farklılaşma potansiyeli ve bu hücrelerin belirteçleri olan EphrinB2 ve VCAM genlerinin

ifade seviyelerinin artışı ile değerlendirildi. Farklılaştırma süreçinde elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için gen ifade analizleri 11 farklı gen ifadesi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçların validasyonu için protein ifade analaizleri farklılaştırmanın her aşamasından western blot analizi yapıldı. Bu projede damar oluşumunda (anjiogenezis ve revaskülarizasyon) nemli rol oynayan iki hücre grubu *in vitro* koşullarda üretildi ve bu hücrelerin endotelial ve düz kas hücrelerine dönüştükleri günümüzün gelişmiş teknolojik metotlarıyla başarıyla üretilip karakterize edildi.

Yıl 2016, 160sayfa

Anahtar kelimeler: Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPK), endotelial öncül hücreler (EH), Düz Kas Hücre(DKH)



ABSTRACT

PhD Thesis

In vitro Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells to Endothelial progenitor and Smooth muscle Cells

Mohammadreza DASTOURI

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Ahmet Rüşhan AKAR

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) succesfully. We concluded that optimal time for harvesting Flk-1⁺ cells on by MACS was is day 5.5 of initial differentiation. Following isolation of Flk-1⁺ progenitor cells they were further matured into CD31⁺/CD133⁺ cells and smooth suscle cells (SMA⁺) within 4 days of

induction. In addition, we evaluated differentiation potential of these EPCs to the arterial and venous endothelial cells by the increase in ephrin B2 and VCAM gene expression levels as marker of arterial and venous markers. 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.

Year 2016, 160 pages

Keywords: Induced pluripotent stem cells (iPSc), endothelial progenitor cells (EPCc), smooth muscle cell(SMC)

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimimin başından sonuna kadar desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip Yoğun iş temposuna rağmen, bana zaman ayıran, eleştirilerini, fikirlerini ve güvenini benden esirgemediği için, attığım her adımda arkamda olup, her konuda desteklediği için değerli Hocam Prof. Dr Ahmet Rüçhan AKAR'a,

Tezin oluşturulması sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni her zaman yönlendiren, bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, hiçbir zaman manevi desteğini eksik etmeyen, hayatımın önemli anlarında desteğini her zaman hissettiğim değerli Hocam Prof Dr Alp CAN ve Prof. Dr Hilal ÖZDAĞ'a

Bilimselliğini, yapıcı ve yaratıcı düşünme şekli ile davranışlarını örnek almaya çalıştığım, emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım, bilimin ve hayatın zorlu yollarında yanımda olarak herkesten şanlı bilim insanları olmamızı sağlayan, sonsuz sevgisi, şevkati ve sabrı için değerli Hocam Prof Dr Aykut ÖZKUL'e,

Değerli katkıları ve fikirlerini paylaşan, yardımlarını esirgemeyen, Sayın Hocam Yrd Doç. Arzu ATALAY'a

Çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım, hayatımın son 10 yılını beraber geçirdiğim, her anında yanımda olan varlıklarıyla mutluluk, kişilikleriyle, güzel kalpleriyle gurur duyduğum, Dr Aynur KARADAG, Dr Deniz BALCI, Dr Semih DALKILIÇ DR Tülin ÖZKAN, Uzm Ali Emre AKPINAR, Dr Buket ALTINOK, Dr Nevin BELDER, Dr. Duru ARAS, Uzm. Alp AYDOS'a

Tez çalışmamı 10B0216001 nolu proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi BAP'a,

Ayrıca, her adımda yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim aileme özellikle kaybettiğim ANNEME, BABAMA ve.....,

Sonsuz teşekkür ederim



Annem ve Babam

Azize HASANALİZADEH ve Hasan DASTOURİ'ye

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	II
ONAY	III
ÖZET	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ABSTRACT	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
TEŞEKKÜR	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İÇİNDEKİLER	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XX
SİMGELER DİZİNİ	XXI
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR	3
2.1.1.1. ARTERYAL DAMAR HASTALIKLARI	3
2.1.1.2. KRİTİK BACAK İSKEMİSİ	3
2.1.1.3. MİYOKARDİYAL ENFARKTÜS VE FONKSİYON KAYBI.....	4
2.2. ANJİYOGENEZ VE VASKÜLOGENEZ:	6
2.2.1. ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER:	7
2.2.1.1. VASKÜLER ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER:	8
2.2.1.1.1. Endotelial hücre belirteçleri:	8
2.2.1.1.2. Endotelial hasar:	12

2.2.1.1.3. Hasarlı Endotel Hücrelerin Endotelial Öncül Hücrelerle Onarımı:.....	13
2.2.1.2. DÜZ KAS HÜCRELERİ:	16
2.2.1.2.1. Vasküler Düz Kas Hücreler:.....	16
2.2.1.2.2. Düz Kas Hücrelerinin Belirteçleri:.....	18
2.2.1.2.3. Düz Kas Hücrelerinin Damar Oluşumunda Rolü:.....	19
2.2.1.3. HÜCRE ADEZYONUNDA ÖNEMLİ OLAN PROTEİNLER:	20
2.3. KÖK HÜCRELER.....	21
2.3.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİ	24
2.3.2. UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELER	26
2.3.2.1. Farklı Hücre Kaynaklarından uPK Hücrelerinin Elde Edilmesi	27
2.3.2.2. Yamanaka Faktörleri:.....	28
2.3.2.3. uPKH'lerin Avantaj ve Dezavantajları.....	32
2.3.2.4. Klinikte kullanılabilir uPK hücre elde etme yöntemleri.....	33
2.3.2.5. uPK Hücrelerin Klinikte Kullanımı	35
2.3.2.5.1. Upk Hücrelerin Kardiyovasküler Rejenerasyon Potansiyeli Ve Hücre Tedavide Kullanılması.....	38
2.3.2.5.2. uPK hücrelerden kardiyovasküler hastalık modellerinin oluşturulması (farmakolojik ve toksikolojik)	41
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>44</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>46</u>
4.1. MATERYAL	46
4.1.1. HÜCRE HATLARI.....	46

4.1.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI VE DONDURULMASI İÇİN KULLANILAN MALZEMELER.....	46
4.1.3. FİKSASYONDA KULLANILAN SOLÜSYONLAR.....	47
4.1.4. İMMÜNOFLORESAN İŞARETLENMESİNDE KULLANILAN MALZEMELER 47	
4.1.5. GÖRÜNTÜLEME	48
4.1.6. GEN İFADE ANALİZİ.....	48
4.1.6.1. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler.....	48
4.1.6.2. RNA'ların Kalite Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler.....	49
4.1.6.3. cDNA Sentezi.....	49
4.1.6.4. Eş-Zamanlı PZR (Kantitatif Real Time-PCR)	49
4.1.7. İMMÜNBLOTLAMA (WESTERN BLOT)	50
4.1.7.1. Protein İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler.....	50
4.1.7.2. Protein Miktar Tayini (Bradford Assay)	50
4.1.7.3. SDS Poliakriamid Jel Elektrofrezisi	50
4.1.7.4. Protein Transferi.....	51
4.1.7.5. Membrandaki Proteinlerin İmmünolojik Olarak Tespiti.....	51
4.2. YÖNTEM	52
4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	52
4.2.1.1. FEF Hücreleri.....	52
4.2.1.2. uPK Hücreleri.....	54
4.2.2. HÜCRE FARKLILAŞTIRMA ÇALIŞMALARI	57

4.2.2.1.	uPKH Hücrelerin Farklılaşması:	57
4.2.2.1.1.	uPKH Hücrelerinin Flk1+ Hücelere Farklılaştırması (1. Aşama).....	57
4.2.2.1.2.	Flk1 ⁺ Ve Flk1 ⁻ Hücrelerini EÖH Ve DKH'lere Farklılaştırması (2. Aşama).....	58
4.2.3.	SAF UPKH VE FARKLILAŞTIRILMIŞ HÜCRE İZOLASYONU	61
4.2.3.1.	Promisin Yardımıyla Saf uPK Hücrelerin Elde Edilmesi	61
4.2.4.	UPKH HÜCRELERİNİN FEF HÜCRELERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI:	61
4.2.4.1.	MACS Sistemi İle Hücre İzolasyonu	61
4.2.4.1.1.	MACS Sistemi Ve Mikroead'ler Yardımıyla Saf uPK Hücrelerin Elde Edilmesi.....	61
4.2.5.	FLK1 ⁺ HÜCRELERİN AKIM SİTOMETRİK ANALİZİ	62
4.2.5.1.1.	MACS Sistemi ve Mikroead'ler Yardımıyla Flk-1 ⁺ Hücrelerinin İzolasyonu.....	63
4.2.6.	İMMÜN BOYAMA İLE HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU.....	64
4.2.6.1.	Hücre Fiksasyonu.....	64
4.2.6.2.	İmmün Boyama ile Hücrelerinin Karakterizasyonu:.....	65
4.2.6.3.	İmmün Boyama Ve Görüntüleme	65
4.2.7.	EŞ-ZAMANLI PZR İLE HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU.....	68
4.2.7.1.	RNA İzolasyonu.....	68
4.2.7.2.	cDNA Sentezi:	69
4.2.7.3.	Eş-zamanlı PZR.....	70
4.2.8.	İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	71
5.	<u>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	74
5.1.	PLURİPOTENSİ DEĞERLENDİRME ANALİZ SONUÇLARI:	74

5.1.1. UPKH'LERİNİN MORFOLOJİK KARAKTERİZASYON VE İMMÜN BOYAMA SONUÇLARI:	74
5.2. UPK HÜCRELERİNİN LATERAL MEZODERMAL (FLK1+) HÜCRELERE FARKLILAMASI VE BU HÜCRELERİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI..	77
5.2.1. FLK1 + HÜCRELERİNİN İMMÜN BOYAMA VE GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI	77
5.2.2. HÜCRE AYRIMI DENEYLERİ, AKIM SİTOMETRİ VE MACS SONUÇLARI:	80
5.2.2.1. Poromisin C İle Hücre İzolasyon Sonuçları:	80
5.2.2.2. uPK Hücrelerinin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu:	82
5.2.2.3. MACS Sonuçları	82
5.2.3. EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI	84
5.2.4. FARKLILAŞTIRMA SÜRECİNDE FLK1 VE CD31 WESTERN BLOT ANALİZ SONUÇLARI	89
5.3. ELDE EDİLEN MEZODERMAL HÜCRELERİN ENDOTELYAL ÖNCÜL VE DÜZ KAS HÜCRELERE FARKLILAŞTIRMA SONUÇLARI.....	91
5.3.1. İMMÜN BOYAMA VE GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI.....	91
5.3.2. EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI:	93
5.3.2.1. Farklılaştırmanın 5.5. Gününden Elde Edilen Hücrelerin VEGF Ve PDGF İçeren Besiyerinde Kültür Ederek 4 Gün Sonra Gen İfade Seviyelerin Analiz Sonuçları.....	93
5.3.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI.....	99
<u>.6 TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	101
6.1.1. uPKH'LERDEN, LATERAL MEZODERMAL (FLK1+) HÜCRELERİN FARKLILAŞTIRILMASI.....	103

6.1.2. LATERAL MEZODERMAL HÜCRELERDEN EÖH VE DKH'LERİNİN FARKLILAŞTIRILMASI.....	109
6.2. SONUÇ	112
<u>EKLER</u>	<u>129</u>
6.3. EK1:BAŞLIK 1	129
6.4. EK2:BAŞLIK 2	130
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>132</u>
<u>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR</u>	<u>136</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. KARDİYAK İSKEMİK HASARDAN SONRAKİ HÜCRESEL OLAYLARIN ŞEMATİK GÖSTERİMİ (110)	5
ŞEKİL 2.2. DAMAR OLUŞUMUNDAN SORUMLU OLAN HÜCRELERİN GELİŞİM SURECİ	7
ŞEKİL 2.3. FLK1/KDR RESEPTÖRÜ VE LIGAND PROTEİNLERİ.....	10
ŞEKİL 2.4. PERİFERİK KANDA BULUNAN EÖH'LERİNİN KAYNAKLARI.....	13
ŞEKİL 2.5. TERAPÖTİK NEOVASKÜLARİZASYONDA HÜCRESEL TEDAVİ. (1 VE 2) ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER, HÜCRE AYIRMA TEKNİKLERİ İLE PERİFERAL KANDAN İZOLE EDİLİR. (3) ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER KATATER KULLANILARAK MİYOKARDA İMPLANTE EDİLİR (4A),(4B). MİYOKARDİYUMA İMPLANTE EDİLEN, ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER, ÖNCEDEN VAR OLAN DAMARLARIN VASKÜLOJENEZ VEYA ANJİOGENEZİ UYARILIRLAR(159).	14
ŞEKİL 2.6. KAN DAMARLARININ İÇ DUVARLARINI ENDOTEL HÜCRELER OLUŞTURMAKTADIR. DÜZ KAS HÜCRELERİ VEYA ENDOTEL PERİSİTLER KANALLARI ÖRTEN (KAPLAYAN) HÜCRELERDİR (MERKEZ). BU TEMEL HÜCRE TİPLERİNİN FARKLI ÖNCÜL HÜCRE TİPLERİNDEN KAYNAKLANDIĞI DÜŞÜNÜLMÜŞTÜR. ENDOTELYAL HÜCRELER EMBRİYO DÖNEMİNDE ANJİOBLAST VE HEMANJİOBLAST ÖNCÜLLERİNDEN (ÜST) VEYA ERGİNLİK DÖNEMİNDE ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELERİNDEN ÜRETİLMEKTEDİR(114).	15
ŞEKİL 2.7. KAN DAMAR DUVARLARINDA DÜZ KAS HÜCRELERİN LOKALİZASYONU	16
ŞEKİL 2.8. 1999 YILINDA KOLLAGENAZ VE ELASTAZ ENZİMİ İLE İZOLE EDİLEN VASKÜLER AORTİK DÜZ KAS HÜCRELER (ATCC, CRL-2797).....	17
ŞEKİL 2.9. EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU	22
ŞEKİL 2.10. ERİŞKİN KÖK HÜCRELERİN BULUNDUĞU DOKULAR	23
ŞEKİL 2.11. KÖK HÜCRELERİN KÖKENİ VE FARKLILAŞMA POTANSİYELLERİ.....	24
ŞEKİL 2.12. KÖK HÜCRE ÜRETİMİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	26
ŞEKİL 2.13. RETROVİRÜS GEN AKTARIMIYLA FİBROBLAST HÜCRELERİNDEN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE ELDE EDİLMESİ	28
ŞEKİL 2.14. FARE MODELİNDE KENDİ DERİ HÜCRESİNDEN ELDE EDİLEN UPK HÜCRELERLE ORAK HÜCRE ANEMİSİNİN TEDAVİSİNDE KULLANILMASI (25).	39
ŞEKİL 2.15. KÖK HÜCRE BAZLI TEDAVİ(95).	40

ŞEKİL 4.1 ŞEKİ FARKLILAŞTIRMANIN 1. AŞAMASI (LATERAL MESODERMAL HÜCRE ELDE EDİLMESİ)	58
ŞEKİL 4.2. FARKLILAŞTIRMANIN İKİNCİ AŞAMASI (EŞ-ZAMANLI PZR ANALİZLERİ)	59
ŞEKİL 4.3. UPKH'LERİNİN BESLEYİCİ FEF HÜCRELERİNDEN MACS SİSTEMİ VE MİKROBEAD'LER YARDIMIYLA İZOLASYONU.....	62
ŞEKİL 4.4. UPKH'LERİNİN, FLK1 ⁺ HÜCRELERE FARKLILAŞTIRMASI VE BU HÜCRELERİN MACS SİSTEMİ İLE İZOLASYONU.....	64
ŞEKİL 5.1. UPKH HÜCRELERİNİN 14. PASAJ GÖRÜNTÜLERİ (X20) (FEF HÜCRELERİNİN ÜZERİNDE KOLONİ OLUŞTURAN UPK HÜCRELERİ)	74
ŞEKİL 5.2. UPK HÜCRELERİNİN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ(SEM)	75
ŞEKİL 5.3. (A) UPK KOLONİLERİ BESLEYİCİ HÜCRELERİN ÜZERİNDE (FEF HÜCRELERİ) (B) PUROMİSİN KULLANILARAK FEF HÜCRELERİNİN ELEMINASYONU (C) GFP ⁺ OLAN UPK HÜCRELERİ (NG-20D-17) D, E VE F) UPK HÜCRELERİ KOLONİLERİNİN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOP (SEM) GÖRÜNTÜLERİ. ÖLÇEK A- C=200 µM, D-F=5µM.....	75
ŞEKİL 5.4. UPKH 'LERİN KONFAKAL MİKROSKOBU ALTINDA GÖRÜNTÜLERİ VE KARAKTERİZASYONU. A VE B) OCT-4 ⁺ OLAN UPKH'LER. C) OCT-4 ⁺ VE GFP ⁺ OLAN UPKH'LER. D) SSEA1 ⁺ OLAN UPKH'LER. E) GFP ⁺ OLAN UPKH'LER. F) SSEA1 ⁺ UPKH'LER.....	76
ŞEKİL 5.5. UPKH 'LERİN İMMÜN BOYAMA YÖNTEMİYLE KONFAKAL MİKROSKOBU ALTINDA GÖRÜNTÜLERİ VE KARAKTERİZASYONU A-B) FALLOİDİN-CY5 BOYANMIŞ UPKH'LER C)7-AAD ÇEKİRDEK BOYASI İLE BOYANMIŞ UPKH'LER D) FALLOİDİN-CY5 VE 7-AAD ÇEKİRDEK BOYASI İLE GÖRÜNTÜLENEN UPKH'LER (20x)	77
ŞEKİL 5.6. UPKH'LRİN KOLLAJEN TİP IV KAPLI PETRİLERDE FARKLILAŞTIRMA BESİYERİNDE GÖRÜNTÜSÜ 40X (FARKLILAŞTIRMANIN 2. GÜNÜ).....	78
ŞEKİL 5.7. FARKLILAŞTIRMANIN İLERLEYEN GÜNLERİNDE (2.5. GÜNDEN- 7.5. GÜNE KADAR) FLK1 PROTEİN İFADESİ VE LOKALİZASYONU. (FLK-1 ⁺ = YEŞİL SİYAL) (DNA =KIRMIZI SİYAL). ÖLÇEK =50µM	79
ŞEKİL 5.8. UPKH HÜCRELERİNİN FLK-1 HÜCRELERİNE FARKLILAŞMASININ 5.5. GÜNÜ. BÜYÜTME:63X VE 100X. ANTI-VEGF RECEPTOR 2 PRİMER ANTİKOR VE FITC SECONDER ANTİKOR (YEŞİL FLORESAN) 7- AMİNOACTİNOMYCİN D (7-AAD), KIRMIZI-FLORESAN DNA BOYASI	79
ŞEKİL 5.9. FARKLI KONSANTRASYONLAR VE ZAMANLARDA PUROMİSİN C UYGULAMASINDAN SONRA UPKH HÜCRE ORTAMLARINDAN GÖRÜNTÜLER. A) PUROMİSİN 1.5 µG/ML VE 3. GÜN. D) PUROMİSİN 2 µG/ML 3. GÜN C, D, E) PUROMİSİN 2.5 µG/ML 3. GÜN.....	81

ŞEKİL 5.10. FARKLILAŞTIRILAN FLK1 ⁺ HÜCRELERİNİN AKIM SITOMETRİ ANALİZ SONUÇLARI. A. 2.5 GÜNDE 1.3%. B) 3.5 GÜNDE 2.8%. C) 4.5 GÜNDE 7.4%. D) 5.5 GÜNDE %24.4.....	82
ŞEKİL 5.11. MACS İLE FLK1 ⁺ VE FLK1 ⁻ HÜCRELERİN İZOLASYONUNUN VE İMMÜN BOYAMA DENEYLERİN ŞEMATİK GÖSTERİMİ.....	83
ŞEKİL 5.12. FARKLILAŞTIRMA SÜRECİNDE EÖH'LERİN SPESİFİK BELİRTEÇLERİ OLAN GENLERİN İFADE SEVİYELERİ (FLK1, CD31, AC133, VE-CADHERİN)	85
ŞEKİL 5.13. FARKLILAŞTIRMA SÜRECİNDE RISK TAŞIYAN GENLERİN İFADE SEVİYESİ (C-MYC, KLF4)	86
ŞEKİL 5.14. FARKLILAŞMA SÜRECİNDE ARTERİYEL VE VENÖZ ENDOTEL HÜCRELERİNİN YÖNÜNDE FARKLILAŞMA BELİRTEÇİ OLAN EPHRINB2, VCAM GEN İFADE SEVİYELERİ.....	88
ŞEKİL 5.15. FARKLILAŞMA SÜRECİNDE DKH'LERİN BELİRTEÇİ OLAN SMA, CALPONIN, DESMIN VE SMMHC GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİ.....	89
ŞEKİL 5.16. FARKLILAŞTIRMA İLERLEYEN GÜNLERİNDE FLK1 PROTEİN İFADE SEVİYELERİ	90
ŞEKİL 5.17. FARKLILAŞTIRMA GÜNLERİNDE CD31 PROTEİN İFADE SEVİYELERİ.....	91
ŞEKİL 5.18. A ve B: FLK1 ⁺ HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞAN CD31 ⁺ HÜCRELERE. (CD31 ⁺ = YEŞİL SİYAL) (DNA= KIRMIZI SİYAL) 63X.....	92
ŞEKİL 5.19. A ve B: FLK1 ⁺ HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞAN CD133 ⁺ HÜCRELER. (CD133 ⁺ = YEŞİL SİYAL) (DNA= KIRMIZI SİYAL) 63X.....	92
ŞEKİL 5.20. A ve B: FLK1 ⁻ HÜCRELERİNDEN FARKLILAŞAN ASMA ⁺ HÜCRELER. (ASMA ⁺ = YEŞİL SİYAL) (DNA= KIRMIZI SİYAL) 63X.....	93
ŞEKİL 5.21. İKİNCİ AŞAMADAN ELDE EDİLEN HÜCRELERİN EŞ-ZAMANLI PZR ANALİZLERİNİN ŞEMATİK GÖSTERİMİ.....	94
ŞEKİL 5.22. VEGF VE PDGF İÇEREN BESİYERLERİ İLE BESLENEN GURUPLARIN, EÖH'LERİ İÇİN SPESİFİK BELİRTEÇ OLAN FLK1, CD31, VE-CADHERİN VE AC133 GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİNİN İKİ GURUP ARASINDA OLAN FARKLILIKLAR	96
ŞEKİL 5.23. VEGF VE PDGF İÇEREN BESİYERLERİ İLE BESLENEN GURUPLARDA, ARTERİYEL VE VENÖZ DAMAR HÜCRELERİNİN BELİRTEÇİ OLAN EPHRINB2 VE VCAM GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİNİN İKİ GRUP ARASINDA OLAN FARKLILIKLAR.....	97
ŞEKİL 5.24. DKH'LERİN SPESİFİK BELİRTEÇLERİ OLAN (SMA, CALPONIN, SMMHC VE DESMIN) GEN İFADE SEVİLERİNİN İKİ GURUP ARASINDA FARKLILIKLAR.....	98

ŞEKİL 5.25. YAMANAKA FAKTÖRLERİ OLAN VE AYNI ZAMANDA ONKOGEN ÖZELİĞİ TAŞIYAN GENLERİN (C-MYC, KLF4) FARKLILAŞTIRMANIN 5.5 GÜNÜNE GÖRE İFADE SEVİLERİNİN FARKLILIKLARI	99
ŞEKİL 5.26. VEGF VE PDGF GRUPLARI ARASINDA OLAN CD31 PROTEİN İFADE SEVİYELERİ	100
ŞEKİL 6.1. BİRİNCİ FARKLILAŞTIRMA SÜREÇİNDE EÖH'LERİNİN VE C-MYC VE KLF 4 GENLERİNİN İFADE VE KÜMELEME ANALİZİ.....	106
ŞEKİL 6.2. BİRİNCİ FARKLILAŞTIRMA SÜREÇİNDE ARTER, VENÖZ VE DKH'LERİNİN GEN İFADE VE KÜMELEME ANALİZİ	107
ŞEKİL 6.3. İKİNCİ FARKLILAŞTIRMA SÜREÇİNDE EÖH, ARTER, VENÖZ ENDOTEL VE DKH'LERİNİN GEN İFADE VE KÜMELEME ANALİZİ.....	111
ŞEKİL 6.4. İKİNCİ FARKLILAŞTIRMA SÜREÇİNDE C-MYC VE KLF 4 GENLERİNİN İFADE VE KÜMELEME ANALİZİ	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 4.1. KULLANILAN HÜCRELER VE ÖZELİKLERİ	46
ÇİZELGE 4.2. PETRİ BÜYÜKLÜĞÜNE GÖRE JELATİN MİKTARI.....	54
ÇİZELGE 4.3. MEF-NG- 20D-17-UPKH'LERİN KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERİ İÇERİĞİ	55
ÇİZELGE 4.4. FLK1 ⁺ HÜCRELERİNİN AKIM SITOMETRİK ANALIZI İÇİN HAZIRLIK AŞAMALARI.....	63
ÇİZELGE 4.5. KULLANILAN ANTİKORLAR VE ÖZELİKLERİ.....	65
ÇİZELGE 4.6. EŞ-ZAMANLI PZR DENEYLERİNDE KULLANILAN OPTİMİZASYON KOŞULLARI	70
ÇİZELGE 4.7. EŞ-ZAMANLI PZR DENEYLERİNDE KULLANILAN PRİMERLERİN ÖZELİKLERİ VE ÇALIŞMA SICAKLIKLARI	71
ÇİZELGE 5.1. PUROMİSİN-C UYGULAMASI İÇİN (HÜCRE İZOLASYONU) UYGUN KONSANTRASYON VE UYGULAMA SÜRECİNİN BEKLİRLENMESİ	80
ÇİZELGE 5.2. MACS YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN FLK1+ HÜCRE YÜZDESİ.....	83
ÇİZELGE 5.3. EÖH'LERİN SPESİFİK BELİRTEÇLERİ OLAN GENLERİN (FLK1, CD31, AC133 VE VE-CADHERİN) İFADE SEVİLERİNİN İSTATİSTİKSEL VERİLERİ (NS: NON-SIGNIFICANT)	84
ÇİZELGE 5.4. ARTERİYEL VE VENÖZ ENDOTEL HÜCRE YÖNÜNDE FARKLILAŞMA BELİRTEÇİ OLAN EPHRİN2, VCAM-1 VE DÜZ KAS HÜCRE BELİRTEÇİ OLAN SMA, CALPONİN, SMMHC VE DESMİN GENLERİNİN İFADE SEVİYELERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ (NS: NON-SIGNIFICANT).....	87
ÇİZELGE 5.5. EÖH'LERİN SPESİFİK BELİRTEÇLERİ OLAN GENLERİN (FLK1, CD31, AC133, VE-CADHERİN, EPHRİN2, VCAM) ARTERİYEL VE VENÖZ ENDOTEL HÜCRE YÖNÜNDE FARKLILAŞMA BELİRTEÇİ OLAN (EPHRİN2, VCAM) GEN İFADE SEVİLERİNİN İKİ GURUP ARASINDA İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ (NS: NON-SIGNIFICANT)	95
ÇİZELGE 5.6. DKH'LERİN SPESİFİK BELİRTEÇLERİ OLAN (SMA, CALPONİN, SMMHC VE DESMİN) GEN İFADE SEVİLERİNİN İKİ GURUP ARASINDA İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	97
ÇİZELGE 5.7. YAMANAKA FAKTÖRLERİ OLAN VE AYNI ZAMANDA ONKOGEN ÖZELİĞİ OLAN (C-MYC, KLF4) GENLERİNİN FARKLILAŞTIRMANIN 5.5 GÜNÜNE GÖRE İFADE SEVİLERİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZLERİ... 99	99

SİMGELER DİZİNİ

(IL)-1 β	İnterlökin 1 β
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
2ME	2 Mercaptoethanol
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
BM-MNC	Bone Marrow-derived Mononuclear Cells
CDAC	Culture dish adherent cell
CDH5	Cadherin 5
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DES	Demisin
DKH	Düz Kas Hücreler
DM	Differentiation Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EBF	Endotelyal Büyüme Faktörü
EC	Embryoid cisimcikler
ECM	Extracellular matrix

EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
EFNB2	Efrin-B2
EH	Endotel Hücreleri
EKH	Embriyonik kök hücreler
EÖH	Endotelyal öncül hücre
ES-FBS	Embryonic Stem Cell - Fetal Bovine Serum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FEF	Fare Embriyonik Fibroblast
FITC	Fluorescein İsothiocyanate
Flk1	Fetal Liver Kinase 1
Flt1	Fms-like tyrosine kinase 1
GFP	Green Fluorescent Protein
GKK	Göbek Kordon Kanı
H9c2	Heart/myocardium Cell Line
HAT	Histon Asetiltransferazlar
HDAC	Histon Deasetilaz
HDM	Hücre-madde adezyonunda hücre dışı matriks

HHT	Hereditör Hemorajik Telenjektazi
HMG-CoA	3-Hidroksi-3-Metilglutaril koenzim A
HPRT	Hypoxanthine-guanine Phospho Ribosyl Transferase
ICAM-1	Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
KBİ	Kritik Bacak İskemisi
Kİ	Kemik İliği
Klf4	Kruppel-like factor 4
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LV	Sol Ventrikül
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCP-1	Monosit Kemo-çekici Protein-1
MI	Myocardial Infarction
MKH	Mezankimal Kök Hücre
MNC	Mononuclear Cell
NEAA	Non Essential Amino Acid

NO	Nitric oxide
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4
PAD	Peripheral artery disease
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF-BB	Platelet – drived growth factor-BB
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecul-1
PFA	Paraformaldehyde
PK	periferal kandan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SM α -actin	Smooth muscle Alfa-aktin-2
Sm-MHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
Tri-P	Tricell patch
TSA	Trikostatin A
uPKH	uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1

VCAM-1	Vasküler hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
vWF	Von Willebrand Factor



1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında, görülen mortalite ve morbiditenin majör nedeni olma yolunda gittikçe artan bir rol üstlenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verileri, kardiyovasküler hastalıkların dünyada bir numaralı ölüm nedeni olduğunu ve 2012 yılında 17.5 milyon insanın kardiyovasküler hastalıklar nedeni ile hayatını kaybettiğini bildirmektedir. Bu oran dünyadaki ölümlerin %30'unu ifade etmektedir. Bu ölümlerin 7.6 milyonu kalp krizi, 5.7 milyonu ise inme kaynaklıdır. 2030 yılına kadar 23 milyondan fazla insanın kardiyovasküler hastalıklardan kaybedileceği tahmin edilmektedir(1).

Gelişmiş ülkelerdeki ölümlerin yarısına yakını ve gelişmekte olan ülkelerdeki ölümlerin üçte biri kalp damar hastalıkları nedeniyle olmaktadır. Dünyada olduğu gibi, ülkemizde de kalp ve damar hastalıkları giderek artmaktadır ve meydana gelen ölümlerin %40 kadarı kalp ve damar hastalıkları nedeniyle olmaktadır. Dünya sağlık problemlerinin başında gelen kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yönelik araştırmalar bilim dünyasının da öncelikleri arasında yer almaktadır(1, 2).

Miyokardiyal iskemi, derin miyokardial hipoksiye bağlı olarak miyokard metaboliti gereksinimi ve temini arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşan patolojik bir hastalıktır(3, 4). Bu olay, tipik olarak koroner arter tıkanmasının neden olduğu miyokardiyuma kan akışını sınırlamaktadır ve bu durumun sürekli devam etmesi halinde miyokardiyal hücre ölümü ve devamında kalp yetmezliği (iskemik kalp hastalığı) ortaya çıkmaktadır. Bu durumda iskemik bölgeye kan akışı sağlanamadığından, dokuda nekrotik alanlar oluşmaktadır. Hasara uğramış dokudan fazla miktarda sitokin ve uyarıcı maddeler salgılanıp tamir mekanizması devreye girer ve bu bölgede yeni damarların oluşumuna neden olur. Ancak bu hasar eğer büyük ise, bu tamir mekanizması yetersiz kalır ve dokuya yeteri miktarda oksijen transferi olmadığından (yetersiz kapiler damar oluşumu) dokuda skar dokusu (nekroz ve apoptozise uğrayan doku) oluşur ve bu doku işlevini yitirir. Bu sürecin geri döndürülmesinde rol oynayan tamir mekanizmasında farklı maddeler ve özellikle de sitokinlerin hasarlı dokulardan salgılanması ile birlikte endotelial öncül hücre (EÖH) adı verdiğimiz hücreler, bu dokuya kemotaksik etki ile göç ederler.

Endotelial öncül hücreler, kemik iliğinden köken alarak kana geçen ve yüksek derecede farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerin hasar

görmüş dokuların onarımında rol oynadıkları bilinmektedir. Bu hücreler anjiyogenezde, tümör büyümesinde ve revaskularizasyonda rol oynamaktadırlar. Çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonların etkisi ile harekete geçerek, yerleştiği bölgelerde kan damarı oluşumunu sağlarlar. Endotelyal progenitör hücreler miyokard infarktüs gibi kalp ve damar hastalıkları sonrasında harekete geçerek, kalp krizinden zarar gören kan damarlarının onarımını sağlarlar. Bu hücreler anjiogenez ve vaskülojenezde büyük rol oynamaktadırlar. Damar oluşumunda endotel hücrelerle iş birliği yapan düz kas hücreleri de önemli göreve sahiptirler.

Endotelyal öncül hücreler, farklı kaynaklardan elde edilmesi ve rejeneratif tıp alanında kullanması sebebiyle bir çok bilim insanı tarafından araştırma konusu olmuştur. Yamanaka ve arkadaşları tarafından 2006 yılında uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücrelerin keşfine kadar, endotelyal öncül ve düz kas hücrelerin elde edilmesine yönelik çalışmalar, embriyonik kök hücre kaynaklı olarak devam etmiştir. Uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücrelerin bilim dünyasına sunulması, rejeneratif tıp ve kök hücre biyolojisinde farklı ve yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Bu hücrelerin bazı avantajlarından d bir çok araştırmacı tarafından farklı amaçlarla araştırılmaktadır.

Sunulan bu tezde, son dönemde geliştirilen uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler kullanılarak, bir kaç aşamada ve *in vitro* koşullarda endotelyal öncül hücre (EÖH) ve düz kas hücreleri (DKH) üretilmiştir. Bu tezde ilk aşamada (uPK) hücreler, belirli koşullarda lateral mezoderm hücrelere farklılaştırılmıştır. Elde edilen bu hücrelerin EÖH yönünde farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca başka bir deneyde elde edilen mezoderm hücrelerinden düz kas hücreler elde edilmesi planlanmıştır. Saydığımız özelliklere sahip olan hücreler, özellikleri tanımlanıp ve izole edildikten sonra, Eş-zamanlı PZR ve immün boyama yöntemleri ile mRNA ve protein düzeyinde de valide edilmiştir. Buna ek olarak elde edilen hücrelerin transplantasyonunda ortaya çıkabilecek risk faktörlerin (onkogenler) gen ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Bu metotlarla elde edilen hücreler farklı kalp ve damar hastalıklarında kullanılma potansiyeline sahiptirler.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

Kardiyovasküler hastalıklar, kalp veya kan damarlarının (arterler ve venler) hastalıklarını içeren gruba verilen genel bir isimlendirmedir. Kardiyovasküler hastalık dolaşım sistemini etkileyen herhangi bir hastalığı tanımlar. Özellikle kalp hastalıkları, beyin ve böbrek damarlarını etkileyen hastalıklar ve periferik damar hastalıkları bu gruba girer. Kardiyovasküler hastalıklarının nedenleri çeşitlilik göstermesine rağmen en sık nedenler ateroskleroz ve / veya hipertansiyon olarak görülmektedir(105).

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında ölümlerin en büyük nedenidir. Son yirmi yıl içinde, kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranları yüksek gelirli ülkelerde düşmüş olsa da hastalık ve ölüm oranları düşük ve orta gelirli ülkelerde şaşırtıcı derecede ve hızlı bir şekilde artmıştır. Bu hastalıklar genellikle yaşlı yetişkinlerde görülse de özellikle ateroskleroz, geçmişi çocukluk çağına dayandığından birincil korunma çabaları yaşamın erken dönemlerinde başlamalıdır. Bu nedenle ateroskleroz önlenmesinde sağlıklı beslenme, egzersiz ve sigaradan kaçınma gibi risk faktörlerini ortadan kaldırmaya yönelik artan vurgu vardır(105).

2.1.1.1. ARTERYAL DAMAR HASTALIKLARI

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 hastalıklarına, beyin ve koroner arter hastalığı sıklıkla eşlik ettiğinden bu hastalarda kalp krizi ve felç riski normal popülasyona göre daha fazladır(105).

2.1.1.2. KRİTİK BACAK İSKEMİSİ

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, ekstremitelerinde stenoz (daralma) veya oklüzyon (tıkanma) nedeni ile meydana gelen, genellikle ateroskleroz kökenli hastalığı ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Hastaların

yaklaşık %95'in de etiyojik faktör aterosklerozdur. Diğer önemli nedenler; tromboemboli, 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, 70 yaş üstü erkeklerde görülme sıklığı %20 gibi yüksek oranlarda bildirildiği epidemiyolojik araştırmalar vardır. Hastaların %40–50'sinde bu tabloya eşlik eden hafif ya da şiddetli koroner arter hastalığı %15–20'sinde arteria karotis bulunmaktadır. Bu patolojilerin tedavi edilmesinde geleneksel ilaç ve cerrahi uygulamalara ilaveten kök hücre temelli yaklaşımlar da uygulanmaya çalışılmıştır. Özellikle periferel damar hastalıklarının tedavisinde farklı özellikte kök hücrelerin kullanılması gündeme gelmiştir(105).

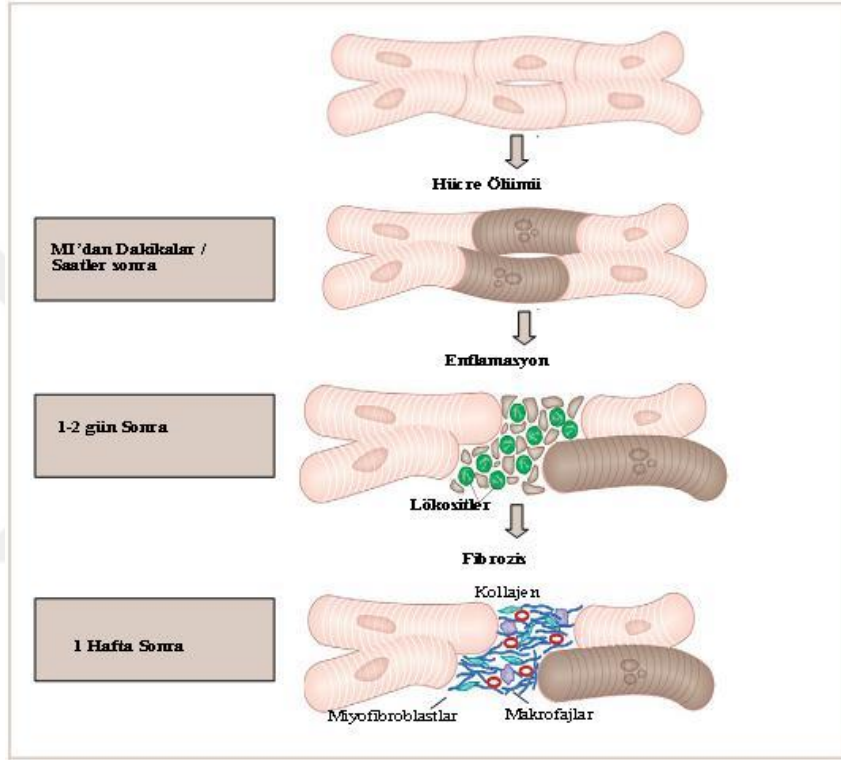
Bu hücrelerden aşağıda bahsedilmiştir.

2.1.1.3. MİYOKARDİYAL ENFARKTÜS VE FONKSİYON KAYBI

Miyokardial iskemi, derin miyokard hipoksisine yol açan, oksijen başta olmak üzere miyokarda metabolit temini ve talebi arasında bir dengesizlik ile karakterize patolojik bir hastalıktır(3). Bu olay, tipik olarak koroner arter tıkanmasının neden olduğu miyokardiyuma kan akışını sınırlamaktadır ve bu durumun sürekli devam etmesi halinde miyokardiyal hücre ölümü ve devamında kalp yetmezliği (iskemik kalp hastalığı) ortaya çıkmaktadır.

Miyokardiyal enfarktüs (MI), damar içinde tromboza yol açan aterosklerotik plak rüptürü ve trombosit agregasyonu sonucu koroner arterlerin tıkanmasıyla oluşur(108). Tıkalı arterlerden kaynaklı şiddetli iskemi, birkaç dakika içinde kardiomyositlerde apoptozise neden olur. İskemik alana reoksijenizasyon sonucu reaktif oksijen türlerinin ve toksik maddelerin birikimi yaralanma ve hücre ölümünü artırmaktadır(109). Etkilenen alanda veya etrafındaki hücrelerden birtakım (tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), monosit kemo-çekici protein-1 (MCP-1), interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi) sitokinler ve kemokinler salgılanır ki bu faktörler iskemik alana çok sayıda ve acil olarak sirkülasyondaki lökositlerin toplanmasını uyarır. Komşu endotel hücreleri tarafından E-selektin, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak pro-inflamatuar immün hücrelerinin toplanmasını sağlarlar. İmmün hücreler hasarlı alanda birikerek hücre atıkları ve

parçalanmış matriks ürünlerini temizlerler. Hücresel artıklar, yaralı alandan kaldırıldıktan sonra, kalan boşluk granülasyon dokusu ile doldurulur. Bu işlem yaralanma sonrası birkaç gün içinde miyofibroblastların gelmesi ile başlar. Granülasyon dokusu, özellikle kan damarları, makrofajlar ve miyofibroblastlar, kollajen birikintisi ve hücre dışı matriks proteinlerinden oluşmaktadır. Enfarktüstün bir hafta sonra, granülasyon dokusu, miyofibroblastlar ile iç içe kollajen birikintileri ile yoğun bir skar doku haline dönüşmeye başlar(110).



Şekil 2.1. Kardiyak iskemik hasardan sonraki hücresel olayların şematik gösterimi (110)

İskemik alan, sağlıklı hücreleri çevreleyen zarar veren, enflamatuvar sitokinler ve proteaz aktivitesi bakımından zengindir. Kalan ventriküler hücreleri üzerindeki ekstra mekanik yük, kardiyak dokunun bütünlüğünü bozar. Böylece lokalize başlayan hasar yavaş yavaş dalgalanma etkisiyle kalbin daha geniş alanlarına yayılır. Fonksiyonel doku kaybı ve bu yeniden modellenme, ventriküler disfonksiyona, elektriksel instabiliteye neden olur ve bu da kalp yetmezliğine ve malign aritmilere yol açar(35).

2.2. ANJİYOGENEZ VE VASKÜLOGENEZ:

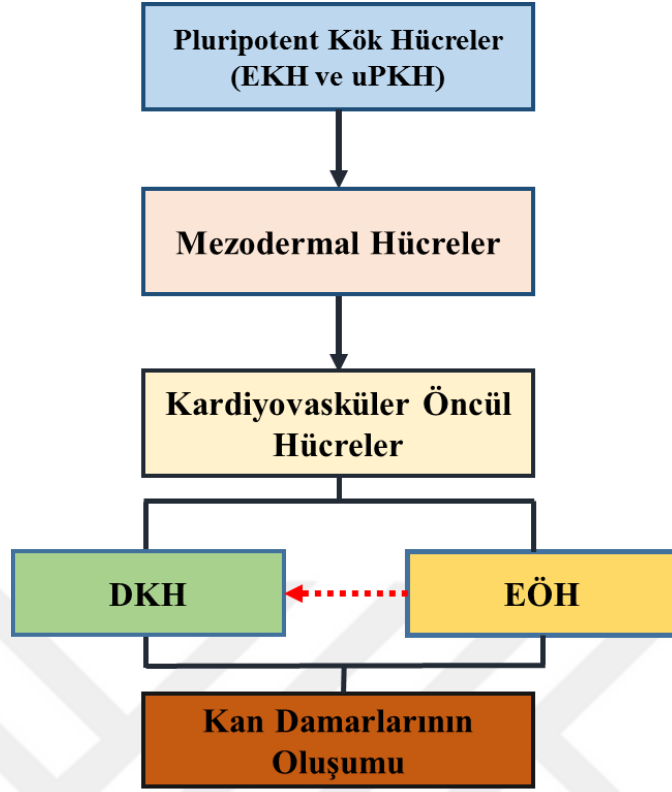
Yakın tarihe kadar postnatal süreçte organizmanın fizyolojik gereksinimlerini karşılamak veya iskemik dokulara veya tümörlere oksijen sağlamak amacıyla yeni kapiller damarların oluşmasında sadece anjiyogenezin rol aldığı düşünülmekteydi. Vaskülogenezin ise sadece embriyonik dönemde yeni damar oluşumunu sağladığı sanılmaktaydı. Ancak, Asahara ve Shi ve ark 1998 yılında yaptıkları deneylerle kemik iliği kaynaklı hematopoietik öncül hücrelerin endotel hücreye embriyonik dönemin dışında da dönüşebildiğini, iskemi sonrası endotel bütünlüğün tekrar sağlanmasında ve yeni kapiller oluşumunda bizzat rol aldıklarını bularak vaskülogenez ile ilgili yaygın kanıyı değiştirdiler(111, 112).

Endotel hücrelerin bölünme yetenekleri ölçüsünde çoğalarak ve göç ederek var olan damarlardan yeni kapillerler oluşturmasına anjiyogenez denir(113). Damar sisteminin geliştirilmesi birçok hayvan türünün embriyonik gelişimi sırasında önemli bir olaydır. Bu işlem sırasında, yerel mezodermal öncül hücreler damar ve endotel hücreleri (EH) farklılaşır. Bu işlem de vaskülogenez olarak adlandırılır(114). Dolaşımda bulunan endotel öncül hücrelerin daha önceden var olan herhangi bir damardan köken almadan olgun endotel hücrelere dönüşerek yeni bir damar oluşturması olarak bilinir(113).

Endotelial öncül hücrelerin açıklanmasından önce, vaskülogenezin doğumdan sonra hayatta görülmediğini ve sadece embriyonik gelişim sürecinde olduğu düşünülmekteydi. Ancak on yıl önce iki grup, dolaşımda olan periferik kandan (PK), göbek kordon kanından(GKK) ve kemik iliğinden (Kİ) izole edilen CD34⁺ hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* fare modelinde, endotelial hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını rapor ettiler. Böylelikle, yetişkin organizmada neoendotelializasyon ve neovaskülarizasyon olaylarının postnatal süreçte gerçekleşebilmesine katkıda bulundular(111, 112).

Sonuç olarak hem anjiyogenezde ve hem vaskülogenezde, damar oluşumunda temel olarak iki farklı hücre rol oynamaktadır:

- a) Endotel öncül hücreleri(EÖH)
- b) Düz kas hücreler(DKH)



Şekil 2.2. Damar oluşumundan sorumlu olan hücrelerin gelişim süreci

2.2.1. ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER:

Günümüzde endotelial öncül hücreler (EÖH), kardiyovasküler hastalıkların tedavi yöntemlerine alternatif olarak düşünülmeyle ve gelişmesini önlemede önemli bir şans olarak görülmektedir. Bu hücreler yaşamın postnatal döneminde de var olan mononükleer hücrelerdir. Ancak erişkin sağlıklı vasküler sisteminde bu hücrelerin bölünme hızları çok düşüktür. Normal koşullarda kan dolaşımında bulunan tüm hücrelerin $\sim 0,01\%$ 'i kadarını oluşturmaktadır. Endotel hücreler sağlıklı bir erişkinde belirli oranlarda vücudun restorasyonuna katkıda bulunabilmektedir. Kemik iliğinin vasküler bölgesinde depolanıp ve sabit bir hızda dolaşıma katılırlar. Dolaşıma katılmalarını etkeleyen birçok patolojik ve fizyolojik olay mevcuttur. Bu olaylar içinde dolaşıma katılmalarını arttıran en önemli sebep doku iskemisi ve hasarıdır(23). Bu hücreler iskemik dokularda *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yeni damarlar oluşturmakla bu dokuların onarımını ve kan akışını sağlarlar(111, 115-117). Bu hücreler, belirli koşullar altında endotel hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Ancak, 1997 yılında EÖH'lerin tanımlanmasından beri(111), EÖH kavramı ve bu hücrelerin

vücuttaki lokalizasyonu ile ilgili tartışmalar halen devam etmektedir. İlk olarak, EÖ hücreleri spesifik antijen ekspresyonu (CD133⁺, Flk1⁺ ve Flt1⁺) ve bu hücrelerin endotelial hücrelerine farklılaşma yeteneği ile tanımlanmıştır(118). Bu hücreler genellikle yetişkin bireylerde periferik kan ve kemik iliğinden elde edilmektedir. İskemik bölgeye yerleşerek bu dokuların postnatal neovaskülarizasyonda rol oynadıkları kabul edilmiştir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, kemik iliğinden farklılaşan bu hücrelerin, damarların oluşumunda, tümör bölgelerinde (112, 113) iyileşen yaralarda(111, 119), arka bacak iskemisinde(86, 120), miyokardiyal enfarktüsde (127) kullanabileceği öne sürülmüştür.

2.2.1.1. VASKÜLER ENDOTELYAL ÖNCÜL HÜCRELER:

EÖ hücrelerin periferik kan ve kemik iliği olmak üzere iki ana kaynağı vardır. Ancak birkaç araştırma, dokuda ikamet eden endotel öncül hücreler üzerinde odaklanmıştır. Alessandri ve ark. 2001 yılında lokal endotelial öncül hücrelerinin insan kapiller damarların oluşumuna dahil olduğunu ilk kez kanıtladılar. Bu grup, embriyonik aort duvarının dış katmanındaki öncül hücre tabakasını tespit ettiler. Daha sonra, başka bir grup öncül hücre tabakasını yetişkin insan arterlerinde buldular. Ancak, bu hücrelerin periferik kan ve kemik iliği veya yerel yerleşik hücrelerden kaynaklanıp ve neovaskülarizasyonda rol oynadıkları son yılların sorulan sorularından olmuştur(121).

Yakın tarihe kadar postnatal süreçte organizmanın fizyolojik gereksinimlerini karşılamak veya iskemik dokulara veya tümörlere oksijen sağlamak amacıyla yeni kapiller damarların oluşmasında sadece anjiyogenezin rol aldığı düşünülüyordu. Vaskülogenezin ise sadece embriyonik dönemde yeni damar oluşumunu sağladığı sanılmaktaydı. Ancak, Asahara ve Shi ve ark 1998 yılında yaptıkları deneylerle kemik iliği kaynaklı hematopoetik öncül hücrelerin endotel hücreye embriyonik dönemin dışında da dönüşebildiğini, iskemi sonrası endotel bütünlüğün tekrar sağlanmasında ve yeni kapiller oluşumunda bizzat rol aldıklarını bularak, vaskülogenez ile ilgili yaygın düşünceyi değiştirdiler(111, 112).

2.2.1.1.1. Endotelial hücre belirteçleri:

Endotelial öncül hücre karakterizasyonu için, birçok araştırmacı tarafından CD34 ve VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) kullanılmıştır. Ayrıca bu belirteçleri kullanarak ve akım sitometrisi yöntemi ile elde edilen bu hücreler, *in vitro* koşullarda endotelial hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip oldukları rapor

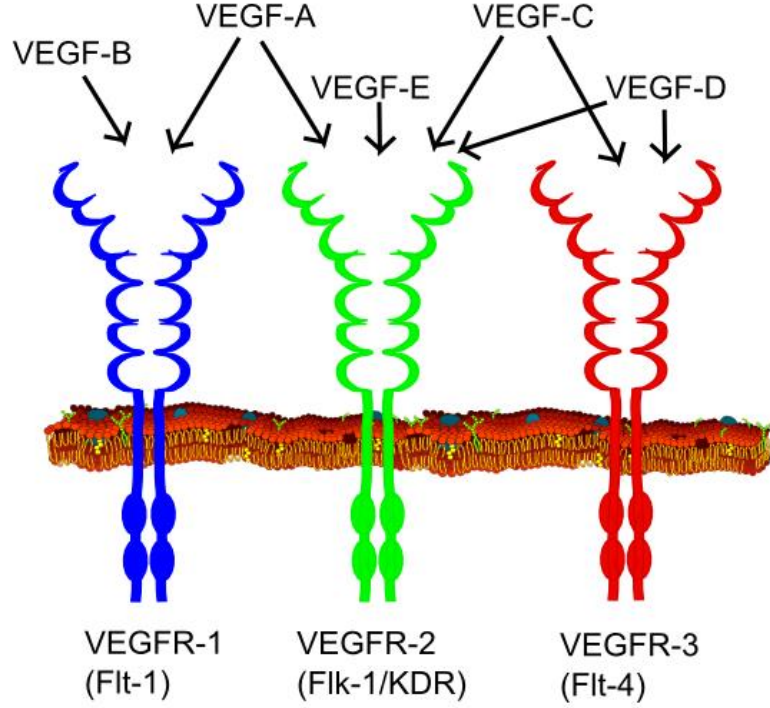
edilmiştir(111, 112, 122). İnsanda CD34, VEGF-2, CD133 belirteçleri kullanarak kardiyak endotelyal öncül hücre izole edilmiştir. Bu özellikleri gösteren hücreler, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda endotelyal hücrelerine farklılaşma potansiyelini göstermişler(123-125).

Endotelyal hücrelerin önemli belirteçleri:

a) FLK1 (VEGFR-2)

Kinase insert domain receptor'ü (KDR, tip III reseptör tirozin kinaz), aynı zamanda, vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR-2) olarak bilinen VEGF reseptörüdür. Bu proteini insanda kodlayan gen KDR adıyla tanımlanmıştır. KDR veya CD309 olarak tanımlanan bu protein aynı zamanda (Fetal liver kinaz 1) olarak da bilinmektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), hem vaskülojenez ve hem anjiyojenez'de önemli bir sinyal proteinidir. *İn vitro* koşullarda, VEGF'nin, endotel hücrelerin mitojenezinde ve hücre göçünde etkili olduğu gösterilmiştir. VEGF ayrıca mikrovasküler geçirgenliği (permabilitesini) artırır ve bazen damar geçirgenlik faktörü olarak da adlandırılmaktadır(126).

VEGF ailesinin tüm üyeleri, hücre yüzeyi üzerinde olan tirozin kinaz reseptörlerine bağlanır ve bu reseptörlerin transfosforilasyonu ve hücre yanıtının uyarılmasına neden olur. VEGF-A proteini VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/Flk-1) reseptörlerine bağlanır. VEGFR-2 reseptörü hemen hemen tüm VEGF'lerin (VEGF-B dışında), reseptörü olarak tanımlanmaktadır(127).



Şekil 2.3. Flk1/KDR reseptörü ve ligand proteinleri

b) CD31:

Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1), CD31 adı ile tanımlanmaktadır. Bu protein 17 koromozom üzerinde bulun PECAM1 geni tarafından kodlanmaktadır(128, 129). PECAM-1 trombositler, monositler, nötrofiller ve T-hücrelerinin bazı türlerinin yüzeyinde bulunmaktadır. Bu protein immünoglobülin süper ailesinden olup büyük olasılıkla lökosit göçü, anjiyoenez, integrin aktivasyonunda rol oynamaktadır. CD-31, normal olarak endotel hücreleri, trombositler, makrofajlar ve Kupffer hücreleri, granülositler, T/NK hücreleri, lenfositler, megakaryositler, osteoklastlar, nötrofiller üzerinde bulunur(128-130).

CD-31 aynı zamanda vasküler tümörler, histiositik maligniteleri ve plazmasitom dahil olmak üzere bazı tümörlerde, ifade edilir. Ama nadiren, Kaposi sarkomu gibi bazı sarkomlarda ve karsinomalarda görünmektedir(123). İmmünohistokimyada, CD31 histolojik doku kesitlerinde endotel hücrelerinin varlığını göstermek için kullanılır. Ayrıca tümör anjiyoenez derecesini değerlendirmek için yardımcı olmaktadır(124).

c) CD133:

CD133 aslında AC133 olarak da tanımlanmaktadır. CD133 insanlarda ve kemirgenlerde bilinen bir glikoproteindir. Ayrıca bu türlerde Prominin 1 (PROM1) olarak da adlandırılmaktadır(131). Şu ana kadar CD133'ün işlevi bilinmemektedir. Özellikle transmembran glikoproteinler üyesi (5-transmembran, 5-TM) olarak hücresel çıkıntılarla lokalize olmaktadır. CD133 hematopoietik kök hücreler(132), endotelial öncül hücreler(131), glioblastoma, nöronal ve glial kök hücreler(133), çeşitli çocuk beyin tümörleri (134) ve yetişkin böbrek, meme dokusu, nefes borusu, tükürük bezleri, plasenta, sindirim sistemi, testis ve diğer bazı doku hücre türlerinde ifade edilir(135, 136).

d) VE-Kadherin:

Kadherin 5, VE-kadherin veya CD144 olarak (vasküler endotelial kadherin) da bilinmektedir. İnsanda CDH5 geni tarafından kodlanmaktadır(137). VE-kadherin, kadherin süper ailesinden olup ve 16. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur. Kodlanan protein, kalsiyuma bağlı olan hücre hücre adezyon glikoproteindir. Bu protein endotelial hücre biyolojisinde özellikle kohesyon (uyum) ve ekstrasellüler bağlantıların organizasyonunda önemli rol oynamaktadır(137). Ayrıca yapılan araştırmalara göre VE-kadherin yeni oluşan damarların korumasını sağlamaktadır(138).

e) VCAM-1

Vasküler hücre adezyon protein 1, aynı zamanda, vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1) veya insanlarda CD106 olarak adlandırılmaktadır. Bu protein VCAM1 gen tarafından kodlanıp ve hücre adezyon molekülü olarak fonksiyon göstermektedir(139). VCAM-1, altı veya yedi immünoglobulin domaini içerir ve endotel hücrelerinin sitokinler tarafından uyarısı ile büyük ve küçük kan damarları üzerinden ifade edilir. VCAM-1 ekspresyonu, aynı zamanda, diğer hücre tiplerinde de (örneğin, düz kas hücrelerinde) gözlenmiştir(140).

Melanom hücreleri endotelyuma tutunmak için VCAM-1'i kullanmaktadır. Ayrıca VCAM-1'in aterosklerotik bölgelere monosit yerleşmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, VCAM-1, potansiyel ilaç hedefi olabilmektedir(140).

f) Efrin-B2:

Efrin-B2 insanlarda EFNB2 gen tarafından kodlanan bir proteindir. Efrin ailesi tirozin kinaz süper ailesinden olup, sinir sisteminde ve eritropoezis gelişim sürecinde aracılık etmektedir(141). Yapılarına göre, efrinler iki farklı gruba ayrılmaktadır. Efrin A (EFNA) bir glikozil-fosfatidilinozitol bağlantı ile membrana tutunmuştur. Ancak efrin-B (EFNB), bir transmembran proteindir. Efrin B2, EFNB tarafından kodlanıp ve EPHB4 ve EPHA3 reseptörlerine bağlanır(142). Efrin-B2, anjiyojenik ve lenf anjiyogenzin kontrolünde anahtar rol oynamaktadır. Fare ve Zebrafish üzerinde yapılan genetik deneylerde efrin-B2'nin, Eph reseptörü, tirozin kinazlar için bir membran ligandı olduğunu ve bu yolakla endotelyum anjiogenezinde önemli rol aldığı gösterilmiştir. Efrin-B2 atrial duvar kaslarının oluşumunda önemli rol oynamaktadır(143).

2.2.1.1.2. Endotelial hasar:

Vasküler endotel disfonksiyonu veya endotel kaybı, ateroskleroz, damar grefti ateroskleroza, anjiyoplasti kaynaklı restenoz ve transplant ateroskleroz dahil olmak üzere vasküler hastalıkların oluşumunda çok önemli bir olaydır(144).

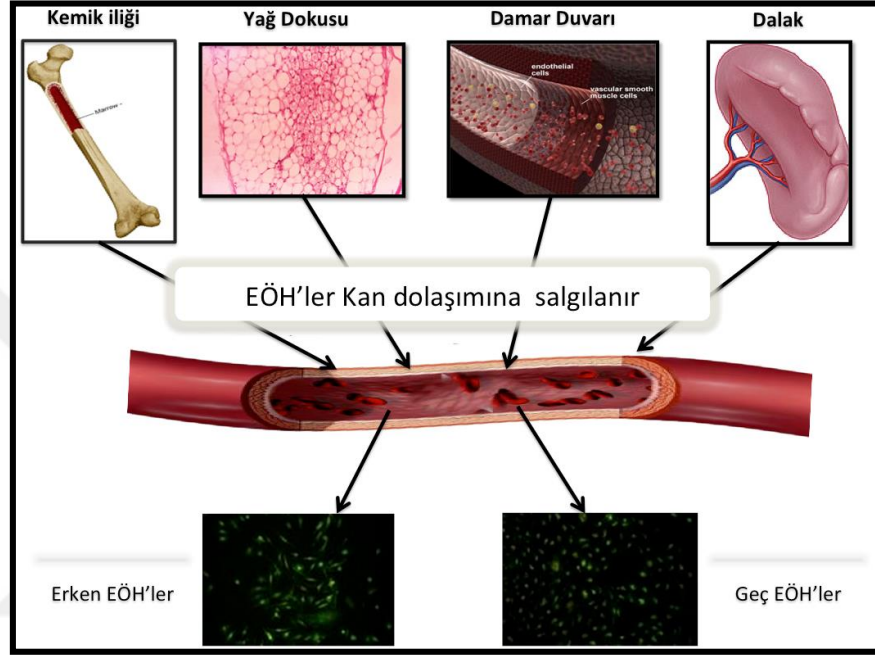
Genel olarak arterlerde hücre döngüsü çok düşük(145). Lokal ateroskleroz bakımından, endotel hasarları, okside lipidler, serbest radikaller, sitokinler, hemodinamik stres ve kan kolesterol yüksek konsantrasyonları tarafından indüklenebilir. Bütün bu olaylar anti-trombotik özelliklerin kaybıyla, endotelial hücre tabakasının apoptoz / nekrozuna neden akut stres yaralanmalara yol açabilir(146). Hücre kümelerinin replikasyon seviyesinin çoğalmasıyla, bu hücrelerin plazma proteinlerine permabilitesinin çoğalması yakından ilişkilidir(145). Ateroskleroz dayanıklı arter alanlarında endotel hücreleri yaklaşık 12 aylık bir ömürleri vardır oysaki lezyon eğilimli yerlerin hücreleri birkaç hafta veya hayvanın yaşına bağlı olarak daha az yaşayabilirler(145).

Endotel disfonksiyonu ve yaralanmalar, hemen hemen her türlü vasküler hastalıklarda oluşur, bu hasarların takibinde endotelial onarım gerçekleşir. Ancak kritik durumlarda ve oluşan hasara bağlı olarak bu onarım yetersiz kalıp geri dönüşümsüz hasarlara yol açabilir(147).

2.2.4. Endotelial öncül hücre kaynakları:

Son bilgiler arter duvarının homeostazisi damar hasarı ve onarımı arasındaki dengeye bağlı olarak kan dolaşımında olan EÖH'lerin ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (147, 148).

Yetişkinlerde periferik dolaşımında, daha olgun EÖH bulunmaktadır; Bu hücreler CD133 ifadelerini kaybetmişler ama yine de CD34 ve VEGFR2 ifadesini devam ettirmektedirler. Doğum sonrası kemik iliği hematopoetik dokusundan türetilen EÖH'ler, EKH'lerin bazı özelliklerini göstermekle beraber yüksek rejeneratif potansiyele sahiptirler(149). Daha sonra yapılan farklı çalışmalardan elde edilen verilere göre EÖH'lerin başta kemik iliği olmak üzere farklı kaynaklardan periferal kana salgılandığı tanımlanmıştır (şekil2.11)(150).



Şekil 2.4. Periferik kanda bulunan EÖH'lerinin kaynakları

Son zamanlarda, birçok araştırmacı, çeşitli dokulardan, örneğin arter duvarında(151), dalakda(152), karaciğerde(153), ve yağ dokularında(154, 155), vasküler öncül hücrelerin varlığını göstermişlerdir.

2.2.1.1.3. Hasarlı Endotel Hücrelerin Endotelial Öncül Hücrelerle Onarımı:

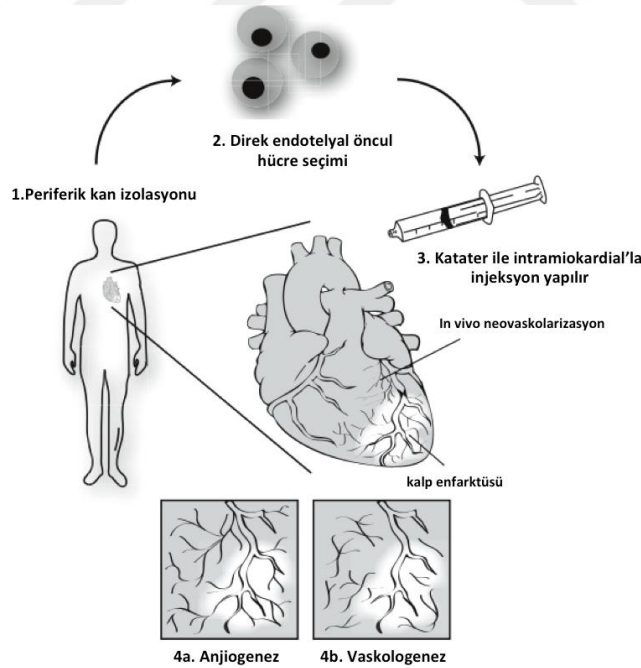
Sıçanlarda oluşturulmuş iskemi modellerinde (arka bacak iskemisi, miyokardiyal iskemi) EÖH trasplantasyon sonrasında, bu hücreler olgun endotel hücrelere dönüşerek iskemik bölgelerde neovaskülarizasyonu anlamlı derecede etkiledikleri gözlenmiştir.

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. Davani ve ark. 2007

yılında yaptıkları çalışmada, uzun süreli statin kullanan bireylerde EÖH'lerin belirlenmesini ve karakterize edilip edilemeyeceğini araştırmışlardır. Statin kullanan ve kullanmayan bireylerden elde edilen tüm mononükleer hücreler akım sitometrisi yardımıyla ayırıp, bu hücreleri özel koşullarda kültüre etmişlerdir. 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 hücre sayısını arttırdığını göstermektedir(156).

Olgun endotelial hücreler farklılaşmanın son ürünü olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla çok az proliferatif potansiyele sahip olup hasarlı endotel hücrelerinin sınırlı bir şekilde onarımında rol oynadıkları ortaya koyulmuştur. Birçok araştırmadan elde edilen verilere göre, hayvan modellerinde damar duvarlarının yaranmasından hasar gören endotel tabakasının onarımında kanda dolaşan EÖH'ler sorumludur(157).

İki bağımsız grup kemik iliğinden kaynaklanan öncül hücrelerin arter damar yaranması üzerine, yeniden endotelizasyonunun ve neointimal oluşumuyla etkili olduğunu gösterdiler(152, 158).

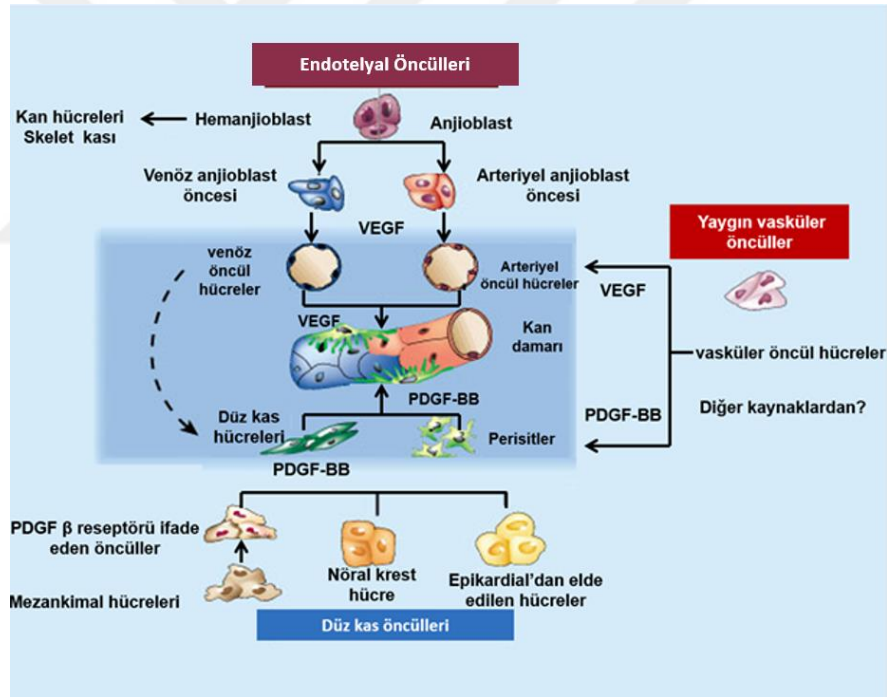


Şekil 2.5. Terapötik neovaskularizasyonda hücresel tedavi. (1 ve 2) Endotelial öncül hücreler, hücre ayırma teknikleri ile periferik kandan izole edilir. (3) Endotelial öncül hücreler katater kullanılarak miyokarda implante edilir (4a),(4b). Miyokardiyuma implante

edilen, endotelial öncül hücreler, önceden var olan damarların vaskülojenez veya anjiogenez uyarırlar(159).

Fiziksel egzersizsiz EÖH'lerin üretimini çoğaltır. Dolayısıyla egzersiz yapan bireylerde EÖH miktarında artış görülür. Bu nedenle fiziksel egzersizsizler EÖH artışına neden olmaktadır(160). Rauscher ve Ark. yaşlanmanın kan dolaşımında olan EÖH sayısında etkili olduğu ve bu nedenle aterosklerotik lezyon oluşumuna ve damar tamirinin azalmasına neden olabileceğini gösterdiler(161). Elde edilen verilere göre, kemik iliği hücrelerini enjekte ettikten sonra ateroprotektif etkisi nedeniyle hiperkolesterolemi ortadan kaldırılıp, EÖH'lerin tamir kapasitesi büyük ölçüde çoğalmaktadır(147).

EÖH'lerin kullanıldığı hayvan modellerinde damarların tedavisi açıkça neointimal hiperplazi engellenmesi ile olduğu ortaya koyulmuştur, ama henüz tam olarak bu konuyla ilgili hüresel olaylar ortaya koyulamamıştır(147).



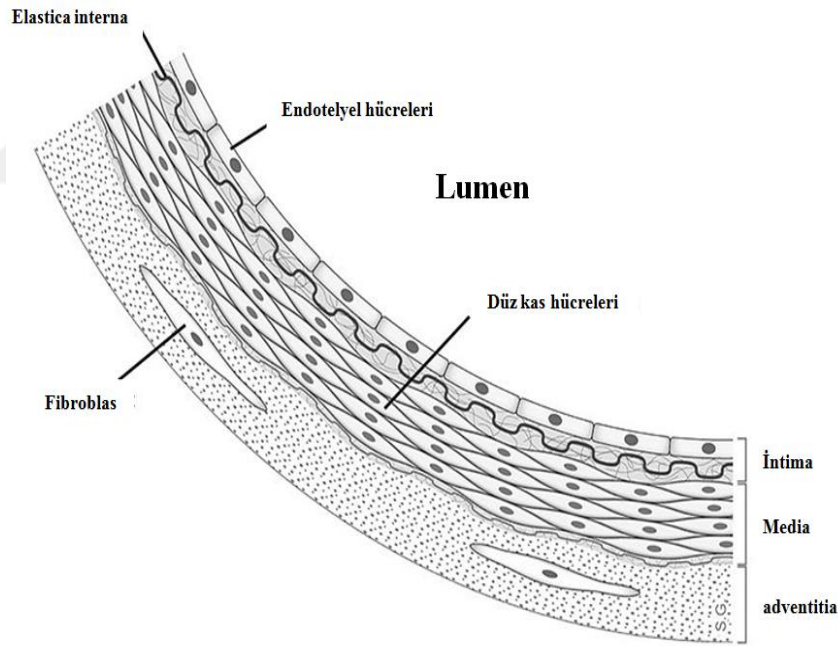
Şekil 2.6. Kan damarlarının iç duvarlarını endotel hücreleri oluşturmaktadır. Düz kas hücreleri veya endotel perisitler kanalları örten (kaplayan) hücrelerdir (merkez). Bu temel hücre tiplerinin farklı öncül hücre tiplerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Endotelial hücreler embriyo döneminde anjioblast ve hemanjioblast öncüllerinden (üst) veya erginlik döneminde endotelial öncül hücrelerinden üretilmektedir(114).

Düz kas hücreleri farklı öncül hücrelerden elde edilmektedir. Bu öncül hücre gurubu, embriyo ve erginde, embriyonik nöral krest hücreler ve epikardium (kalbin dış tabakası) embriyonik öncül hücreleri içermektedir. Düz kas hücreleri, endotel hücrelerinden de oluşabilir. Ama Yamaşıta ve ark'nin elde ettiği verilere göre kan damar hücrelerinin her iki tipini üreten diğer bir kaynak öncül hücrelerdir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), EÖH'lerin geliştirilmesini teşvik eder. Platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) düz kas hücrelerin ve perisitlerin gelişimi uyarmaktadır(114).

2.2.1.2. DÜZ KAS HÜCRELERİ:

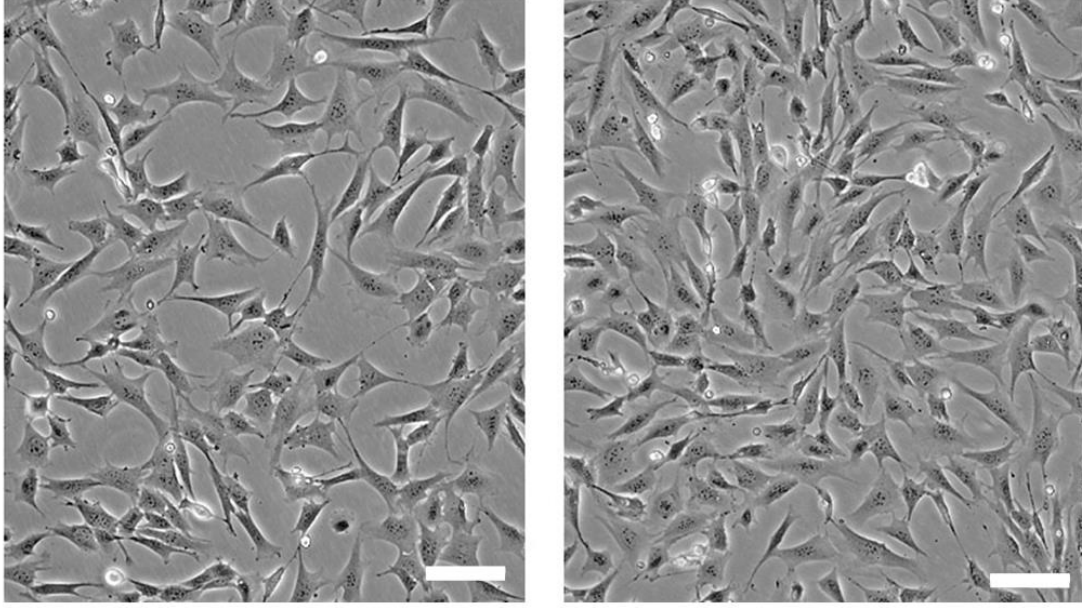
2.2.1.2.1. Vasküler Düz Kas Hücreler:

Vasküler düz kas hücreler, düz kas hücrelerin belirli bir kısmıdır ve kan damarlarının duvarlarında yer alan hücreleri oluşturmaktadır. Damarların duvarlarında bulunan düz kas hücreleri vücutta kan hacmini ve yerel kan basıncını kontrol etmektedirler. Bu mekanizma kan dolaşımını ve kanın gerekli yerlere taşınmasını sağlamaktadır.



Şekil 2.7. Kan damar duvarlarında düz kas hücrelerin lokalizasyonu

Vasküler düz kas hücrelerinin asıl görevi vücutta olan kan damarlarını kalibre etmesidir. Arterlerde, venlere göre daha fazla düz kas hücreleri bulunduğundan dolayı arterlerin duvarları daha kalındır(162).



Düşük yoğunluklu

Scale Bar=100µm

Yüksek yoğunluklu

Scale Bar=100µm

Şekil 2.8. 1999 yılında kollagenaz ve elastaz enzimi ile izole edilen vasküler aortik düz kas hücreler (ATCC, CRL-2797).

Damar duvarının oluşumu, hücre ve hücre dışı matriks bileşenleri, omurgalıların kalp-damar sisteminin gelişiminde ve olgunlaşmasında kritik bir süreçtir. Embriyonun organ sistemlerinin gelişiminde, besinlerin taşınması ve atıkların kaldırılması, dolaşım sisteminin asıl görevidir. Son on yılda damar gelişim sürecinin açıklanmasında çok büyük adımlar atılmasına rağmen vasküler ağın oluşumu ile ilgili birçok temel sorular cevapsız kalmaktadır. Vasküler öncül hücrelerin, nerede ve nasıl damar modelinin oluşumuna karar verdiği tartışılan sorular içinde yer almaktadır(163, 164) .

Endotel oluşumu ile ilgili birçok bilgi elde edilmiş olsada, vasküler düz kas hücre (VDKH) öncüllerinin farklılaşma yolağı ve bu hücrelerin kullanımının düzenlenmesi tam olarak açıklanmamıştır. Gelişme ve olgunlaşma sırasında, VDKH biyosentetik, proliferatif ve gelişmekte olan damar duvarının kasılma bileşeni olarak görev yapmaktadır. Bütün bu fonksiyonlar, fizyolojik açıdan olgun bir damarın oluşturulması için kritiktir(165). VDKH'ler, vasküler endotel ile bağlantılı hale geldikçe, ESM moleküllerini yardımıyla damar duvarının şekillenmesi ve onarımını organize ederler(166). Gelişim sürecinde ilkel VDKH'ler, olgunlaşmamış endotelle beraber kısa bir süre sonra çoğalmaya başlarlar. Damar olgunlaştıkça, VDKH'lerin varlığı, gelişmekte olan organizmada kan akışını sağlar(167).

2.2.1.2.2. Düz Kas Hücrelerinin Belirteçleri:

Başka hücre tipleri gibi, DKH'leri de kendilerine özgü belirteçlerle karakterize edilmektedir. Ancak bu karakterizasyon hücrenin gelişim sürecine göre farklı belirteçlerle yapılmaktadır. Bu hücrelerin ergin ve gelişmekte olan damar duvarlarında bulunan en önemli belirteçleri şunlardır:

SM α -actin:

Alfa-aktin-2, aortik düz kas aktini ya da düz kas alfa aktin olarak da bilinen (α -SMA, SM actin, alfa-SM-aktin, ASMA) insanlarda 10q22-S24'da bulunan ACTA2 gen tarafından kodlanan bir proteindir. Alfa-düz kas aktini (α -SMA) miyofibroblast oluşumunun bir belirteci olarak kullanılır(168, 169).

SM-MHC:

Myosin-11 insanlarda MYH11 gen tarafından kodlanan bir proteindir. Aynı zamanda AAT4, FAA4, SMHC ve SMMHC olarak tanımlanmaktadır. Bu protein miyozin ağır zincir ailesine ait bir düz kas miyozinidir. Myosin-11, bir hekzamer proteinin alt birimi olarak, iki ağır zincir alt-birimlerinden ve iki çift aynı olmayan hafif zincir alt-birimlerinden oluşmaktadır. Bu protein önemli bir kasılma proteini olarak, ATP hidrolizi ile kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürmektedir(170).

Kalponin:

Kalponin bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Kalponin düz kas miyosin ATPase aktivitesini inhibe eder. Kalponin aktine bağlı proteinlerin, fosfolipidlerin ve aktin miozin etkileşimini düzenlenmesinin bağlanmasından sorumlu bir proteindir(170).

Desmin:

Bu protein insanda DES geni tarafından kodlanmaktadır(171, 172). Bu gen DES; CSM1; CSM2 olarak gösterilmektedir. Desmin tip III intermediate filament olarak sarkomerlerin Z çizgisinin yanında bulunmaktadır. 1976 da (173) açıklanıp ve 1977 de(174) purifiye olup ve 1989 da klonlanmıştır. Desmin sadece omurgalılarda ifade edilir ancak homolog proteinler birçok bireyde bulunmaktadır(127). Bu protein 52 DK lik intermediate

filamentlerin alt birimi olarak iskelet kaslarında, düz kas dokularında ve kardiak kas dokularında bulunmaktadır. Demisin embryonik aşamada kas dokularında en erken ifade edilen proteinlerdendir. Erken kas hücrelerinin gelişiminde mevcut olsa da, sadece düşük seviyelerde sentezlendiği görünmektedir. Hücrelerin son farklılaşmasında ifade seviyesi artmaya başlar(171).

2.2.1.2.3. Düz Kas Hücrelerinin Damar Oluşumunda Rolü:

Ateroskleroz ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklar, geri dönüşümsüz ve fonksiyonunu kaybeden damar hasarlarıyla ortaya çıkar. Populasyonda sık görülen bu hastalıklar, yaşam kalitesini ve süresini etkilemektedir. VDKH'leri hipertansiyon ve takibinde aterosklerotik plak oluşumu mekanizmasında ve damar kalınlaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bazı moleküller örneğin PDGF (platelet-derived growth factor), VDK hücrelerin üzerine kemotaksik ve mitojenik etkisi vardır. PDGF-benzeri moleküller patolojik koşullarda otokrin şekilde VDK hücreleri tarafından üretilmektedir. Endotelial ve DK hücreleri immün aktivasyon yolağıyla ve imünoglobulin ve selektin adezyon moleküllerinin sentezi ile damar duvarı hasarına yanıt verirler. Örneğin hücreler arası yapışma molekül-1 (ICAM-1), vasküler adezyon molekül-1 (VCAM-1) veya endotel lökosit adezyon molekül-1 (ELAM-1) antijenleri bahsedilen hücrelerin üzerinde bulunmaktadır(175).

Bu moleküller örneğin lökositler, lenfositler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücreleri için reseptör olarak tanımlanmaktadır. Damar duvarının patolojisinde mast hücrelerinin rolü genellikle göz ardı edilmesine rağmen, patolojik olarak değişmiş bir damar duvarında mast hücrelerin, VDK hücrelerine olan oranı 1:5 olduğu rapor edilmiştir(176). Enflamatuar hücreler, damar duvarının içine nüfuz ettikten sonra, proteolitik enzimler salgılayıp, damar dışı matriksi okside edip bozabilir, böylece VDKH'lerin bu bölgeye göçünü ve gelişmesini etkilerler(177). Buna ek olarak, enflamatuar hücreler, interlökinler veya tümör nekroz faktör (TNF) gibi sitokinler üretirler. PDGF'ye benzer şekilde, bu maddeler VDK hücrelerinin fenotiplerini değiştirip kasılan hücre fototipe farklılaşmalarını etkilerler(178).

Sonuç olarak, VDK hücreleri, kan damarlarının fizyolojisinde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca patolojik koşullar altında yeniden damarlanmayı sağlarlar. Bu hücrelerin adezyonu,

hareketi, çoğalması ve farklılaşma özellikleri bu hücrelerin klinikte uygulamasında önemli faktörler arasında yer almaktadır. Ayrıca damar hasarlarının onarımında veya angiogenezinde endotel hücrelerin yanı sıra VDKH'lerin kullanımı bu hasarların onarımını veya anjiogenez hızını artırmaktadır. Buna ek olarak hücre-madde iletişimde özellikle bahsedilen proteinlerin bu mekanizmada büyük bir görev sahibi oldukları tanımlanmaktadır.

2.2.1.3. HÜCRE ADEZYONUNDA ÖNEMLİ OLAN PROTEİNLER:

Hücre-madde adezyonunda hücre dışı matriks (HDM) proteinleri belirgin bir şekilde hücre tutunması, hareketi, çoğalması, metabolik aktivite, canlılığı, farklılaşması ve fenotipik olgunlaşmasında aracılık etmektedir. Bu proteinler özellikle kollajen, elastin, fibronektin, vitronektin ve laminin içerirler. Bu proteinlerin çoğu in vivo ortamda vasküler HDM'nin önemli bileşenleridir ve bu nedenle, kan damarının yeniden yapılmasında ve rejenerasyonunda önemli bir rol oynamaktadır(179).

Kollajen memelilerin dokularında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu protein memelilerde, tüm proteinlerin % 25-30'unu oluşturmaktadır. Bu molekül (alfa zinciri olarak adlandırılır) üç polipeptit zincirinden oluşup, her biri sol heliks formundadır. Bu güne kadar, 29 çeşit kollajen tanımlanmıştır. En yaygın olanı kollajen, tip I'dir. Bir canlı organizma içinde bulunan kollajenin % 90'ını temsil eder ve esas olarak epidermis, bağ, kemik ve diş içerisinde bulunmaktadır ve aynı zamanda vasküler HDM'nin önemli bir bileşenidir. Kollajen tip II kırıkdağları oluşturur. Tip III embriyonik gelişme kollajenidir ve daha sonra kollajen I'e değiştirilir(179). Ancak patojenik koşullarda damar duvarlarında miktarı yükselmeye başlar(180, 181).

Tip IV kollajen laminin ile birlikte bazal lamina meydana çıkar. Laminin ile birlikte VDK hücrelerin kasılan fenotipini korur(182). VDK hücreleri, β 1-integrin yapışma molekülü ile özellikle kollajen reseptörleri olarak adlandırılır. α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1 integrini ile kollajene bağlanırlar. Elastin çözünmeyen skleroprotein olarak tanımlanır ve hayvansal dokularda (bağlar, bronşlar, akciğerler ve damar duvar dokuları) elastik liflerin ana bileşenidir. Kalbe yakın büyük damarlarda, torasik aort veya karotid arterler gibi damarlarda elastin yüksek miktarlarda bulunmaktadır(183).

Fibronektin dimerik glikoproteinlerin ailesine (yaklaşık ~440kD) aittir. Fibronektinler HDM'de bulunan kollajen, heparin sülfat ve fibrin gibi proteoglikanlara bağlanıp, vasküler hasar onarımına dahil yara iyileşmesine, katılan bir geçici matriks molekülü oluştururlar. Bu protein kan serumunun önemli bileşeni olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca hücre kültürü besiyerlerinde ek protein olarak kullanılmaktadır(184).

Vitronektin 459 amino asitden oluşan bir 75 kDa glikoproteindir. Bu protein kan dolaşımında 200-400 mg/ml konsantrasyonunda bulunan bir glikoproteindir. Ayrıca HDM olarak besiyerine ilave edilen ve serumun içinde bulunan bir proteindir. Hücre kültürlerinde, vitronektin VDKH'lerin göçünü ve çoğalmasını etkilemektedir(185).

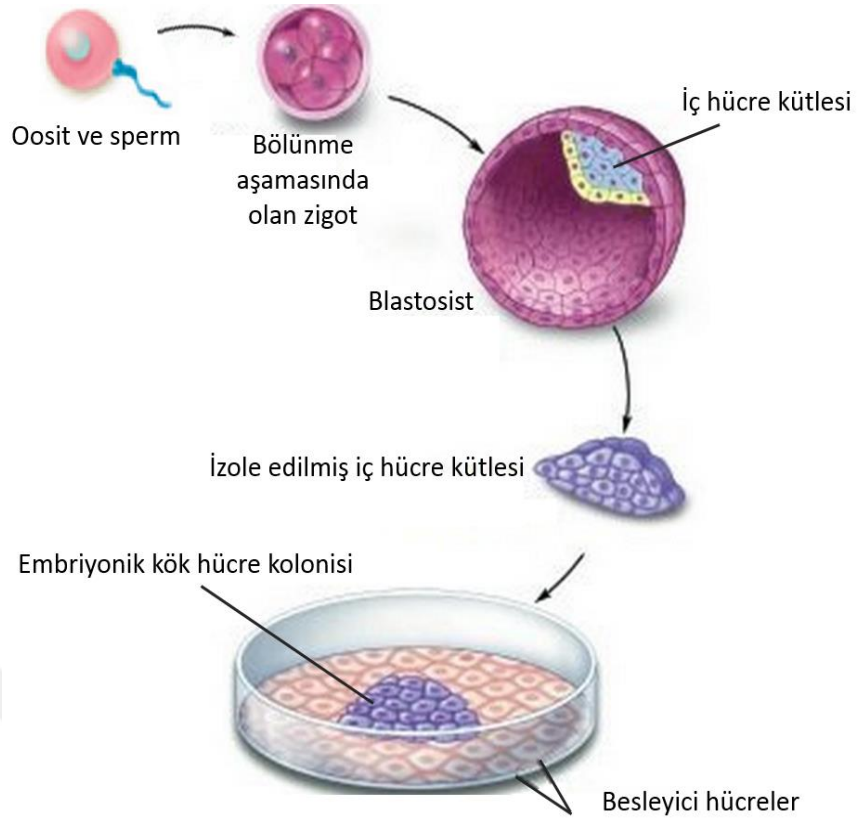
Lamininler büyük moleküllü heterotrimer proteinlerdir (850kDa). Bu proteinler bazal laminada bulunan en önemli proteindir. Damar duvarlarında, kolajen IV, elastin ve sülfatlı ve heparin benzeri glikozaminoglikanlarla birlikte VDK hücrelerinin kasılma fenotipine farklılaşmasını sağlamaktalar. Laminin 16 izoformu, memelilerde tanımlanmıştır. Laminin hücresele reseptörleri $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$, $\alpha9\beta1$ integrinlerden ibarettir(186, 187).

Bu proteinler kardiyovasküler onarımda da çok önemli rol oynarlar. Bu sistemde hasar olduğu zaman hücre madde intraksiyonu ile göç eden hücreler hasarlanmış bölgeye yerleşip dokunun onarımını sağlarlar.

2.3. KÖK HÜCRELER

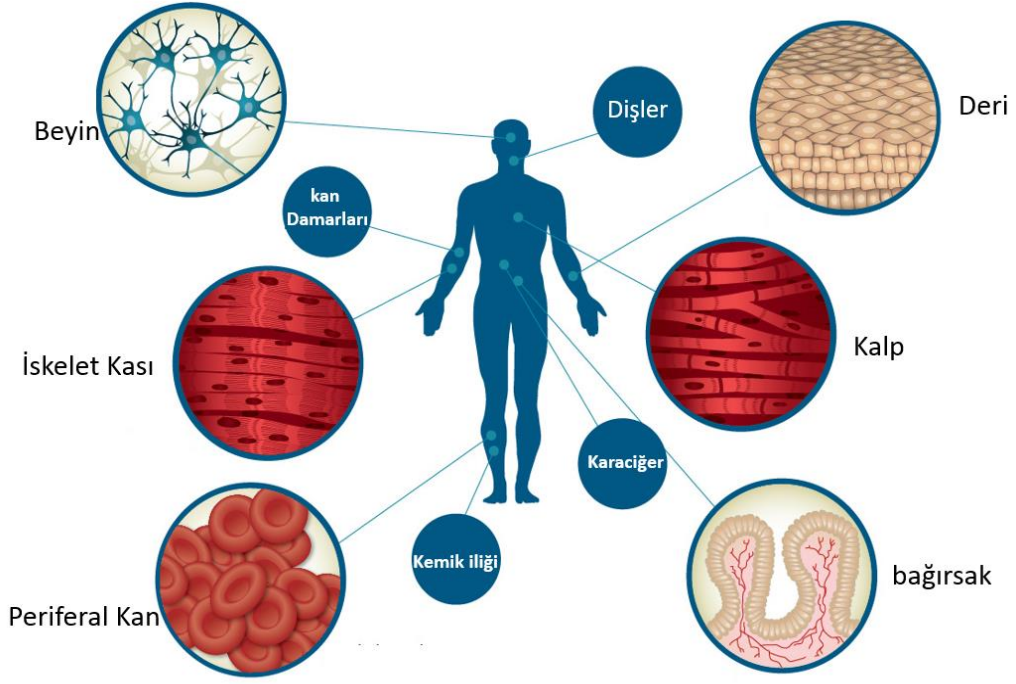
Kök hücreler, çok hücreli organizmalarda yer alan, her tip hücreye farklılaşabilme özelliğine sahip ve kendini yenileme potansiyeli olan hücrelerdir. Bu hücrelerin iki genel tipi bulunmaktadır;

1. Embriyonik Kök Hücre: Embriyonun blastosist iç hücre kütesinden elde edilen ve pluripotent özeliğe sahip olmaları sebebiyle vücuttaki tüm hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.9. Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu

2. Erişkin Kök Hücreler: Bir organizmanın farklı dokularında yer alan kök hücrelerdir. Bu tip hücreler beyin, iskelet kası, periferal kan, bağırsak, kalp, deri, kemik iliği, karaciğer, kan damarları ve dişlerde bulunmaktadır (Şekil 2.92).

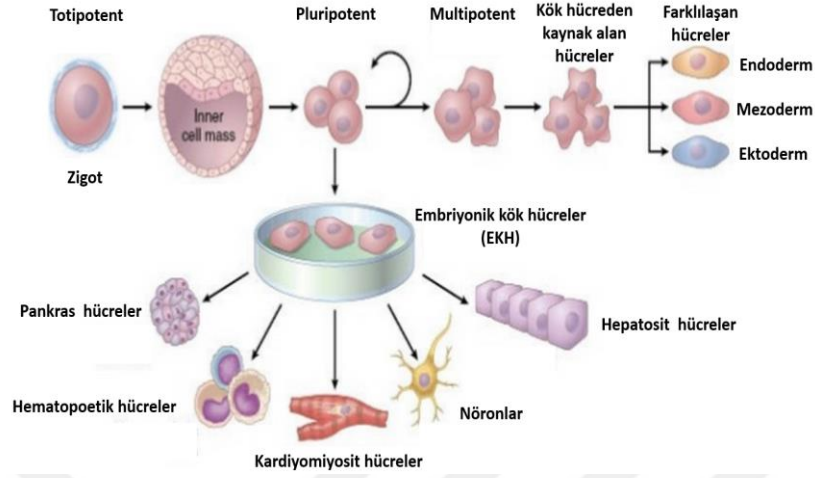


Şekil 2.10. Erişkin kök hücrelerin bulunduğu dokular

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre 5 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.3.):

- Totipotent Hücreler:** Bu hücreler embriyonik ve ekstra embriyonik hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir. Sperm ve yumurtanın birleşmesi ile döllenmiş olan bu hücreler, bir kaç bölünmeden sonra bile kendi özelliklerini korurlar(5).
- Pluripotent Hücreler:** Totipotent kök hücrelerden köken alıp hemen hemen tüm germ hücre tabakalarına ve tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler(6). Bu hücrelerden her üç germ tabakasını oluşturmak mümkündür. Örnek olarak embriyonik kök hücreler(7).
- Multipotent Hücreler:** Bu hücreler birçok hücre tiplerine, özellikle birbirine yakın olan hücre tiplerine farklılaşabilirler. Örnek olarak mezankim kök hücreler (6).
- Oligopotent Hücreler:** Bu hücreler sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler. Örnek olarak lenfoid veya miyeloid kök hücreler verilebilir(6).
- Unipotent Hücreler:** Bu hücreler tek tip hücreye farklılaşabilirler. Kendini yenileyebilme potansiyellerinden dolayı kök hücre olmayan hücrelerle farklılık

göstermektedirler. Bu hücelere örnek olarak öncül hüceler, kas kök hüceleri verilebilir(6, 8).



Şekil 2.11. Kök hücelerin kökeni ve farklılaşma potansiyelleri

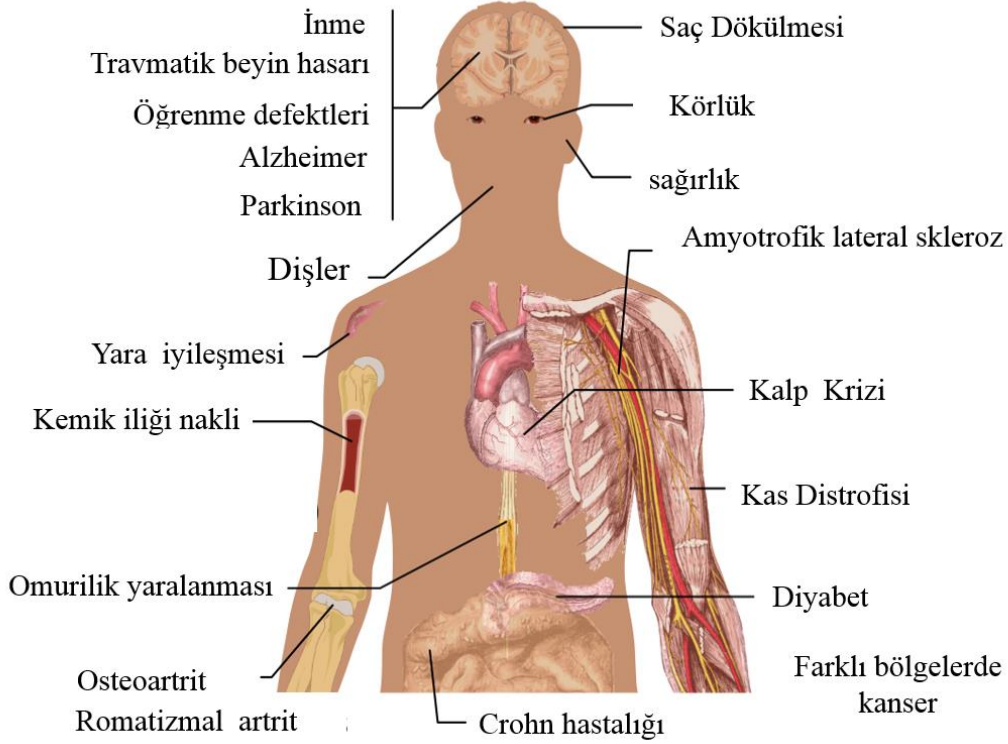
2.3.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİ

1981 yılında Martin Evans-Matthew Kaufman ve ark. tarafından, ilk olarak sıçan embriyonik kök hücelerin (EKH) izole edilmesi bilim dünyasında çok büyük ilgi görmüştür(8, 9). Thomson ve ark 1998 yılında, insan blastosist embriyolarından insan embriyonik kök hüceleri izole edilip ve kültüre edilmiştir(10). Bu gelişmelerin ışığında, araştırmacılar kök hüceleri birçok hastalıkta tedavi amacıyla kullanmayı tasarlamış ve kök hücre araştırmalarına büyük umutlar bağlamışlardır. Embriyonik kök hücelere, sahip oldukları plastisite ve limitsiz olarak kendilerini yenileyebilme özelliklerinden dolayı, yenileyici tıp uygulamalarında ve doku replasman çalışmalarında büyük önem kazanmışlardır. Tüm bu olumlu özelliklerine rağmen insan embriyonik kök hücelerin kullanımını kısıtlayan iki önemli problem bulunmaktadır;

a) Embriyonik kök hücelerin izolasyonu sırasında insan embriyolarının yok edilmesi etik problemler oluşturmaktadır.

b) Hücre transplantasyonundan sonra, alıcının bağışıklık sistemi tarafından tanınması ve yabancı olarak algılanıp savunma hücelerin saldırısına uğraması immün rejeksiyona neden olmaktadır.

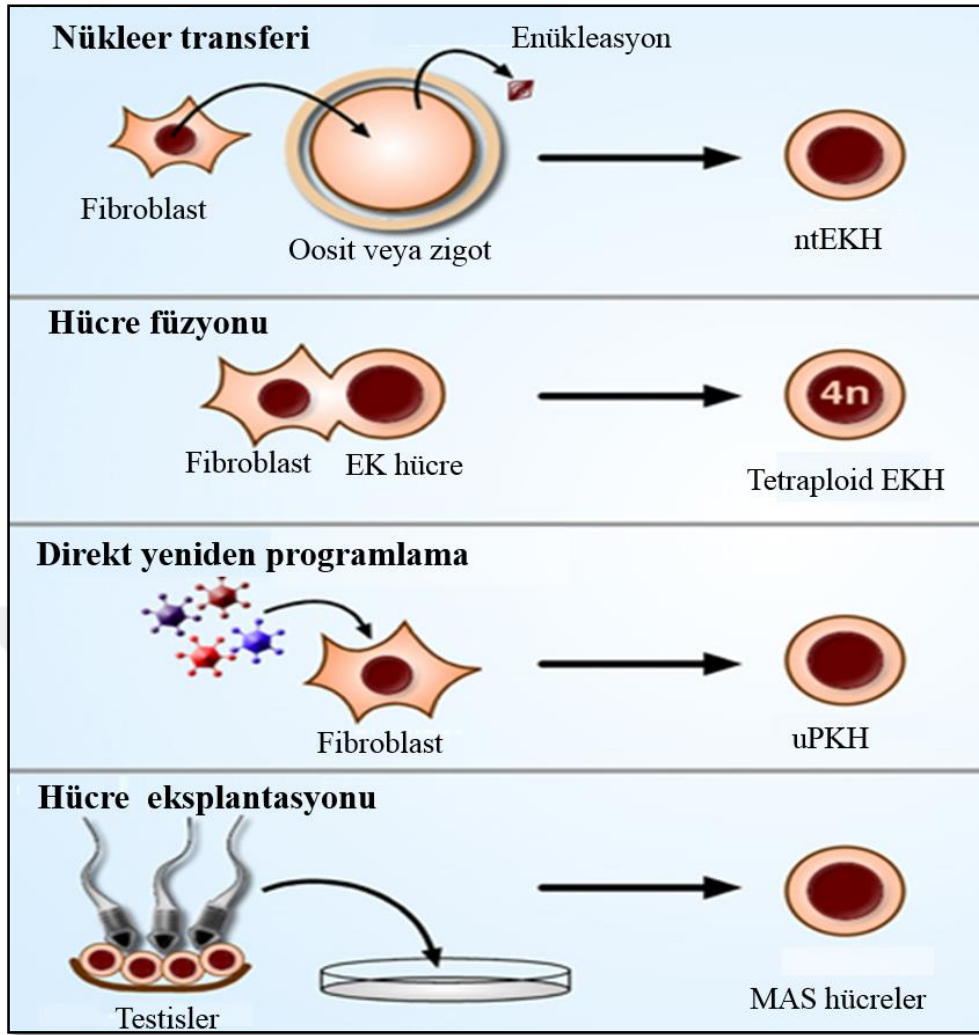
Ancak bu sıkıntılara rağmen, bu hücreler tıp alanında kullanılmıştır. Kök hücrelerin klinikteki uygulamaları arasında; Romatizmal artrit, parkinson, alzheimer, osteoartrit(11), inme ve travmatik beyin hasarı, kalp krizi(12), öğrenme defektleri(13), omurilik yaralanması(14), saç dökülmesi(15), diş problemleri(16), sağırılık(17), körlük(18), amiyotrofik lateral skleroz(19), yara iyileşmesi(20), crohn hastalığı(21) gibi hastalıklar başta gelmektedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Kök hücrelerin kullanıldığı alanlar(22)

İnsan embriyonik kök hücrelerinin klinikte kullanılmasını kısıtlayan problemlerin bulunması, araştırmacıları farklı hücre tipleri ile çalışmaya ve kök hücre kullanımında farklı yöntemler geliştirmeye yönlendirmiştir. Günümüze kadar kök hücre çalışmalarında aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır;

- Hücre füzyonu
- Yeniden programlama
- Somatik hücre nükleer transferi
- Direk yeniden programlama



Şekil 2.12. Kök hücre üretiminde kullanılan yöntemler

2.3.2. UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELER

2006 yılında ilk defa Yamanaka ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, fare fibroblast hücrelerinden pluripotent hücreler elde edilmiştir. Bu çalışmada viral transfeksiyon (retrovirüs vb.) yöntemiyle belirli genlerin fibroblast hücrelere aktarılmasıyla, somatik olan bu hücrelere embriyonik kök hücrelere benzer özelliklerin kazandırılması sağlanmıştır. Yeniden programlanan somatik hücreler pluripotent özelliği kazanmaktadır. *Oct-4*, *Sox2*, *Klf4* ve *c-Myc* genlerinin aktarılmasıyla pluripotent özelliği kazanan bu hücreler uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) olarak tanımlanmışlardır. uPK hücreler, belirli genlerin ifade edilmesiyle, pluripotent olmayan somatik hücrelerden geri farklılaştırılarak üretilmektedir(23).

2007 yılında insan somatik hücrelerinden uPKH üretimi için, *Oct-3/4*, *Sox2*, *c-Myc* ve *Klf4* genlerinin aktarımı ve ifadesiyle uPKH elde edilmiştir. Zamanla bu hücrelerin farklı hastalıklarda kullanılabilme düşüncesi büyük bir önem kazanmıştır(24). uPKH'ler, belirli genlerin ekspresyonu, proteinler, kromatin metilasyon paterni, embriyoid, teratoma, yaşayabilir kimera gibi özellikleri göstermeleri sebebiyle embriyonik kök hücrelere benzerlik göstermektedirler. Ancak bu hücrelerin pluripotent kök hücrelerle ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır.

uPKH'lerin geliştirilmesi bilim dünyasında büyük bir ilgi uyandırmıştır. Bunun en önemli sebebi embriyonik kök hücrelerin kullanımını sınırlayan iki temel problemin ortadan kalkmış olmasıdır. uPKH'ler kök hücre araştırmalarına büyük avantajlar sağlamıştır;

- İnsan embriyosundan köken almaması ve böylelikle etik problemlerin çözülmesi sonucunda bu hücrelerin pek çok araştırmada rahatça kullanılması sağlanmış olması,
- Hastanın kendi hücresinden uPK hücre üretiminin mümkün olması ve bu nedenle immünorejeksiyon probleminin ortadan kalkması ile her hastaya özgü uPKH üretilmesi mümkün hale gelmiş olmasıdır.

2.3.2.1. Farklı Hücre Kaynaklarından uPK Hücrelerinin Elde Edilmesi

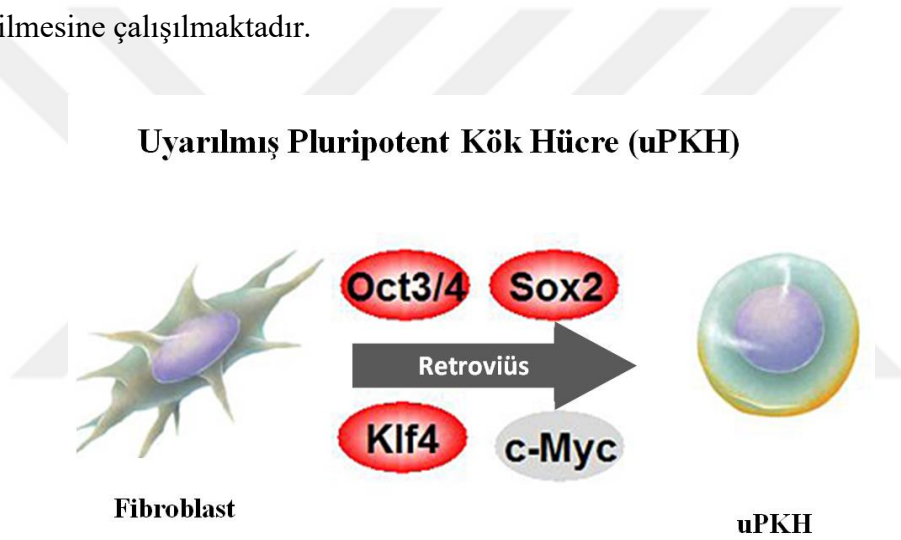
uPK hücrelerinin geliştirilmesinden sonra bu hücrelerin değeri arttıkça, dünyanın her bir yerinden farklı gruplar bu hücrelerle ilgili çalışmaya başlamışlar ve birçok grup bu hücreleri farklı hücre kaynaklarından elde etmişlerdir. 2008 yılında Hanna ve arkadaşları, fare B-Lenfosit hücrelerinden, Stadfeld ve arkadaşları ise fare pankreatik β hücrelerinden uPKH üretmişlerdir(25, 26).

Sonraki çalışmalarda sırasıyla, fare nöral kök hücrelerinden(27), ergin farenin karaciğer ve mide hücrelerinden(28), insan keratinosit hücrelerinden(29), hematopoietik hücrelerden(30), fare melanosit hücrelerinden(31), insan periferel kan hücrelerinden(32), insan amniyotik hücrelerden(33), *Oct-4* ve *Sox2* kullanarak insan kordon kanının endotelial hücrelerinden(34), adipoz kök hücrelerinden(35), insan hepatosit hücrelerden(36), lentivirüs vektör kullanarak insan periferel kan hücrelerinden(37), plasmid vektör yardımıyla insan postnatal tek çekirdekli kan hücrelerinden (entegere olmayan yöntemle)(38), sendai virüs kullanarak insan periferel kan hücrelerinden(39), viral olmayan polisistronik plazmid

kullanarak insan adipoz dokusundan elde edilen kök hücrelerden (40) ve c-Myc aktarmadan insan adipoz dokusundan elde edilen kök hücrelerden (41) uPK hücreleri elde edilmiştir. Günümüzde bir çok çalışma farklı hücre kaynaklarından uPKH'si üretmek için devam etmektedir.

2.3.2.2. Yamanaka Faktörleri:

2006 yılında Yamanaka ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre hücrenin yeniden programlanması için en az 4 transkripsiyon faktörü (Oct-4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) gerekmektedir (Şekil 2.7). Bu faktörler hücreyi embriyonik safhaya götürüp pluripotensi özelliği sağlamaktadırlar. Bu faktörler bilim dünyasında Yamanaka faktörleri olarak tanımlanmaktadır. Daha sonra yapılan araştırmalarda bu faktörlerinin en aza indirilmesine çalışılmaktadır.



Şekil 2.13. Retrovirüs gen aktarımıyla fibroblast hücrelerinden uyarılmış pluripotent kök hücre elde edilmesi

Oct-4: Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4) proteini insanlarda POU5F1 geni ile kodlanmaktadır(42). POU ailesinden olan bu protein homeodomain transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu protein embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesinde kritik rol oynamaktadır(43). Bu nedenle bilim insanları tarafından farklılaşmamış hücrelerin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. *Oct-4* geninin ifadesi hücrelerin farklılaşması ile yakından ilgilidir(44).

Oct-4 transkripsiyon faktörü oositte maternal faktör olarak aktif rol üstlenmektedir ancak implantasyon dönemi boyunca embriyolarda aktif halde kalır. Bu genin ifadesi farklılaşmamış olan fenotip ve tümörlerle ilişkilidir(45). Oct-4 geninin ifadesinin durdurulması hücrenin farklılaşmasına neden olur. 2005 yılında Zaehres ve arkadaşları, bu genin insan EKH'lerinin kendilerini yenileme özellikleri ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir(46).

2000 yılında Niwa ve arkadaşları, fare embriyonik kök hücrelerinde bu genin ifadesi ve susturmasıyla, bu hücrelerin korunması ve gelişimindeki rolünü araştırmışlardır(44). Ayrıca bu genin ifade seviyesinin, EKH'lerin hangi hücre tipine farklılaşacağına belirlemede önemli rol oynadığını tespit etmişlerdir. İfade seviyesi iki kattan az olursa ilkel endoderm ve mezoderm farklılaşmasına, bu genin susturulması hücrenin pluripotensisinin kaybına ve trofoktoderme farklılaşmasına neden olur. Böylece Oct-4'ün kritik bir seviyede ifadesi hücrenin kendini yenileme potansiyelini sürdürmesi için gereklidir ve bu genin ekspresyon seviyesinin düşük veya yüksek olmasına bağlı olarak farklı gelişim programlarını indüklemektedir. Niwa ve arkadaşları Oct-4 geninin pluripotenside ana regülatör rolüne sahip olduğunu belirtmişlerdir(44).

Oct-4, Sox2 ve Nanog transkripsiyon faktörlerinin birbirinin ifadesini indükleme potansiyeline sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu faktörlerin, embriyonik kök hücreler gibi blastosistin iç hücre kitle seviyesinin stabilitesi, farklılaşmamış hücrelerin kendilerini yenileme ve korunması için gerekli olduğu ortaya konulmuştur(47).

Oct-4 ile birlikte Sox2, Klf4 ve c-Myc, uyarılmış pluripotent kök hücrelerin oluşunda kullanılan transkripsiyon faktörleridir(48-50). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu dört faktörden yalnızca ikisinin (Oct-4 ve Klf4) fare erişkin kök hücrelerinin yeniden programlaması için yeterli olduğu tespit edilmiştir(27). Son olarak, tek bir faktör yani Oct-4'ün bu dönüşüm için yeterli olduğu ispatlanmıştır(51). Farklılaşan hücrelerde Oct-4 geninin ifadesi daha düşük seviyededir ve bu gen bir kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır.

Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2 veya Sox2 farklılaşmamış olan embriyonik kök hücrelerin pluripotensisi seviyesini korumak ve bu hücrelerin kendini yenilemesini sağlamak için gerekli olan bir proteindir. Bu faktör Sox2 transkripsiyon faktör ailesine ait olup memelilerin gelişiminde önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu protein,

embriyonik ve nöral kök hücrelerin stabilitesinde, indüklenen pluripotenside ve onarımsal tıp alanında kritik bir role sahiptir(52).

LIF sinyali (Leukemia inhibitory factor) embriyonik kök hücreleri pluripotent safhasında tutan protein olarak JAK-STAT sinyal yolağını etkilemekte ve *Sox2* geninin ifade seviyesin korurken *Klf4* geninin ifade seviyesinin de artışına neden olmaktadır. Ayrıca *Oct-4*, *Sox2* ve *Nanog* genlerinin yüksek ifade seviyesi, LIF yolağında olan tüm pluripotensi genlerinin transkripsiyon seviyelerini düzenlemektedir(53).

NPM1 (nükleofosmin) geni, tek başına bir transkripsiyon düzenleyicisi olarak ve *Sox2*, *Oct-4* ve *Nanog* ile birlikte kompleks oluşturarak, kök hücrelerin proliferasyonu ve pluripotensi regülasyonunda önemli etki göstermektedirler(54, 55)

Oct-4 ve *Sox2* enhancerlerinin(hızlandırıcılar) düzenlenmesi, *Sox2* olmadığı durumlarda da gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte yapılan araştırmaların sonucunda, *Sox2*'nin embriyonik kök hücrelerde ana rolünün *Oct-4* ifadesinin kontrolü olduğu ortaya çıkmıştır(56).

Yamanaka ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada *Sox2* proteini, *Oct-4*, *c-Myc* ve *Klf4* genleri ile birlikte uPKH'lerin oluşumunda yeterli oldukları gösterilmiştir. Bu sayede sadece 4 transkripsiyon fakörünün pluripotenside gerekli olduğu gösterilmiş ve bu durumda en az manipulasyonla rejeneratif tıpta kullanıma sunulmuştur(24).

Pluripotensinin kaybı, germ hücrelerinde *Sox2* ve *Oct-4* hipermetilasyonu ve *Sox2* geninin post transkripsional baskılanması, miR134 ile gerçekleşmektedir(57, 58). *Sox2*'nin değişen seviyeleri embriyonik kök hücrelerin farklılaşma kaderini etkileyebilir ve mezoderm germ tabakasının oluşumunu inhibe edip bu hücrelerin nöral ektoderm tabakasına farklılaşmasını sağlamaktadır(59). *Sox2* NPM1 ile bir kompleks oluşturarak, ektoderm farklılaşma sürecinde ektoderm tabakası oluşana dek önemli işlevsel rol oynamaktadır(54). Ancak *Sox2* ifadesi öncül hücre farklılaşmasının son safhasında azalmaktadır(60).

Klf4: *Klf4* (Kruppel-like factor 4), insanlarda *Klf4* geni tarafından kodlanan bir proteindir. EKH'lerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu protein mezenkimal kök hücrelerde (MKH) de belirteç olarak tanımlanmıştır. *Klf4*'ün CREB-bağlayıcı protein ile etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. *Klf4* transkripsiyon faktörü, β -katenin ile bir kompleks

oluşturarak enzimatik alt birim olarak telomeraz (Tert) promotorunda bulunmaktadır ve bu genin ifadesini etkilemektedir. Ancak β -katenin yokluğunda *Tert* geninin ifadesini değiştirememektedir(61).

c-Myc: c-Myc (Myc) regülatör bir gen olup ve transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır. c-Myc'in mutant versiyonu birçok kanserde bulunmaktadır. c-Myc'in işlev bozukluğu, serviks, kolon, göğüs, akciğer ve mide kanserinde belirlenmiştir. c-Myc çok güçlü bir proto-onkogen olup, birçok kanser türünde ifade seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. Nobel ödüllü James D. Watson ve arkadaşları, Myc'in anti-kanser ilaçlar için umut verici bir hedef olduğunu belirtmişlerdir(62-64).

İnsan genomunda Myc, kromozom 8 üzerinde yer almaktadır. Bu gen enhancer kutu dizisine (E-boxes) bağlanarak, histon asetil transferazları (HAT'ları) etkileyerek tüm genlerin % 15 inin ifadesini regüle etmektedir(62). c-Myc proteini bir transkripsiyon faktörü olarak, konsensus (korunmuş) dizilerine (Enhancer Box sequences (E-boxes)) bağlanır ve histon asetiltransferazları (HATs) aktive ederek birçok genin ifadesini düzenler. Transkripsiyonel represör olarak da görev yapan Myc aynı zamanda, DNA replikasyonunun kontrolünde doğrudan rol oynamaktadır(63).

Myc daha önce belirtilen görevlerinin yanı sıra, Wnt, Shh yollarının ve endotelial büyüme faktörünün (EBF) (MAPK / ERK yolağıyla) çeşitli mitojenik sinyallerinin aktif hale gelmesinde rol almaktadır. c-Myc aktivasyonu, hedef genlerin ifadelerinin modifikasyonu ile birçok biyolojik etkilere neden olmaktadır. Hücre proliferasyonunda etkili olduğu bilinen c-Myc, hücre büyümesinde ve kök hücrelerinin kendini yenilemesi ve farklılaşması üzerinde önemli rol oynamaktadır(64).

Nanog (Homeobox Protein NANOG): Embriyonik kök hücrelerin kendini yenilemesi ile ilgili önemli bir transkripsiyon faktörüdür(65, 66) ve hücrelerin pluripotensisini korumada önemli görevi vardır. EKH 'lerin tanımlanmasında Oct-4 ve Sox2 gibi faktörlerin yanında Nanog da kullanılmaktadır(67). Yapılan çalışmalarda embriyoların, Oct-4, Nanog ve *Rex1* gibi pluripotent genleri ifade ettikleri gösterilmiştir. Nanog proteini, Rex1 promotorunun transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır.

Fare EKH'lerinde Nanog'un aşırı ekspresyonu, bu hücrelerin LIF eksikliğinde kendini yenileme yeteneklerini korurken(65, 66), insan EKH'lerinin pluripotent safhada kalmasını sağlamaktadır(68). Nanog geninin susturulması, hücreleri farklılaşmaya teşvik eder(46).

Yamanaka ve arkadaşları, fare embriyonik veya erişkin fibroblastlardan, Oc3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 yardımıyla EKH'ye benzer hücre elde etmelerinin ardından yapılan çalışmalarda, Nanog' un da bu faktörler arasında yer aldığı ve vazgeçilmez faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir(23).

Elde edilen EKH hatlarında pluripotenside rol oynadığı gösterilen diğer spesifik belirteçler aşağıda sıralanmıştır(69).

- TRA-1-60
- TRA-1-81
- SSEA4
- Alkalin fosfataz
- TERT
- Rex1

2.3.2.3. uPKH'lerin Avantaj ve Dezavantajları

uPK hücrelerinin bulunuşundan bu yana, bu hücrelerin klinikte kullanması birçok araştırmanın konusu olmuş ve birçok bilim insanı tarafından araştırılmıştır.

Bu hücreler bazı avantajlarından dolayı klinikte kullanılmak için daha uygun olmaktadır: (a) Hastaya özgü uPK hücresi üretmek mümkündür. (b) Erişkin insan veya hayvan için pluripotent hücre elde etmek mümkündür. (c) EKH'lerde olduğu gibi etik sıkıntılar bu hücrelerde ortadan kalkmıştır.

Bu hücreler birçok olumlu özelliklerine rağmen, klinikte kullanımını engelleyen bazı dezavantajlara da sahiplerdir. Bu dezavantajlardan biri viral transfeksiyondur. Bu hücrelerin üretiminde viral transfeksiyon yoluyla gen aktarımı yapıldığı için, virüsleri elimine etmek mümkün değildir. Bir diğer olumsuz etkisi de bu hücrelerde gen entegrasyonu olması nedeniyle klinikte kullanılmasının güvenilir olmamasıdır.

2.3.2.4. Klinikte kullanılabilir uPK hücre elde etme yöntemleri

Son zamanlarda yapılan çalışmalar uPK hücrelerin güvenilir şekilde kullanılması için dezavantajlarının azaltılması yönünde hızla ilerlemektedir. Bu yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

1) uPK hücrelerinin üretiminde kullanılan transkripsiyon faktörlerini en aza düşürmek;

Bu çalışmalarla uPK hücrelerin üretiminde rol oynayan 4 Yamanaka faktörünün sayısını azaltmak ve üretilmiş uPK hücrelerinde bu faktörlerin yan etkilerinin azaltılmasına çalışılmaktadır. Örneğin c-Myc yüksek derecede onkogen özelliğe sahiptir. Birçok çalışmada bu faktörü kullanmadan uPK hücresi elde edilmesi başarılabilmiş (28) veya yalnız iki faktör'le (Oct-4 ve Klf4) uPK hücreleri üretilenmiştir(27).

2) uPK hücrelerinin üretiminde güvenilebilir yöntemler veya entegre olmayan yöntemlerin kullanılması (integration free ips);

uPK hücrelerin üretiminde farklı yöntemler izlenmektedir:

a) Entegre olan yöntemler

Retrovirus veya lentivirüslerle transfeksiyon: Entegre olan yöntemde Yamanaka faktörleri “retrovirus” aracılığıyla (48-50) veya “lentivirüslerle” aktarılır(70, 71). Bu yöntemlerde ekzojenik gen entegrasyonu ve viral transfeksiyonla elde edilen uPK hücrelerin, pratikte kullanması güvenilir değildir.

Uygun azaltma (Excisable) metodu: Bu yöntemde polisistronik viral vektör kullanılmaktadır. Tek polisistronik viral vektör kullanıldığı için virüs sayısı azaltılmıştır(72).

Transpozon: 1950 yılında Barbara McClintock tarafından tanımlanan transpozonlar hareket edebilen genetik birimlerdir. Bunlar tek bir hücrenin genomunda bir pozisyonun başka bir pozisyona taşınabilirler. Bunlara “jumping genes” adı da verilmektedir. Son yapılan bir çalışmada “piggy Bac transpozon” kullanarak yamanaka faktörlerinin aktarılmasıyla yüksek verimli uPKH hücreleri elde edilmiştir(73).

b) Entegre olmayan yöntemler (Non-integration methods):

Plasmid: İlk defa plasmid transfeksiyon yöntemi ile fare embriyonik fibroblastlarından (FEF'ler) uPK hücreleri elde edilmişti(74).

Adenoviral: 2008 yılında Stadfeld ve arkadaşları tarafından, ilk defa erişkin fare hepatositlerinden entegre olmayan adenovirüs vektörü kullanarak uPK hücreleri üretilmiştir(26). Bu yöntemle insan fibroblast hücrelerinden uPK hücrelerin üretilmesi 2009 yılında Zhou ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir(75).

Bu yöntemlerden entegre olan yöntemler güvenilir yöntemler olmamakla birlikte, gen entegrasyonu ve viral transfeksiyon ile elde edilen uPK hücrelerinin klinikte kullanımı neredeyse mümkün olmamaktadır. Ancak virüs sayısının azaltıldığı (excisable) yöntem veya entegre olmayan yöntemlerden elde edilmiş uPK hücrelerinin klinikte kullanılma potansiyeli daha yüksektir.

c) Yamanaka faktörlerinin protein veya mRNA'larını kullanarak uPKH'lerin elde edilmesi (DNA-free method)

İlk defa 2009 yılında, insan ve fare hücrelerinden viral veya vektör plasmidi kullanmadan, sadece yeniden programlama faktörlerinin rekombinant proteinleri kullanılarak uPK hücrelerinin oluşturulması gerçekleştirilmiştir(76). Viral transfeksiyon ve gen entegrasyonunun olmaması sebebiyle klinikte kullanılma potansiyeli daha yüksek ve güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntemin tek dezavantajı, veriminin çok düşük olmasıdır.

2010 yılında yapılan bir çalışmada yamanaka faktörlerinin mRNA'larının aktarılmasıyla uPK hücreleri elde edilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen uPKH oranı daha yüksek olmakla birlikte klinikte kullanma potansiyeli daha fazladır(77).

d) Direkt yeniden programlama:

Zhou ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, farede bulunan erişkin ekzokrin hücrelerini beta-hücrelerine yeniden programlamışlardır. Erişkin hücrenin bazı maddeler kullanarak, pluripotent kök hücre yapmadan direkt olarak bir başka erişkin hücreye yeniden programlanmıştır(78).

2.3.2.5. uPK Hücrelerin Klinikte Kullanımı

uPKH'lerin saydığımız avantajlarından dolayı, özellikle hastaya özgü uPKH üretilmesi, bu hücrelerin klinikte kullanılmasına zemin hazırlamıştır. Biçok araştırmacı bu hücreleri kendi klinik araştırmalarında kullanmıştır.

2010 yılında Hollanda'da yapılan bir çalışmada önce bir herediter hemorajik telenjektasia (HHT) hastası ve 2 sağlıklı bireyden, uPK hücre hattı üretilmiş, bu hücrelerin embriyonik kök hücreler gibi belirli ekspresyon paterni gösterdikleri tespit edilmiştir. *In vitro* koşullarda bu uPK hücrelerden embriyonik süreçte rol alan 3 tabakalı yapı oluşturulmuştur. Ayrıca bu hücrelerden yine *in vitro* koşullarda kardiyomyositler ve vasküler hücreler elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan tekniğin, bu hastalıklarla çalışabilme potansiyelinin yüksek olduğu açıklanmıştır(79).

2009 yılında Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, önce Oct-4, Sox2, Nanog ve Lin28 genlerinin aktarımıyla uPK hücrelerini elde etmiş ve bu hücrelerin fonksiyonunu EKH'ler ile karşılaştırmışlardır. Bir sonraki aşamada her iki hücreden kardiyomyosit elde edilmesinin ardından, RT-PZR yardımıyla her iki hücrede de aynı kardiyak ifade paterni gözlemlemişlerdir. Pluripotenside rol alan Oct-4 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 EKH'lerden elde edilmiş kardiyomyositlerin proliferasyonunun aynı olduğu ve yapılan elektrofizyolojik çalışmalar sonucunda, uPK hücrelerin EKH'ler gibi arterial ve ventriküler fenotiplere farklılaşma kapasitesine sahip olduklarını gösterilmiştir. Ayrıca bu uPK hücrelerinin ortolog hücre kaynağı olarak, kardiyak onarımda ve kardiyovasküler araştırmalarda da kullanılabilecekleri önerilmiştir(80).

2008 yılında Narazaki ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan uPK hücreleri *in vitro* koşullarda kardiyovasküler hücrelere farklılaştırılmıştır. Bu çalışmada iki grupta EKH'ler ve uPK hücreler karşılaştırılarak incelenmiştir. İlk aşamada Flk1⁺ olan hücreler elde edilmiş ve bu hücrelerden, endotelial ve mural hücreler elde edilmiştir. Bir sonraki aşamada arterial, venöz ve lenfatik endotelial hücrelere farklılaşması gerçekleştirilmiştir. Belirli koşullarda OP9 stroma hücreleri Flk1⁺ hücreler ile kültüre edildiğinde

kardiyomiyositler elde edilmiştir. Sonuç olarak uPKH ve EKH'lerin kardiyovasküler hücrelere diferansiyasyon açısından farklılık göstermediği tespit edilmiştir(81).

Eggermann ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir araştırmada, mononükleer hücreler insan umbilikal kord kanından CD34 yüzey belirteçlerine göre yoğunluk gradient santrifüjleme tekniği ile izole edilmiştir. İzole edilen hücreler, 9 gün süresince kültüre edilmiştir. Daha sonra bu hücrelerin yüzey belirteçleri immünfloresan boyama ve FACS yöntemiyle analiz edilmiştir. CD34 yüzey belirteçlerine göre seçilmeyen hücrelerde endotelyal 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 ve CD133 eksprese olmamıştır. CD34⁺-CDAC (Culture dish adherent cell) hücrelerde 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 endotelyal hücre belirteçlerini eksprese ederek farklılaşabilecekleri gösterilmiştir(82).

2008 yılında Mauritz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, standart embriyoid-temelli farklılaşma protokolüne göre, uPK hücrelerin EKH'ler gibi 24 günde farklılaştığı belirlenmiştir. Farklılaşma sonucunda, uPK hücrelerden embriyoid oluşturmuştur. Moleküler ve yapısal analizler sonucunda uPK hücrelerden üretilen kardiyomiyositlerin embriyonik kök hücrelerden üretilen kardiyomiyositlerle benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. RT-PCR analizleri sonucunda, kardiyak 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, EKH'lerin aksine uPK hücrelerin hücresele kardiyomiyoplasti ve miyokardial doku mühendisliği için otolog fonksiyonel kardiyomiyosit oluşumunda kullanılabilmesi ileri sürülmüştür(83, 84).

Örneğin, 2008 yılında Hu ve arkadaşları endotelyal öncül hücreleri (EÖH'leri), statin grubu 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 uygulanmıştır. Transplantasyondan sonra iskemik dokuda

iskelet kas hücrelerinin 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(85).

Takahashi ve ark. 1999 yılında yaptıkları araştırmada insan EÖH'lerini kritik bacak iskemisine uğrayan sıçanlarda kullanmışlar ve transplantasyondan sonra iskemik dokuda kan akımının hızlandığını ve kapiller artış olduğunu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bacak kaybı, EÖH uygulanan grupta önemli ölçüde azalmıştır(86).

Shintani ve ark. tarafından 2001 yılında yapılan bir araştırmada tavşan bacak iskemi modelinde kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücreler (MNC) kullanılarak neovaskülerizasyon incelenmiştir. Florasan işaretli BM-MNC'ler iskemi bölgesine enjekte edilmiştir. İnjesiyondan 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 neovaskülerizasyon gözlenmiştir(87).

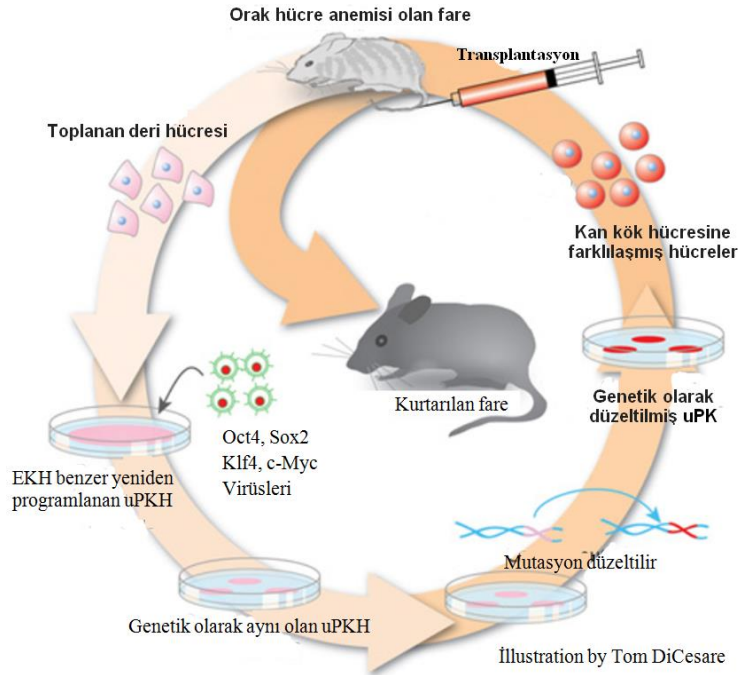
2010 yılında Lian ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, insan uPK hücrelerinin MKH'lere farklılaşmasının klinik olarak mümkün olduğu gösterilmiştir. Üç monoklonal, stabil karyotipli ve fonksiyonel MKH kültürlerinden, CD24⁺ ve CD105⁺ hücreler kombine sorting ile başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Bu hücrelerin pluripotensi özelliği yoktur ve MKH yüzey antijenleri göstermekle birlikte, adipoz, osteosit ve kondrosit hücrelerine farklılaşabilirler. Arka bacak iskemisine uğrayan, uPK hücrelerinden elde edilen MKH'ler, transplante edildiği yerde, damar oluşumu ve kas rejenerasyonu gösterdikleri tespit edilmiştir. uPK hücrelerinden elde edilen MKH'lerin en önemli avantajları sağkalım oranlarının yüksek olması, transplantasyon yeteneklerinin yüksek olması, vasküler indüksiyon, kas rejenerasyonu, de novo farklılaşma ve parakrin mekanizmalarının olmasıdır. Sonuç olarak, fonksiyonel MKH'ler, tek hücre düzeyinden başlayarak klonal olarak insan uPK hücrelerinden üretilebilirler. Hastaya özel uPK-MKH'leri üretildiğinde, doku iskemilerinin tedavilerde kullanma potansiyeline sahiptirler (88) .

2.3.2.5.1. Upk Hücrelerin Kardiyovasküler Rejenerasyon Potansiyeli Ve Hücrel Tedavide Kullanılması

uPK hücreleri, kendini yenileme ve pluripotensi özelliklerine sahip oldukları için EKH'lerine iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Ayrıca hastaya özgü uPK hücresi üretmek bu hücrelerin transplantasyonunda immün rejeksiyon riskini ortadan kaldırmaktadır. Buna ek olarak EKH'lerinin kullanmasında karşılaştığımız etik sorunlar bu hücrelerin üretilmesi ve kullanmasıyla ortadan kalktığı düşünülmektedir. Bu muazzam faydalar uPK hücrelerini, rejeneratif tıp için yeni bir hücre kaynağı olarak sunmaktadır. uPK hücre teknolojisi hastalığın patogenezi ve ilaç keşfi alanında yapılan araştırmalarda yüksek potansiyele sahip olduğu bilinmektedir(89).

Kalp ve damar hastalıkları, anomalileri ve sendromları günümüzde olan ölümlerin en önemli nedenlerindedir. Bu problemi çözmek için, bilimsel araştırmalarda yeni modeller oluşturulması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir(90). Bu kapsamda erişkin bir hastadan yeniden programlama yöntemiyle uPK hücre elde etmek ve bu hücreleri hastalık tedavisinde kullanmak umut vericidir. Ayrıca hastalık modelleri oluşturmak ve *in vitro* koşullarda ilaç veya yöntem uygulamak için en iyi seçeneklerden birini oluşturmaktadır.

Bu nedenle uPK hücre teknolojisi, hastalıkların, farmakolojik ve toksikolojik testlerin ve hücre tabanlı tedavi patogenezinde çalışmak için eşsiz bir imkan ortaya koymuştur(91). 2007 yılında ilk defa fare modelinde deri hücresinden üretilmiş otolog uPK hücrelerini orak hücre anemisinde kullanarak bu hastalığı farede tedavi ettiler (Şekil 2.6)(25).

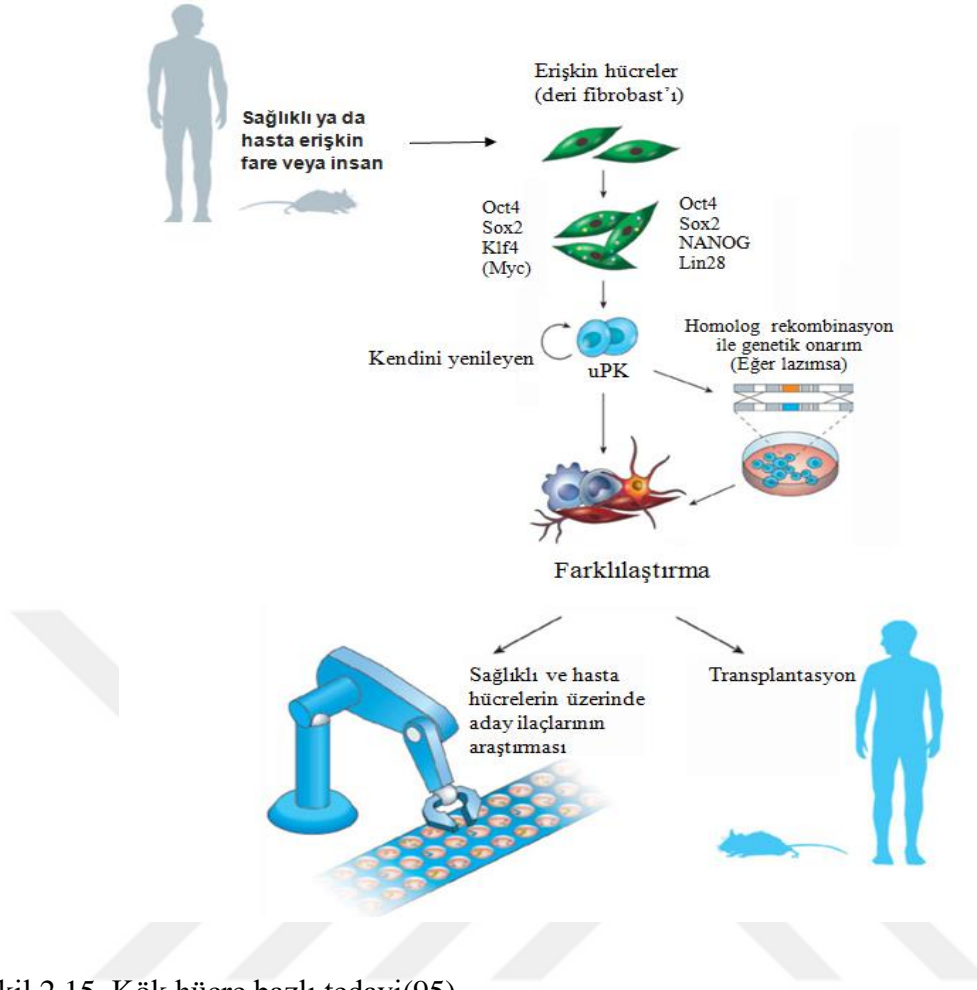


Şekil 2.14. Fare modelinde kendi deri hücresinden elde edilen uPK hücrelerle orak hücre anemisinin tedavisinde kullanılması (25).

İnsan uPK hücrelerinden elde edilmiş endotelial hücrelerin fare modelinde periferik arter hastalığını iyileştirici potansiyeli değerlendirilmiştir. Hücreler SCID farelerin arka bacak iskemisinin olduğu bölgeye enjekte edilmiş ve bu hayvanlar kontrol grupla kıyaslandıklarında, bu hücrelerin (uPKH'lerden elde edilmiş endotelial hücreler) anjiogenezis etkisi gösterilmiştir(92).

Bir başka araştırmada insan fibroblastından elde edilmiş uPK hücrelerinden endotelial hücre (EH) oluşturulmuş ve bu hücrelerden de mezodermal hücreler izole edilmiştir. Bu hücreler MI geçiren athymic nude farelere nakledilmiş ve bu farelerde kontrol grubuna göre iyileşme izlemiştir. Sonuç olarak bu çalışmada uPK hücrelerin akut MI tedavisinde olası potansiyeli ortaya koyulmuştur(93).

2011 yılında çalışılan bir araştırmada, tricell patch (Tri-P) oluşturması için, peritonum hücreleri, uPK hücrelerinden elde edilmiş kardiyomiyositler, endotelial hücreler ve fare embriyonik fibroblastlar ile kültür edilmiştir. Elde edilen bu hücreler Mİ geçiren AC6 farelerin tedavisinde kullanılmıştır. Sonuç olarak bu farelerde kontrol grubuna göre 2-4 hafta içinde sol ventriküler (LV) fonksiyonu iyileştirdiğini ve LV'nin fibrozunun azalmasıyla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur(94).



Şekil 2.15. Kök hücre bazlı tedavi(95).

Kardiyak öncül hücrelerin rejeneratif ve anjiogenik etkisi bilinmektedir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada fare uPK hücrelerini kardiyak öncül hücelere farklılaştırılmıştır. Farklılaştırılan Flk1⁺ ve Flk1⁻ hücreler FACS yöntemi ile ayırarak bu hücreler iskemik miyokard (Koroner arter hastalığı (KAH)) olan hayvan modeline aktarılmıştır. Transplantasyondan sonra sol ventrikülde iyileşme ve fonksiyon düzelmesi gözlenmiştir. Araştırma sonunda Flk1⁺ öncül hücrelerin Flk1⁻ hücelere göre sol ventriküler fonksiyonu üzerinde daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Sonuçta uPK hücrelerinden elde edilmiş olan Flk1⁺ progenitor hücreler *in vitro* ve *in vivo* koşullarda kardiovasküler hücelere farklılaşarak, akut Mİ'dan sonra kardiyak fonksiyonu iyileştirildiği gösterilmiştir. Bu araştırmanın sonucu ile Mİ hastalarında otolog uPKH temeli tedavi yönteminin olasılığını daha da güçlendirmiştir(96).

2011 yılında Singla ve ark. H9c2 fare kardiyomyositlerinden ilk defa uPK hücreleri üretmişler ve bu hücrelerin *in vitro* koşullarında kardiyomyositlere farklılaşma potansiyelini değerlendirmişlerdir. Bu hücrelerden elde edilen kardiyomyositler Mİ geçirmiş fare modeline uygulanmış ve sonuçta bu hücrelerin kalp fonksununu geliştirdiği tespit edilmiştir. Böylelikle bu hücrelerin rejeneratif özeliğine sahip oldukları ortaya çıkmıştır(97).

2.3.2.5.2. uPK hücelerden kardiyovasküler hastalık modellerinin oluşturulması (farmakolojik ve toksikolojik)

Embriyonik veya yetişkin kök hücrelerden elde edilen kardiyomyositlerden kalp hastalık modellerinin geliştirilmesi ve ilaç toksisite testlerinde yararlanılması oldukça önemlidir. Mevcut ilaç uygulama modelleri özellikle kardiyak yan etkilerinin tespiti için kullanılan yöntemler, birçok eksiklikle sınırlanmıştır. İnsan embriyonik kök hücreleri ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler kardiyomyositlerin elde edilmesinde kullanılabilmedir ve bu kardiyomyositler erken kardiyotoksisite algılama ve yeni ilaç keşfinde kullanılma potansiyeline sahiptir. Son yıllarda insan kardiyomyositleri potansiyel kaynak olarak insan EKH'lerinden üretilmiştir. Ancak bu hücrelerin kullanılması etik sıkıntılarla sınırlanmaktadır ve günümüzde insan embriyosunu kullanmadan uPK hücrelerin elde edilmesi mümkündür. Ayrıca hastaya özgü uPKH üretmek ve *in vitro* koşullarda bu hücrelerden kardiyomyosit elde etmek bu teknolojinin avantajlarından(79). Dolayısıyla uPK teknolojisini kullanarak hastalık modelleme yoluyla hastaya özel farmakolojik tarama ve ilaç geliştirme imkanını sunmaktadır(98).

uPKH teknolojisini kullanmakla hastaya özgü uPK hücrelerinden kardiyomyosit üretip ve *in vitro* koşullarda birçok ilacın riskini değerlendirmek, tedavi sürecinde ve ilaç geliştirilmesinde büyük bir ilerlemeye neden olacaktır(99). Ayrıca bu sistem kardiyak toksisite tahmininde ve kardiyak araştırmalar için yeni fırsatlar sunmaktadır. Son yıllarda bu alandaki çalışmalar *in vitro* koşullarda birçok kardiyovasküler hastalıkların, örneğin Timothy sendromu, gibi (Timothy sendromu (LQT8) kalsiyum kanalını kodlayan gendeki mutasyonlardan dolayı meydana gelmektedir.) hastalıkların ve insan kardiyak aritmisinin moleküler ve hücresel mekanizmasını açıklamıştır(100).

uPKH ve EKH'lerden elde edilmiş kardiyomiositlerin kalsiyum taşıma özelliklerini değerlendirmiştir. Bu denemenin sonuçunda EKH hücreleri uPKH'lere göre daha iyi kalsium taşıma özeliğine sahip oldukları ortaya koyulmuştur(101).

Konjenital uzun QT sendromu (LQTS) tip 1, EKG de uzamış QT mesafesi, ventriküler aritmiler, torsadede pointes (TDP) ve ventriküler fibrilasyona eğilim sebebiyle oluşan senkop ve ani ölümle karakterize klinik ve genetik olarak heterojen bir sendromdur. Bu hastalığa özel uPKH üretilmiş ve bu hücreler fonksiyonel kardiyomiositlere farklılaştırılmıştır. Bu araştırmada bu fenotipten elde edilen kardiyomiositlerde katekolamin ile indüklenen aritmi ve beta-block'un azaldığı gösterildi(102). Hastaya özgü uPK hücreleri üreterek anormal fenotip olan kardiyak bozukluğun (long Q) modellenmesi yapılmıştır. Bu hastalık modellenmesi yeni tedavi ajanları ve yöntemlerinin tanımlanması için son derece önemli olmuştur(103).

Kalbin elektriksel aktivitesinin, uygun kontraksiyon koordinasyonunun anormallikleri olan elektrokardiyografik ileti defektlerini gösteren leopard sendromu kardiyomiyopatidir ve mortalite ile ilişkilidir. Leopard sendromu olan bir hastadan ve sağlam olan (wild type) kardeşinden uPK hücreleri üretilerek bu hücreler karşılaştırılmıştır. Hasta uPK hücrelerinde yüksek derecede sarkomerik organizasyon ve NFTC4'un tercihen nukleusta lokalize olduğu öğrenilmiştir. Bu zellikler potansiyel bir kardiyomyopatik hipertrofi ile ilişkili olduğunun göstergesidir(104).

Genel bir bakışta uPK hücrelerinin bulunuşundan sonra bu hücrelerin değeri giderek artmaktadır. Bu hücrelerin EKH'lere benzerlikleri ve daha kolay elde edilip ve kullanılması ile araştırmacılar tarafından tercih edilmiştir. Birçok araştırmanın konusu olan uPKH teknolojisi hızla gelişmektedir ve birçok farklı alanda üretilip ve kullanılabilme potansiyeli değerlendirilmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar diğer hastalıklara göre daha yaygın olduğu ve ölümle sonuçlandığı için, birçok araştırmacı bu alanda çalışmaktadır ve elde edilen hücrelerin bu alanda kullanımını daha cazip hale getirmiştir. Bu hücrelerin bazı avantajları aşığıda sıralanmıştır:

- Bu hücrelerin kardiyovasküler hücreler için limitsiz kaynak olması,
- Bu teknoloji yardımıyla hastaya özgü uPK hücre üretme imkanının sağlanması,

- Hastaya özgü üretilen hücrelerden elde edilen farklı hücrelerin hastaya transplantasyonunda immün rejeksiyonunun ortadan kalkması,
- Hastaya özgü üretilen uPK hücrelerinin bazı mutasyonlar ve bazı epigenetik hastalıklara model oluşturma imkanının sağlanması
- Hastalık modellerinde ilaç kontrolü ve doz denemelerinin yapılabilmesi
- Bu modellerde *in vitro* koşullarda yeni ilaç kontrolünün yapılabilmesi
- Genetik mutasyonların tespiti
- Hastaya özel ilaç tasarlama imkanı sağlamıştır.

Ayrıca kalp ve damar hastalıklarında bu hücrelerin kullanması rejeneratif tıp için büyük bir avantaj olarak tanımlanmıştır (105-107). Ancak bu teknolojinin avantajlarının yanında bazı sıkıntılarının aşılması gerekmektedir. Örneğin:

- Elde edilen hücrelerin etkinliğini arttırmak,
- Daha iyi yeniden programlama yöntemleri geliştirmek,
- uPK hücrelerinden elde edilen hücrelerin (kardiyomiosit veya diğer hücreler) saf olarak izolasyonunu gerçekleştirmek.

Bunların yanında bu hücrelerin klinikte kullanması için güvenilebilir hücre elde etmek gerekmektedir. uPK teknolojisi ile ilgili araştırmalar son zamanlarda daha güvenilir ve klinikte kullanılabilir yöntemler üzerine odaklanmıştır. uPK hücrelerin klinikte kullanma sıkıntılarına ek olarak bu hücrelerin, farklılaşmadan kullanılmasında, teratoma oluşturma riski beklenmektedir. Ancak bu sıkıntıyı aşmak için uPK hücrelerinden elde edilen farklılaşmış hücreler izole edildikten sonra klinikte kullanmak için tercih edilmektedir. Entegre olmayan uPKH üretmek ve bu yöntemlerin gelişmesi ile. Yakın zamanda elde edilen hücrelerin daha güvenilir halde klinik uygulamalarda kullanılması düşünülmektedir(105).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Endotelyal öncül hücreler, kemik iliğinden köken alarak kana geçen ve yüksek derecede farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerin hasar görmüş dokuların onarımında rol oynadıkları bilinmektedir. Bu hücreler anjiyogeneze, tümör büyümesinde ve revaskularizasyonda rol oynamaktadırlar. Çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonların etkisi ile harekete geçerek, yerleştiği bölgelerde kan damarı oluşumunu sağlarlar. Endotelyal progenitör hücreler miyokard infarktüs gibi kalp ve damar hastalıkları sonrasında harekete geçerek, kalp krizinden zarar gören kan damarlarının onarımını sağlarlar. Bu hücreler anjiyogenez ve vaskülojenezde büyük rol oynamaktadırlar. Damar oluşumunda endotel hücrelerle iş birliği yapan düz kas hücreleri de önemli göreve sahiptirler.

Endotelyal öncül hücreler, farklı kaynaklardan elde edilmesi ve rejeneratif tıp alanında kullanılması sebebiyle birçok bilim insanı tarafından araştırma konusu olmuştur. İncelenen literatürlere göre kardiyoasküler hastalıkların birçoğunun özellikle myokardial infarktüsün tedavisinde, iskemik bölgenin oluşmasının engellenmesidir. Bu durumlarda bireyde hasarlı bölgede anjiyogenezis ve revaskularizasyon en çok önem taşımaktadır. Bu kritik durumda EÖH bu bölgeye yerleşmeleri ve orda yeniden damarların oluşması bu dokuyu nekroz veya skardan korunmasını sağlamaktadır. Ama nerdeyse, hasarın büyüklüğünden ve dolaşımda olan EÖH'ler bu yenilenmeye yetersiz olup veya kemik iliğinden bu dokuya göç etmesi zaman alıcı bir olay olduğundan dolayı bu kısa zaman diliminde ek olarak hastaya özgü EÖH'lerin hasarlı dokuya hücre aktarmak düşünülmekte ve birçok araştırmacı tarafından dünya çapında araştırılmaktadır. Yamanaka ve arkadaşları tarafından 2006 yılında uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücrelerin keşfine kadar, endotelyal öncül ve düz kas hücrelerin elde edilmesine yönelik çalışmalar, embriyonik kök hücre kaynaklı olarak devam etmiştir. Uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücrelerin bilim dünyasına sunulması, rejeneratif tıp ve kök hücre biyolojisinde farklı ve yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Bu hücrelerin bazı avantajlarından birçok araştırmacı tarafından farklı amaçlarla araştırılmaktadır.

Sunulan bu tezin amacı, son dönemde geliştirilen uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler kullanılarak, bir kaç aşamada ve in vitro koşullarda endotelial öncül hücre (EÖH) ve düz kas hücreleri (DKH) üretilmesidir. Bu amaçla, ilk aşamada (uPK) hücreler, belirli koşullarda lateral mezoderm hücrelere farklılaştırılmış ve elde edilen bu hücrelerin EÖH yönünde farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca başka bir deneyde elde edilen mezoderm hücrelerinden düz kas hücreler elde edilmesi planlanmıştır. Saydığımız özelliklere sahip olan hücreler, özellikleri tanımlanıp ve izole edildikten sonra, Eş-zamanlı PZR ve immün boyama yöntemleri ile mRNA ve protein düzeyinde de valide edilmiştir. Buna ek olarak elde edilen hücrelerin transplantasyonunda ortaya çıkabilecek risk faktörlerin (onkogenler) gen ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Bu metotlarla elde edilen hücreler farklı kalp ve damar hastalıklarında kullanılma potansiyeline sahiptirler.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Çalışmamızda aşağıda belirtilen hücre serileri kullanılmıştır(Çizelge 4.1):

- Fare fibroblastlarından üretilen iPS-MEF-Ng- 20D-17 hücre serisi
- Besleyici hücre olarak FEF (Fare Embriyonik Fibroblast) hücreleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Kullanılan hücreler ve özellikleri

Hücre ismi	Hücre kaynağı	Bilimsel adı	Özellikleri
uPKH (Yamanaka ve ark., 2006)	Fare fibroblastlarından	iPS-MEF-Ng-20D-17	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog-GFP-IRES-Puro ^r genleri MEF hücrelerine aktarılmıştır
Fare Embriyonik Fibroblast (FEF)	13.5 günlük fare embriyosudan	FEF	Bu hücreler inaktif edilip besleyici hücre olarak uPK hücrelerin kültüründe kullanılır

4.1.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI VE DONDURULMASI İÇİN KULLANILAN MALZEMELER

Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar:

1. ES-FBS(Gibco 10439-024)
2. Penisilin /Streptomisin(Lonza17-602E)
3. L-Glutamine-200 mM (100X), liquid(Gibco25030-081)
4. MEM Sodium Pyruvate Solution 100 mM (100X), liquid
5. Non-essential amino acid(Gibco 11140-50)
6. 2-Mercaptoethanol (Gibco 21985-023)
7. Leukemia inhibitory factor 107 U/ml(Sigma L5158)
8. DMEM Media – KnockOut(Gibco 1118-50)
9. PBS 10X(Gibco 70011-044)
10. Trypsin EDTA (Hyclone, SV30037.01)
11. DMEM Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) (Sigma, D8437)
12. Santrifüj (Hettich)
13. Jelatin (Sigma, G1890)

14. Collagen Type IV(BD)
15. Saf su (Lonza, BE51200)
16. 12 mm çaplı yuvarlak lamel (Electron Microscopy Sciences, 72195-12)
17. 6 ve 24 kuyucuklu plate (Corning)
18. 4 Well chamber slide(Sigma)
19. pastör pipet (Sigma)

4.1.3. FİKSASYONDA KULLANILAN SOLÜSYONLAR

1. D-PBS (Sigma, D8662)
2. PFA (Sigma, 158127)
3. PBS (Sigma, P4417)
4. %2 NaN₃ (Azid) (Sigma, S2002)

4.1.4. İMMÜNOFLORESAN İŞARETLENMESİNDE KULLANILAN MALZEMELER

1. Yıkama çözeltisi:
 - PBS (Sigma, P4417)
2. Geçirgenlik çözeltisi
 - %0,5 PBST (Triton X-100 (Sigma, X-100), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100) (çekirdek boyamasında PBS yerine kullanılır)
3. Bloklama çözeltisi (BSA-PBST)(bazı örneklerde kullanılmaktadır)
 - 1:1 PBS (Sigma, P4417)
 - %1 BSA (Sigma, A2153)
 - %0,25 Triton X-100 (Sigma, X100)
 - %2 Goat Serum (Sigma, G9023)
4. Primer antikolar:
 - Poliklonal anti-Oct-4 rabbit IgG (abcam, ab137427), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100 seyreltme

- Poliklonal anti-CD31 rabbit IgG (abcam, ab97959), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100 seyreltme
- Poliklonal anti-Ve Cadherin rabbit IgG (abcam, ab80892), PBS (Sigma, P4417) 1:100 seyreltme
- Poliklonal anti-VEGFR2 rabbit IgG (abcam, ab13840), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100 seyreltme
- Poliklonal anti-AC133 rabbit IgG (abcam, ab34139), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100 seyreltme
- Poliklonal anti- α SMA rabbit IgG (abcam, ab34139), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100 seyreltme

5. Sekonder antikor: Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11034), PBS (Sigma, P4417) 0,5:100 seyreltme

4.1.5. GÖRÜNTÜLEME

1. PBS (Sigma, P4417)
2. Mounting medium with hoechst
3. Lam (Citoglass)
4. Lamel (Citoglass)
5. Konfokal mikroskop (Carl Zeiss)

4.1.6. GEN İFADE ANALİZİ

4.1.6.1. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler

1. TRIzol (Invitrogen, 15596-026)
2. Kloroform (Sigma, C2432)
3. İsoopropanol (Sigma, I9516)
4. Steril su (Lonza, BE51200) ile %70 olarak seyreltilmiş saf etanol (Sigma, 32221)
5. % 0.1 DEPC (Sigma, D5758)
6. 1.5 ml RNase/DNase free falkon tüpleri (Axygen, MCT-150-C)
7. Soğutmalı santrifüj (Thermo IEC, Microlite RF)

4.1.6.2. RNA'ların Kalite Kontrolü İçin Kullanılan Malzemeler

1. Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
2. Agaroz (Sigma, A9539)
3. Stok (5x) TBE (Trizma Base EDTA) tamponu
 - 54 gr trizma base (Sigma, T1503)
 - 27.5 gr borik asit (Sigma, B6768)
 - 0.5 M EDTA 20 ml (Sigma, E5134)
 - 1 Litre çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
4. Etidyum bromür
5. Jel yükleme boyası (Biolab, B7021)
6. DNA ladder 100 bp (Biolab, N3231)
7. Elektroforez güç kaynağı (ATTO, myPower 300, AE8130)
8. Elektroforez tankı (Thermo, Minicell Primo Horizontal Gel System, EC320)
9. Jel Görüntüleme sistemi (Gene Genius Bioimaging System, SYDR2-1352)

4.1.6.3. cDNA Sentezi

1. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, 4897030001)
2. Steril su (Lonza, BE51200)
3. Thermal Gradient Cyclers (Bio-Rad, ALS1296)
4. 0.2 ml PCR tüpleri (Sarstedt, 72.737.002)

4.1.6.4. Eş-Zamanlı PZR (Kantitatif Real Time-PCR)

1. Primer
2. LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x (Roche, 4707516001)
3. LightCycler® 480 Multiwell plate 384 (Roche, 4729749)
4. Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R, 392934)

5. Real Time-PCR cihazı (LightCycler® 480/384, Roche, İsviçre)

4.1.7. İMMÜNBLOTLAMA (WESTERN BLOT)

4.1.7.1. Protein İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler

1. Doku öğütücü (1 ml Tissue Grinders, Tenbroeck, Wheaton, 357421)
2. Complete Lysis-M (Roche, 04719956001)
3. Ultrasonik cihazı (Sonics & Materials, Vibra Cell, V 130)
4. Soğutmalı Santrifüj (Thermo, MicroCL 17R)

4.1.7.2. Protein Miktar Tayini (Bradford Assay)

1. Bradford boyası (BioRad, 500-0205)
2. BSA (Sigma, A2153)
3. Orbital çalkalayıcı (FinePCR, SH30)
4. Spektrofotometre cihazı (BioRad, SmartSpec 3000)

4.1.7.3. SDS Poliakriamid Jel Elektroforezi

1. Stok (10x) TBS (Tris-Buffered Saline) tamponu (PH 7.6)
 - 24.23 gr Trizma base (Sigma, T1503)
 - 80.06 gr NaCl (Amresco, 0241)
 - 1 Litre çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
2. TBS-T (1x)
 - 100 ml TBS (10x)
 - 2 ml (% 0.2) Tween-20 (Sigma, P9416)
 - 900 ml çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
3. Hücre ve doku örneklerinden izole edilen total protein

4. Yükleme tamponu

- Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x) (Invitrogen, LC2676)
- DTT (Dithiothreitol) 1M

5. Protein ladder 10-230 KDa (BioLabs, P7711)

6. Kuru blok ısıtıcı (Major Science, MD-02N)

7. Soğutmalı Santrifüj (Thermo, MicroCL 17R)

8. Yürütme tamponu

- 50 ml Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x) (Invitrogen, LC2675)
- 450 ml çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)

9. SDS poliakriamid elektroforez jeli (Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Protein Gels, 1.0 mm, 10 well, Invitrogen, EC6025BOX)

10. Elektroforez tankı (XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System)

11. Elektroforez güç kaynağı (ATTO, myPower 300, AE8130)

4.1.7.4. Protein Transferi

1. iBlot® Transfer Stack, PVDF, regular size (Invitrogen, IB401001)

- iBlot® Anode Stack
- iBlot® Filter Paper
- iBlot® Cathode Stack
- iBlot® Disposable Sponge

3. iBlot Dry Blotting System (Invitrogen)

4.1.7.5. Membrandaki Proteinlerin İmmünojenik Olarak Tespiti

1. Bloklama çözeltisi (BSA-TBS-T)

- 5 gr (%5) BAS (Sigma, A2153)
- 100 ml TBS-T

2. Orbital çalkalayıcı (FinePCR, SH30)

3. Primer antikolarlar

- Poliklonal anti-Oct-4 rabbit IgG (abcam, ab137427), BSA-TBS-T, 1:500 seyreltme
- Poliklonal anti-Sox2 rabbit IgG (abcam, ab97959), BSA-TBS-T, 3 µg/ml
- Poliklonal anti-Nanog rabbit IgG (abcam, ab80892), BSA-TBS-T, 1:250 seyreltme
- Poliklonal anti-DDX4/VASA rabbit IgG (abcam, ab13840), BSA-TBS-T, 2 µg/ml
- Poliklonal anti-DAZL rabbit IgG (abcam, ab34139), BSA-TBS-T, 2 µg/ml

4. TBS-T

5. Sekonder antikor: Goat anti-Rabbit IgG-HRP konjuge (BioRad, 1706515), BSA-TBS-T, 1:10000 seyreltme

6. ECL veya Enhanced Chemiluminescence (LumiGLO[®] Reagent and Peroxide 20X, CellSignaling, 7003)

7. Referans kontrol: Anti-beta aktin-HRP konjuge (abcam, ab49900), BSA-TBS-T, 1:50000 seyreltme

7. Görüntüleme cihazı (Kodak Image Station, 4000MM)

4.2. YÖNTEM

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

4.2.1.1. FEF Hücreleri

A. FEF Hücreleri İçin Besiyeri Hazırlaması

Fare Embriyonik Fibroblast (FEF) hücrelerinin hızlı bölünme özelliğinden dolayı DMEM high glucose besiyeri kullanıldı. Besiyerine 2 mM L-glutamin, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM nonessential amino acids, %10 FBS (fetal sığır serumu), 100 U/ml penisilin/streptomisin ve 100 µM, amfoterisin eklendi. Hücreler bu ortam içerisinde, %5 CO₂'in

bulunduğu, %95 oranında neme sahip olan 37°C'deki etüvde kültür edildi. Hücreler yeterli yoğunluğua ulaşınca kadar 2 günde bir besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi.

B. FEF Hücrelerinin İzolasyonu Ve Kültürü Ve İnaktivasyonu:

FEF 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 falkona aktarıldı ve her embriyo başına 1 ml tripsin EDTA eklendi. Su banyosunda 37°C'de 20 dakika bekletildi. Tripsini inhibe etmek için embriyo başına 2 ml besiyeri eklendi. 180 g'de 5 dakika santrifüj edilip supernatant altılarak kalan pelet üzerine besiyeri eklendi. Bu hücreler 75 'lik flasklarda kültüre edildi. Elde edilen FEF 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. FEF Hücrelerinin Pasajlanması

- 1) Hücreler %90 yoğunlukta (Konfluent) olduğu zaman pasajları yapılarak çoğaltıldı.
 - 2) Flaskların üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırdıldı.
 - 3) Hücreler, serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı.
 - 4) PBS aspire edilerek uzaklaştırdıldı. Flaska Tripsin-EDTA eklendi. Hücreler inkübatörde (37°C) 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 eklenerek bu enzim inhibe edildi. T75'lik flask için 10 ml besiyeri, T25'lik flask için 5 ml besiyeri eklendi.

- 6) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve bir falkon tüpe aktarıldı.
- 7) 1 ml hücre Vi-cell cihazında hücre sayımı için kullanıldı.
- 8) Hücre süspansiyonu 130 g , 7 dak santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 9) Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırıldı.
- 10) Flask veya petrilere ekim yapıldı.
- 11) Hücreler inkübatör içerisinde, %5 CO₂, %95 nemde ve 37°C'da kültür edildi.

4.2.1.2. 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 -20°C'de muhafaza edildi.
- 4) 25 ml'lik flask için 3 ml ve 75 flaska 5 ml jelatin kullanıldı.
- 5) Jelatin eklenen flasklar inkübatörde 37°C'da en az 20 dakika inkübe edildi.
- 6) Laminar kabinde jelatin çekildikten sonra 20–25 dakika (flaskların kurumasına kadar) bekletildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Petri büyüklüğüne göre jelatin miktarı

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

B. MEF-Ng- 20D-17-UPKH'ler İçin Besiyeri Hazırlaması:

MEF-Ng- 20D-17-UPKH'lerin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. MEF-Ng- 20D-17-UPKH'lerin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği

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

C. Fare uPK Hücrelerin Dondurulması İçin Kullanılan 2x Besiyeri

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

Fare uPK hücre dndurması için kullnılan 2x besiyeri taze bir şekilde hazırlandı ve buzda saklandı.

D. uPKH Hücrelerin Kültürü Ve Pasajlanması:

uPKH hücrelerinin pasajlanabilir duruma gelebilmesi için kolonilerin büyüyerek birbirine yaklaşmaları gerekmektedir (normalde 4 günde bu seviyeye ulaşırlar). Bu aşamadan sonra hücrelerin pasajlanması gerekmektedir. Bu hücrelerin kültürü için, dondurulup stok yapılan inaktif FEF hücreleri çözüldü ve uPK hücrelerin pasajlanmasından 1 gün önce flasklara ekildi. Bir gece inkübasyondan sonra besiyeri aspire edilip, PBS'le bir kere yıkandı. uPK hücreleri, bir gece önceden hazırlamış olduğumuz FEF hücrelerin üzerine ekildi. uPKH'lerin pasajlanmasının aşamaları sırayla şu şekildedir:

- 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 ×g de 5 dak.), süpernatant uzaklaştırıldı.
- 9) Hücreler istenilen konsantrasyonda besiyerinde sulandırıldı.
- 10) Önceden hazırlanan FEF hücrelerinin ekilmiş olduğu flasklara ekim yapıldı.
- 11) Hücreler inkübatör içerisinde, %5 CO₂, %95 oranında neme ve 37°C'de kültür edildi.

E. uPK Hücrelerinin Dondurulması:

- 1) Flask/Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- 2) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı, ve aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- 3) Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edildi.
- 4) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edildi (uPKH besiyeri ile).
- 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 (200g de 5 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'e alındı.
- 11) İsoopropanol freezing container -80 derin dondurucuya konuldu (-80°C'de içerisinde bu özel taşıyıcıda muhafaza edilerek sıcaklığın dakikada 1°C düşmesi sağlanır).
- 12) 24 saat sonra dondurma tüpleri sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

F. uPKH Hücrelerin Çözülmesi

- 1) -196°C'den alınan kriyovial 37°C'ye ayarlanan 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 5dk. 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 değiştirildi. Kültür kabı her gün inverted mikroskop ile kontrol edildi ve hücreler pasajlanabilecek duruma gelince kaldırıldı.

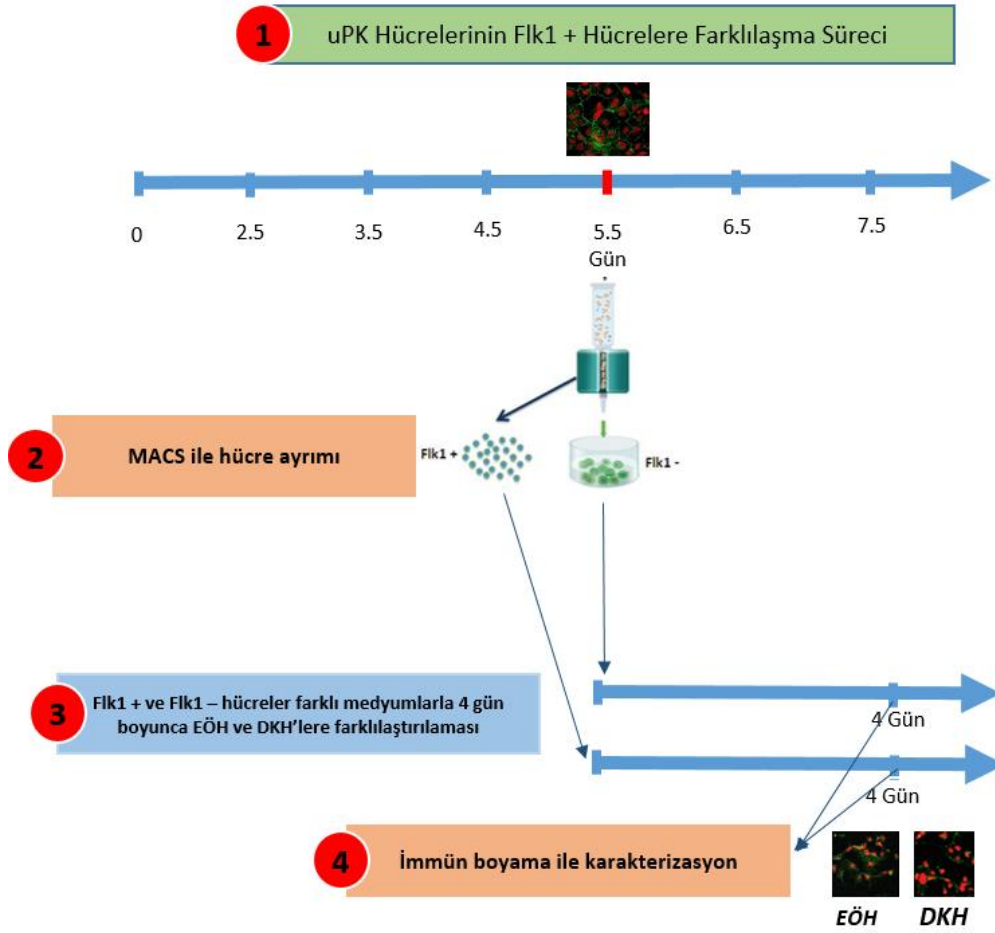
4.2.2. HÜCRE FARKLILAŞTIRMA ÇALIŞMALARI

4.2.2.1. uPKH Hücrelerin Farklılaşması:

4.2.2.1.1. uPKH Hücrelerinin Flk1+ Hücrelere Farklılaştırması (1. Aşama)

Bu aşamada farklılaştırma besiyeri ve kollajen tip IV kaplı petripler kullanarak 7.5 gününde gerçekleştirildi. Bu süreçte immün boyama, akım sitometrisi, Eş-zamanlı PZR analizi ve western blot analizleri paralel olarak yapıldı.

İmmün boyama analizleri iki aşamada gerçekleştirildi. Mezodermal hücrelerin elde edilmesinden sonra ve ikinci aşamada Flk1⁺ hücrelerden EÖH ve DKH elde edildikten sonra immün boyama analizleri yapıldı.

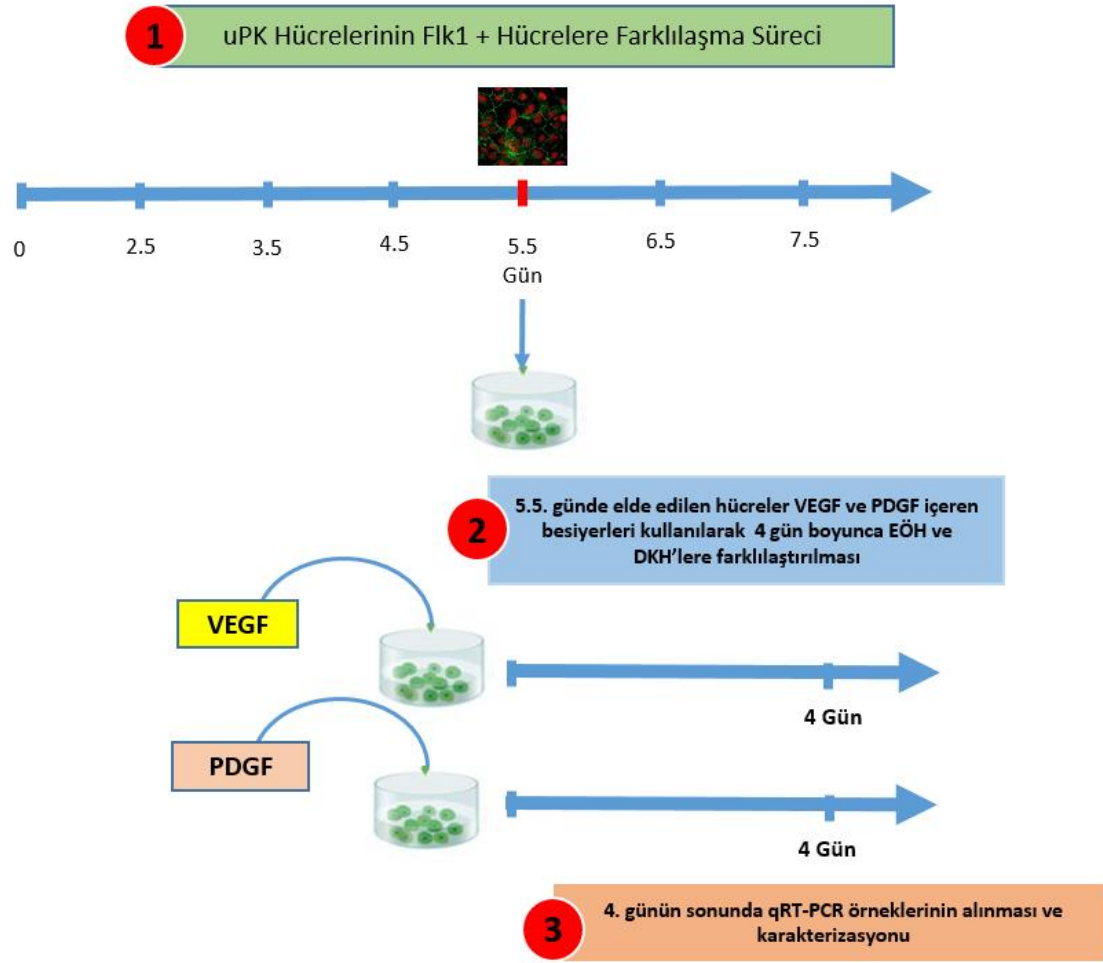


Şekil 4.1 Şeki Farklılaştırmanın 1. Aşaması (lateral mesodermal hücre elde edilmesi)

4.2.2.1.2. Flk1⁺ Ve Flk1⁻ Hücrelerini EÖH Ve DKH'lere Farklılaştırması (2. Aşama)

Bu aşamada FLk1⁺ ve Flk1⁻ hücreler sırayla VEGF ve PDGF içeren besiyerleri ile kültür edildi. Bu farklılaştırmanın 4. gününde immün boyama analizleri yapıldı ve EÖH ve DKH karakterizasyonu gerçekleştirildi. (şekil4.2)

Ayrıca Eş-zamanlı PZR analizleri için ikinci aşamada önceki aşamadan elde edilen hücreler 5.5. günde izole edilmeden iki farklı besiyeri ile kültür edildi. PDGF ve VEGF içeren besiyerleri ile 4 gün kültür edilen hücreler trizol ile kaldırıldı ve Eş-zamanlı PZR analizleri farklılaştırmanın ikinci aşamasında gerçekleşti. (şekil4.3)



Şekil 4.2. Farklılaştırmanın ikinci aşaması (Eş-zamanlı PZR analizleri)

A. Farklılaşma Ortamının Hazırlanması:

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

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

B. Kollajen Kaplı 24 Kuyucuklu Platelerin Hazırlaması:

Farklılaşmayı gerçekleştirmek için kollajen kaplı petriler ve yuvarlak lameller gerekmektedir. Bu nedenle kollajen kaplı petriler temin edildikten sonra yuvarlak lamellerin hazırlaması için:

1. Kollajen tip IV solüsyonu hazırlandı
2. 24 kuyucuklu platlerin içine atında yuvarlak lameller koyuldu.
3. Bu kuyucuklara 200 uL kollajen tip IV solusuyunu eklenip laminer kabin içinde ve UV ışığı altında oda ısısında inkübe edildi.
4. 2 saat sonra lamellerin üzerinde kalan kollajen, pipet ile çekilerek tekrar bir gece boyu aynı koşullar altında kurumaya bırakıldı.
5. Bu yuvarlak lameller 24 kuyucuklu plateler ve özel poşet içinde +4°C de kullanım gerçekleşene kadar muhafıza edildi.

C. Saf uPKH'lerin Kollajen Kaplı Petrilerde Kültürü:

Promisin ve mikroeadler yardımıyla elde ettiğimiz saf uPKH hücrelerini, kollajen tip IV platelerde farklılaşma besiyeri ile kültüre edildi. Ayrıca konfokal mikroskobu ile hücreleri takip etmek için yuvarlak lamellerin üzerine de hücre aktarıldı ve farklılaşma besiyeri ile kültüre edildi. uPK hücreler farklılaşma besiyeride 1. günden itibaren farklılaşmaya başlamaktadır ve Flk1 geni 2. günden ifadesi artmaya başlayıp ve 5.5 gün sonra ise maksimuma ulaşır. Bu nedenle örneklerin 2.5 günden, 7.5 güne kadar morfolojik ve gen ekspresyon değişiklikleri takip edildi. 2.5, 3.5, ...,7.5 günlerde RT-PZR için örnekler trizole alınıp hızlı bir şekilde -80°C aktarıldı. Bununla paralel olarak yuvarlak lameller üzerinde farklılaştırılan hücreler PFA (Paraformaldehid) ile fikse edilip +4°C'e kaldırıldı. Bu örneklerde immün boyama deneyleri yapıldı.

4.2.3. SAF UPKH VE FARKLILAŞTIRILMIŞ HÜCRE İZOLASYONU

4.2.3.1. Promisin Yardımıyla Saf uPK Hücrelerin Elde Edilmesi

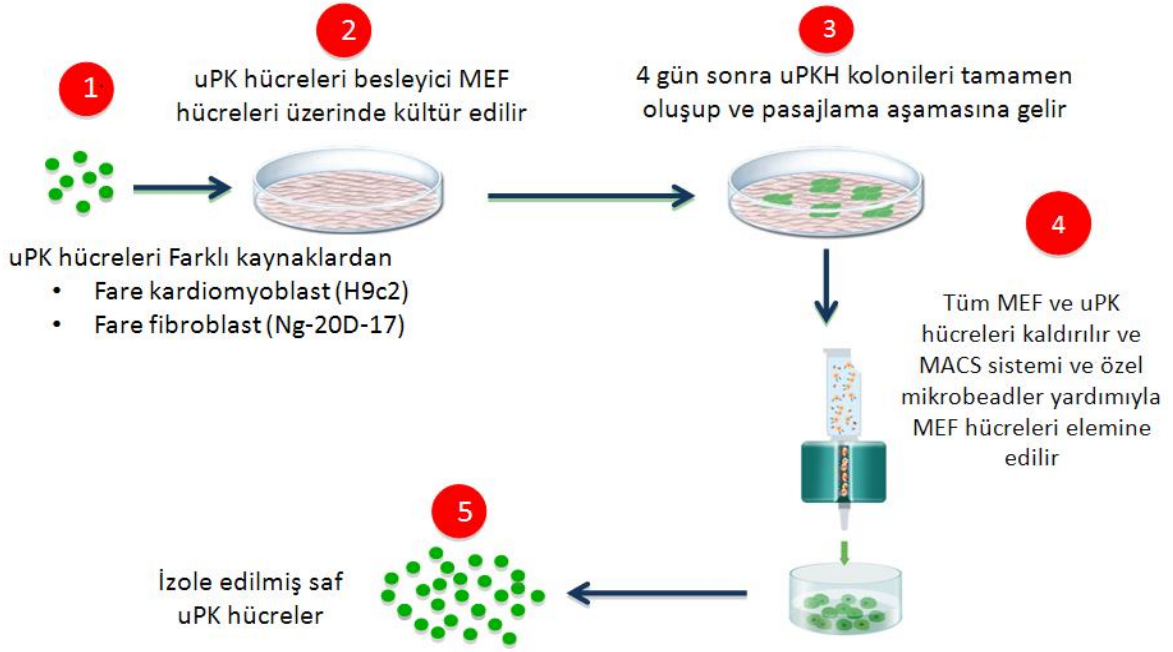
4.2.4. uPKH hücrelerinin FEF hücrelerinden saflaştırılması:

Öncelikli olarak uPKH hücrelerinin farklılaştırılması için bu hücreleri besleyici hücrelerden ayrılması hedeflendi. uPKH ve besleyici hücre topluluğu birlikte petrinin tabanından tripsin ile kaldırıldı. MEF-Ng-20D-17-uPK hücrelerinde Puromisin direnç geni olduğu için ortamda Puromisin antibiyotiği olduğunda FEF hücrelerinin eliminasyonu kolaylıkla başarıldı. FEF hücrelerini elimine etmek için konsantrasyon optimizasyonu için kültür ortamına promisin C ilave edildi ve etkisi mikroskop altında incelenerek görüntülendi. Konsantrasyon oranları 1, 1.5, 2 µg/ml olarak uygulandı. En iyi sonuç 2 µg/ml ve 3. günde elde edildi. Promisin uygulaması sonunda uPKH hücreleri saf olarak elde edildi.

4.2.4.1. MACS Sistemi İle Hücre İzolasyonu

4.2.4.1.1. MACS Sistemi Ve Mikrobead'ler Yardımıyla Saf uPK Hücrelerin Elde Edilmesi

MEF-Ng-20D-17-uPK hücrelerini FEF hücrelerinden saflaştırılması, MACS sisteminde ve Feeder Removal MicroBead'ler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreleri tripsin ETDA ile kaldırdıktan sonra kitin protokolünü kullanarak başarılı şekilde saf MEF-Ng-20D-17-uPK hücreleri elde edildi. (Şekil4.4).



Şekil 4.3. uPKH'lerinin besleyici FEF hücrelerinden MACS sistemi ve Mikrobead'ler yardımıyla izolasyonu.

4.2.5. FIK1⁺ HÜCRELERİN AKIM SİTOMETRİK ANALİZİ

Lateral mesodermal hücrelerinin yüzey belirteçlerinden olan Fik1 karakterizasyonu ve farklılaşma yüzdesi için akım sitometri analizi yapılmıştır .

1. 1 ml'de hücre suspansiyonu Vi Cell ile sayıldıktan sonra ependorf tüpe alındı.
2. 200 g'de 1 dakika santrifüj edilip, üstte kalan besiyerleri atıldı.
3. Pelet üzerine 90 µl boyama solüsyonu ve 10 µl antikor koyulduktan sonra 30 dakika buzda ve karanlıkta bekletildi.
4. Boyama solüsyonundan kurtulmak amacıyla boyama solüsyonundaki hücelere 500 µl PBS eklendikten sonra 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

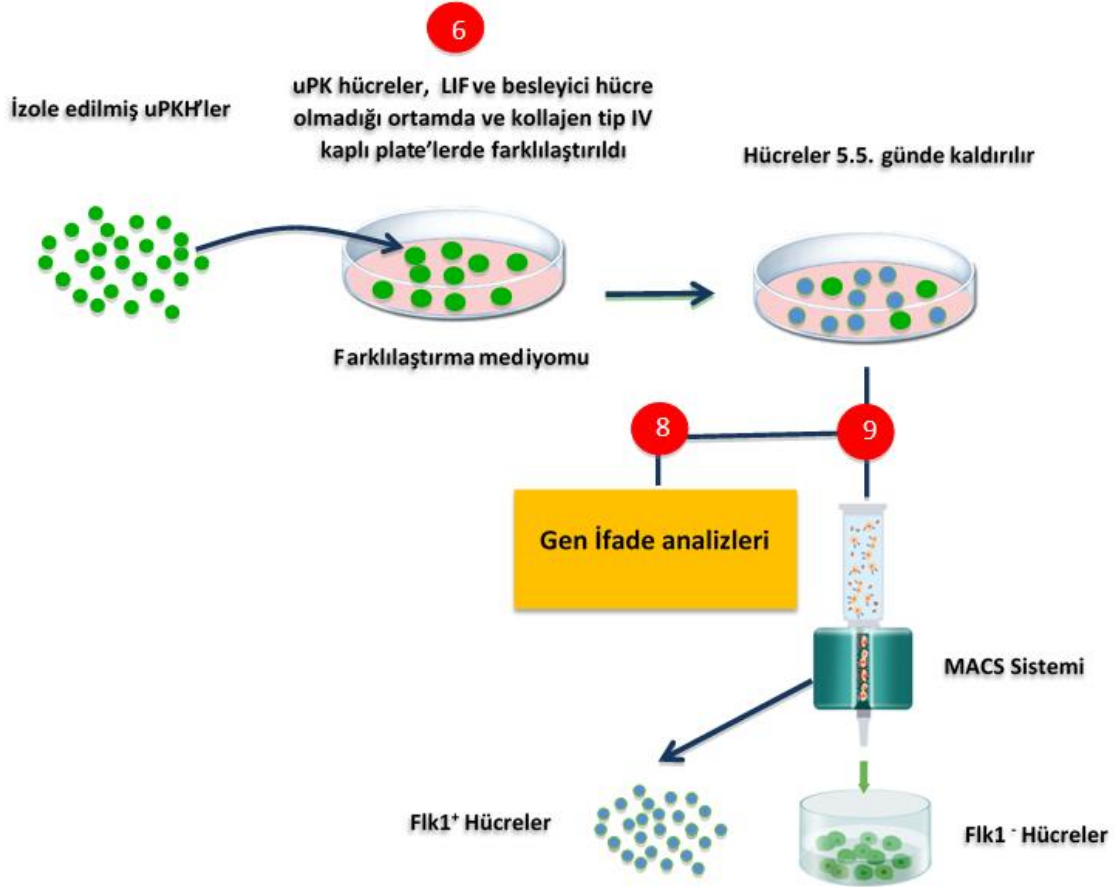
Üst kısmı atıldıktan sonra pelet üzerine 100 µl steril PBS konularak Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi yapıldı.

Çizelge 4.4. Flk1⁺ hücrelerinin akım sitometrik analizi için hazırlık aşamaları

Antikor	Primer antikor-konjuge	Sekonder antikor	Bekleme Süresi	Yıkama	Sulandırma
CD31-APC	5µl Antikor	-	30dak.	200 g'de 1dak santrifüj	50/100µl

4.2.5.1.1. MACS Sistemi ve Mikrobead'ler Yardımıyla Flk-1⁺ Hücrelerinin İzolasyonu

İkinci aşamada elde ettiğimiz saf uPK hücrelerini kolajen tip IV kaplı petrielerde kültür edildi. Bu kültürde FEF hücresi kullanılmıyor. Ayrıca bu hücrelerin kültürü için farklılaşma besiyeri (186) kullanıldı. 5.5 gün sonra bu hücreler kaldırıldı ve MACS sistemi yardımıyla özel mikrobead kullanarak Flk1⁺ hücreleri izole edildi. Bu deneyin sonucunda uPKH'lerden Flk1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler elde edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. uPKH'lerinin, Flk1⁺ hücelere farklılaştırması ve bu hücrelerin MACS sistemi ile izolasyonu

4.2.6. İMMÜN BOYAMA İLE HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU

Farklılaştırmanın her aşamasından elde edilen hücrelerin karakterizasyonu için immün boyama yapıldı. Asıl deneye paralel olarak hücreler yuvarlak lameller üzerinde kültüre edildi. Belirli zamanlarda bu lamellerin üzerinde olan hücrelerin morfolojik ve immün karakterizasyonu için önce hücreler fikse edildi. Sonraki aşamada fikse edilmiş hücreleri lameller üzerinde antikorlarla boyandı ve konfokal mikroskop altında görüntülendi.

4.2.6.1. 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.

4.2.6.2. İmmün Boyama ile Hücrelerinin Karakterizasyonu:

Çalışma öncesinde uPKH hücrelerinin kimliklerini doğrulamak amacıyla SSEA1 ve OCT-4 antikoları ile boyayarak konfokal mikroskop altında görüntülendi.

Daha sonra uPK hücrelerini Flk-1+ hücre yönünde farklılaştırdıktan sonra elde edilen hücrelerin immün karakterizasyonu için Anti-VEGF-receptor 2 antikorunu kullanıldı. 2. aşamada izole edilen Flk-1⁺ ve Flk-1⁻ hücreler özel besiyeri kullanılarak, CD31⁺, CD133 ve α SMA⁺ hücrelere farklılaştırıldı. Farklılaşmanın belirteci olarak Anti-CD 31, CD133 ve Anti-alpha smooth muscle Actin antikoları ile boyama yapıldı.

4.2.6.3. İmmün Boyama Ve Görüntüleme

İmmün boyamada kullanılan antikolar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Çizelge 4.5. Kullanılan antikolar ve özellikleri

Hücre tipi	Antikor ismi	Açıklama	İLGİLİ GEN
uPK'ler	Oct-4	Oct-4 Rabbit Monoclonal Antibody, clone C30A3	POU class 5 homebox 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+ hücreler	VEGF-2	Anti-VEGF-receptor 2 antibody	Kinase insert domain protein receptor
Düz kas hücreleri	Alpha smooth muscle Actin	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody	alpha 2, smooth muscle, aorta (ACTA2)
Endotelial öncül hücreler	CD31 veya Pecam-1	Anti- CD 31	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1

Hücrelerin görüntülenmesi için:

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

a) Sulandırılmış SSEA1 (primer) ile 1 saat 37°C 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) 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.

Flk-1 (VEGFR2) antikorunu 2.5, 3.5,....., 7.5 günlerde alınan örnekler (yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılan ve fikse edilen hücreler) immün boyamada kullanıldı. Sekonder antikor kullandıktan sonra konfokal mikroskopta görüntülendi. Flk1+ hücreleri görüntülemek için:

- a) 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 (çekirdek boyası) 0,5 saat 37⁰C inkübe edildi.
- f) PBS ile yıkandı.

g) Hoechst içeren kapatma medyumu ile lam üzerinde kapatıldı.

İkinci aşamada 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) 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 gurubun örneklerine PFA fiksasyonu yapıldıktan sonra bu şekilde immün boyama yapıldı:

a) 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

4.2.7. EŞ-ZAMANLI PZR İLE HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU

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

4.2.7.1. RNA İzolasyonu

Gen ifade analizi için, hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Platelerin içine 1 ml trizol eklendi.
2. Bir kaç defa pipetaj yaparak hücreler kaldırılıp ependorfa toplandı.
3. Elde edilen örnekler hızlı bir şekilde -80°C'ye kaldırıldı.

RNA izolasyonu 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 g'de 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 g'de 8 dk santrifüj edildi. Dipte beyaz RNA pelleti oluştu.
10. Pellete dikkat edilerek izopropanol uzaklaştırıldı.
11. Tüplere 1ml %75'lik EtOH eklenerek pelet kaldırıldı. (alkol yıkama amaçlı)

12. Tüpler 4°C’de 7500 g’de 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 içermeyen 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.

4.2.7.2. cDNA Sentezi:

İzole edilen RNA’ların ölçümü yapıldı. Nanodrop yardımıyla ve spektrofotomerik yöntem ile örneklerin 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/ul RNA olması için örnekler eşitlendi. cDNA sentezi için Roche First Trascriptor cDNA syntesis kit kullanıldı:

✓ RNA denatürasyonu

1. Kit solüsyonları çözüldü
2. Denaturasyon 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 tüp üzerine 80 µl nuclease free su eklenir 100 µl'ye dilue edilir
- Tüm örnekler -20 °C'ye kaldırıldı.

4.2.7.3. Eş-zamanlı PZR

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

Çizelge 4.6. Eş-zamanlı PZR deneylerinde kullanılan optimizasyon koşulları

	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 çalışıldığını anlamak için optimizasyon deneyleri kuruldu ve sonuçta primerlerin çalışma koşulları çizelge 5.7'de özetlendi. Deneyler roche Light Cycler 480 cihazında 3 biyolojik tekrar ve 3 örnekle yapıldı. Ayrıca cDNA sentezinde, Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Kiti ve Eş-zamanlı PZR deneylerinde Sso Fast EvaGreen supermix kullanıldı.

Çizelge 4.7. Eş-zamanlı PZR 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
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)
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)

4.2.8. İstatistiksel Yöntem

Eş-zamanlı PZR yöntem ile karşılaştırma günlerinde çeşitli gen ifadeleri (Δ CT) tek yönlü varyans analizi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Varyans analizi yöntemi verilerin normal dağılım gösterdiği varsayımına dayanmaktadır. Bu ön şartın sağlanıp sağlanmadığını test

etmek için Shapiro – Wilk ve Kolmogrov – Semirnov testlerinden yararlanılmıştır. Normal dağılım şartının yerine gelmediği durumlarda başvurulan çözüm yollarından birisi, verilerin transformasyonlara tabi tutularak bu ön şartın sağlanmasına çalışılmasıdır. Ancak hangi transformasyonun kullanılması gerektiğine karar vermek oldukça zordur. Transformasyon yöntemlerinden biri olan Box–Cox transformasyon tekniği bu zorluğu ve kararsızlığı gidermek üzere geliştirilmiştir. Çalışmada normal dağılım göstermeyen gen ifade değerlerinin aşağıdaki verilen Box – Cox transformasyon eşitliği kullanılarak normal dağılımı sağlanmıştır:

$$z(\lambda) = (y^\lambda - 1) / (\lambda G_y^{\lambda-1})$$

Bu eşitlikte;

$z(\lambda)$: Gen ifadesinin transforme edilmiş değerini,

y : Gen ifade değeri,

G_y : Gen ifade değerine ait geometrik ortalamayı,

λ : transformasyonda kullanılan katsayıyı,

ifade etmektedir.

Yukarıdaki eşitlikte, istatistiksel paket programının önerdiği optimal λ değeri kullanılmıştır. Ayrıca, varyans analizi tekniğinin (119) kullanılması için gerekli olan grup varyansların homojenliğinin ön şartının sağlanıp sağlanmadığı Levene yöntemi kullanılarak test edilmiştir.

Gen ifadesi bakımından grup ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığını test etmek için tesadüf parselleri deneme tertibi (CRD)'nde tek yönlü varyans analizi tekniği kullanılmıştır. Uygulamada yaygın olarak kullanılan çoklu karşılaştırma testlerinden DUNCAN önem testinden ($p < 0.05$) yararlanılmıştır.

Buna ilaveten bağımlı değişken olarak gen ifade değerlerinin bağımsız değişken olan farklılaşma günlerinin lineer, kuadratik ve kübik regresyonlarının istatistiksel önemliliğinin tespiti için ortogonal polinomial kontrast yöntemi kullanılmıştır. Bu

yöntem farklılaşma günlerine bağlı olarak gen ifadesinin ortaya koyduğu Yanıt Eğrisi (Response Curve)'nin çeşitli derecelerdeki (lineer, kuadratik vs) ilişkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesine imkan sağlamaktadır.

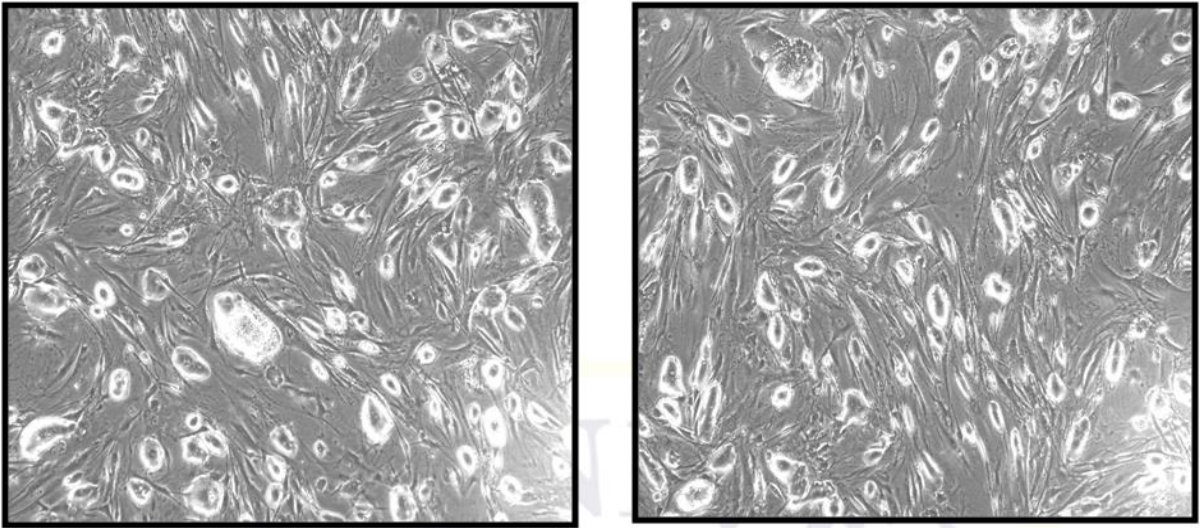


5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. PLURİPOTENSİ DEĞERLENDİRME ANALİZ SONUÇLARI:

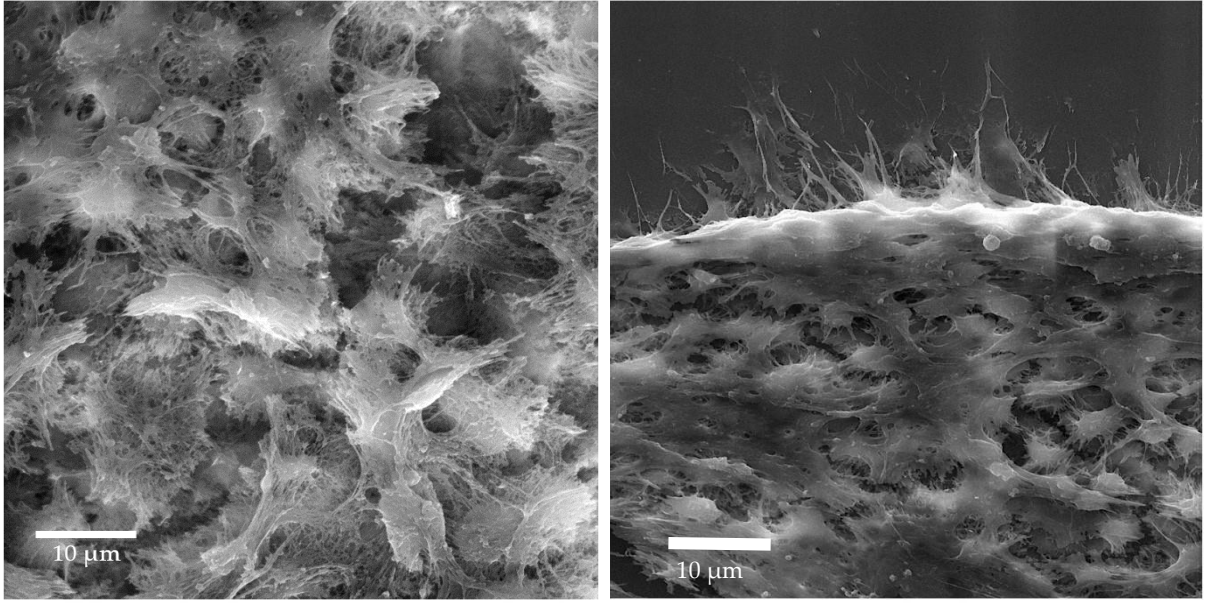
5.1.1. UPKH'LERİNİN MORFOLOJİK KARAKTERİZASYON VE İMMÜN BOYAMA SONUÇLARI:

uPK hücreleri yeterli miktarda çoğaltıldıktan sonra farklı günlerde inverted mikroskop altında incelendi. Ayrıca bu hücrelerin koloni oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 5.1).

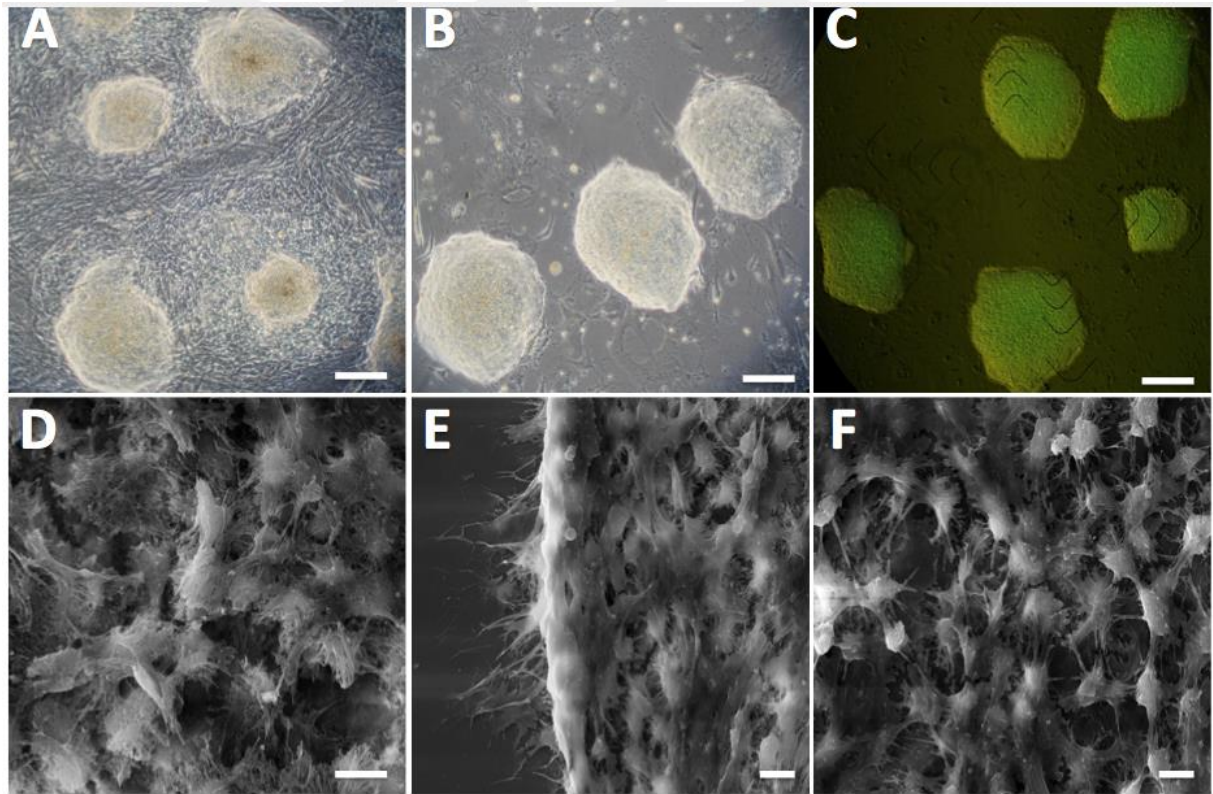


Şekil 5.1. uPKH hücrelerin 14. pasaj görüntüleri (x20) (FEF hücrelerinin üzerinde koloni oluşturan uPK hücreleri)

uPK hücrelerini FEF hücrelerinden ayırmak için ortama puromisin antibiyotiği eklendi. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan puromisinle en etkili olan konsantrasyon belirlendi. Puromisin uygulanan kültürlerde FEF hücreleri tamamen elimine 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 alınmıştır (Şekil 5.2, şekil 5.3).

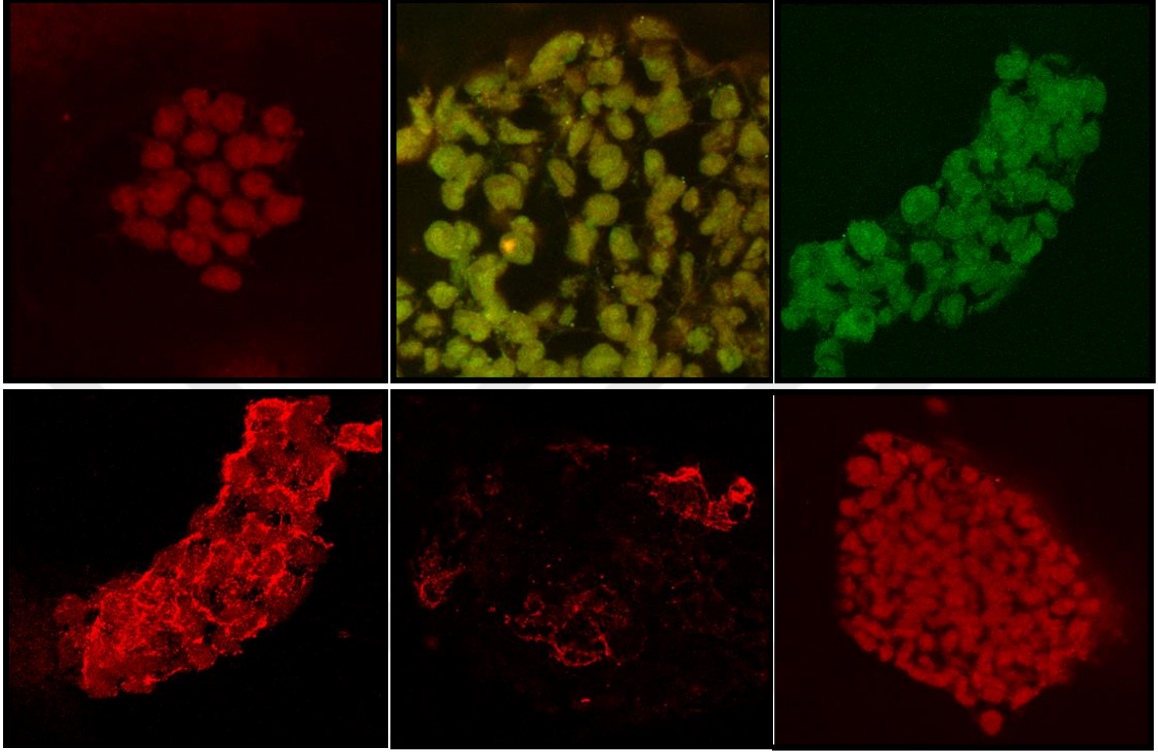


Şekil 5.2. uPK hücrelerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri(SEM)



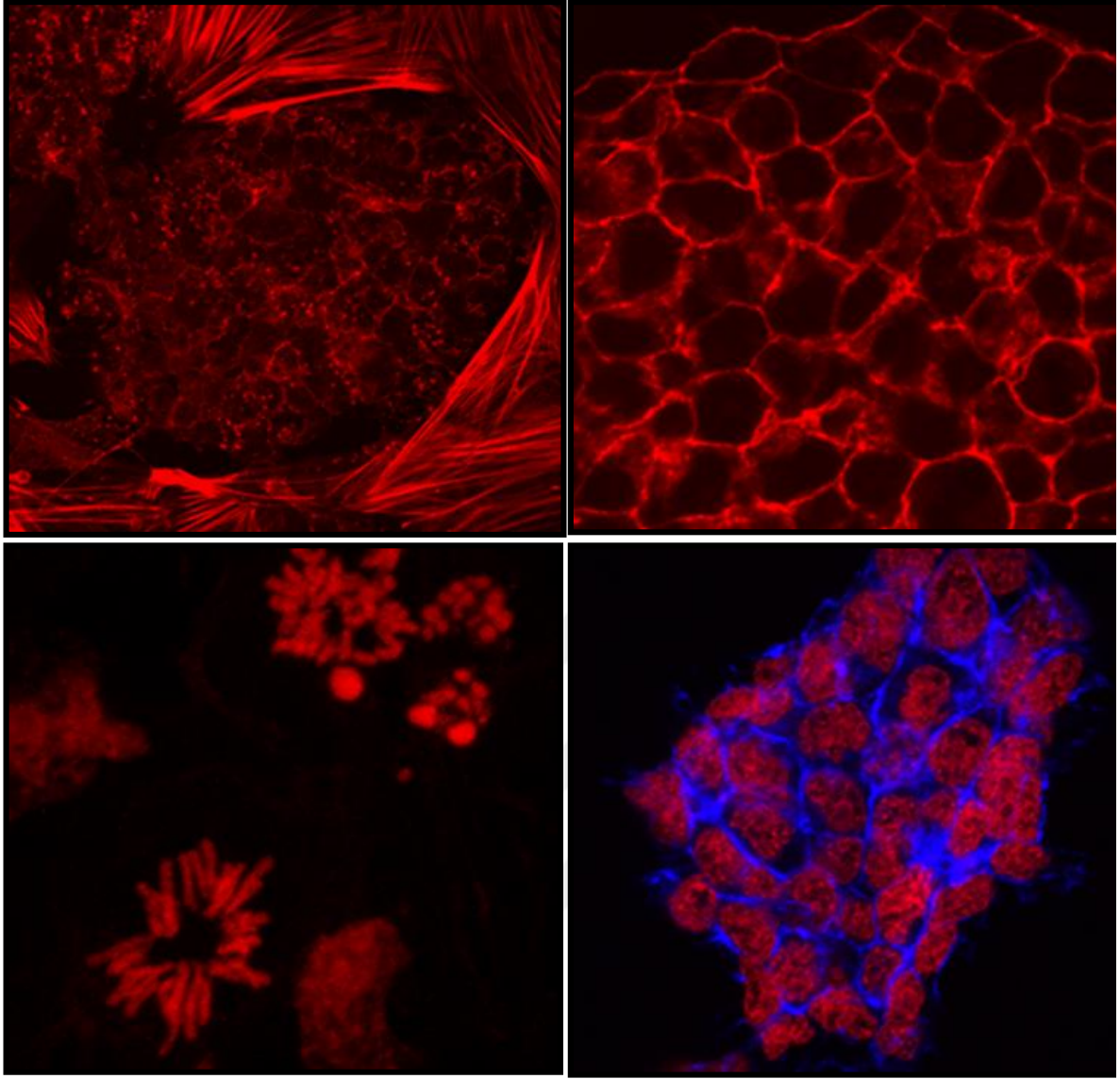
Şekil 5.3. (A) uPK kolonileri besleyici hücrelerin üzerinde (FEF hücreleri) (B) Puromisin kullanılarak FEF hücrelerin elemasyonu (C) GFP⁺ olan uPK hücreleri (Ng-20D-17) D, E ve F) uPK hücreleri kolonilerinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri. Ölçek A-C=200 µm, D-F=5µm.

uPK hücrelerinin pluripotensi 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 yöntemle hücrelerin uPK hücre özeliği gösterdikleri doğrulandı (Şekil 5.4)



Şekil 5.4. uPKH 'lerin konfokal mikroskobu altında görüntüleri ve karakterizasyonu. A ve B) Oct-4⁺ olan uPKH'ler. C) Oct-4⁺ ve GFP⁺ olan uPKH'ler. D) SSEA1⁺ olan uPKH'ler. E) GFP⁺ olan uPKH'ler. F) SSEA1⁺ uPKH'ler.

Ayrıca uPK hücrelerin ve bu hücrelerin oluşturduğu kolonilerin yapısını incelemek amacıyla Falloidin, cy5 ve 7-AAD kullanıp, konfokal mikroskop altında incelendi (Şekil 5.5)



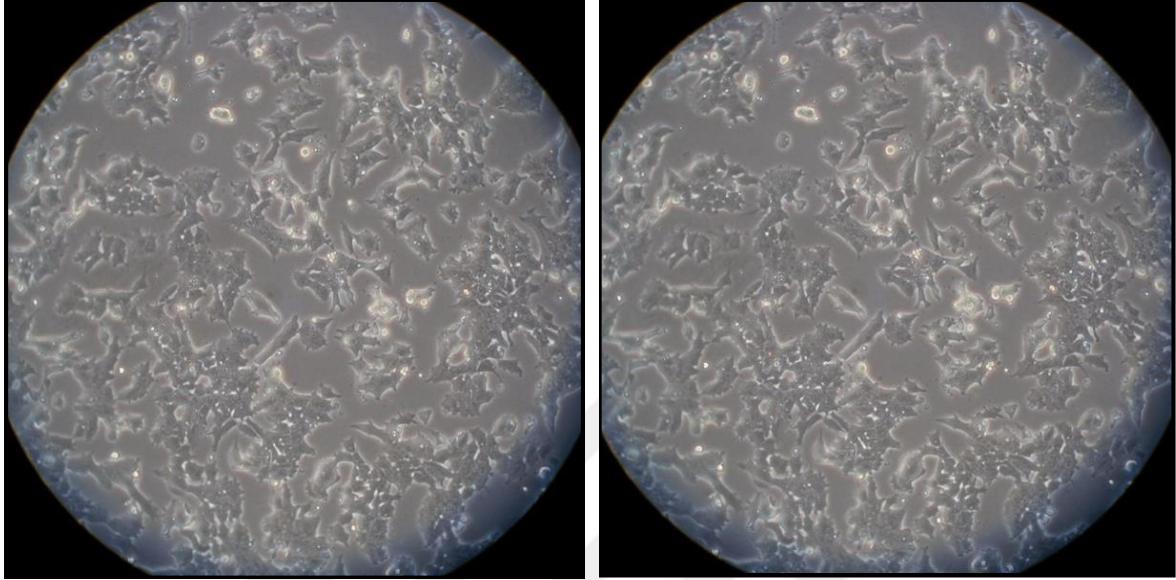
Şekil 5.5. uPKH 'lerin immün boyama yöntemiyle konfokal mikroskobu altında görüntüleri ve karakterizasyonu A-B) Falloidin-cy5 boyanmış uPKH'ler C)7-AAD çekirdek boyası ile boyanmış uPKH'ler D) Falloidin-cy5 ve 7-AAD çekirdek boyası ile görüntülenen uPKH'ler (20x)

5.2. UPK HÜCRELERİNİN LATERAL MEZODERMAL (FLK1+) HÜCRELERE FARKLILAMASI VE BU HÜCRELERİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

5.2.1. FLK1 + HÜCRELERİNİN İMMÜN BOYAMA VE GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI

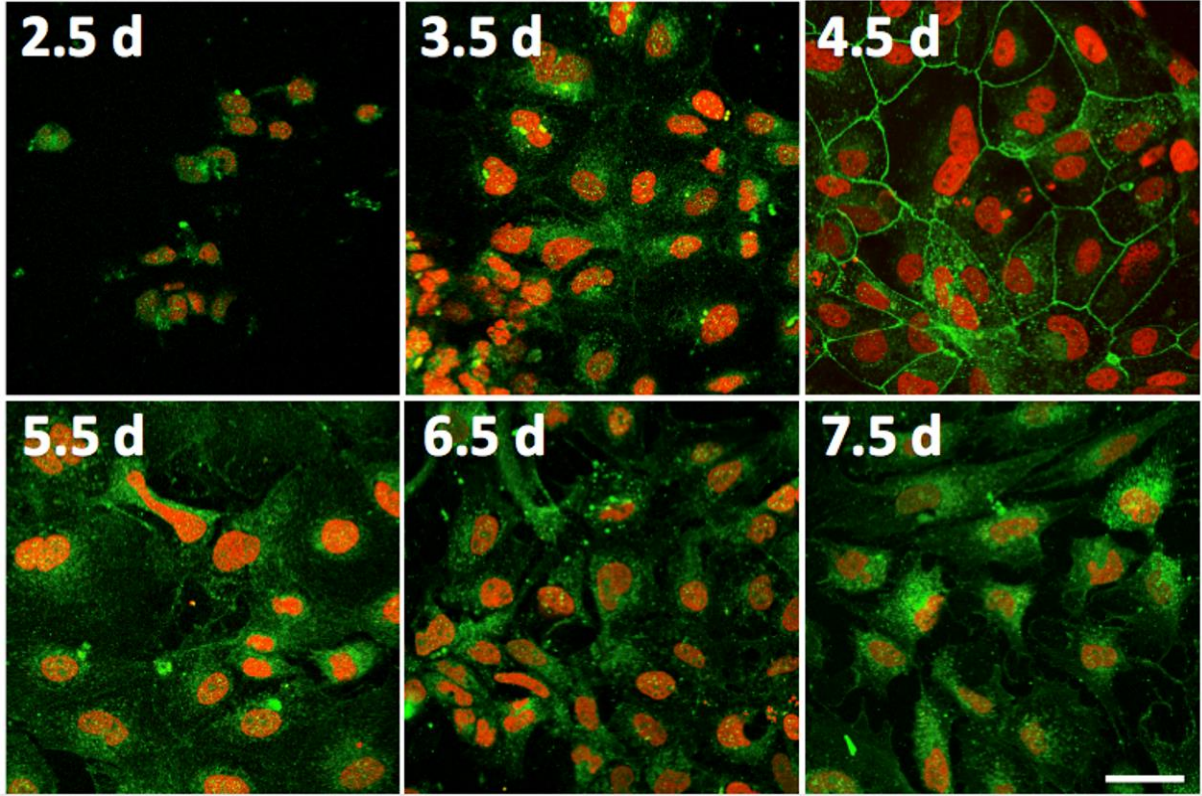
Çoğaltılarak elde edilen saf uPK hücreler kolajen tip IV kaplı petrilerde kültüre edildi. Ayrıca bu hücrelerin kültürü için farklılaştırma besiyeri (186) kullanıldı. Bu süreçte

hücrelerin morfolojik farklılaşması takip edildi. Bu aşamada hücreler kültür kaplarına tutunduktan sonra morfolojik değişiklik (yıldız şeklide) ortaya çıktı (şekil 5.6) Bu hücreler belirli bir konsantrasyonda (1.7×10^3 hücre/cm²) kültür edildi ve bu sürecin sonunda hücreler tamamen kültür kabını kapladı.

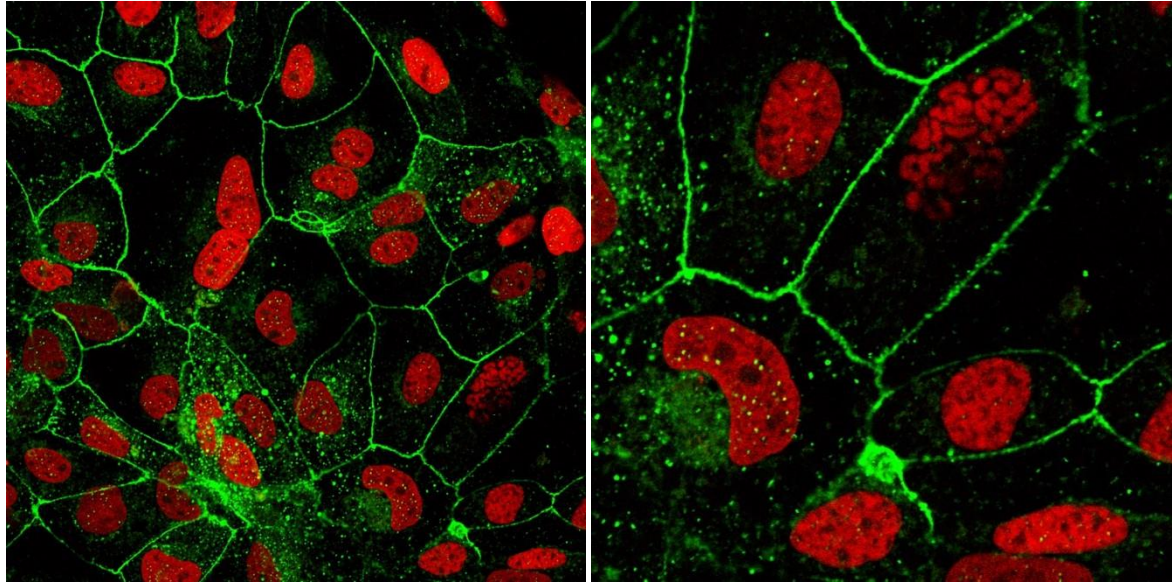


Şekil 5.6. uPKH'lerin kollajen tip IV kaplı petrilerde farklılaştırma besiyerinde görüntüsü 40X (farklılaştırmanın 2. günü)

uPK hücrelerini Flk1⁺ hücelere farklılaştırma sürecini incelemek amacıyla jelatin tip IV yuvarlak lameller üzerinde ve farklılaştırma besiyeri ile saf uPK hücreleri kültür edildi ve 2.5. ile 7.5. günler arasında fikse edilen hücreler, Flk1 antikoruna ile immün boyama yapıldı. İlerleyen günlerde Flk1 ifadesinin (şekil 8 yeşil sinyal) artmaya başladığı ve 5.5. günde pike ulaştığı tespit edildi. Ayrıca bu deneyler sonucunda Flk1⁺ hücre izolasyonu için, farklılaştırmanın 5.5. günü, en uygun gün olduğu tespit edildi (Şekil 5.7, şekil 5.8).



Şekil 5.7. Farklılaştırmanın ilerleyen günlerinde (2.5. günden- 7.5. güne kadar) Flk1 protein ifadesi ve lokalizasyonu. (Flk-1⁺ = yeşil sinyal) (DNA =kırmızı sinyal). Ölçek =50µm



Şekil 5.8. uPKH hücrelerinin Flk-1 hücrelerine farklılaşmasının 5.5. günü. Büyütme:63X ve 100X. Anti-VEGF Receptor 2 primer antikor ve FITC seconder antikor (yeşil floresan) 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), kırmızı-floresan DNA boyası

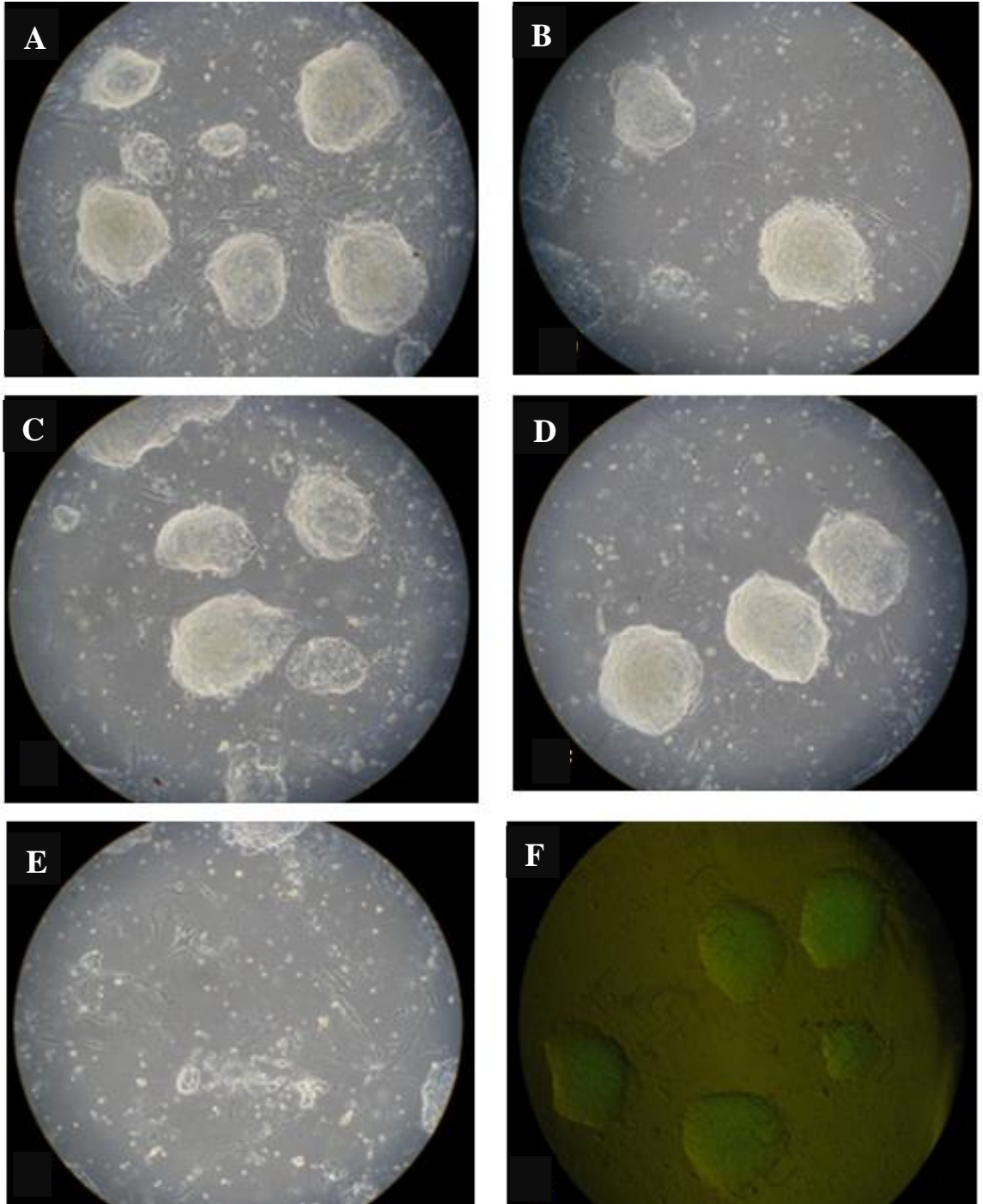
5.2.2. HÜCRE AYRIMI DENEYLERİ, AKIM SİTOMETRİ VE MACS SONUÇLARI:

5.2.2.1. Poromisin C İle Hücre İzolasyon Sonuçları:

FEF hücrelerini elimine etmek için hücrelere puromisin C uygulandı. Konsantrasyon optimizasyonunda farklı konsantrasyonlarda puromisin C kültür ortamına ilave edildi ve etkisi mikroskop altında incelenerek görüntülendi (tablo 4 ve şekil 12). Konsantrasyon oranları 1, 1.5, 2 µg/ml olarak uygulandı. En iyi sonuç 2 µg/ml ve 3. günde elde edildi. Puromisin C uygulamasından sonra FEF hücreleri, uPKH hücrelerden uzaklaştırıldı. Böylelikle saf uPKH hücresi elde edildi.

Çizelge 5.1. Puromisin-C uygulaması için (hücre izolasyonu) uygun konsantrasyon ve uygulama sürecinin belirlenmesi

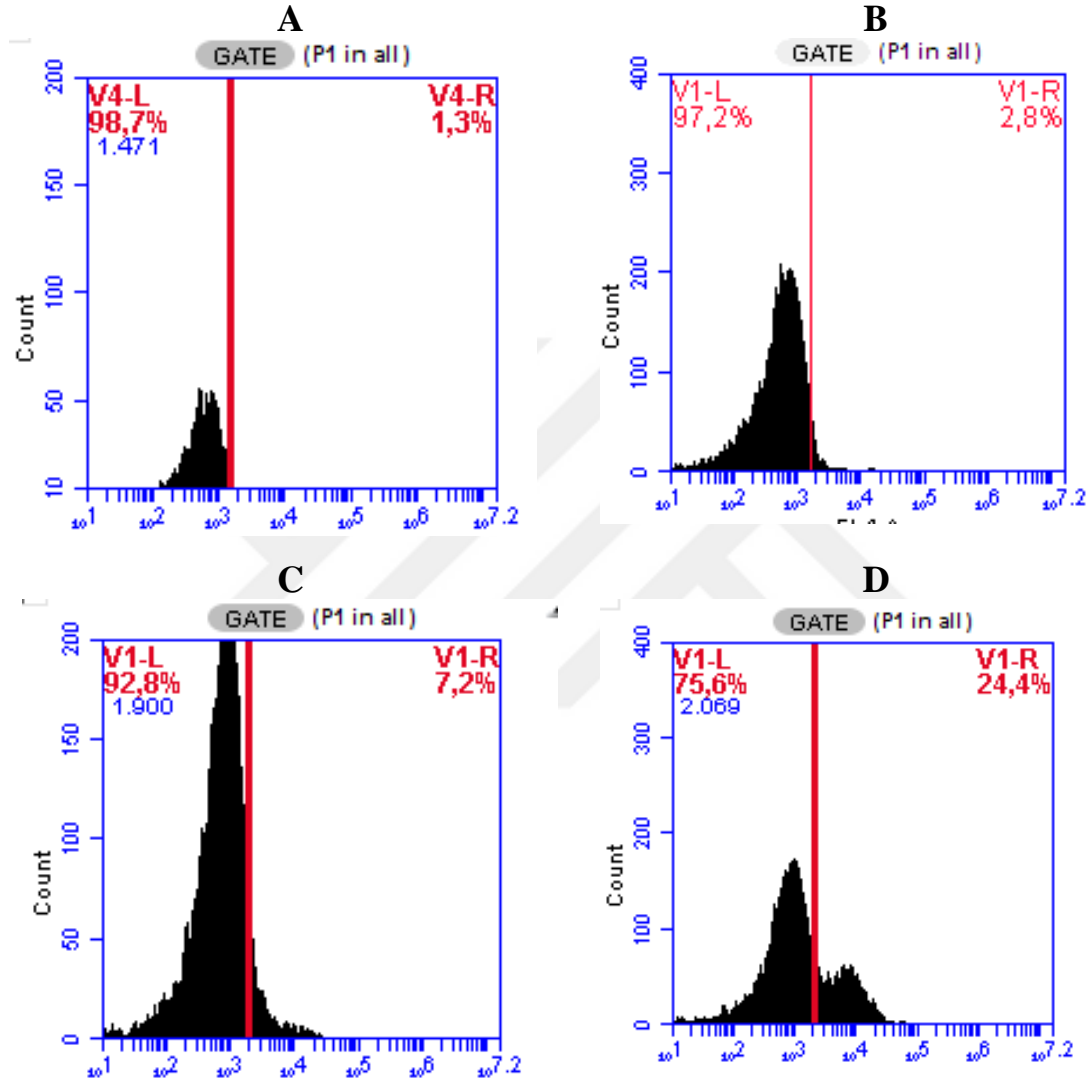
Konsantrasyon	Kontrol	1 µg/ml	1.5 µg/ml	2 µg/ml	2.5 µg/ml
Zaman					
1.gün	Normal çoğalma	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Etkili ve uPKH kaybı
2.gün	Normal çoğalma	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Etkili ve uPKH kaybı
3.gün	Normal çoğalma	Yetersiz Etki	Yetersiz Etki	Etkili	Etkili ve uPKH kaybı



Şekil 5.9. Farklı konsantrasyonlar ve zamanlarda Puromisin C uygulamasından sonra uPKH hücre ortamlarından görüntüler. A) Puromisin 1.5 µg/ml ve 3. gün. D) Puromisin 2 µg/ml 3. gün C, D, E) Puromisin 2.5 µg/ml 3. gün F) Puromisin 2.5 µg/ml 3. gün

5.2.2.2. uPK Hücrelerinin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu:

uPK hücrelerinde günler (2.5.- 5.5.) arasındaki değişen Flk1⁺ hücre yüzdesinin belirlenmesi için akım sitometri analizi yapılmıştır. Sonuçlar şekil 6.6'da belirtildiği gibidir. Flk1⁺ hücre yüzdesi 2.5. günden 5.5. güne kadar sırayla, 1.3%, 2.8%, 7.2% ve 24.4% olarak bulunmuştur.



Şekil 5.10. Farklılaştırılan Flk1⁺ hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları. A. 2.5 günde 1.3%. B) 3.5 günde 2.8%. C) 4.5 günde 7.4%. D) 5.5 günde %24.4

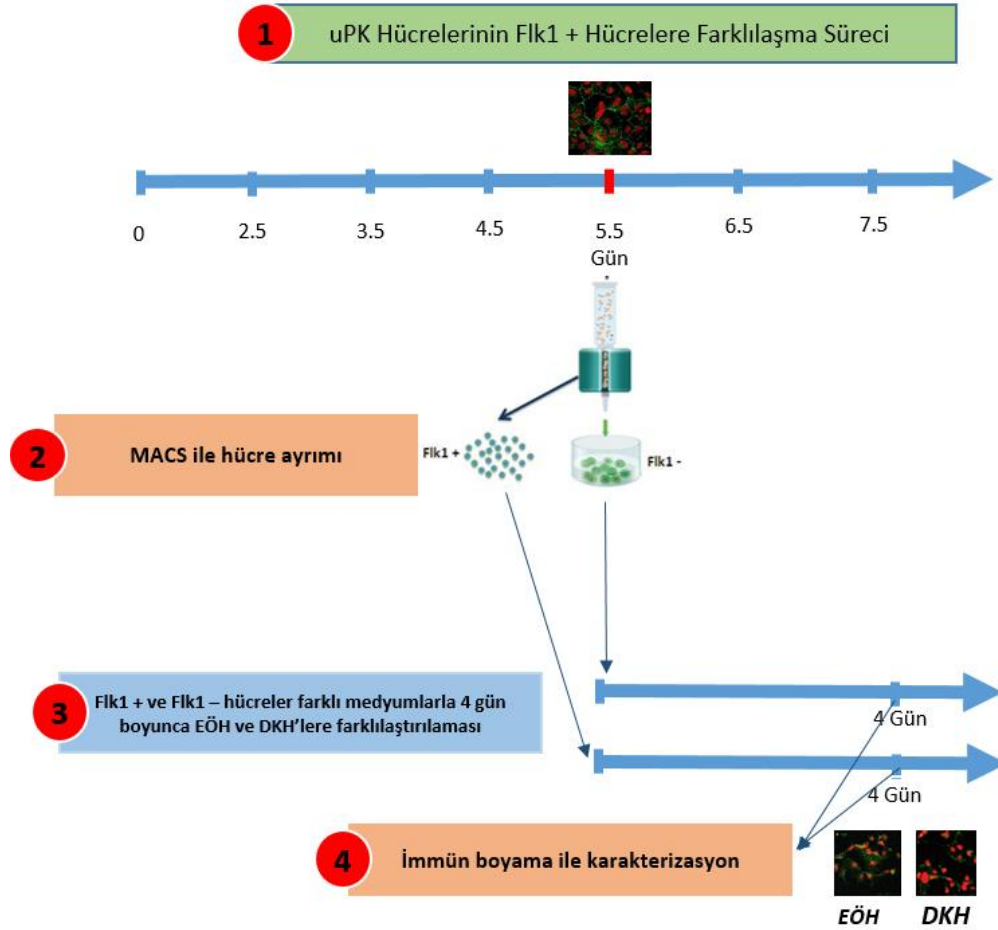
5.2.2.3. MACS Sonuçları

Flk1⁺ hücre izolasyonu için kullanılan en yaygın yöntem, monoklonal antikorların kullanıldığı ve manyetik boncuklarla işaretlemenin yapıldığı: immunomanyetik ayırma tekniğidir. Bu metot ile, çok sayıda ve yüksek derecede saflaştırılmış Flk1⁺ hücreler elde edilmektedir. Çalışmamızda MACS sistemi kullanılarak Flk1⁺ hücreler 5.5 günde izole

edilmiştir. Belirlenen günler (2.5-7.5) arasında Flk1+ hücre izolasyonu için en uygun günü bulmak için yapılan Eş-zamanlı PZR, immün boyama ve akım sitometri sonuçları ile karar verildi. Bu sonuçlara göre izolasyon için en uygun gün 5.5. gün olduğu tespit edilmiştir. Ancak akim sitometrisi ve MACS sonuçları çok yakın olduğu için MACS sistemi ile izolasyon gerçekleştirildi. (Çizelge 5.2. ve Şekil 5.11)

Çizelge 5.2. MACS yöntemi ile elde edilen Flk1+ hücre yüzdesi

Farklılaşan hücre sayısı	12.500.000 H
İzole edilen Flk1 + hücre sayısı	3.150.000 H
Oran	%25.2



Şekil 5.11. MACS ile Flk1⁺ ve Flk1⁻ hücrelerin izolasyonunun ve immün boyama deneylerinin şematik gösterimi

5.2.3. EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI

Belirlenen günlerde (2.5-7.5) farklılaşan hücrelerden RNA izole edildi ve genetik analizler için tasarlanan primerler kullanılarak bu hücrelerin karakterizasyonu gerçekleştirildi. EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin (Flk1, CD31, AC133 ve Ve-Cadherin) ifade seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca arteriyel ve venöz endotel hücre belirteci olan bazı genlerin (EphrinB2, VCAM) analizi yapıldı. Buna ek olarak hücrelerin farklılaştırma sürecinde düz kas belirteçi olan bazı genler (SMA, SMMHC, Calponin ve Desmin) incelendi. Bu genlerin ifade seviyelerinin değişimi farklılaşmanın ilerleyen günlerinde (2.5 günden 7.5 güne kadar) kontrol edildi. Bu analizlerden elde edilen verilere göre hücre izolasyonu için en uygun zamana karar verilmiştir.

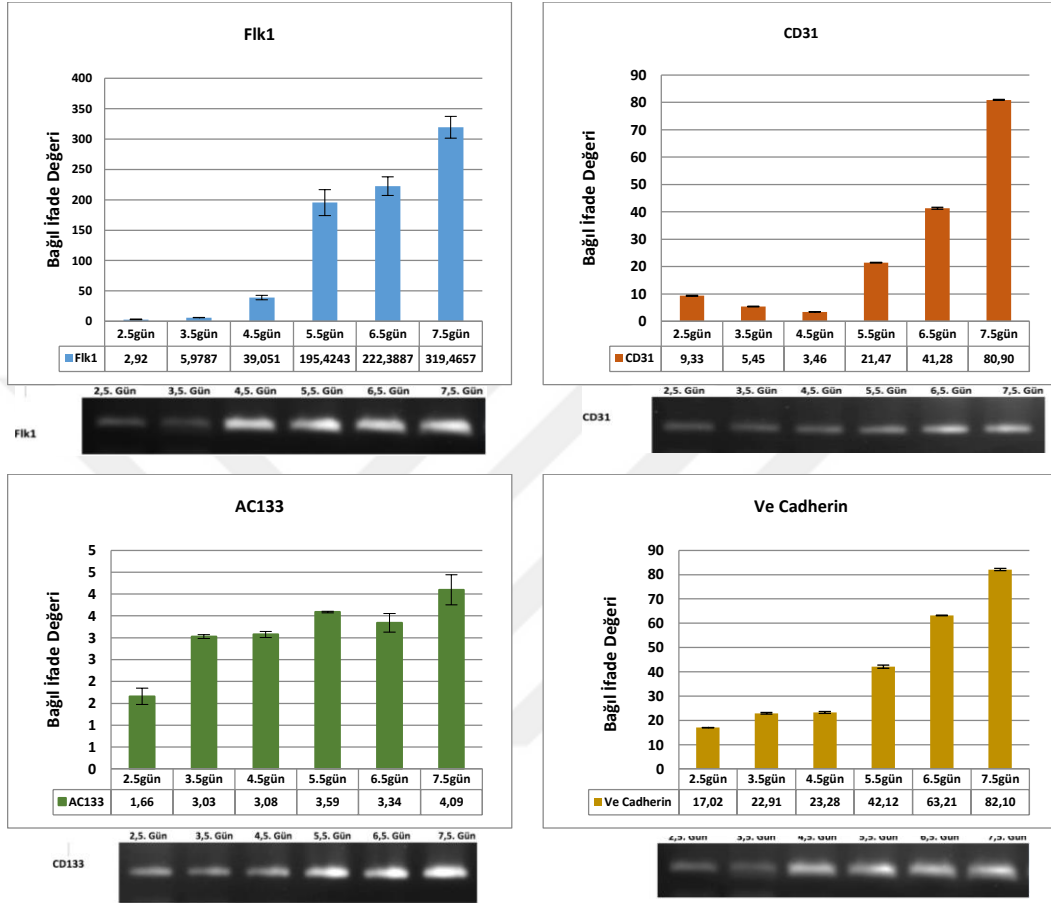
Yapılan Eş-zamanlı PZR sonuçlarının istatistik analizlerine göre, 2.5-4.5 gün arasında ifade seviyesi düşük olmasına rağmen 5.5 günde ifade seviyesinin yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. 6.5-7.5 günlerde ise ifade seviyesinde çok az miktarda artış belirlenmiştir. Çizelge 5. de gruplar arasındaki istatistiksel fark ve p değerleri gösterilmiştir. Ayrıca poligonal polinomial korelasyon analizlere göre lineer, kuadratik, kubik ve quarter anlamlılığı çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 5.3. EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin (Flk1, CD31, AC133 ve Ve-Cadherin) ifade seviyelerinin istatistiksel verileri (ns: non-significant)

		Mean ± SE					
Grup(gen)	Flk1	CD31	AC133	Ve Cadherin	C-Myc	Klf4	
2.5 Gün	1.92 ^d ± 0.14	9.33 ^d ± 0.13	1.66 ^c ± 0.18635	17.02 ^c ± 0.10	5.43 ± 0.51	6.02 ^d ± 0.92	
3.5 Gün	5.98 ^d ± 0.24	5.45 ^c ± 0.11	3.03 ^b ± 0.04	22.91 ^d ± 0.34	5.48 ± 0.64	5.76 ^d ± 1.07	
4.5 Gün	39.10 ^c ± 3.52	3.46 [±] 0.08	3.08 ^b ± 0.07	23.28 ^d ± 0.36	4.57 ± 0.46	6.96 ^{cd} ± 0.50	
5.5 Gün	196.42 ^b ± 22.96	21.47 ^c ± 0.11	3.59 ^{ab} ± 0.02	42.12 ^c ± 0.64	5.90 ± 0.19	9.05 ^c ± 0.39	
6.5 Gün	209.39 ^b ± 99.35	41.28 ^b ± 0.368	3.34 ^b ± 0.21	63.21 ^b ± 0.13	5.43 ± 1.10	13.83 ^b ± 0.85	
7.5 Gün	336.13 ^a ± 41.31	80.90 ^a ± 0.17	4.10 ^a ± 0.35	82.10 ^a ± 0.49	6.71 ± 0.62	24.14 ^a ± 1.16	
P - Değeri	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.378 ns	<0.0001	
Kontrast Polinomial							
P - Değeri	Liner	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.186 ns	<0.0001
	Kuadratik	<0.0001	<0.0001	0.407 ns	<0.0001	0.207 ns	<0.0001
	Kübik	0.149 ns	<0.0001	0.038 ns	<0.0001	0.875 ns	0.456 ns
	Quarter	0.006 ns	<0.0001	0.660 ns	<0.0001	0.924 ns	0.145 ns

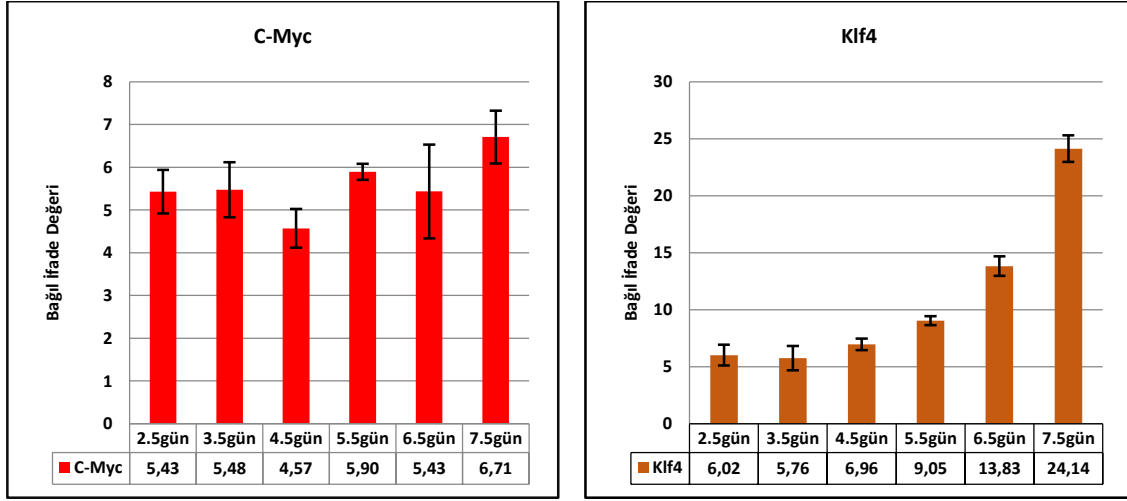
EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin Flk1, CD31, AC133 ve Ve-Cadherin ifade seviyelerine bakıldığı zaman, farklılaşmanın ilerleyen günlerinde (2.5.-7.5. günlerde) bu

genlerin ifade seviyelerinde artış gösterilmiştir. 2.5.-4.5. günler arasında bu genlerin ifadesi az miktarda artış gösterirken 5.5. günde gen ifadeleri yüksek miktarda artış göstermiş ve bu artış sonraki günlerde de devam etmiştir. Flk1, CD31, ve-Cadherin ve AC133 genlerinin ifade artışı günler arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.0001$). (Şekil 5.12)



Şekil 5.12. Farklılaştırma sürecinde EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin ifade seviyeleri (Flk1, CD31, AC133, Ve-cadherin)

Farklılaştırma sürecinde yamanaka faktörlerinin içinde yer alıp aynı zamanda onkogen potansiyeline sahip olan c-Myc ve Klf4 genlerinin ifade değişiklikleri de incelenmiştir. Farklılaştırma sonucu elde edilen hücreler klinikte kullanılma potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu açıdan yaklaşıldığında bunun gibi risk faktörlerinin (c-Myc ve Klf4 genlerinin ifade değişiklikleri) araştırılması önem arz etmektedir. Farklılaştırma sürecinde c-Myc geninin ifade seviyesi günler arasında fark göstermemekle ($p>0.05$) birlikte Klf4 geninin ifadesi ilerleyen günlerde anlamlı olarak artmıştır ($p<0.0001$). (Şekil 5.13)



Şekil 5.13. Farklılaştırma sürecinde risk taşıyan genlerin ifade seviyesi (c-Myc, Klf4)

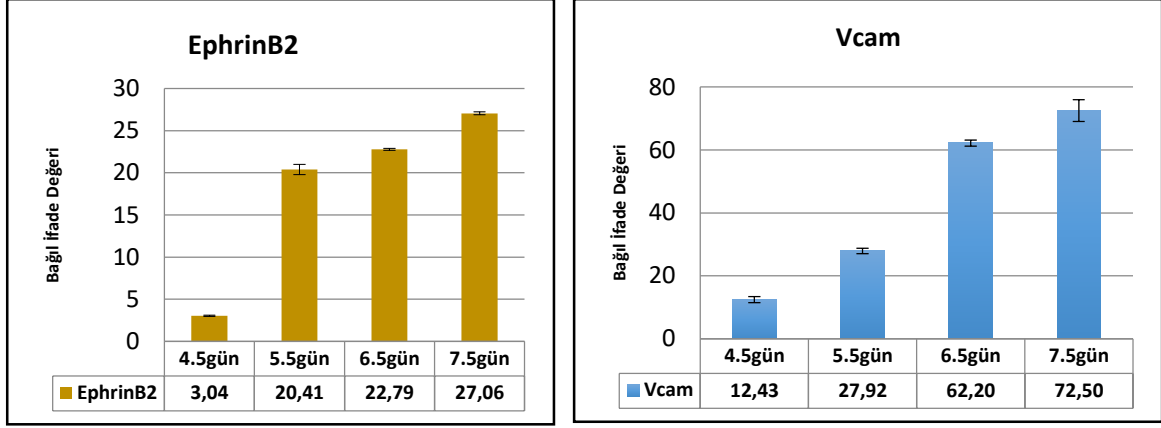
Çizelge 5.3’de görüldüğü gibi, çalışma sonuçlarını güçlendiren arteriyel ve venöz endotel hücresi yönünde farklılaşma belirteci olan EphrinB2, VCAM-1 ve düz kas hücre belirteci olan SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin genlerinin ifade analizleri de yapılmıştır. Ancak yapılan önceki deneyler sonucu elde edilen verilere göre 2.5. ve 3.5. günlerde gen ifade seviyeleri çok düşük ve istatistiksel olarak anlamsız olduğu için bu genlerde (EphrinB2, VCAM, SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin) 4.5.-7.5. günden itibaren gen ifade analizi yapılmıştır.

Yapılan Eş-zamanlı PZR sonuçlarının istatistik analizlerine genel baktığımızda yaklaşık bütün genlerde 4.5 günde ifade seviyesi düşük olmasına rağmen 5.5 günde ifade seviyesinin yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. 6.5. ve 7.5. günlerde ise ifade seviyesinde çok az miktarda artış belirlenmiştir. Çizelge 5.4’de gruplar arasındaki istatistiksel fark ve p değerleri gösterilmiştir. Ayrıca poligonal polinomyal korelasyon analizlere göre lineer, kuadratik, kubik ve quarter anlamlılığı çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 5.4. Arteriyel ve venöz endotel hücresi yönünde farklılaşma belirteçi olan EphrinB2, VCAM-1 ve düz kas hücre belirteci olan SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin genlerinin ifade seviyelerinin istatistiksel analizleri (ns: non-significant)

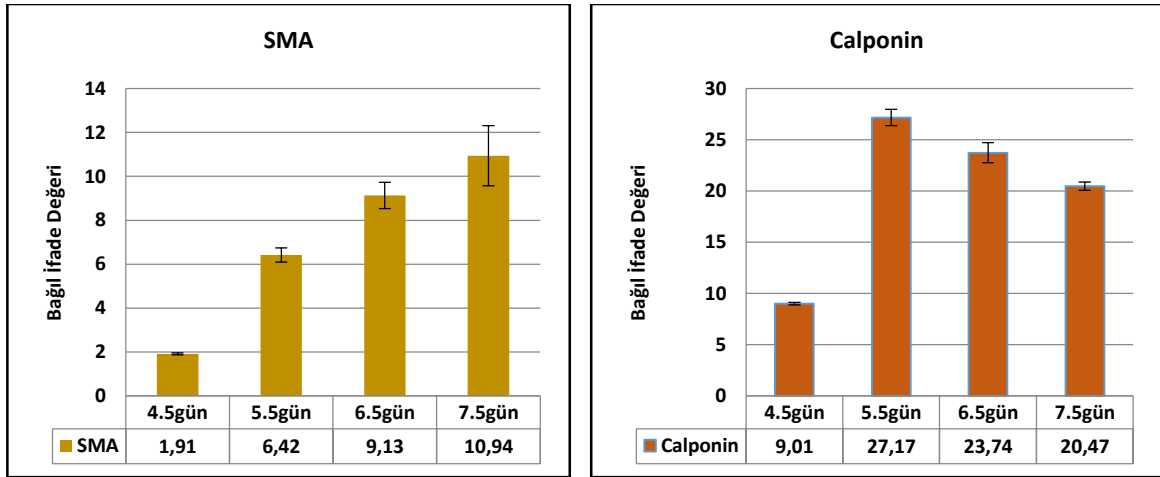
Grup(gen)	Mean ± SE						
	SMA	Calponin	SMMHC	Desmin	EphrinB2	VCAM	
4.5 Gün	1.91c ± 0.044	9.01d ± 0.12	3.04c ± 0.14	1.27c ± 0.01	3.34d ± 0.08	12.43d ± 0.94	
5.5 Gün	6.42b ± 0.32	27.17a ± 0.80	6.04ab ± 0.38	11.58b ± 0.22	20.41c ± 0.61	27.92c ± 0.84	
6.5 Gün	9.13a ± 0.60	23.74b ± 0.98	7.39a ± 0.52	11.95b ± 0.12	22.79b ± 0.12	62.20b ± 0.96	
7.5 Gün	10.94 a ± 1.37	20.47c ± 0.41	5.80b ± 0.58	17.59a ± 0.07	27.06a ± 0.18	72.50a ± 3.46	
P - Değeri	<0.0001	<0.0001	<0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
Kontrast Polinomiyal							
P - Değeri	Liner	<0.0001	<0.0001	0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Kuadratik	0.117 ns	<0.0001	0.001	<0.0001	<0.0001	0.2010
	Kübik	0.801 ns	<0.0001	0.534 ns	<0.0001	<0.0001	0.001
	Quarter	-	-	-	-	-	-

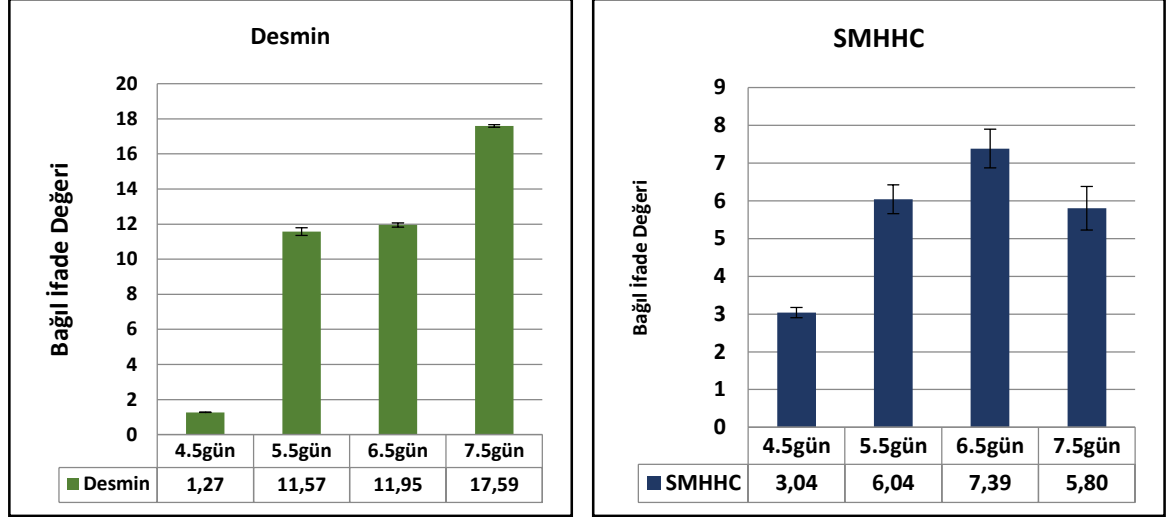
Şekil 5.15’de arteriyel ve venöz endotel hücresi yönünde farklılaşma belirteci olan EphrinB2, VCAM ifade seviyelerine bakıldığı zaman 4.5-7.5 günlerde ifade seviyeleri artış göstermektedir. 4.5 gününde gen ifadesi düşük gözlenirken 5.5 günde gen ifadelerinde yüksek miktarda artış görülmüş ve bu artış sonraki günlerde de devam etmiştir. Bu genlerinin ifade artışı günler arasında istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.0001) (Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı. ve Şekil 5.13.)



Şekil 5.14. Farklılaşma sürecinde arteriyel ve venöz endotel hücresi yönünde farklılaşma belirteci olan EphrinB2, VCAM gen ifade seviyeleri

Düz kas hücre yönünde farklılaşma belirteci olan SMA ve Desmin ifade seviyelerine bakıldığı zaman 4.5.-7.5. günlerde ifade seviyeleri artış göstermemiştir. 4.5. gününde gen ifadesi düşük gözlenirken 5.5. günde gen ifadelerinde yüksek miktarda artış göstermiş ve bu artış sonraki günlerde de devam etmiştir. Bu genlerinin ifade artışı günler arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$) (Şekil 5). Calponin, SMMHC ifade seviyelerine bakıldığı zaman 4.5.- 6.5. günlerde ifade seviyelerinde artış gözlenmiştir. Ancak bu genlerin ifadesinde 7.5. günde azalma görülmüştür. Bu genlerinin ifade farklılığı, günler arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$) (Şekil 5.17).

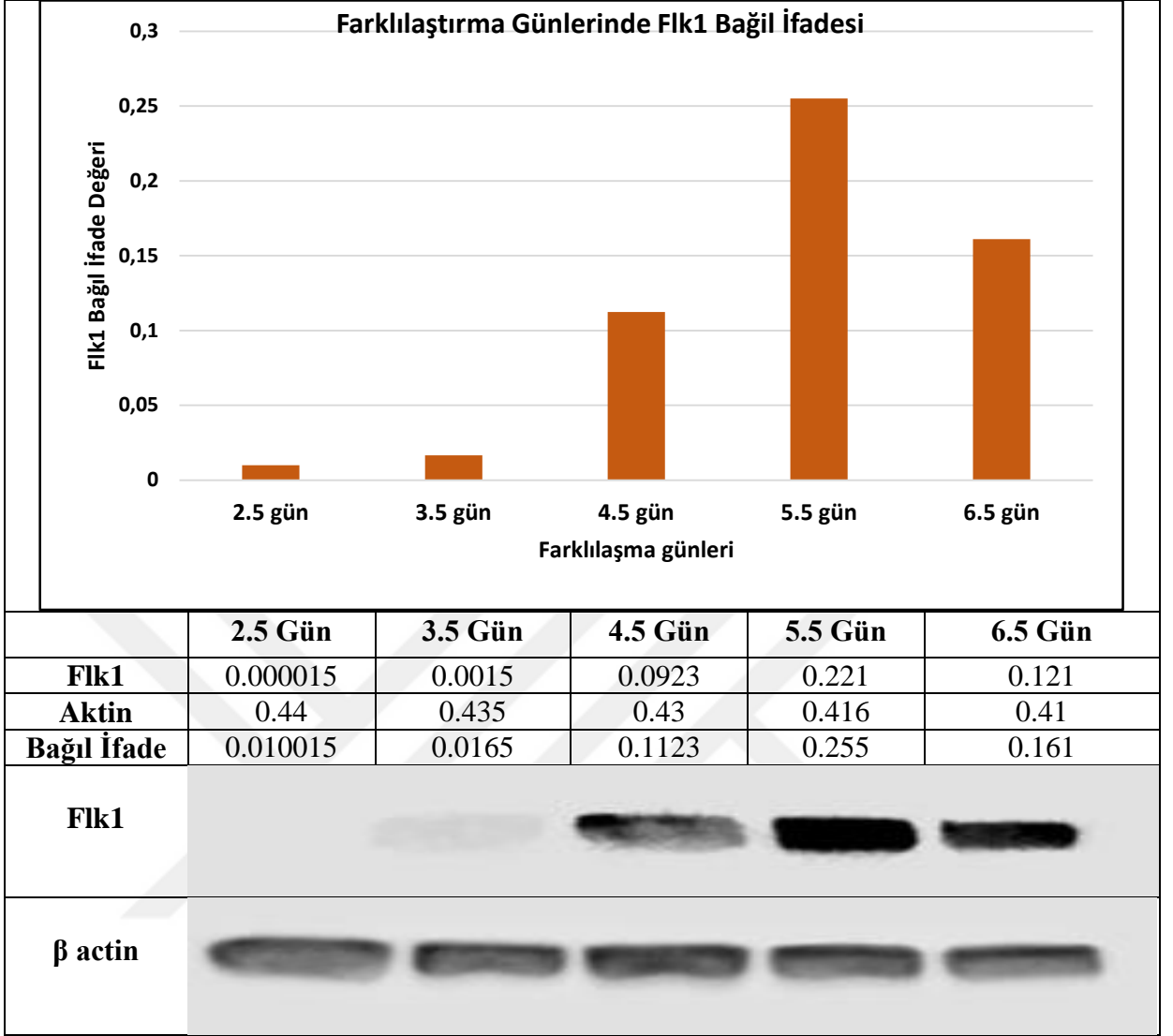




Şekil 5.15. Farklılaşma sürecinde DKH'lerin belirteçi olan SMA, Calponin, Desmin ve SMMHC genlerinin ifade seviyeleri

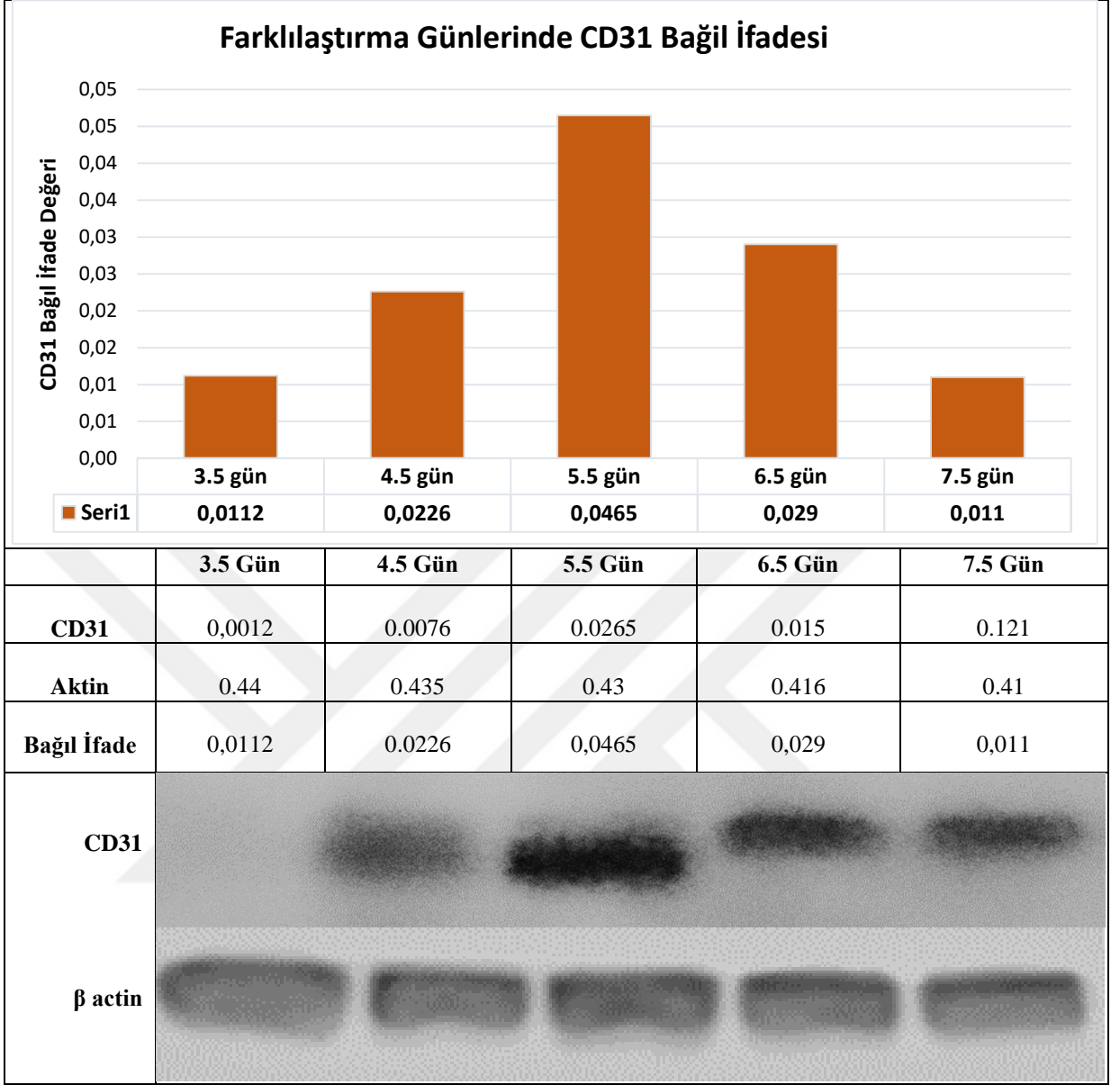
5.2.4. FARKLILAŞTIRMA SÜRECİNDE FLK1 VE CD31 WESTERN BLOT ANALİZ SONUÇLARI

Farklılaşma sürecinde Flk1 ve CD31 protein ifade seviyeleri western blot analizi ile teyit edilmiştir. Sonuçlara bakıldığı zaman 2.5.- 4.5. günlerde Flk1 protein ifadesi düşükken 5.5. günde en yüksek seviyeye ulaşmış ve 6.5. günde düşmeye başlamıştır. Gen ifade seviyeleriyle protein ifadelerini karşılaştırdığımız zaman gen ifade seviyesinin 5.5 günde yükseldiğini ve ilerleyen günlerde bu yükselme devam ettiği görülmektedir. Ancak protein ifade seviyesi 5.5. günde en yüksek seviyeye ulaşmış ve 6.5. günde azalmaya başlamıştır. Protein ifadesindeki bu azalma gen ifadesinden bağımsız mekanizmaların etkin olduğunu düşünülmektedir. (Şekil 5.12 ve 5.17)



Şekil 5.16. Farklılaştırma ilerleyen günlerinde Flk1 protein ifade seviyeleri

Farklılaştırmanın birinci aşasında 3.5 - 7.5 günlerin arasındaki EÖH belirteci olan CD31 geninin protein ifade seviyesi Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında zaman 2.5- 4.5 günlerde protein düşükken 5.5 günde en yüksek seviyeye ulaşmış ve 6.5 günde düşmeye başlamıştır. Gen ifade seviyeleriyle protein ifadelerini karşılaştırdığımız zaman gen ifade seviyesinin 5.5 günde yükseldiğini ve ilerleyen günlerde bu artışın devam edildiği görülmektedir. Ancak protein ifade seviyesi 5.5 günde en yüksek seviyeye ulaşmış ve 6.5 günde azalmaya başlamıştır. Protein ifadesindeki bu azalma gen ifadesinden bağımsız mekanizmaların etkin olduğunu düşündürülebilir. (Şekil 5.18).



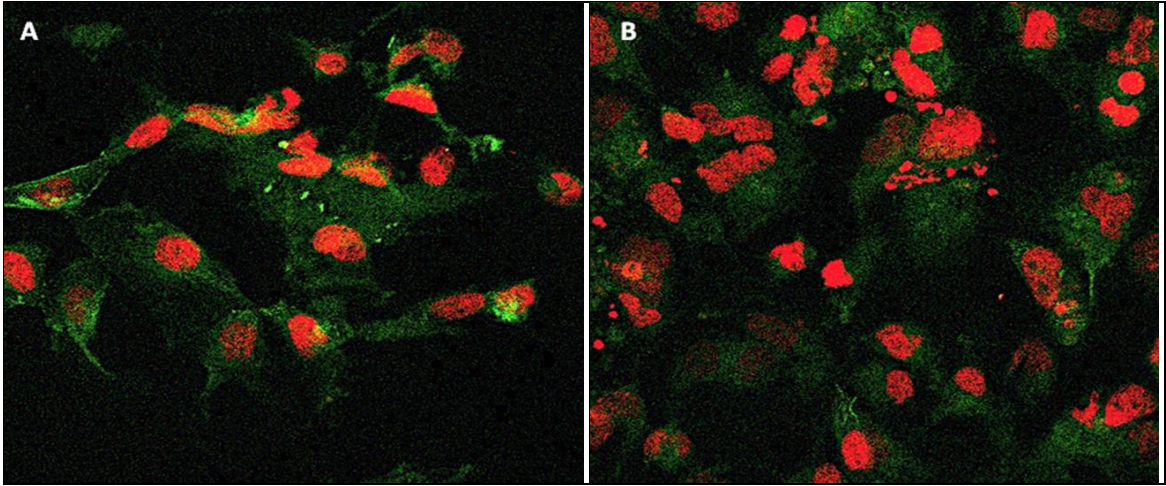
Şekil 5.17. Farklılaştırma günlerinde CD31 protein ifade seviyeleri

5.3. ELDE EDİLEN MEZODERMAL HÜCRELERİN ENDOTELYAL ÖNCÜL VE DÜZ KAS HÜCRELERE FARKLILAŞTIRMA SONUÇLARI

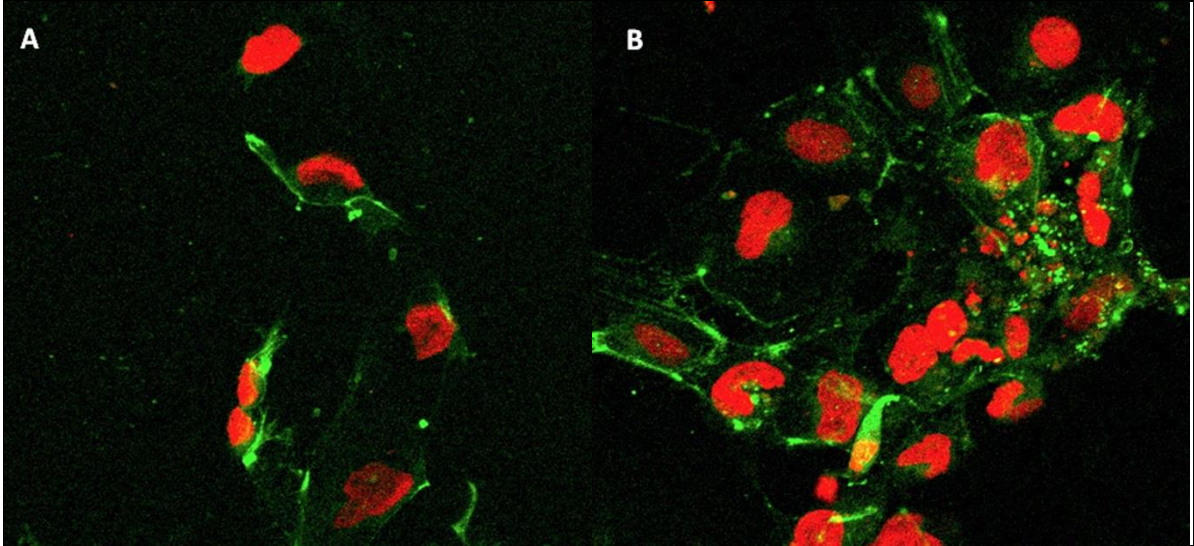
5.3.1. İMMÜN BOYAMA VE GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI

Farklılaşmanın 5.5. gününde izole edilen Flk1⁺ hücreler kollajen tip IV kaplı kültür kaplarına aktarıldı. Flk1⁺ hücreler VEGF içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün boyunca kültür edildi. 4. günün sonunda farklılaşan hücrelerden örnekler alınarak endotelial hücre belirteçleri olan CD31⁺ ve CD133⁺ görüntülemek için immün boyama yapıldı. Şekil 5.19 ve şekil 5.20'de Flk1⁺ hücrelerden elde edilen CD31⁺ ve CD133⁺ olan hücreler yeşil

sinyalle gösterilmiştir.



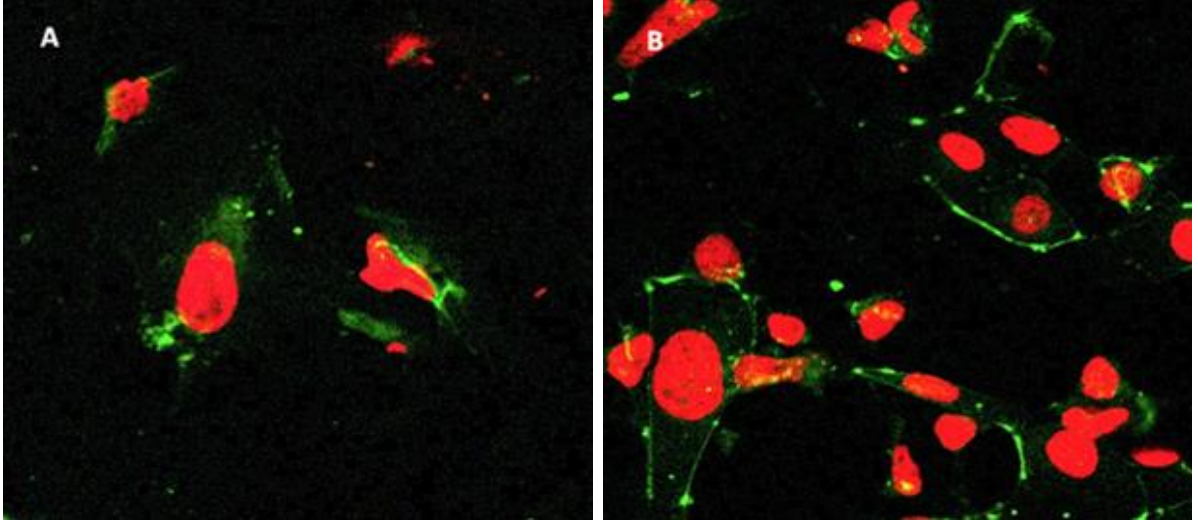
Şekil 5.18. **A ve B:** Flk1⁺ hücrelerinden farklılaşan CD31⁺ hücelere. (CD31⁺= yeşil sinyal) (DNA= kırmızı sinyal) 63X



Şekil 5.19. **A ve B:** Flk1⁺ hücrelerinden farklılaşan CD133⁺ hücelere. (CD133⁺= yeşil sinyal) (DNA= kırmızı sinyal) 63X

Ayrıca farklılaşmanın 5.5 günde izole edilen Flk1⁻ hücelere kollajen tip IV kaplı kültür kaplarına aktarıldı. Bu hücelere PDGF içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün boyunca kültür edildi. 4. günün sonunda düz kas hücre markeri olan α SMA görüntülemek için immün boyama yapıldı. Şekil 5.22’de Flk1⁻ hücelere elde edilen Düz kas belirteci taşıyan hücelere yeşil sinyalle görüntüldü.

İmmün boyama sonuçlarına göre Flk1⁻, PDGF içeren farklılaştırma besiyeri kullanarak SMA⁺ hücelere farklılaştığı tespit edildi.

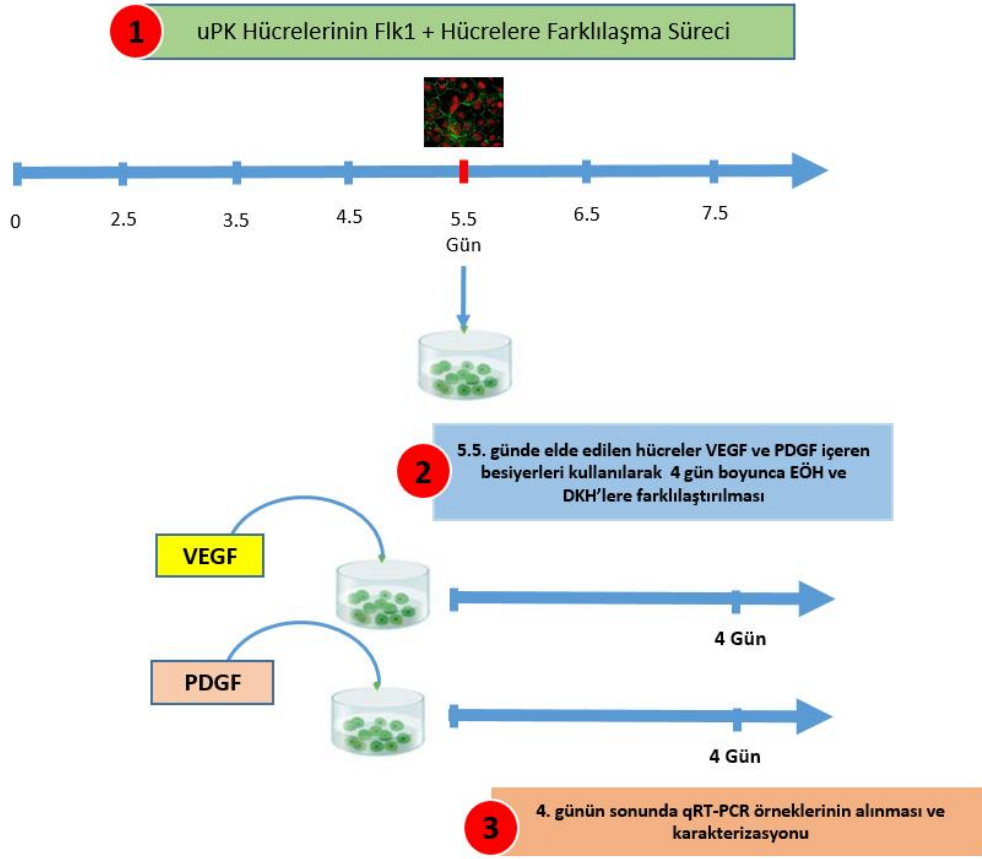


Şekil 5.20. **A ve B:** Flk1⁻ hücrelerinden farklılaşan α SMA⁺ hücreler. (α SMA⁺ = yeşil sinyal) (DNA= kırmızı sinyal) 63X

5.3.2. EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI:

5.3.2.1. Farklılaştırmanın 5.5. Gününden Elde Edilen Hücrelerin VEGF Ve PDGF İçeren Besiyerinde Kültür Ederek 4 Gün Sonra Gen İfade Seviyelerin Analiz Sonuçları

Farklılaşmanın 5.5 günde elde edilen tüm hücreler (izole edilmeden) kollajen tip IV kaplı kültür kaplarına aktarıldı. Bu hücreler iki grupta VEGF ve PDGF içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün boyunca kültür edildi. 4. günün sonunda farklılaşan hücrelerden örnekler alınarak trizol metoduyla RNA izolasyonu yapıldı.



Şekil 5.21 İkinci aşamadan elde edilen hücrelerin Eş-zamanlı PZR analizlerinin şematik gösterimi.

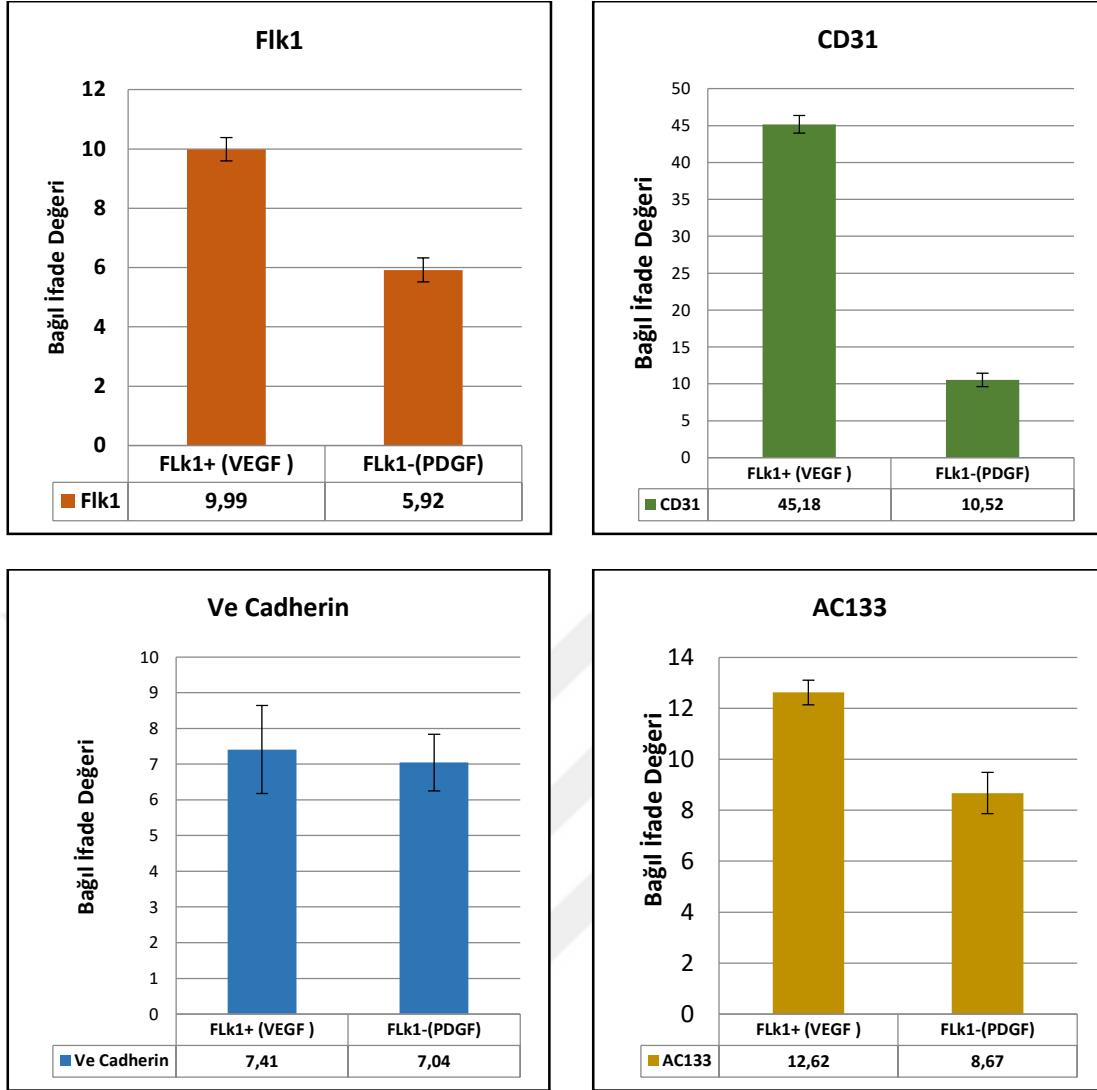
EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin (Flk1, CD31, AC133 ve Ve-Cadherin), arteriyel venöz yönünde farklılaşma belirteci olan genlerin (EphrinB2, VCAM), DKH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin(SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin) ifade seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca farklılaştırma sürecinde yamanaka faktörlerinin içinde yer alıp aynı zamanda onkogen olan c-Myc ve Klf4 genlerinin ifade değişimleri incelenmiştir.

Yapılan Eş-zamanlı PZR sonuçlarının istatistik analizlerine tüm örneklerde ifade seviyesinin iki grup arasında(VEGF ve PDGF uygulanan gruplar) farklı olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 5.5, 5.6 ve 5.7'de gruplar arasındaki istatistiksel fark ve p değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 5.5. EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin (Flk1, CD31, AC133, Ve-Cadherin, EphrinB2, VCAM) arteriyel ve venöz endotel hücresi yönünde farklılaşma belirteci olan (EphrinB2, VCAM) gen ifade seviyelerinin iki grup arasında istatistiksel analizleri (ns: non-significant)

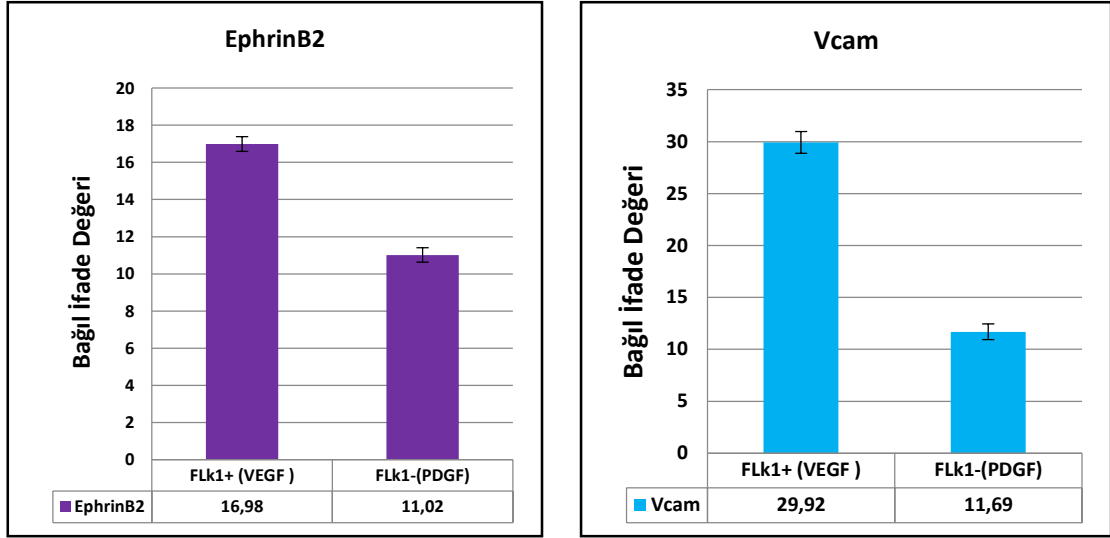
Grup	Mean ± SE					
	Flk1	CD31	AC133	Ve Cadherin	EphrinB2	Vcam
VEGF	9.99^a ± 0.39	45.18^a±1.17	12.62^a ±0.48	7.41 ±1.23	16.98^a ±0.39	29.92^a ±1.05
PDGF	5.92^b ± 0.41	10.52^b±0.9	8.67^b ±0.81	7.04 ±0.80	11.02^b ±0.39	11.69^b ±0.75
P - Değeri	0.002	<0.0001	0.014	0.815 ns	<0.0001	0.001

EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan genlerin Flk1, CD31, AC133 ve Ve-Cadherin ifade seviyelerine iki grup arasında farklılık göstermektedir. Flk1, CD31, AC133 genlerinin iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. (Sırayla P<0.0005, P<0.0001 ve P<0.05) Sadece Ve-Cadherin geninin ifade seviyesi iki grup arasında farklılık göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır. (Şekil 5.23)



Şekil 5.22. VEGF ve PDGF içeren besiyerleri ile beslenen grupların, EÖH'leri için spesifik belirteç olan Flk1, CD31, Ve-Cadherin ve AC133 genlerinin ifade seviyelerinin iki grup arasında olan farklılıklar

Ayrıca arteriyel ve venöz endotel hücresi yönünde farklılaşma belirteci olan EphrinB2, VCAM ifade seviyelerine iki grup arasında farklılık göstermektedir. İki grup arasında olan bu farklılık her iki gen içinde istatistiksel olarak anlamlıdır. (Sırayla $P < 0.0001$ ve $P = 0.001$) (Şekil 5.24)

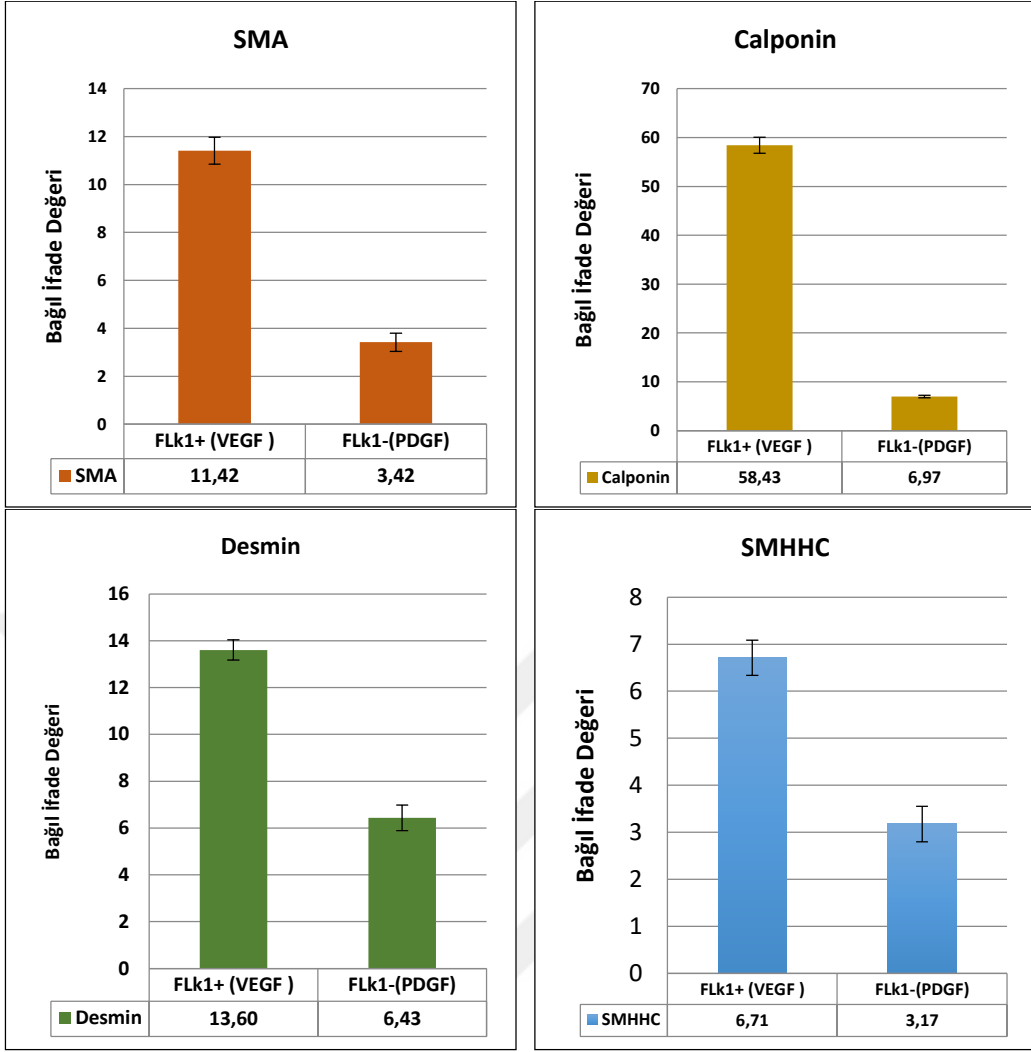


Şekil 5.23. VEGF ve PDGF içeren besiyerleri ile beslenen guruplarda, arteriyel ve venöz damar hücresi belirteçi olan EphrinB2 ve VCAM genlerinin ifade seviyelerinin iki grup arasında olan farklılıklar

DKH'lerin spesifik belirteçleri olan SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin gen ifade sevipleri iki grup arasında farklılık göstermektedir. Bu genlerin iki grup arasındaki ifade seviye farklılıkları istatistiksel olarak anlamlıdır. (Sırayla $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $P < 0.005$ ve $p < 0.0001$) (Şekil 5.25)

Çizelge 5.6. DKH'lerin spesifik belirteçleri olan (SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin) gen ifade seviyelerinin iki grup arasında istatistiksel analizi

Grup	Mean \pm SE			
	SMA	Calponin	SMMHC	Desmin
VEGF	11.42 ^a \pm 0.56	58.43 ^a \pm 1.61	6.71 ^a \pm 0.37	13.60 ^a \pm 0.43
PDGF	3.42 ^b \pm 0.38	6.97 ^b \pm 0.26	3.17 ^b \pm 0.38	6.43 ^b \pm 0.54
P - Değeri	<0.0001	<0.0001	0.003	<0.0001

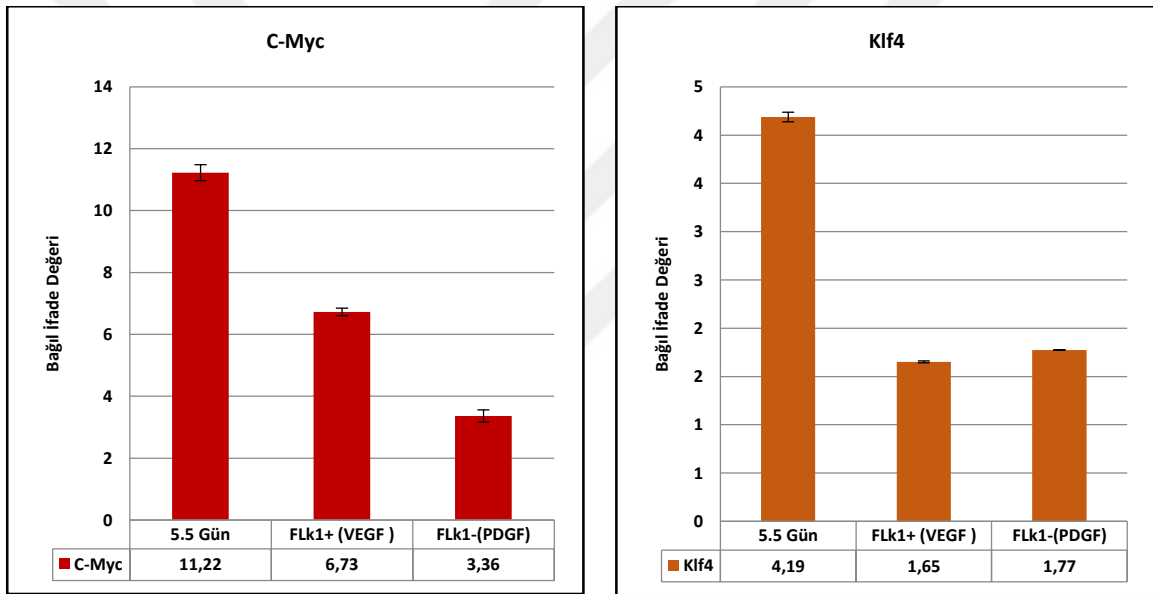


Şekil 5.24. DKH'lerin spesifik belirteçleri olan (SMA, Calponin, SMMHC ve Desmin) gen ifade seviyelerinin iki grup arasında farklılıklar

Farklılaştırma sürecinde yamanaka faktörlerinin içinde yer alıp aynı zamanda onkogen olan c-myc ve Klf4 genlerinin ifade değişiklikleri incelenmiştir. Farklılaştırma sonucu elde edilen hücreler klinikte kullanılma potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu açıdan yaklaşıldığında risk faktörlerinin araştırılması önem arz eder. Farklılaştırma sürecinin sonunda c-myc ve Klf4 genlerinin ifade seviyesi farklılaştırmanın 5.5 gününe göre anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir ($p < 0.0001$ ve $p < 0.0001$) (Şekil5.26).

Çizelge 5.7. Yamanaka faktörleri olan ve aynı zamanda onkogen özeliği olan (C-Myc, Klf4) genlerinin farklılaştırmanın 5.5 gününe göre ifade seviyelerinin istatistiksel analizleri

Grup	Mean \pm SE	
	C-Myc	Klf4
Farklılaşmanın 5.5.Günü	11.22 ^a \pm 0.26	4.19 ^a \pm 0.05
VEGF	6.73 ^b \pm 0.12	1.65 ^b \pm 0.01
PDGF	3.36 ^c \pm 0.19	1.77 ^c \pm 0.00
P - Değeri	<0.0001	<0.0001



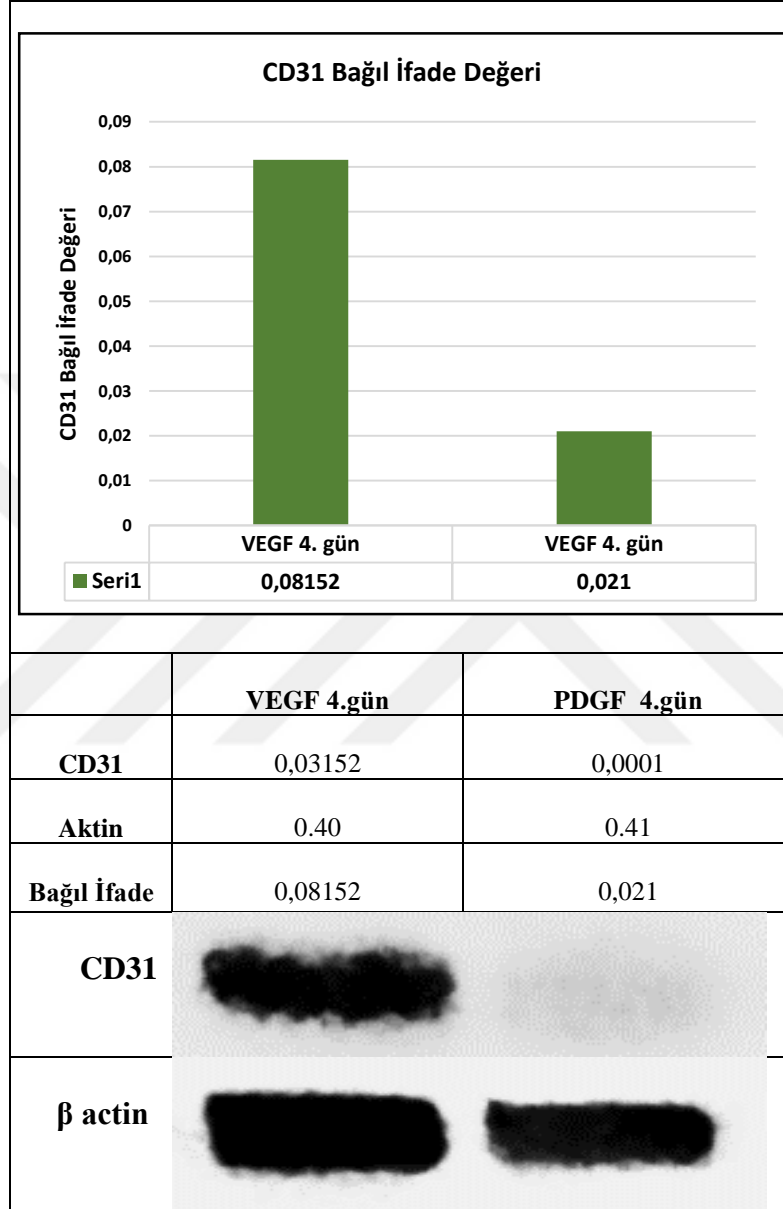
Şekil 5.25. Yamanaka faktörleri olan ve aynı zamanda onkogen özeliği taşıyan genlerin (C-Myc, Klf4) farklılaştırmanın 5.5 gününe göre ifade seviyelerinin farklılıkları

5.3.3. WESTERN BLOT SONUÇLARI

Farklılaştırmanın 2. aşamasından elde edilen hücrelerde EÖH markeri olan CD31 geninin protein ifade seviyeleri western blot analizi ile teyit edilmiştir. Farklılaşmanın 5.5 günde elde edilen hücreler kollajen tip IV kaplı kültür kaplarına aktarıldı. Bu hücrelere sırayla VEGF ve PDGF içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün boyunca kültür edildi. 4. günün sonunda farklılaşan hücrelerden örnekler alınarak total protein izole edildi

EÖH'lerin spesifik belirteçleri olan CD31, protein ifade seviyelerine her iki grup arasında

bakılmıştır. Bu genin protein ifade seviyesi β aktin housekeeping gen ifade seviyesi ile normalize edildikten sonra şekil 5.27 gösterilmiştir. Bu şekilde görüldüğü gibi CD31 proteinin ifade seviyesi VEGF içeren besiyeri ile beslenen hücrelerde başka gruba göre (PDGF içeren) daha yüksektir.



Şekil 5.26. VEGF ve PDGF grupları arasında olan CD31 protein ifade seviyeleri

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Kalp ve damar hastalıkları, anomalileri ve sendromları günümüzde ölümlerin en önemli nedenleri arasındadır. Bu hastalıkların önüne geçilebilmesi için, yeni bilimsel araştırmalar yapılmalı ve yeni modeller oluşturularak farklı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir(90). Bu kapsamda erişkin bir hastadan yeniden programlama yöntemiyle uPK hücre elde etmek ve bu hücreleri hastalık tedavisinde kullanmak umut vericidir. Ayrıca hastalık modelleri oluşturmak ve *in vitro* koşullarda ilaç veya yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için en iyi seçenekler olarak ön plana çıkmaktadırlar.

uPK hücreleri, kendini yenileme ve pluripotensi özelliklerine sahip olmaları sebebiyle, EKH'lerine iyi bir alternatif oluşturmaktadır. Ayrıca hastaya özgü uPK hücresi üretilmesi bu hücrelerin transplantasyonunda immün rejeksiyon riskini ortadan kaldırmaktadır. Buna ek olarak bu hücrelerin üretilmesi ve kullanmasıyla birlikte, EKH'lerinin kullanmasında karşılaşılan etik sorunların da ortadan kalkacağı düşünülmektedir. Bu önemli faydalar uPK hücrelerini rejeneratif tıp için yeni bir hücre kaynağı olarak ön plana çıkarmaktadır. uPK hücre teknolojisinin, hastalığın patogenezi ve ilaç keşfi alanında yapılan araştırmalarda yüksek potansiyele sahip olduğu bilinmektedir(89).

Miyokardial iskemi, derin miyokard hipoksisine yol açan, özellikle oksijen için, miyokard metaboliti temini ve talebi arasında bir dengesizlik ile karakterize patolojik bir hastalıktır(3, 4). Bu olay, tipik olarak koroner arter tıkanmasına neden olarak miyokardiyuma kan akışını sınırlamaktadır ve bu durumun sürekli devam etmesi halinde miyokardiyal hücre ölümü ve devamında kalp yetmezliği (iskemik kalp hastalığı) ortaya çıkmaktadır. Doğal olarak bu durumda hasar görmüş dokudan fazla miktarda sitokin ve uyarıcı maddeler salgılanması ve tamir mekanizmasının da devreye girmesi bu bölgede yeni damarların oluşumuna neden olmaktadır. Bu tamir mekanizmasında özellikle sitokinlerin hasarlı dokulardan salgılanması ile birlikte endotelial öncül hücre (EÖH) adı verdiğimiz hücreler ve bu hücrelerden farklılaşan düz kas hücreleri bu dokuya kemotaksik etki ile göç etmektedirler.

EÖH'ler kemik iliğinde üretilir ve bazı sitokinler ve benzeri proteinler vasıtasıyla kan dolaşımına geçerler. Bu hücreler kök hücrelerden köken aldıkları için yüksek derecede farklılaşma özelliğine sahiptirler. Hasar gören dokuların onarımı, revaskülarizasyon ve anjogenez'de rol alırlar, ancak anjiogenez'deki rollerinden dolayı tümörlerin büyümesini de indüklerler.

Bu hücreler, kardiyovasküler hasarlarda özellikle miyokard infarktüsü gibi hastalıklarda kan dolaşımını vasıtasıyla hasarlı bölgeye yerleşip ve yeni damar oluşturmak veya damarların onarımında etkili rol oynarlar. Buna ek olarak bazı dokuların revaskülarizasyonundan sorumludurlar. Damar oluşumunda endotel hücrelerle iş birliği yapan düz kas hücreleri de önemli bir göreve sahiptirler.

Son yıllarda yapılan araştırmalar EÖH'lerin onarımsal tıpta önemli olduğunu ortaya koymuştur. Birçok araştırmada, bu hücreler kandan izole edip kardiyovasküler hastalıklarda kullanılırken, bazı araştırmalar bu hücreleri kök hücrelerden farklılaştırmaya yönelik olarak devam etmektedir. Bu çalışmalara ek olarak farklı çalışma grupları tarafından in vitro koşullarda EÖH hücrelerin üretilmelerine yönelik araştırmalar yapılmaktadır. 2006 yılında Yamanaka ve arkadaşları, uPKH üretimini bilim dünyasına sunmalarıyla birlikte, birçok araştırmacı bu hücreleri, pluripotent kök hücre olarak kendi araştırmalarına dahil etmişlerdir.

Sunulan bu tez çalışmasında, uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler kullanılarak, birçok farklı aşamada ve in vitro koşullarda endotelial öncül hücre (EÖH) ve düz kas hücreleri (DKH) üretilmiştir. İlk aşamada uPK hücreler, belirli koşullarda lateral mezoderm hücrelere farklılaştırılmıştır. İkinci aşamada ise elde edilen mezoderm hücrelerden EÖH'ler ve DKH'lerin farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücrelerin karakterizasyonu immünohistokimyasal yöntemlerle yapılmış, elde edilen sonuçlar gen ekspresyon ve protein düzeyinde valide edilmiştir. Buna ek olarak elde edilen hücrelerin transplantasyonunda sorun oluşturabilecek risk faktörlerinin (onkogenler) gen ifadeleri değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucu elde edilen hücreler farklı kalp ve damar hastalıklarında kullanılma potansiyeline sahip olabilecekleri gösterilmiştir.

6.1.1. uPKH'LERDEN, LATERAL MEZODERMAL (FLK1⁺) HÜCRELERİN FARKLILAŞTIRILMASI

Öncelikle uPKH hücrelerinin çoğaltılması amacı ile bu hücrelerin besleyici hücreler (FEF) ile kültürü yapılmıştır. Daha sonra puromisin antibiyotigi ve MACS sistemi ile saf uPKH'ler izole edilmiştir. İzole edilen saf uPKH'ler extraselüler matrix (Kollajen tip IV) kaplı platelerde farklılaşma besi yeri kullanılarak 7.5 gün boyunca lateral mezodermal hücrelere (Flk1⁺) farklılaştırılmıştır. Hücreler 2.5., 3.5., 4.5., 5.5., 6.5. ve 7.5. günlerde akım sitometri ve immünositokimya yöntemleri ile takip edilmiş ve bu süreçte Flk1⁺ hücre yoğunluğunun 5.5. günde en yüksek miktara ulaştığı saptanmıştır.

İmmün boyama sonuçlarından elde edilen verilere paralel olarak, Flk1⁺ hücrelerine farklılaşma sürecinde, protein ifade seviyesi 2.5. günden 7.5. güne kadar incelenmiştir. Flk1 protein düzeyinin giderek arttığı ve 5.5. gün en üst seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, farklılaşmayı takip eden süreçte 2.5.-7.5. günler arasında her gün immün boyama ile görüntü alınmamıştır. İfade seviyesinin en yüksek olduğu düşünülen günde immün boyama ile Flk1 protein ifadesi tespit edilmiştir. 2008 yılında Yamamizu Narazaki ve ark (188), (81) ve 2009'da Niwa ve ark (189) ve 2010 yılında Suzuki ve ark(190) tarafından yapılan çalışmalarda immün boyamaların 4.5. ve 5. günde yapıldığı görülmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada ise Flk1 protein ifade seviyesi farklılaşmanın her gününde görüntülenmiş ve ifade seviyesinin artışı farklılaştırmanın ilerleyen günlerinde de tespit edilmiştir. Ayrıca bu gözlemlerde 5.5. günde protein ifadesinin maksimum seviyeye ulaştığı saptanmıştır.

Çalışmamızda akım sitometri yöntemiyle yapılan analizler sonucu, uPK hücrelerinden elde ettiğimiz Flk1⁺ hücrelerin 2.5. ile 7.5. gün arasında farklılaşma sürecindeki yüzdeleri sırasıyla, 2.5. günde %1.3, 3.5. günde %2.8, 4.5 günde %7.2 ve 5.5 günde %24.4 olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi Flk1⁺ hücrelerin yüzdesi giderek artmakta olup 5.5. günde en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Suzuki ve ark. 2010 yılında, aynı hücreleri kullanarak yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde farklılaşma 7.5 gün boyunca takip edilmiş ve sadece akım sitometri kullanılarak Flk1⁺ hücre sayısını en fazla olduğu zamanı 4.5. gün olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları bu araştırmaların akım sitometri yüzdelerine baktığımızda Flk1⁺ hücrelerin farklılaşma sürecinde yüzdeleri sırasıyla; %11.3 (3.5.

gün), %27 (4.5. gün), %14.9 (5.5. gün), %13.2 (6.5. gün) ve %6.5 (7.5. gün) olarak belirlemişlerdir(190).

Narazaki ve ark 2008 yılında yaptıkları çalışmada, uPK hücrelerinden Flk1⁺ hücrelerin farklılaştırılmasını sağlamışlar ve yapılan akım sitometri analizleri sonucunda, farklılaştırma sürecinde elde edilen Flk1⁺ hücrelerin yüzdelerini 3.5., 4.5. ve 5.5. günlerde sırasıyla; %13.7, %27 ve %16.2 olarak tespit etmişlerdir(81). Niwa ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise aynı hücreler kullanılarak, 5 gün boyunca farklılaşma süreci takip edilmiş ve akimsitometri sonuçlarına göre Flk1⁺ hücre sayısının en yüksek olduğu zamanı 5. gün olarak belirlemişlerdir(189).

Elde ettiğimiz sonuçlar yukarıda belirtilen 3 farklı çalışmaya benzerlik göstermektedir ancak bu çalışmalarda Flk1⁺ hücre yüzdesinin en yüksek olduğu zamanlar 4.5. ve 5. gün olarak görülürken, bizim yaptığımız çalışmada Flk1⁺ hücre seviyesinin en yüksek yüzdesine 5.5. günde ulaşılmıştır.

Farklılaşma sürecinde, hücrelerin hangi yönde farklılaştığı ayrıca elde edilen verilere dayanarak hangi gün izolasyon için uygun olduğunu öğrenmek için belirteç genlerin ifade düzeyleri incelenmiştir. Eş-zamanlı PZR yöntemi kullanılarak, EÖH'lerin spesifik belirteç genlerinin, (Flk1, CD31, AC133 ve Ve-Cadherin) farklılaşma sürecinin 2.5. gününden itibaren 7.5. güne kadar olan ifade düzeyleri araştırılmıştır. Ayrıca Arter ve venöz endotel hücre farklılaşma sürecindeki belirteç genler olan EphrinB2 ve VCAM genlerinin ifade düzeyleri de araştırılmıştır.

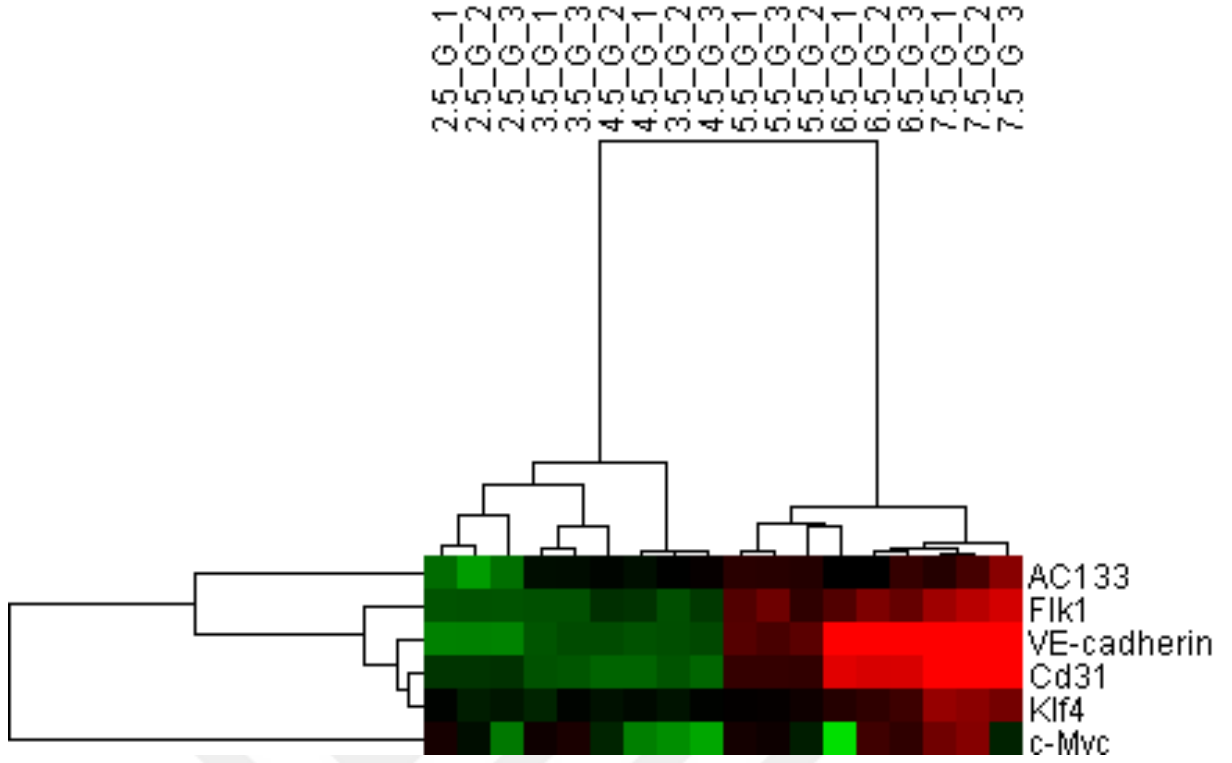
uPK hücrelerinin Flk1⁺ hücrelerine farklılaşma sürecinde endotelial ve düz kas hücrelerinin belirteci olan genler ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda tek gen veya en fazla 3 gen ifade seviyesi analiz edilmiştir. Ancak yaptığımız çalışmada farklılaştırmanın birinci aşamasında EÖH'lerinin belirteci olan 6 gen ve düz kas belirteci olan 4 genin ifadesi farklılaştırmanın ilerleyen günlerinde analiz edilmiş ve çalışmamızda özgün veriler elde edilmiştir.

2013 yılında Kohler ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, farklılaştırma sürecinin 0. Günü ile 5. Günü arasında olan Flk1, CD31 ve Ve-Cadherin gen ifadelerinin farklılıkları

incelenmiş ve her üç genin de 5. gündeki ifade seviyeleri, 0. gündeki ifade seviyelerine göre büyük artış göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar elde ettiğimiz veriler ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir(191).

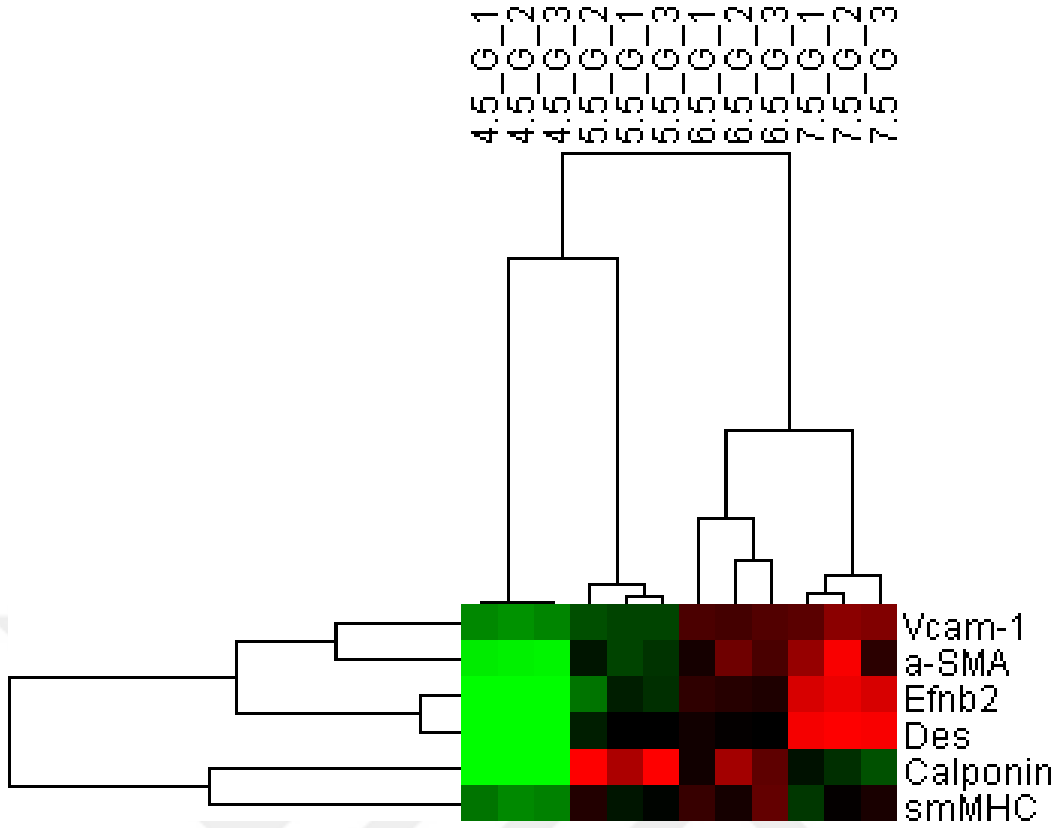
2010 yılında Suzuki ve ark yaptıkları araştırmada Flk1 geninin ifade düzeyini Eş-zamanlı PZR analizi ile 5. güne kadar takip etmişler ve bu genin ifadesinin 5. güne kadar artış gösterdiği ancak 6. günden ifadesinin azaldığını belirtmişlerdir. Bu veriler ile elde ettiğimiz sonuçlar 5. güne kadar benzerlik göstermiştir. Ancak yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre bu genin ifade seviyesinin artışı 6. ve 7. günde de devam etmiştir.

Şekil 6.1. de farklılaşmanın 1. aşamasında gen ifade analiz sonuçları kümeleme analizi olarak verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere hemen hemen tüm genlerde 2.5. günden 4.5. güne kadar ifade profillerinde artış olduğu görülmüş ve bu artışın en belirgin olduğu zamanın 5.5. günde olduğu belirlenmiştir. Sonuçlarımıza göre, Flk1, AC133, CD31, Ve-Cadherin genlerinin ifade seviyelerinin, farklılaşmanın ilerleyen günlerinde de arttığı belirlenmiştir. Ayrıca bu genler ile birlikte onkogen özelliği olan ve hücre proliferasyonunda rol oynayan c-Myc ve Klf4 genlerinin ifade seviyelerinin de bu farklılaşma sürecinde artışı gösterilmiştir.



Şekil 6.1. Birinci farklılaştırma sürecinde EÖH'lerinin ve c-Myc ve Klf 4 genlerinin ifade ve kümeleme analizi

Şekil 6.2. ye bakıldığında arter ve venöz endotel belirteci olan genlerin (EphrinB2, VCAM) farklılaşma sürecindeki ifade seviyesinin 5.5. ve 6.5. günlerde yüksek derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. DKH yönünde farklılaşmada, DKH belirteci olan genlerin de (α SMA, Calponin, Desmin ve smHC) 4.5.-7.5. gün arasındaki ifade seviyelerinin, 5.5. günde yüksek bir düzeye ulaştığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.2. Birinci farklılaştırma sürecinde Arter, venöz ve DKH'lerinin gen ifade ve kümeleme analizi

2006 yılında Lanner ve ark tarafından yapılan bir çalışmada, EKH'lerin endotelial öncül hücrelere farklılaşması sürecinde, EphrinB2 geninin ifade seviyesini izlemişler ve bu genin ifade seviyesinin giderek artış gösterdiğini ve 8. günde en yüksek seviyeye ulaştığını gözlemlemişlerdir(192).

2011 yılında Uosaki ve arkadaşları uPK hücrelerin VCAM-1+ hücreye farklılaşmalarını sağlayıp gen ifadesinin 5. günden itibaren artmaya başladığı ve 9.-11. günde en yüksek seviyeye geldiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmadan elde edilen veriler, yaptığımız araştırmayla benzerlik göstermekle birlikte, bizim sonuçlarımızda ifade artışının 4.5. günden başlayarak, giderek artış göstermiştir(193).

2009 yılında Xie ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada, uPK hücrelerden SmMHC⁺ hücreler elde etmişlerdir. Bu belirteç genin ifadesi, farklılaştırma sürecinde, ilerleyen günlerde artış göstermiştir ancak 6. ve 9. gün arasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bizim

elde ettiğimiz bulgularda, bu genin ifade seviyesi farklılaştırma sürecinde 4.5. günden başlayıp, 6.5. günde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüş ve 7.5. günde azalmaya başladığı tespit edilmiştir(194).

2014 yılında DKH belirteci olan α SMA geninin ifade seviyelerinin incelendiği bir çalışmada, Stefanska ve ark tarafından farklılaşma sürecinde gen ifadesinin 4. günde başlayıp ve 7. günde yüksek seviyelere ulaştığı saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç yaptığımız araştırmanın sonucu ile benzerlik göstermektedir(195).

Bunlara ek olarak çalışmamızda farklılaştırma sürecinde, Desmin ve Calponin genlerinin ifade seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Desmin geninin ifade seviyesi farklılaşmanın 5.5. gününden başlayıp ve 7.5. gününe kadar artmaya devam etmiştir. Calponin geninin ifadesi ise 4.5. günde başlayıp 5.5. günde en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra giderek düşmeye başladığı saptanmıştır.

uPKH'lerden lateral mezodermal hücre farklılaştırma sürecinde Eş-zamanlı PZR analizlerinin validasyonu için Flk1 geninin protein ifade analizi Western Blot yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerin sonuçlarına göre, Flk1 geninin protein bağıl ifade seviyesi 2.5. günden 6.5. güne kadar sırayla; 0.1, 0.02, 0.11, 0.26 ve 0.16 olarak görülmektedir. Bu verilere dayanak bu genin protein ifade seviyesi, farklılaşmanın ilerleyen günlerinde artış göstermektedir ve 5.5. günde en yüksek seviyeye ulaşırken, 6.5. günde azalmaya başlamıştır. Elde edilen bu veriler immün boyamadan elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Ancak Eş-zamanlı PZR analizlerine göre gen ifade seviyesi 5.5. güne kadar artış göstererek, western blot ve immün boyama sonuçlarından farklı olarak 6.5. ve 7.5. günlerde de devam etmektedir. Gen ifade seviyesi ve protein seviyesinde görünen bu değişiklik transkripsiyon sonrası mekanizmalara bağlı olduğu düşünülmektedir.

Narazaki ve ark 2008 yılında yaptıkları çalışmada Flk1 protein analizini 0. günden 4. güne kadar takip etmişler ve elde ettikleri verilere göre, bizim bulgularımız ile benzerlik göstererek, bu genin ifadesinin giderek arttığını göstermişlerdir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda lateral mezoderm hücre izolasyon zamanlarını belirlemek amacıyla sadece Flk1 geninin ifade seviyesi göz önüne alınmıştır. Yaptığımız çalışmada ise immün boyama, Western Blot ve akım sitometri teknikleri bir arada

kullanılmış, bu analizlere ek olarak Eş-zamanlı PZR yöntemiyle 10 genin ifade seviyeleri incelenerek izolasyon zamanına karar verilmiştir. Yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlardan farklı olarak, bizim çalışmamızda gen ve protein düzeyleri ile hücre yoğunluğunun 5.5. günde en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu nedenle, Flk1⁺ hücrelerin başka hücre tiplerine farklılaşmalarına izin verilmeden, bu hücrelerin izolasyonu 5.5. günde gerçekleştirilmiştir.

6.1.2. LATERAL MEZODERMAL HÜCRELERDEN EÖH VE DKH'LERİNİN FARKLILAŞTIRILMASI

Tez çalışmamızın ikinci aşamasında Flk1 hücrelerinden EÖH elde etmek için birinci aşamanın 5.5. gününden izole edilen Flk1⁺ hücreleri VEGF içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün boyunca kültür edilmiştir. 4. günün sonunda farklılaşan hücrelerden örnekler alınarak endotelial hücre belirteçleri olan CD31 ve CD133'i görüntülemek amacıyla immün boyama yapılmıştır. İmmün boyama sonuçlarına göre CD31⁺ ve CD133⁺ hücrelerin elde edildiği görülmüş ve CD31 geni ile elde edilen sonuçlar Narazaki ark (2008), Yamamizu ve ark, Kohler ark (2013), ve Lanner ve ark (2006) tarafından yapılan araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. (2,4,5,6) CD133 genini boyama yapılarak görüntülediği benzer bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın sonucu olarak, iki aşamada uPKH'lerden endotelial hücre elde edilmiş ve bu sonuçların validasyonu için gen ve protein ifade analizi tekrarlanmıştır.

Birinci aşamanın 5.5. gününden izole edilen Flk1⁻ hücreler kollajen tip IV kaplı kültür kaplarına aktararak, hücreler PDGF içeren farklılaşma besiyerinde 4 gün boyunca kültür edilmiştir. 4. günün sonunda düz kas hücre belirteci olan α SMA⁺ hücreleri görüntülemek amacıyla immün boyama yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucu olarak, iki aşamada uPKH'lerden düz kas hücreleri elde edilmiştir.

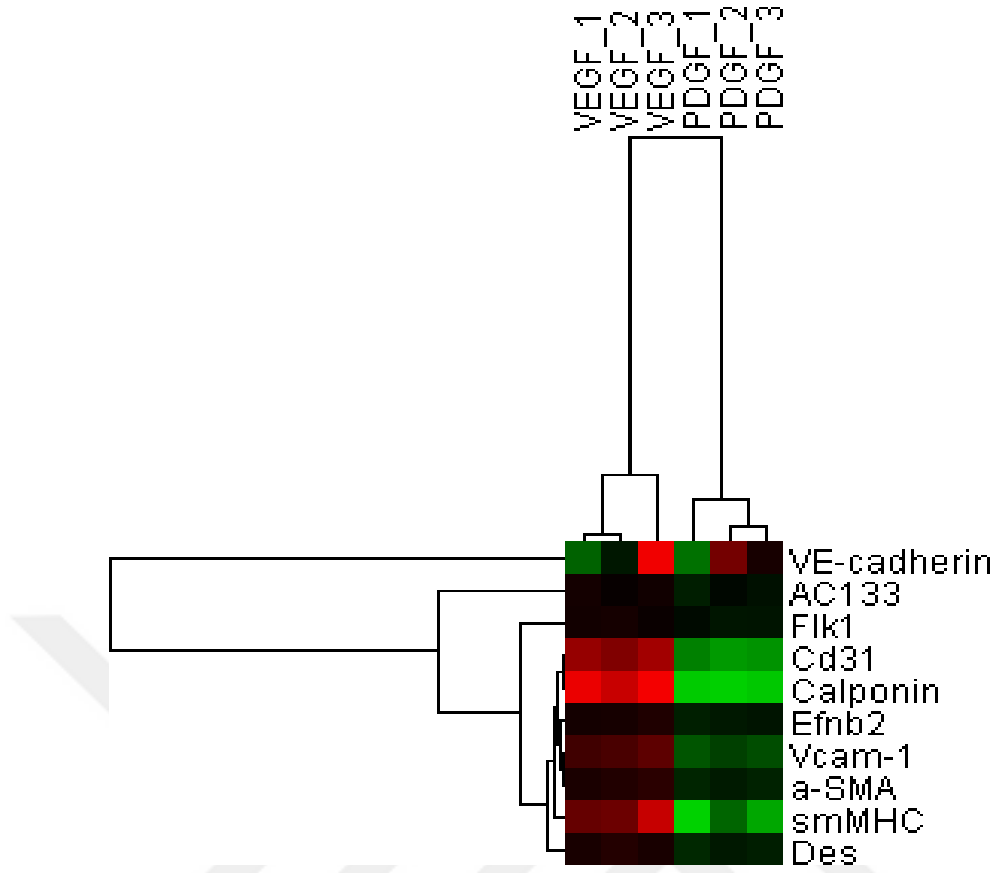
İkinci aşamada elde ettiğimiz Eş-zamanlı PZR sonuçlarını incelediğimizde, EÖH belirteci olan Flk1, AC133, CD31 ve Ve-Cadherin genlerinin her iki grupta (VEGF ve PDGF kullanılan gruplar) artış göstermesine rağmen VEGF kullanılan grupta PDGF kullanılan gruba göre, genlerin ifade düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu aşamada elde edilen gen ifade seviye analizlerini karşılaştırmak için yapılmış benzer bir gen ifade çalışması bulunmamaktadır.

EÖH'lerin karakterizasyonu için, bu hücrelerin en önemli belirteci olan CD31 geninin protein ifade analizleri yapılmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre CD31 proteininin her iki grupta da ifade edildiği görülmüş, ancak VEGF kullanılan grupta bu proteinin ifade seviyesinin, PDGF kullanılan gruba göre daha fazla olduğu saptanmıştır (şekil 5.24.).

Şekil 6.3.'de gösterildiği gibi VEGF kullanılan grupta Arteryal ve venöz belirteçleri olan genlerin (EphrinB2, VCAM) ifade seviyesinin, PDGF kullanılan gruba göre yüksek olduğu gösterilmiştir. Elde edilen gen ifade sonuçları 2006 yılında, Lanner ve ark tarafından yapılan araştırma sonuçları ile paralellik göstermektedir(192).

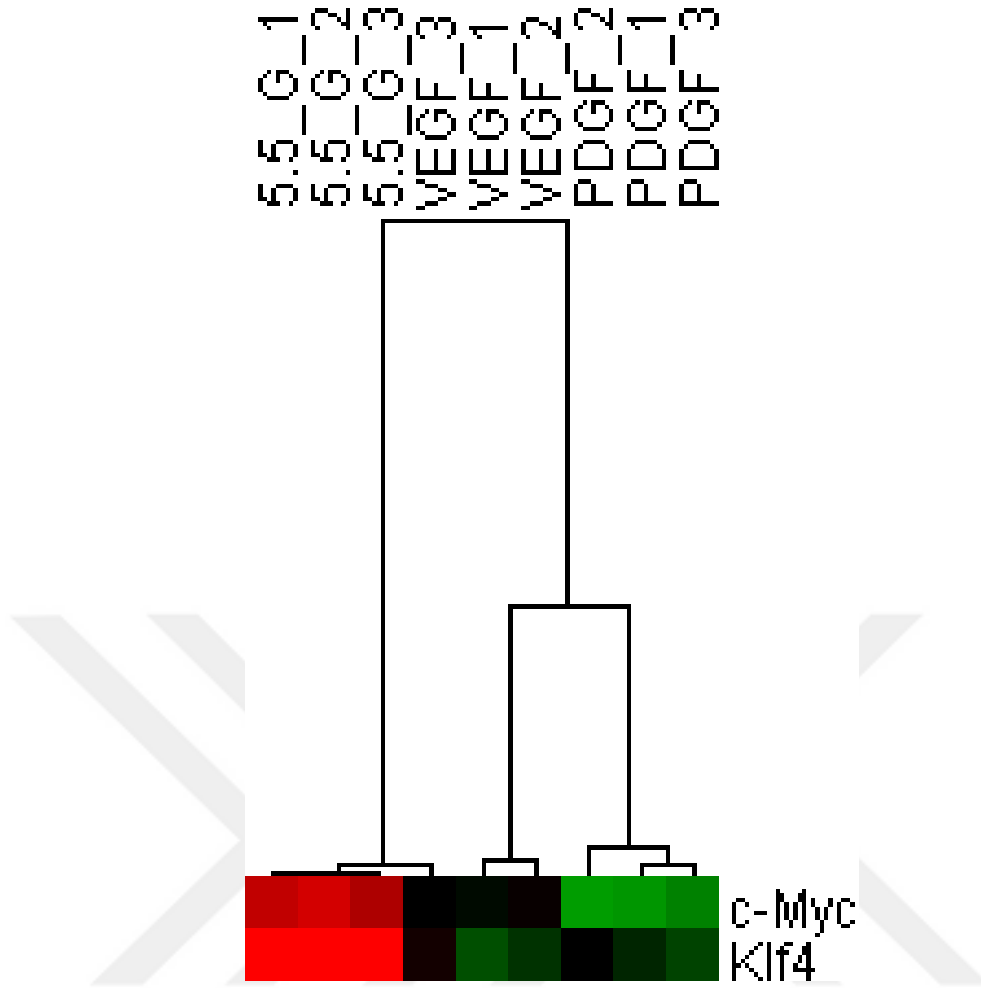
DKH'lerinin karakterizasyonu için immün boyama ve gen ifade analizleri yöntemleri kullanılmıştır. İmmün boyama deneylerinden elde edilen verilere göre, bu aşamada elde edilen DKH'ler, α SMA⁺ hücreler olarak görüntülenmiş ve bu sonuçlar, Stefanska ve ark (2014) tarafından yapılan çalışmaya benzerlik göstermektedir(195).

Eş-zamanlı PZR sonuçlarını incelediğimizde, α SMA, Calponin, Desmin ve SmMHC belirteçlerinin ifade analizleri sonucunda, VEGF kullanılan gruptaki ifade seviyelerinin, PDGF kullanılan gruba göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Şekil 6.3.). α SMA geninin ifade sonuçları ile Stefanska ve ark (2014) tarafından yapılan çalışma sonuçlarının benzer olduğu görülmektedir(195). Calponin gen ifadesi analizlerinden elde edilen sonuçların 2008 yılında Narazaki ve ark tarafından yapılan araştırma sonuçlarıyla paralellik gösterirken, (81) Desmin ve SmMHC gen ifadelerinin analizini karşılaştıracak bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 6.3. İkinc farklılaştırma sürecinde EÖH, arter, venöz endotel ve DKH'lerinin gen ifade ve kümeleme analizi

Araştırmanın ikinci aşamasından elde edilen hücrelerde (EÖH ve DKH), hücre proliferasyonunda rol alan ve onkogen özeliği olan c-Myc ve Klf4 genlerinin ifade seviyeleri incelenmiş ve her iki gruptaki ifade düzeylerinin birinci aşamanın 5.5. gününe göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.4.). PDGF kullanılan grupta bu genlerin ifade seviyelerinin VEGF kullanılan guruba göre daha az olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.4. İkinci farklılaştırma sürecinde c-Myc ve Klf 4 genlerinin ifade ve kümeleme analizi

6.2. SONUÇ

Bu çalışmada öncelikle uPK hücrelerden in vitro koşullarda ilk aşamada lateral mezodermal Flk1+ hücreler elde edilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda farklılaşma sürecinde sadece Flk1 geni ve bununla birlikte Ve-Cadherin genlerinin bu süreçte değişimi araştırılmıştır(81, 190). Yapılan bir çok çalışmada gen ifade değişiklikleri Eş-zamanlı PZR tekniği ve elektroforez ve gel görüntüsü yöntemleri ile gösterilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada ise lateral mezodermal farklılaşma sürecinde EÖH belirteçleri olan Flk1, CD31, CD133, Ve-Cadherin genlerinin yanı sıra, Arteryal venöz belirteçleri olan VCAM ve EphrinB2 genlerinin ifade seviyeleri incelenmiştir. Bununla birlikte DKH belirteçleri olan α SMA, Calponin, Desmin ve SmmHC genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir.

Bu sonuçlarla paralel olarak immün boyama ve western blot deneylerin sonucuna bakarak sadece gen ifade seviyesi ile sınırlı kalınmamış, protein ifade seviyesinde de analizler yapılmış ve lateral mezodermal hücreler karakterize edilmiştir.

Bugüne kadar lateral mezodermal hücrelerin izolasyonu sadece Flk1 geninin farklılaşma sürecindeki ifade seviyesi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda bu hücrelerin izolasyonu için en uygun zamanı belirlemek amacıyla 10 farklı genin ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. Gen ifade analizlerine paralel olarak protein ifade seviyesi ve immün boyama yöntemleri ile bu hücrelerin karakterizasyonları ve izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle yapılan çalışma ve elde edilen veriler özgün değere sahiptir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda pluripotent hücreleri, in vitro koşullarda mezodermal yönünde farklılaştırıp ve farklılaşmanın 4.5. ve 5. gününde elde edilen hücreler endotelial öncül hücre olarak kullanılmıştır(81, 190). Ancak bu hücreler birçok hücreye farklılaşabilme potansiyeline sahip olmaları sebebiyle, öncül hücre olmadıkları düşünülmektedir. Bu hücrelerin EÖH başlığı altında karakterize olmaları için, daha farklı bir süreçten geçip ve değişik özellikler kazanmaları gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen ilk lateral mezodermal hücreler, EÖH' lere farklılaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu süreçte bugüne kadar tanımlanan ve bu hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan gen ifade profili de takip edilmiştir. Buna ek olarak elde edilen EÖH'lerin Arteriyal ve venöz endotel hücrelere farklılaşma potansiyeli ve bu hücrelerin belirteçleri olan EphrinB2 ve VCAM genlerinin ifade seviyelerinin artışı ile değerlendirilmiştir.

Yapılan bu çalışmalara ek olarak DKH farklılaştırması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. 4 farklı belirtecin ilk kez kullanılması ve bu sayede hücrelerin karakterize edilmesi çalışmanın bir başka özgün değerini ifade etmektedir. Ayrıca yapılan çalışmada immün boyama yöntemi ile de karakterize edilen DKH' lerin önemli belirteci olan α SMA'nın ifadesi ve hücredeki lokalizasyonu gösterilmiştir.

Çalışmaların sonucunda son ürün olarak elde edilen EÖH ve DKH' lerinin klinikte kullanılması düşünülmektedir. Ancak bu hücrelerin klinikte kullanılması için risk olasılığının en aza düşürülmesi gerekmektedir. Kök hücrelerde özellikle uPKH' lere aktif olan ve yüksek derecede ifade olan c-Myc ve Klf4 genleri hücre poliriferasyonundan sorumlu olmakla birlikte onkogen özelliğine sahiptir. Transplantasyonda kullanıma

potansiyeline sahip olan bu hücrelerde, c-Myc ve Klf4 genlerinin yüksek ifadesi, aktarılan bireye risk teşkil edebilmektedir. Dolayısıyla son ürün olarak adlandırdığımız hücrelerin transplantasyon öncesinde, bu genlerin ifade seviyelerinin saptanması ve risk potansiyellerinin belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan bu çalışmanın her iki aşamasında bu onkogenlerin ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu genlerin ifade seviyesi ilk aşamada elde edilen hücrelerde çok farklılık göstermese bile, ikinci aşamada elde edilen ve son ürün olarak kabul ettiğimiz EÖH ve DKH'lerinde büyük derecede düşüş göstermiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu hücrelerin klinikte kullanılma riskinin, uPKH'lere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda vaskülerizasyon (anjiogenez) denemelerinin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır ve çalışma sonucunda ulaşılan bulguların, klinikte kardiyovasküler hastalıklara yönelik hücresel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılacak yeni çalışmalara öncülük edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR Literature

- 1 http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. WAa.
- 2 Schafer R, Northoff H. Cardioprotection and cardiac regeneration by mesenchymal stem cells. *Panminerva Med.* 2008 Mar;**50**(1):31-9.
- 3 Eltzhig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;**17**(11):1391-401.
- 4 Eckle T, Hartmann K, Bonney S, et al. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nat Med.* 2012 May;**18**(5):774-82.
- 5 Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;**114**:185-99.
- 6 Scholer HR. [The potential of stem cells. A status update]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2004 Jun;**47**(6):565-77.
- 7 Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2005 Jul;**100**(1):12-27.
- 8 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 Dec;**78**(12):7634-8.
- 9 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;**292**(5819):154-6.
- 10 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;**282**(5391):1145-7.
- 11 Stem Cell Basics: What are the potential uses of human stem cells and the obstacles that must be overcome before these potential uses will be realized? *Stem Cell Inf World Wide Web site Bethesda, MD Natl Institutes Heal US Dep Heal Hum Serv* 2009.
- 12 Steinberg D. Stem cells tapped to replenish organs. *Scientist.* 2000 Nov 27;**14**(23):20-+.
- 13 J Y. Israeli scientists reverse brain birth defects using stem cells. 2008.

- 14 Kang KS, Kim SW, Oh YH, et al. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytherapy*. 2005 Sep;**7**(4):368-73.
- 15 Hair Cloning Nears Reality as Baldness Cure. WebMD 2004.
- 16 Yen AHH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan;**331**(1):359-72.
- 17 Gene therapy is first deafness 'cure. *New Sci* 2005.
- 18 Stem cells used to restore vision. BBC NEWS - UK - Engl - South Cties 2005 Available at: http://newsbbccouk/2/hi/uk_news/england/southern_counties/4495419stm.
- 19 Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *JAMA*. 2001 Apr 4;**285**(13):1691-3.
- 20 Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med*. 2007;**58**:299-312.
- 21 Anderson Q. Osiris trumpets its adult stem cell product. *Genet Eng Biotechn N*. 2008 Jun 15;**28**(12):13-.
- 22 Häggström M. Medical gallery of Mikael Häggström 2014. *Wikiversity Journal of Medicine* 2014; DOI:10.15347/wjm/2014.008. ISSN 20018762.
- 23 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;**126**(4):663-76.
- 24 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;**131**(5):861-72.
- 25 Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency (vol 133, pg 250, 2008). *Cell*. 2008 Jul 25;**134**(2):365-.
- 26 Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*. 2008 Jun 24;**18**(12):890-4.
- 27 Kim JB, Zaehres H, Wu GM, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*. 2008 Jul 31;**454**(7204):646-U54.
- 28 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008 Aug 1;**321**(5889):699-702.
- 29 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008 Nov;**26**(11):1276-84.

- 30 Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, et al. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet.* 2009 Sep;**41**(9):968-U29.
- 31 Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci.* 2009 Oct;**122**(19):3502-10.
- 32 Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood.* 2009 May 28;**113**(22):5476-9.
- 33 Li CL, Zhou JM, Shi GL, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet.* 2009 Nov 15;**18**(22):4340-9.
- 34 Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell.* 2009 Oct 2;**5**(4):434-41.
- 35 Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *P Natl Acad Sci USA.* 2009 Sep 15;**106**(37):15720-5.
- 36 Liu H, Ye ZH, Kim Y, Sharkis S, Jang YY. Generation of Endoderm-Derived Human Induced Pluripotent Stem Cells from Primary Hepatocytes. *Hepatology.* 2010 May;**51**(5):1810-9.
- 37 Sommer AG, Rozelle SS, Sullivan S, et al. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Peripheral Blood Using the STEMCCA Lentiviral Vector. *Jove-J Vis Exp.* 2012 Oct(68).
- 38 Dowey SN, Huang XS, Chou BK, Ye ZH, Cheng LZ. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc.* 2012 Nov;**7**(11):2013-21.
- 39 Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nat Protoc.* 2012 Apr;**7**(4):718-28.
- 40 Qu XJ, Liu TQ, Song KD, Li XQ, Ge D. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Human Adipose-Derived Stem Cells Using a Non-Viral Polycistronic Plasmid in Feeder-Free Conditions. *Plos One.* 2012 Oct 26;**7**(10).
- 41 Aoki T, Ohnishi H, Oda Y, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Adipose-Derived Stem Cells Without c-MYC. *Tissue Eng Pt A.* 2010 Jul;**16**(7):2197-206.
- 42 Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 Gene Family - Cdna Sequences, Alternative Splicing, Gene Organization, Chromosomal Location, and Expression at Low-Levels in Adult Tissues. *Nucleic Acids Res.* 1992 Sep 11;**20**(17):4613-20.

- 43 Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005 Sep 23;**122**(6):947-56.
- 44 Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000 Apr;**24**(4):372-6.
- 45 Looijenga LHJ, Stoop H, de Leeuw HPJC, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res*. 2003 May 1;**63**(9):2244-50.
- 46 Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005 Mar;**23**(3):299-305.
- 47 Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;**280**(26):24731-7.
- 48 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007 Jul 19;**448**(7151):313-U1.
- 49 Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007 Jul;**1**(1):55-70.
- 50 Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007 Jul 19;**448**(7151):318-U2.
- 51 Kim JB, Sebastiano V, Wu GM, et al. Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. *Cell*. 2009 Feb 6;**136**(3):411-9.
- 52 Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wires Syst Biol Med*. 2009 Sep-Oct;**1**(2):228-36.
- 53 Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 2009 Jul 2;**460**(7251):118-22.
- 54 Johansson H, Simonsson S. Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin (Npm1) to control embryonic stem (ES) cell fate determination. *Aging-Us*. 2010 Nov;**2**(11):815-22.
- 55 Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*. 2009 Jul 15;**136**(14):2311-22.
- 56 Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;**9**(6):625-U26.
- 57 Imamura M, Miura K, Iwabuchi K, et al. Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *Bmc Dev Biol*. 2006 Jul 21;**6**.

- 58 Tay Y, Zhang JQ, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008 Oct 23;**455**(7216):1124-U12.
- 59 Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers. *Cell*. 2011 Jun 10;**145**(6):875-89.
- 60 Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. 2003 Aug 28;**39**(5):749-65.
- 61 Geiman DE, Ton-That H, Johnson JM, Yang VW. Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res*. 2000 Mar 1;**28**(5):1106-13.
- 62 Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK. Pluripotency redux - Advances in stem-cell research. *New Engl J Med*. 2007 Oct 11;**357**(15):1469-72.
- 63 Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 2007 Jul 26;**448**(7152):445-U3.
- 64 Denis N, Kitzis A, Kruh J, Dautry F, Corcos D. Stimulation of Methotrexate Resistance and Dihydrofolate-Reductase Gene Amplification by C-Myc. *Oncogene*. 1991 Aug;**6**(8):1453-7.
- 65 Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May 30;**113**(5):643-55.
- 66 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003 May 30;**113**(5):631-42.
- 67 Li SSL, Liu YH, Tseng CN, Chung TL, Lee TY, Singh S. Characterization and gene expression profiling of five new human embryonic stem cell lines derived in Taiwan. *Stem Cells Dev*. 2006 Aug;**15**(4):532-55.
- 68 Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. 2006 Mar 15;**133**(6):1193-201.
- 69 Shi WJ, Wang H, Pan GJ, Geng YJ, Guo YQ, Pei DQ. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*. 2006 Aug 18;**281**(33):23319-25.
- 70 Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *P Natl Acad Sci USA*. 2009 Jan 6;**106**(1):157-62.
- 71 Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*. 2009;**27**(3):543-9.

- 72 Stadtfeld M, Maherali N, Borkent M, Hochedlinger K. A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods*. 2010 Jan;**7**(1):53-U10.
- 73 Stadtfeld M, Hochedlinger K. Without a trace? PiggyBac-ing toward pluripotency. *Nat Methods*. 2009 May;**6**(5):329-30.
- 74 Okita K, Nakagawa M, Hong HJ, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*. 2008 Nov 7;**322**(5903):949-53.
- 75 Zhou WB, Freed CR. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*. 2009 Nov;**27**(11):2667-74.
- 76 Zhou HY, Wu SL, Joo JY, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 May 8;**4**(5):381-4.
- 77 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;**7**(5):618-30.
- 78 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008 Oct 2;**455**(7213):627-U30.
- 79 Freund C, Davis RP, Gkatzis K, Ward-van Oostwaard D, Mummery CL. The first reported generation of human induced pluripotent stem cells (iPS cells) and iPS cell-derived cardiomyocytes in the Netherlands. *Neth Heart J*. 2010 Jan;**18**(1):51-4.
- 80 Zhang JH, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res*. 2009 Feb 27;**104**(4):E30-E41.
- 81 Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008 Jul 29;**118**(5):498-506.
- 82 Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*. 2003 May 1;**58**(2):478-86.
- 83 Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, et al. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs - Therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscl Throm Vas*. 2004 Dec;**24**(12):E192-E6.
- 84 Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008 Jul 29;**118**(5):507-17.
- 85 Hu ZL, Zhang FM, Yang ZJ, et al. Combination of simvastatin administration and EPC transplantation enhances angiogenesis and protects against apoptosis for hindlimb ischemia. *J Biomed Sci*. 2008 Jul;**15**(4):509-17.

- 86 Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*. 1999 Apr;**5**(4):434-8.
- 87 Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001 Feb 13;**103**(6):897-903.
- 88 Lian QZ, Zhang YL, Zhang JQ, et al. Functional Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Limb Ischemia in Mice. *Circulation*. 2010 Mar 9;**121**(9):1113-U91.
- 89 Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiovascular Medicine. *Stem Cells Int*. 2011.
- 90 Boheler KR. Pluripotency of human embryonic and induced pluripotent stem cells for cardiac and vascular regeneration. *Thromb Haemostasis*. 2010 Jul;**104**(1):23-9.
- 91 Lian QZ, Chow YY, Esteban MA, Pei DQ, Tse HF. Future perspective of induced pluripotent stem cells for diagnosis, drug screening and treatment of human diseases. *Thromb Haemostasis*. 2010 Jul;**104**(1):39-44.
- 92 Rufaihah AJ, Huang NF, Jame S, et al. Endothelial Cells Derived From Human iPSCS Increase Capillary Density and Improve Perfusion in a Mouse Model of Peripheral Arterial Disease. *Arterioscl Throm Vas*. 2011 Nov;**31**(11):E72-U44.
- 93 Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of Acute Myocardial Infarction by Human Stemness Factors Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation*. 2009 Aug 4;**120**(5):408-16.
- 94 Dai B, Huang W, Xu MF, et al. Reduced Collagen Deposition in Infarcted Myocardium Facilitates Induced Pluripotent Stem Cell Engraftment and Angiomyogenesis for Improvement of Left Ventricular Function. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 8;**58**(20):2118-27.
- 95 Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008 May 15;**453**(7193):322-9.
- 96 Mauritz C, Martens A, Rojas SV, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2011 Nov;**32**(21):2634-41.
- 97 Singla DK, Long XL, Glass C, Singla RD, Yan BB. Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Repair and Regenerate Infarcted Myocardium. *Mol Pharmaceut*. 2011 Sep-Oct;**8**(5):1573-81.
- 98 Khan JM, Lyon AR, Harding SE. The case for induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in pharmacological screening. *Brit J Pharmacol*. 2013 May;**169**(2):304-17.
- 99 Guo L, Abrams RMC, Babiarez JE, et al. Estimating the Risk of Drug-Induced Proarrhythmia Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Toxicol Sci*. 2011 Sep;**123**(1):281-9.

- 100 Yazawa M, Hsueh B, Jia XL, et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 2011 Mar 10;**471**(7337):230-U120.
- 101 Lee YK, Ng KM, Lai WH, et al. Calcium Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Rev Rep*. 2011 Nov;**7**(4):976-86.
- 102 Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *New Engl J Med*. 2010 Oct 7;**363**(15):1397-409.
- 103 Itzhaki I, Rapoport S, Huber I, et al. Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *Plos One*. 2011 Apr 1;**6**(4).
- 104 Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*. 2010 Jun 10;**465**(7299):808-U12.
- 105 Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Gene Dev*. 2010 Oct 15;**24**(20):2239-63.
- 106 Wei YY, Zeng W, Wan R, et al. Chondrogenic Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells from Osteoarthritic Chondrocytes in Alginate Matrix. *Eur Cells Mater*. 2012 Jan-Jun;**23**:1-12.
- 107 Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;**10**(6):678-84.
- 108 Gibson CM, Kirtane AJ, Murphy SA, et al. Impact of contrast agent type (ionic versus nonionic) used for coronary angiography on angiographic, electrocardiographic, and clinical outcomes following thrombolytic administration in acute myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2001 May;**53**(1):6-11.
- 109 Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007 Sep 13;**357**(11):1121-35.
- 110 Boudoulas KD, Hatzopoulos AK. Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease. *Dis Model Mech*. 2009 Jul-Aug;**2**(7-8):344-58.
- 111 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;**275**(5302):964-7.
- 112 Shi Q, Rafii S, Wu MHD, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998 Jul 15;**92**(2):362-7.
- 113 KE SÖT. ENDOTEL PROGENİTÖR HÜCRELER. *Marmara Med J* 2007:59–65. 2007.
- 114 P. C. Mechanisms of angiogenesis and goatriogenesis. . *Nat Med* 2000;6(4):389–395.
- 115 Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Nov 1;**104**(9):2752-60.

- 116 Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005 Apr 1;**105**(7):2783-6.
- 117 Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*. 2006 Apr 15;**133**(8):1543-51.
- 118 Leri A, Kajstura J. Endothelial progenitor cells - Unexpected disclosures. *Circ Res*. 2005 Aug 19;**97**(4):299-301.
- 119 Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Medicine*. 2001 Nov;**7**(11):1194-201.
- 120 Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005 Feb 1;**105**(3):1068-77.
- 121 Castagnola C, Alessandrino EP, Lunghi M, et al. Consolidation treatment with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in acute myeloid leukemia: a single center experience. *Ann Hematol*. 2001 May;**80**(5):267-71.
- 122 Bompais H, Chagraoui J, Canron X, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004 Apr 1;**103**(7):2577-84.
- 123 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;**95**(3):952-8.
- 124 Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Aug;**24**(8):1442-7.
- 125 Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*. 2006 Nov;**6**(11):835-45.
- 126 Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*. 2007 Oct;**19**(10):2003-12.
- 127 Bar H, Strelkov SV, Sjoberg G, Aebi U, Herrmann H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol*. 2004 Nov;**148**(2):137-52.
- 128 Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990 Mar 9;**247**(4947):1219-22.

- 129 Gumina RJ, Kirschbaum NE, Rao PN, vanTuinen P, Newman PJ. The human PECAM1 gene maps to 17q23. *Genomics*. 1996 Jun 1;**34**(2):229-32.
- 130 Xie Y, Muller WA. Fluorescence in situ hybridization mapping of the mouse platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) to mouse chromosome 6, region F3-G1. *Genomics*. 1996 Oct 15;**37**(2):226-8.
- 131 Corbeil D, Roper K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*. 2000 Feb 25;**275**(8):5512-20.
- 132 Horn PA, Tesch H, Staib P, et al. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 1999 Feb 15;**93**(4):1435-7.
- 133 Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Mechanisms of disease: Neural stem cells and the origin of gliomas. *New Engl J Med*. 2005 Aug 25;**353**(8):811-22.
- 134 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;**63**(18):5821-8.
- 135 Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell B*. 2005 Apr;**37**(4):715-9.
- 136 Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. 2008 Jan;**214**(1):3-9.
- 137 Suzuki S, Sano K, Tanihara H. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul*. 1991 Apr;**2**(4):261-70.
- 138 Crosby CV, Fleming PA, Argraves WS, et al. VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. *Blood*. 2005 Apr 1;**105**(7):2771-6.
- 139 Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, et al. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1;**88**(17):7859-63.
- 140 Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol*. 2002 Jun 24;**157**(7):1233-45.
- 141 Bonaldo MD, Yu MT, Jelenc P, et al. Selection of Cdnas Using Chromosome-Specific Genomic Clones - Application to Human-Chromosome-13. *Hum Mol Genet*. 1994 Sep;**3**(9):1663-73.
- 142 Cerretti DP, Bos TV, Nelson N, et al. Isolation of LERK-5: A ligand of the eph-related receptor tyrosine kinases. *Mol Immunol*. 1995 Nov;**32**(16):1197-205.
- 143 Wang YD, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 2010 May 27;**465**(7297):483-U108.

- 144 Gimbrone MA. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemostasis*. 1999 Aug;**82**(2):722-6.
- 145 Schwartz SM, Benditt EP. Clustering of Replicating Cells in Aortic Endothelium. *P Natl Acad Sci USA*. 1976;**73**(2):651-3.
- 146 Ross R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New Engl J Med*. 1999 Jan 14;**340**(2):115-26.
- 147 Xu QB. Progenitor cells in vascular repair. *Curr Opin Lipidol*. 2007 Oct;**18**(5):534-9.
- 148 Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Feb;**3**(2):94-101.
- 149 Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*. 2003 Jun 24;**107**(24):3093-100.
- 150 Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005 Mar;**45**(3):321-5.
- 151 Hu Y ZZ, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;**113**(9):1258–1265. 2004.
- 152 Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res*. 2006 Oct 13;**99**(8):E74-E83.
- 153 Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, et al. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res*. 2007 Mar 2;**100**(4):581-9.
- 154 Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells - Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004 Feb 10;**109**(5):656-63.
- 155 Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Andre M, Penicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006 Apr 1;**312**(6):727-36.
- 156 Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE, et al. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2007 May 7;**562**(1-2):111-8.
- 157 Q. X. Mouse models of atherosclerosis: from aortic injuries to vascular grafts. *Am J Pathol* 2004;**165**(1):1–10.
- 158 Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization - A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002 Jun 25;**105**(25):3017-24.

- 159 Krenning G, van Luyn MJA, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med*. 2009 Apr;**15**(4):180-9.
- 160 Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004 Jan 20;**109**(2):220-6.
- 161 Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. 2003 Jul 29;**108**(4):457-63.
- 162 Noden DM. Embryonic Origins and Assembly of Blood-Vessels. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Oct;**140**(4):1097-103.
- 163 Thayer JM MK, Giachelli CM, Schwartz SM. Formation of the goatrinal media during vascular development. *Cell Mol Biol Res* 1995;41(4):251–262.
- 164 Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlenlievre F, Buck CA. Vasculogenesis in the Early Quail Blastodisc as Studied with a Monoclonal-Antibody Recognizing Endothelial-Cells. *Development*. 1987 Jun;**100**(2):339-49.
- 165 Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res*. 1999 Jan-Feb;**36**(1):2-27.
- 166 Durmowicz AG, Badesch DB, Parks WC, Mecham RP, Stenmark KR. Hypoxia-induced inhibition of tropoelastin synthesis by neonatal calf pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991 Nov;**5**(5):464-9.
- 167 Lee SH, Hungerford JE, Little CD, Iruela-Arispe ML. Proliferation and differentiation of smooth muscle cell precursors occurs simultaneously during the development of the vessel wall. *Dev Dyn*. 1997 Aug;**209**(4):342-52.
- 168 Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Apr;**41**(5):1122-9.
- 169 Ueyama H, Bruns G, Kanda N. Assignment of the vascular smooth muscle actin gene ACTSA to human chromosome 10. *Jinrui Idengaku Zasshi*. 1990 Jun;**35**(2):145-50.
- 170 Matsuoka R, Yoshida MC, Furutani Y, et al. Human smooth muscle myosin heavy chain gene mapped to chromosomal region 16q12. *Am J Med Genet*. 1993 Apr 1;**46**(1):61-7.
- 171 Li ZL, Lilienbaum A, Butler-Browne G, Paulin D. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene*. 1989 May 30;**78**(2):243-54.
- 172 Munoz-Marmol AM, Strasser G, Isamat M, et al. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 15;**95**(19):11312-7.
- 173 Lazarides E, Hubbard BD. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Dec;**73**(12):4344-8.

- 174 Izant JG, Lazarides E. Invariance and heterogeneity in the major structural and regulatory proteins of chick muscle cells revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Apr;**74**(4):1450-4.
- 175 Bacakova L, Mares V, Lisa V, Svorcik V. Molecular mechanisms of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions. *Biomaterials*. 2000 Jun;**21**(11):1173-9.
- 176 Rohatgi A, Owens AW, Khera A, et al. Differential Associations Between Soluble Cellular Adhesion Molecules and Atherosclerosis in the Dallas Heart Study A Distinct Role for Soluble Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule. *Arterioscl Throm Vas*. 2009 Oct;**29**(10):1684-90.
- 177 Hedin U TJ. Plasma fibronectin promotes modulation of goatrinal smooth-muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation* 1987;**33**(3):239–246.
- 178 Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR. Complex Regulation and Function of the Inflammatory Smooth Muscle Cell Phenotype in Atherosclerosis. *Journal of Vascular Research*. 2010;**47**(2):168-80.
- 179 Parizek M, Novotna K, Bacakova L. The Role of Smooth Muscle Cells in Vessel Wall Pathophysiology and Reconstruction Using Bioactive Synthetic Polymers. *Physiol Res*. 2011;**60**(3):419-37.
- 180 Bacakova L, Wilhelm J, Herget J, Novotna J, Eckhart A. Oxidized collagen stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells. *Exp Mol Pathol*. 1997;**64**(3):185-94.
- 181 Bacakova L, Lisa V, Kubinova L, et al. Ultraviolet light-irradiated collagen III modulates expression of cytoskeletal and surface adhesion molecules in rat aortic smooth muscle cells in vitro. *Virchows Arch*. 2002 Jan;**440**(1):50-62.
- 182 Li C, Cantor WJ, Nili N, et al. Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jun 5;**39**(11):1852-8.
- 183 Gobin AS, West JL. Val-ala-pro-gly, an elastin-derived non-integrin ligand: Smooth muscle cell adhesion and specificity. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Oct 1;**67a**(1):255-9.
- 184 Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002 Oct 15;**115**(20):3861-3.
- 185 Dufourcq P, Couffignal T, Alzieu P, et al. Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation. *Cardiovasc Res*. 2002 Mar;**53**(4):952-62.
- 186 Roy J, Tran PK, Religa P, et al. Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture. *Exp Cell Res*. 2002 Feb 15;**273**(2):169-77.
- 187 Suzuki S, Narita Y, Yamawaki A, et al. Effects of Extracellular Matrix on Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Smooth

Muscle Cell Lineage: Utility for Cardiovascular Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs*. 2010;**191**(4):269-80.

188 Yamamizu K, Kawasaki K, Katayama S, Watabe T, Yamashita JK. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. *Blood*. 2009 Oct 22;**114**(17):3707-16.

189 Niwa A, Umeda K, Chang H, et al. Orderly Hematopoietic Development of Induced Pluripotent Stem Cells via Flk-1(+) Hemoangiogenic Progenitors. *J Cell Physiol*. 2009 Nov;**221**(2):367-77.

190 Suzuki H, Shibata R, Kito T, et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells. *BMC Cell Biol*. 2010;**11**:72.

191 Kohler EE, Wary KK, Li F, et al. Flk1+and VE-Cadherin plus Endothelial Cells Derived from iPSCs Recapitulates Vascular Development during Differentiation and Display Similar Angiogenic Potential as ESC-Derived Cells. *Plos One*. 2013 Dec 30;**8**(12).

192 Lanner F, Sohl M, Farnebo F. Functional arterial and venous fate is determined by graded VEGF signaling and notch status during embryonic stem cell differentiation. *Arterioscl Throm Vas*. 2007 Mar;**27**(3):487-93.

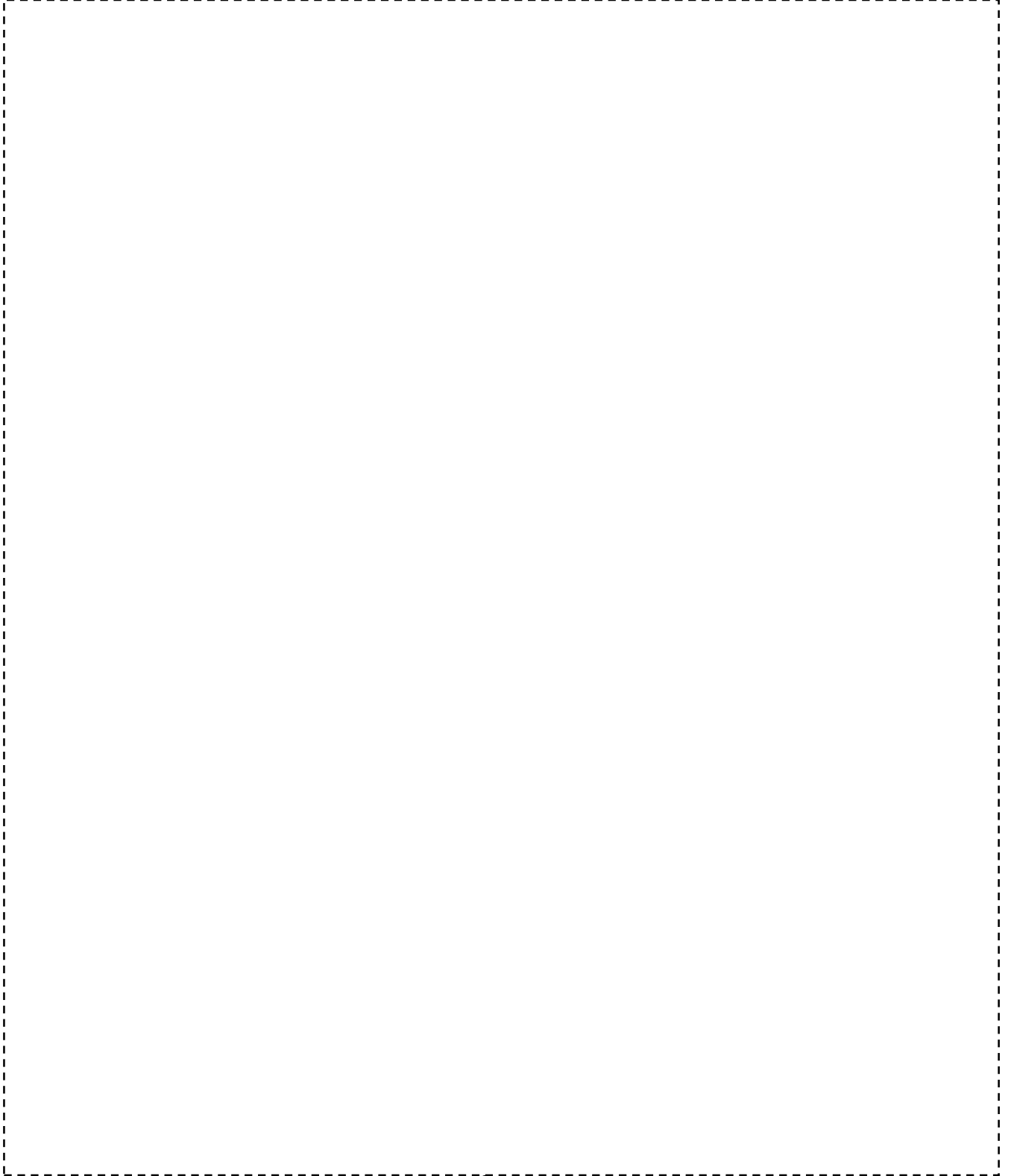
193 Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, et al. Efficient and Scalable Purification of Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells by VCAM1 Surface Expression. *Plos One*. 2011 Aug 18;**6**(8).

194 Xie CQ, Huang HR, Wei S, et al. A Comparison of Murine Smooth Muscle Cells Generated from Embryonic versus Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jun;**18**(5):741-8.

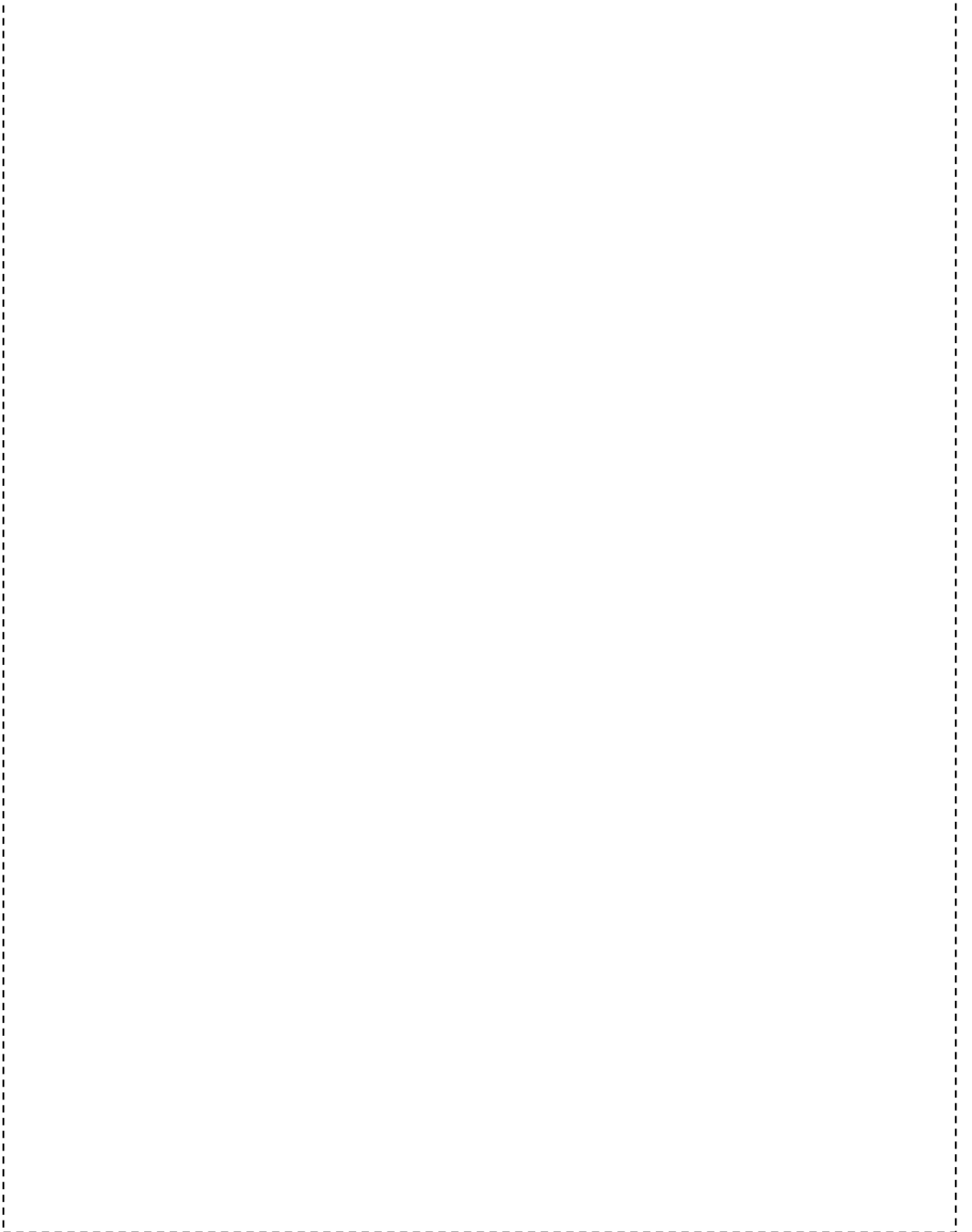
195 Stefanska M, Costa G, Lie-a-Ling M, Kouskoff V, Lacaud G. Smooth muscle cells largely develop independently of functional hemogenic endothelium. *Stem Cell Res*. 2014 Jan;**12**(1):222-32.

EKLER

6.3. EK1:Başlık 1



6.4. EK2:Başlık 2





ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mohammadreza DASTOURI

Doğum Yeri: İRAN

Doğum Tarihi: 22.01.1973

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Farsca, Azerice

Eğitim Durumu:

Lise: Golşenraz Shabestar-İRAN

Lisans: İslamic Azad Üniversitesi-Shabester Bölümü- Animal science

Yüksek Lisans : İslamic Azad Üniversitesi-Shabester Bölümü- Animal science

İş Tecrübesi

Kurumu: İslamic Azad Üniversitesi-Shabester Görevi: Öğretim Öyesi

Yılları:2004-2015

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

1. Durdu S, Deniz GC, Dogan A, Zaim C, Karadag A, **Dastouri MR**, Akar AR. Stem cell mediated cardiovascular repair. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 Mar; 90(3):337-51. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22394394
2. Deniz GC, Durdu S, Karadağ A, Zaim Ç, **Dastouri R**, Akar AR. Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Cellular and Molecular Aspect. *Damar Cerrahisi Dergisi (Turkish Journal of Vascular Surgery)* 2012 21(2): 101-9.
3. Mirzaei-Aghsaghali, A., N. Maheri-Sis, A. Mirza-Aghazadeh, Y. Ebrahimnezhad, **M. R. Dastouri**, and A. Aghajanzadeh-Golshani. 2008. Estimation of methane production in using nutrient composition of the diet. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7 (6): 765-770.

4. Ebrahimnezhad, Y., N. Maheri-Sis, H. Aghdam Shahriyar, **M. R. Dastouri**, A. Aghajanzadeh-Golshani, A. Tahvildarzadeh, and K. A. Najafyan. 2008. The effect of combination citric acid and microbial phytase on the egg quality characteristics in laying hens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 3 (5): 293-297
5. Maheri-Sis, N., A. R. Safaei, A. Mirzaei-Aghsaghali, A. Mirza-Aghazadeh, and **M. R. Dastouri**. 2007. Use of in vitro gas production technique to compare nutritive value of quackgrass and alfalfa for ruminants. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6(12): 1351-1356.
6. **Dastouri, M. R.**, K. Fakhimzadeh, J. Shayeg, J. Dolgari-Sharaf, M. R. Valilou, and N. Maheri-Sis. 2008. Evaluating antibacterial activity of the Iranian honey through MIC method on some dermal and intestinal pathogenic. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7(4): 409-412.
7. **Dastouri M. R.**, N. Maheri-Sis, A. Aghajanzadeh-Golshani, and Y. Ebrahimnezhad. 2007. The effect of replacement feeding of some protein sources with pollen on honeybee population and colony performance. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6 (11): 1258-1261.

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. Aynur Karadağ, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, **Mohammed Reza Dastouri**, Serkan Durdu, , Yalda Hekmatshoar, Mercy M. Davidson, Mehmet Uğur, Hilal Özdağ, Alp Can, Ahmet Rüçhan Akar, Asuman Sunguroğlu. Cell Fusion Following Cardiomyocyte and Mesenchymal Stem Cell Co-Culture and Functional Evaluation of Cellular Changes. (Poster presentation) The FEBS EMBO 2014 Conference 30 August - 4 September 2014, FRANCE.
2. Aynur Karadağ, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, **Mohammed Reza Dastouri**, Serkan Durdu, , Yalda Hekmatshoar, Mercy M. Davidson, Mehmet Uğur, Hilal Özdağ, Alp Can, Ahmet Rüçhan Akar, Asuman Sunguroğlu. Cell Fusion Following Cardiomyocyte and Mesenchymal Stem Cell Co-Culture and Functional Evaluation of Cellular Changes. (Poster presentation) The FEBS EMBO 2014 Conference 30 August - 4 September 2014, FRANCE.

3. **M.R. Dastouri**, A. Karadağ, D. Balcı, G. Çubukçuoğlu Deniz, S. Durdu, A. Can, A.R. Akar, 2013. Endothelial progenitor cell differentiation of induced pluripotent stem cells in vitro for advanced heart failure (Poster presentation). Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 281 (Suppl. 1) (2014) 220. Tackling Advanced Heart Failure: Mechanical Circulatory Support & Transplantation Istanbul Academy 2013 by TSCVS and ISHLT.
4. **M.R. Dastouri**, A. Karadağ, D. Balcı, G. Çubukçuoğlu Deniz, S. Durdu, A. Can, A.R. Akar, 2013 . Cell fusion of cardiomyocytes and mesenchymal stem cells may promote cardiac regeneration in end-stage heart failure.(Poster presentation) Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 22 (1) 227-228 Ocak 2014. Tackling Advanced Heart Failure: Mechanical Circulatory Support & Transplantation Istanbul Academy 2013 by TSCVS and ISHLT.
5. **Mohammad Reza Dastouri**, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çübükçuoğlu 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) TERMIS –AM conference 10-13 November 2013 atlanta. USA.
6. **Mohammad Reza Dastouri**, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Ahmet Rüçhan Akar, Alp Can Iv vitro differentiation of endothelial progenitor cells generated from mouse induced pluripotent stem cells. ISSCR(international society for stem cell research)-11th annual Meeting Boston,MA,USA
7. Mohammad reza Dastouri, Jalil Dolghari Sharaf, Naser Maheri Sis,Jalal Shayegh, Abolfazl Aghajamzadeh Golshani. The effect of honey bee larvae with different ages on some bacteria. (Poster presentation) The 9Th Asian apiculture Association Conference &Exhibition-AAA CHINA
8. M.R.Dastouri, Mohammad Araghi, 2007. The study of variation in queens egg laying, pollen and honey storage with the use of protein resources in honey bee colonies feeding. (poster presentation) BRA International Conference on Recent Trends in Apicultural Science,10 -14 June, Mikkeli,FINLAND
9. **Mohammad reza Dastouri**, Jalil Dolghari Sharaf, Naser Maheri Sis,Jalal Shayegh. (2006). The study and evaluation of medical properties of poly floral honey and its comparison with mono floral honey.(poster presentation) 1st International conference on the medical uses of honey, Kota Bharu- MALASIA
10. **M.R.Dastouri**, J. Shayeg, J. Dolghari-Shraf, (2006). Antibacterial Synergistic Effects of Some Bee Products (Honey and Propolis) on Several Pathogenic Bacteria. Eighth Asian Apicultural Association conference (AAA) Perth 20th - 24 March, AUSTRALIA (oral presentation).

11. **M.R.Dastouri**, J.Shayeg,J.Dolghari-Shraf. (2005).Evaluation the antibacterial effect of royal jelly on certain spectrum of pathogenic bacteria. International apiculture congress, November 13-18, Bangalore, INDIA (oral presentation).
12. **M.R.Dastouri**, J.Shayeg,J.Dolghari-Shraf,(2005). Evaluating antibacterial activity of the honey through MIC method on some dermal & intestinal pathogen.Third German Bee Products and Apitherapy Congress, Expo and Workshop with International Participation, April 01 to 06-th. Passau, GERMANY (oral presentation).
13. **M.R.Dastouri**, J.Shayeg,J.Dolghari-Shraf, (2005). Evaluating antibacterial activity of the extracts from propolis through MIC method.Third German Bee Products and Apitherapy Congress, Expo and Workshop with International Participation, April 01 to 06th. Passau, GERMANY,(oral presentation).
14. **M. R. Dastouri**, M. Araghi,The effect of protein substitutes of pollen on population of honey bee colonies. (Oral presentation). Issues Concerning Developing Countries International Trade in Honey. Hanoi, VIETNAM. 2004

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. **Dastouri M.R.**, Karadağ A., Balcı D., Deniz G.C., Durdu S., Can A., Akar A.R. In Vitro Generation of smooth muscle and endothelial progenitor cells differentiated from mouse Induced Pluripotent Stem Cells. Turkish Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery /Volume 22 Supplementum/October ISSN - 1301-5680. Turkish society of cardiovascular surgery Titanic Deluxe Hotel Convention Center - Belek- Antalya, TURKEY, October 30th and November 2rd 2014.
2. Karadağ A., Deniz G.C., **Dastouri M.R.**, Durdu S., Can A., Akar A.R. Cell Fusion Following Cardiomyocyte and Mesenchymal Stem Cell Co-Culture and Functional Evaluation of Cellular Changes. Turkish Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery /Volume 22 Supplementum/October ISSN - 1301-5680. Turkish society of cardiovascular surgery Titanic Deluxe Hotel Convention Center-Belek- Antalya, TURKEY, October 30th and November 2rd 2014.
3. **Mohammad Reza Dastouri**, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çübükçüoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Ahmet Rüchan Akar, Alp Can. Characterization of Flk1+ cells derived from ips cells (Oral presentation). Second Symposium on Stem Cells. 29 November 2012.İstanbul, TURKEY.
4. **Mohammad Reza Dastouri**, Aynur Karadağ, Deniz Balcı, Günseli Çübükçüoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Alp Can, Ahmet Rüchan Akar. 2008. Flk1+ cells derived from ips cells as a ndothelial progenitor cells (oral presentation). XII Turkish National Congress of Cardiovascular Surgery, 27-31 October 2012 Antalya / Turkey.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Reference Type: Journal Article

Record Number: 211

Author: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/, WHO. Available at:

