

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN KÜLTÜRÜ,
FARKLILAŞMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Arzu TAŞ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Prof. Dr. Hakkı DALÇIK
Eş Danışman : Doç. Dr. Sezen ARAT

KOCAELİ
2005

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İşbu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Süreyya CEYLAN

Üye Prof. Dr. Hakkı DALÇIK (Danışman)

Üye Doç. Dr. Sezen ARAT (Eş Danışman)

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

..../..../2005

Prof. Dr. Nejat GACAR

Enstitü Müdürü

Mühür

FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN KÜLTÜRÜ, FARKLILAŞMASI ve KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında embriyonik kök hücrelerin kültür ortamında farklılaşması ve uygulanan RA'ye bağlı olarak nöronal farklılaşma oranlarının artırılması hedeflenmiştir. Bu çalışma doku ve hücre hasarlarının tedavisi için bir model olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada fare embriyonik kök hücrelerinin besleyici tabakalar üzerinde kültürü, spontan ve nöronal farklılaşması üzerinde yoğunlaşmıştır. Nöronal farklılaşma için RA kullanılmıştır. RA'nın zaman ve konsantrasyon bağımlı değişimleri incelenmiştir.

Fare embriyonik kök hücreleri çalışmanın ilk aşamasında besleyici tabakalar üzerinde kültüre edilmiştir. İkinci kısımda ise embriyonik kök hücrelerin spontan olarak farklılaşmaları sağlanmıştır. Bir sonraki aşamada RA uygulanarak kök hücrelerin nöronal farklılaşmaları sağlanmıştır. Uygulanan RA'nın verilme zamanı ve konsantrasyonları değiştirilerek farklılaşmayı nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Sonuçlar, besleyici tabakaların embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliklerini korudukları göstermiştir. Spontan farklılaşma esnasında ilk olarak mezodermal kökenli hücrelerin oluştuğu ve bu hücrelerin hücre popülasyonun çoğunu oluşturduğu, bunun yanı sıra az sayıda nöronal hücrelerinde meydana geldiği gösterilmiştir. RA uygulamalarında ise, RA'nın düşük konsantrasyonlarının nöronal farklılaşmayı uyardığı fakat mezenşimal kökenli hücrelerinde meydana geldiği gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda mezenşimal farklılaşmaya rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Embriyonik kök hücre, spontan farklılaşma, nöronal farklılaşma, retinoik asit

CULTIVATION, DIFFERENTIATION AND CHARACTERIZATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS

ABSTRACT

In the present study was aimed to investigate the differentiation of embryonic stem cells in vitro with or without RA. This study is important in providing information for the further stem cell therapies.

In the present study, mouse embryonic stem cells were cultured on feeder layers and their spontaneous and neural differentiation capacity was investigated. Neural differentiation was induced with RA. In culture conditions, RA's time and dose-dependent effects were investigated.

In the first part of the study, mouse embryonic stem cells were cultured on feeder layers. Later, spontaneous differentiation of embryonic stem cells was done. Then neural differentiation was induced with RA and time and dose-dependent effects of RA were investigated.

Results of the present study, feeder layers inhibited the differentiation of embryonic stem cells. During the spontaneous differentiation, the cells began to beat just like cardiac cells which are derived from mesoderm. In addition, small amounts of neural cells were visualized. Low concentrations of RA induced neural differentiation, however distinct mezenchymal cells were also demonstrated. High concentration of RA did not induce any mezenchymal cells.

Keywords: Embryonic stem cells, spontaneous differentiation, neural differentiation, retinoic acid

TEŞEKKÜR

Çalışma konumu belirleyerek bana yeni ufuklar açan, beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım, **Prof. Dr. Hakkı Dalçık'a**; laboratuvarını bana açan, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım, **Doç. Dr. Sezen Arat'a**; eğitim sürem boyunca büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocalarım, **Prof.Dr. Süreyya Ceylan'a**; **Doç.Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz'a**; **Yrd. Doç.Dr. Serdar Filiz'e** ve **Yrd. Doç.Dr. Süheyla Gonca'ya**; çalışma arkadaşlarım **Arş. Gör.Pelin Çoştur Bıyık'sız'a**; **Hande Mercan'a** ve **Tolga Akkoç'a** ;

Çalışmalarım süresinde desteğini gördüğüm ve yardımlarını esirgemeyen başta **Doç. Dr. Haydar Bağış** olmak üzere **Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen Laboratuvarı çalışanları Dr. Diğdem Aktopraklıgil, Gazi Turgut ve Şakir Sekmen'e**; spektrometrik analizler konusunda yardımlarını esirgemeyen **Prof.Dr. Alexandre Demchenko** ve **Şule Öncül'e** ; hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen ve her zaman desteğini hissettiğim **Öğr. Gör. Dr. Yusufhan Yazır'a**; tezim ve hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım **Nilay Mahmutoğlu'na, Ömer Sak'a** ve **Aslı Aktaş'a** ve her zaman yanımda olan ve beni destekleyen **Aileme.....**

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücreler	1
1.2.Embriyonik Kök Hücreler	2
1.3. Embriyonik Kök Hücre Besiyeri Bileşenleri	5
1.4.Lösemi İnhibe Edici Faktör (LIF).....	6
1.5.Retinoik Asit (RA)	7
1.6. Embriyonik Kök Hücre Kültürü ve Besleyici Tabakalar.....	9
1.7. Embriyonik Kök Hücreler ve Fenotip.....	10
1.8. Embriyonik Kök Hücre Farklılaşması.....	11
1.9. Embriyonik Kök Hücrelerin Nöronal Farklılaşması	13
2.Amaç ve Kapsam	14
3. Gereç ve Yöntem	14
3.1.Besleyici Hücre Tabakalarının Hazırlanması.....	14
3.2. Besleyici Tabakalar Üzerinde EK Hücrelerin Kültürü.....	15
3.3 Deney Grupları	16
3.3.1. EK Hücrelerin Kültürü	16
3.3.2. EK Hücrelerin Farklılaşması.....	16
3.3.2.1 Embrioid Cisim Oluşumu	17
3.3.2.2. EK Hücrelerin Spontan Farklılaşması.....	18

3.3.3. Nöral Farklılaşma.....	18
3.3.3.1. 4gün-/4gün+ RA Uygulaması	
.....	18
3.3.3.2. 0-2 günler Arasında RA Uygulaması	
.....	19
3.3.3.3. 2 günlük EB'lerin Ekilmesi ve Ekim Sonrası 3 gün RA Uygulanması	
.....	19
3.3.3.4. 2 gün-/ 3 gün + Farklı Konsantrasyonlarda RA Uygulaması	19
4. Analiz Metodları.....	20
4.1.SSEA-1 İmmunboyaması.....	20
4.2. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Tayini	20
4.3. Oct-4 İmmunboyaması.....	21
4.4. NCAM İmmunboyaması.....	21
4.5.Actin İmmunboyaması.....	21
4.6.Vimentin İmmunboyaması	22
4.7. GFAP İmmunboyaması.....	22
4.8.Nestin İmmunboyaması	23
4.9.Histolojik Boyamalar.....	23
4.10. Spektrometrik Analizler.....	24
5. SONUÇLAR.....	24
5.1. EK Hücrelerin Kültürü	24
5.1.1. . Alkalın Fosfataz Aktivitesi Tayini	24
5.1.2. SSEA-1 İmmunboyaması.....	25
5.1.3. Oct-4 İmmunboyaması.	25
5.2. EK Hücrelerin Farklılaşması.	25
5.2.1. Embrioid Cisim Oluşumu	25
5.2.2. EK Hücrelerin Spontan Farklılaşması	28
5.3. Nöral Farklılaşma	30
5.3.1. 4gün-/4gün+ RA Uygulaması	30
5.3.2. . 0-2 günler Arasında RA Uygulaması	32
5.3.3. 2 günlük EB'lerin Ekilmesi ve Ekim Sonrası 3 gün RA Uygulanması...	33

5.3.4. 2 gün-/ 3 gün +Farklı Konsantrasyonlara RA Uygulaması.....	34
5.3.5. Spektrometrik Analizler	40
6. TARTIŞMA	42
7. SONUÇ	46
8.ÖNERİLER	47
REFERANSLAR	48
EKLER	60
EK1.DMEM Çözeltisi	61
EK2.Mitomisinli Besiyeri	61
EK3.PBS Çözeltisi	61
EK4. Jelatin Çözeltisi	62
EK5.10 mM RA	62
EK6. ALP Aktivitesi	62
EK7.Blok Solüsyonu	62
EK8. HBS	63
EK9. Yıkama Solüsyonu	63
EK 10. Kullanılan Cihazlar	63
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER ve KISALTMALAR

- ALP : Alkalin fosfataz
DMEM : Dulbescco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Dimetil sülfoksit
ECM : Ekstraselüler matriks
EK hücre : Embriyonik kök hücre
EC hücre : Embriyonik carsinoma hücre
EG hücre : Embriyonik germ hücre
FCS : Fetal dana Serumu
GFAP : Glial fibriller asidik protein
HBS : yüksek tuz içeren tampon
H-E : Hematoksilen – Eozin boyaması
IVF : In vitro fertilizasyon
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
NCAM : Nöral hücre adhezyon molekülü
Oct-4 : Germline- specific transcription factor
PBS : Fosfat tamponu
PFA : Paraformaldehit
PMEF : Primer fare embriyonik fibroblast
RA : Retinoik asit
SSEA-1 : Stage Secific Embryonic Antigen-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Fare EK hücrelerin in vitro ve in vivo gelişimi	12
Şekil 5.1.	Besleyici tabakalar üzerindeki R1 kolonileri.ALP aktivitesi	24
Şekil 5.2.	Besleyici tabakalar üzerindeki R1 kolonileri.SSEA-1 immunboyamsı	25
Şekil 5.3.	Süspanse kültür 1 günlük EB	26
Şekil 5.4.	Süspanse kültür 2 ve 3 günlük EB'ler	26
Şekil 5.5.	Süspanse kültür 4 ve 6 günlük EB'ler	27
Şekil 5.6.	Süspanse kültür 8 ve 10 günlük EB'ler	27
Şekil 5.7.	4gün-/4gün+RA uygulanan 12 günlük EB	27
Şekil 5.8.	Kontrolsüz farklılaşma 5.ve 9.gün boyama	29
Şekil 5.9.	Kontrolsüz farklılaşma 17.gün boyama.	29
Şekil 5.10.	Kontrolsüz farklılaşma 8 ve 17.gün boyama.	30
Şekil 5.11.	Kontrolsüz farklılaşma Atım gösteren hücreler 17.ve 30.gün.	30
Şekil 5.12.	4-/4+ RA uygulaması.2, 5,7 ve 9.gün boyama	32
Şekil 5.13.	0-2 gün RA uygulaması.5.gün boyama	32
Şekil 5.14.	2 günlük EB'lere RA uygulaması.5 ve 9.gün boyama	34
Şekil 5.15.	2-/3+ 50nM RA uygulaması.2, 5 ve 9.gün boyama	38
Şekil 5.16.	2-/3+ 100nM RA uygulaması.2, 5,7 ve 9.gün boyama	39
Şekil 5.17.	2-/3+ 1µM RA uygulaması. 9.gün boyama	39
Şekil 5.18.	2-/3+ 3µM RA uygulaması.5 ve7.gün boyama	39
Şekil 5.19.	2 günlük EB'lere RA uygulaması 11.gün spektrometrik analiz grafiği	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Fare EK hücrelerin in vitro ortamda farklılaştığı hücre tipleri.....	4
Çizelge 1.2. RA'ın aktivasyon mekanizması ve RA sinyal yolları.....	8
Çizelge 3.1. EK hücre besiyeri bileşenleri.....	15
Çizelge 5.1. Deney Sonuçları.....	41

1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

Tarih boyunca insanoğlu hastalıklara çare bulmaya ve insan ömrünü uzatmaya çalışmıştır. Bu çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Özellikle doku-hücre-organ nakillerinde karşılaşılan zorluklar sonucunda; bireyin kendisinden alınan hücrelerin (kök hücreler) kullanımı gündeme gelmiştir. Yenileyici veya tamir edici tıp alanında kök hücrelerden yararlanılmaktadır.

Kök hücre; uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğinde olan, özelleşmemiş, farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği olan ve hasarlı dokularda dokunun işlevini kazanmasını sağlayan hücrelerdir. Bu özellikleriyle vücuttaki somatik hücrelerden farklıdırlar.

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde, farklı özellikteki kök hücrelerle karşılaşırız. Hiyerarşinin en üst sırasında totipotent hücreler yer almaktadır. Totipotent hücreler, embriyoyu ve embriyoya ait ekstraembriyonik membran ve dokuları oluşturabilirler (Gerecht-Nir ve Itskovitz-Eldor, 2004). Totipotent hücrelerin bir alt basamağında pluripotent hücreler yer alır. Pluripotent hücreler (embriyonik kök hücreler), embriyoya ait üç germ yaprağından gelişen tüm hücreleri oluşturabilirler fakat ekstraembriyonik yapıları oluşturamazlar. Bu nedenle bir embriyoyu oluşturabilme yeteneğinden yoksundurlar. Pluripotent hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Gelişim ilerledikçe hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek daha özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Buldukları dokuya özgü hücreleri oluşturabilen kök hücreler multipotent kök hücreler diye adlandırılır. Son dönemde multipotent kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, sadece buldukları dokuya ait hücreleri değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana getirebildikleri gösterilmiştir (Gritti A 2002, Vatz 2002). Bu tip farklılaşma transfarklılaşma veya plastisite olarak adlandırılır. Hiyerarşinin en altında ise unipotent kök hücreler ya da

progenitor hücreler bulunur. Progenitor hücreler, sadece spesifik hatlara farklılaşma eğilimi gösterirler (Gerecht-Nir 2003, Gardner R.L. 2002, Cetinkaya 2004).

1.2. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler; vücuttaki değişik hücre tiplerine dönüşebilme ve sınırsız bölünme yetenekleriyle son yılların popüler araştırma konularından biri haline gelmiştir. Embriyonik kök hücre (EK) hatlarının kurulması, memelilerin gelişimsel biyolojilerini araştıran bir çok çalışmaya olanak sağlamıştır. Son yirmi yıl içerisinde laboratuvar ortamında embriyonik kök hücrelerden farklı tipte somatik hücreler elde edilmiştir. Embriyonik kök hücrelerden homojen ve saf bir hücre popülasyonu elde etmek için çalışmalar halen devam etmektedir.

Kök hücre çalışmaları yaklaşık 30 yıl önce farklılaşmamış bir hücre popülasyonunun izolasyonu ile başlamıştır. Erken fare embriyolarının yetişkin farenin dokularına verilmesiyle teratokarsinoma denilen testislerde spontan oluşan bir tümör meydana geldiği görülmüştür. Bu tümörün içinden farklılaşmamış bir hücre popülasyonu izole edilmiş ve embriyonal karsinoma (EC) hücreleri denmiştir. Bu hücreler fare blastosistlerine enjekte edildiklerinde doğan yavruların değişik dokularına katıldıkları görülmüştür (Andrews, 2001, Cetinkaya 2004).

Embriyonik kök hücreler, blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir ve ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (Evans ve Kaufmann 1981 ve Martin 1981). Embriyonik kök hücreler ; germ hücrelerini de oluşturabildiklerinden dolayı totipotent hücre olarak da tanımlanabilmektedirler. Embriyonik kök hücreler tüm vücut hücrelerine farklılaşabilmesine rağmen embriyonun zarlarını meydana getiren trofoektoderm hücrelerine farklılaşamaz (Smith G.A,2001). Embriyonik kök hücreler, alıcı blastosistlere transfer edildiklerinde pluripotent özelliklerini korurlar ve organizmanın

primitif üç katmanına ait (endoderm, mezoderm ve ektoderm) hücelere ve hatta germ hücrelerine de farklılaşabilirler (Stravidis ve Smith 2003; Keller 1995). Bu hücreler embriyoya geri verildiklerinde eşey hattı da dahil olmak üzere tüm dokuların oluşumuna iştirak ederek kimerik canlıların oluşumunu sağlarlar (Arat S 1997 ve 2000, Cetinkaya 2004).

Fare embriyonik kök hücrelerine duyulan ilgi başta transgenik hayvanlarla hastalık modelleri geliştirilmek istenmesinden kaynaklanmıştır. DNA'sı modifiye edilmiş embriyonik kök hücrelerin blastosistlere enjekte edilmesiyle kimerik canlılar oluşturulmuştur (Cetinkaya 2004). Genetik olarak değiştirilen embriyonik kök hücreler kullanılarak tek gen lokuslarında mutasyonlar meydana getirilmiştir. Böylece knock out fareler oluşturulmuş ve bu canlılarda insan hastalık modelleri geliştirilmiştir (Wobus, 1999).

Embriyonik kök hücreler gibi pluripotent özellik gösteren iki tip hücre daha vardır. Bunlardan birincisi; Embriyonik karsinoma hücreleri diğeri ise primordial germ hücrelerinden elde edilen embriyonik germ (EG) hücreleridir (Stewart,1992).

EK, EG ve EC hücre hatları *in vitro* ortamda farklılaşmamış fare embriyonik hücre özellikleri sergilerler. Bu özellikler şunlardır:

- a) pluripotent farklılaşma kapasitesi (Bain 1995, Rohwedel 1999)
- b) alkalın fosfataz expressyonu
- c) SSEA-1 expressyonu
- d) Oct-4 expressyonu
- e) hücre sikluslarında kısa G1 fazına sahip olmalarıdır (Rohwedel 1999, Guan 1999).

EK hücreler *in vitro* şartlarda, besleyici hücre tabakası ve sitokinlerin varlığında farklılaşmadan yaşamlarını sürdürebilirler. Besleyici tabaka olarak fare embriyonik fibroblast hücreleri (Mouse Embryonic Fibroblast; MEF) kullanılmaktadır (Vatz 2002). Lösemi inhibe edici faktör (Leukemia İnhibitory Factor; LIF) adlı sitokin, fare EK hücrelerinin

farklılaşmasını önlemektedir (Murray 2001). Fare EK hücreleri MEF üzerinde ve/veya LIF varlığında uzun süre farklılaşmadan kaldıkları gösterilmiştir (Rippon ve Bishop 2004).

Besleyici tabakalar ve LIF kültür ortamından uzaklaştırıldığında EK hücreler spontan olarak farklılaşırlar (Keller 1995, Bain 1995). EK hücreleri süspanse kültürlerinde üç boyutlu hücre agregatları oluştururlar ve bu üç boyutlu yapı embriyoid cisim (Embryoid Body; EB) olarak adlandırılır (Bain 1995, Frachierd 1995, Keller 1995). Embriyoid cisimler incelendiğinde farklılaşmış ve farklılaşmamış hücre gruplarından oluşan bu yapının dış yüzeyindeki endodermal hücreler ve içindeki boşluk ile 6 günlük bir embriyoya benzediği gösterilmiştir (O'Shea 1999). EB'ler üç germ yaprağına ait hücrelerin tümünü içerir (Rippon ve Bishop 2004, Itskovitz-Eldor 2000, Cetinkaya 2004).

EK hücrelerin farklı sitokinler sayesinde değişik hücre tiplerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Çizelge 1.1'de EK hücrelerin farklılaştıkları hücre tipleri gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Fare embriyonik kök hücrelerin *in vitro* ortamda farklılaştığı hücre tipleri

Hücre Tipi	Referanslar
Hematopoietik hücreler	Doetschman et al. 1985, Nakano et al. 1996
Mast hücresi	Tsai et al. 2000
Dendritik hücreler	Fairchild et.al. 2000
Endotel hücresi	Risau et.al.1988,Yamashita et.al 2000
Kalp kası hücresi	Maltsev et.al.1993,Guan et.al. 1996
Çizgili kas hücresi	Rohwedel et.al.1994
Düz kas hücresi	Yamashita et.al.2000
Yağ hücresi	Dani et.al. 1997
Osteoblast	Buttery et.al. 2001
Kondrosit	Kramer et.al.2000
Nöron	Bain et.al.1995, Okabe et.al.1996
Astrosit	Fraichard et.al.1995
Oligodendrosit	Brustle et.al. 1999, Liu et.al. 2000

EK hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin bulunmasından sonra bu hücrelerin doku hasarlarının yenilenmesinde kullanılabileceği gündeme gelmiştir. Doku hasarlarında kullanılabilecek homojen bir hücre popülasyonu elde etmek için çalışmalar devam etmektedir.

Fare EK hücrelerinden elde edilen tecrübeler insan EK hücrelerinin kültüre edilmesinde ve farklılaşma çalışmalarında ipuçları sağlamıştır. İlk çalışmalarda 1980'li yılların ortalarında *İn vitro* Fertilizasyon (IVF) sonrası elde edilen fazla embriyolar kullanılmış fakat embriyoların dondurulmasında karşılaşılan zorluklar aşılanaya kadar başarı bir izolasyon yapılamamıştır. Farenin yanı sıra tavşan (Graves,1993), domuz (Whesler,1994), sığır (Cherny, 1994) ve tavuktan da (Pain, 1996) embriyonik kök hücre izolasyonu yapılmıştır. Thomson ve ekibi 1995 yılında ilk primat embriyonik kök hücrelerini izole etmişlerdir. Primat EK hücrelerinin izolasyonunun ardından 1998 yılında aynı ekip ilk insan EK hücre hatlarını elde etmiştir (Thomson 1998; Levenberg 2003). Bunu takip eden yıllar içerisinde birçok insan EK hücre hattı elde edilmiştir. Bugün 'National Institute of Health (NIH) ' te kayıtlı 78 tane insan EK hücre hattı mevcuttur (www.nih.gov, Cetinkaya 2004).

İnsan EK hücreleri, fare EK hücreleri gibi pluripotent özelliktedirler. Fare EK hücreleri gibi sınırsız kendini yenileyebilme ve üç germ yaprağına ait tüm hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (Schuldiner 2001, Laslett 2003). İnsan EK hücreleri üç embriyonik hatta ait hücreleri içeren EB leri oluşturabilirler (Itskovitz 2000, Thomson 2000) ve büyüme faktörlerinin ilavesiyle farklı hücre tiplerine farklılaştırılabilmektedirler (Schuldiner et al 2000).

1.3. Embriyonik Kök Hücre Besiyeri Bileşenleri *

Embriyonik kök hücreler için kullanılan besiyeri diğer hücre tipleri için kullanılan besiyerlerinden farklı özelliktedir. Ek hücreler için besleyici çözeltisi zengin olan yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tercih edilir. Besiyerine ilaveten, aminoasit, L-Glutamin ve merkaptoethanol uygulanır. EK hücreler kullanılan serum tipine ve kalitesine karşı oldukça hassastırlar. Endüstriyel serum üretiminde bir standart olmadığından kullanılacak serumun önceden test edilmesi gerekmektedir. Bu hücreler beş gün boyunca %

15 ve % 30 oranında serum uygulanmış besiyerinde kültüre edildiklerinde % 30 oranında serum kullanılan örneklerde toksisite gözlemlenmiştir (Abbondanzo ,1993).

Kültür ortamında hayvansal ürünlerden uzaklaşmak ve daha kontrollü deneyler yapmak isteyen araştırmacılar için firmalar hücreye uygun serumsuz besiyerleri geliştirmektedirler. Invitrogen ve Stem Cell Technology gibi özel firmalar kök hücrelerin farklılaştırılmasında veya kendilerini yenilebilmelerini sağlayan serumsuz besiyerleri geliştirmişlerdir. 1998 yılında geliştirilen Serum Replacement (SR), hayvansal ürünlerden olabildiğince arındırılmış bir çözüldür (Price,1998). İnsan EK hücrelerinin SR ve bFGF içeren kültür ortamında farklılaşmadan kalabildikleri gösterilmiştir (Amit, 2002).

1.4. Lösemi İnhibe Edici Faktör (Leukemia Inhibitory Factor; LIF) *

Lösemi İnhibe Edici faktör (Leukemia Inhibitory Factor; LIF), IL-6 ailesine ait bir sitokindir (Niwa, 2001). LIF 'in fare embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmadan kültür ortamında tutulması için kritik bir faktör olduğu gösterilmiştir. LIF, fare embriyonik kök hücrelerin uzun dönemde farklılaşmadan kültür ortamında tutulmasını sağladığından besleyici tabakanın yerini alabileceği düşünülmüştür (Nichols 1990). D3 fare embriyonik kök hücre hattı besleyici tabaka olmadan sadece rekombinant LIF varlığında iki ay boyunca farklılaşmadan kültüre edilebilmiştir. Bu hücreler blastosistlere verildiğinde oluşan kimerik hayvanın hücre hatlarına katılmışlardır (Pease,1990). Rathjen ve ekibi tarafından 1990 yılında LIF'in iki formu izole edilmiştir. D-LIF, çözümlü halde ortamda bulunan form; M-LIF ise matrikse bağımlı halde bulunan formdur.

LIF reseptörü iki alt birimden meydana gelir. Birincisi ligana özgü altbirimdir ve lösemi inhibe edici faktör reseptör beta (LIFR β) diye adlandırılır. İkincisi ise hücre içinde sinyal yolunu başlatır ve gp130 olarak isimlendirilir. Gp 130; IL-6 ailesi sitokinlerinin ortak reseptörüdür (Vassilieva 2000; Niwa 2001). LIF membrandaki reseptöre bağlandıktan sonra hücre içi aktivitesini Jak/Stat yolu ile sağlar. LIF'in etkili olmasında en önemli rolü Stat 3 adlı

transkripsiyon faktörü oynar. LIF sinyali Jak/Stat yolu ile çekirdeğe iletilir ve böylece EK hücrelerin kendilerini yenilemesi sağlanır (Niwa 2001).

LIF farklı kaynaklardan elde edilebilir. En etkili yol fibroblastlardan oluşan besleyici tabakanın kullanılmasıdır. Fibroblast hücreleri LIF sentezlerler ve EK hücrelerin beslenmelerini sağlar (Stewart,1992). Besleyici tabakanın olmadığı durumlarda rekombinant LIF kullanılır. Bufo rat karaciğer hücreleri (BRL) LIF sentezlerler. Bu hücrelerin süpernatantları kullanılarak besleyici tabaka olmaksızın EK hücrelerin kültürü yapılır. LIF geni (pc10-6R cDNA klonları) ile transfekte edilen COS hücrelerinin süpernatantlarının LIF kaynağı olarak EK hücre kültürüne katılması EK hücrelerinin pluripotent özelliklerini korumaları için yeterli olmuştur (Smith 1998).

* : Gaye Cetinkaya'nın Yüksek Lisans Tez Çalışmasından yararlanılmıştır (2004)

1.5. Retinoik Asit (RA)

Vitamin A türevleri olan retinoidler, embriyogenesis sırasında, çeşitli hücre tiplerinin farklılaşması ve proliferasyonunun düzenlenmesinde kritik rol oynar (Bolton, 1999). RA, vitamin A'nın fizyolojik metabolitlerinden biridir (Bolton, 1999) *in vivo* doku ve organ farklılaşması üzerinde önemli etkilere sahiptir (Schictt ve Madarasz, 1997). RA'nın *in vitro*, fare embriyonik kök hücrelerin nöral doku farklılaşmasını indükleyici etkisi bilinmektedir (Strübing 1995).

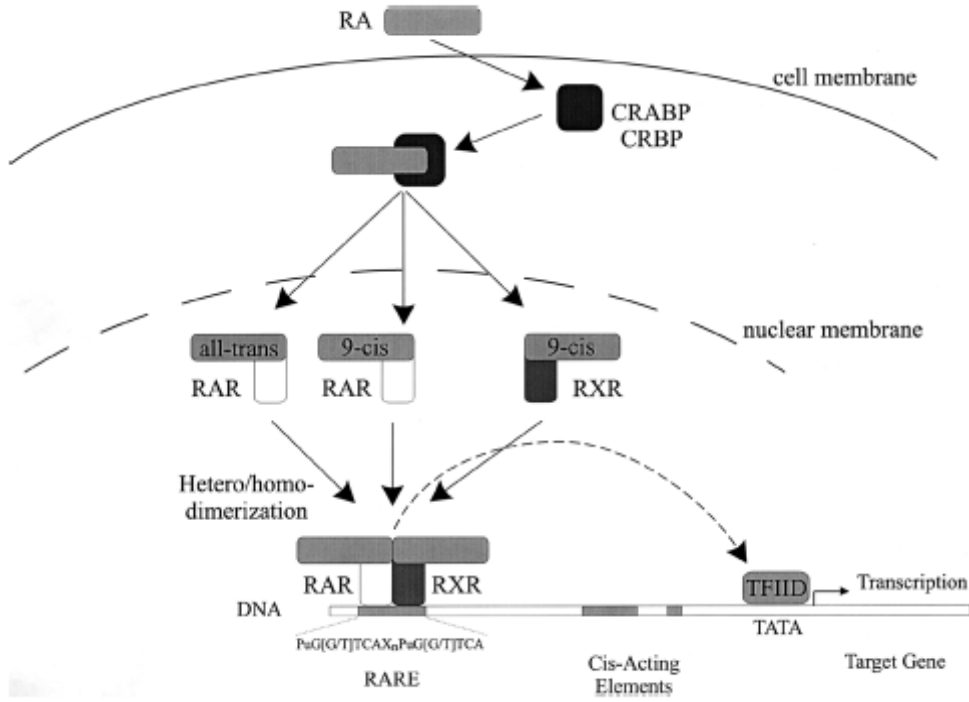
Bu yüzyılın başından beri, Vitamin A'nın yaşam çemberi üzerinde önemli besleyici bir bileşen olduğu bilinmektedir (Wolf, 1996). Gebelik sırasında veya erken postnatal fazda Vitamin A yoksunluğu embriyonik malformasyonlara neden olmaktadır. RA'nın *in vivo* etkisini göstermek amacıyla; aşırı miktarda retinoid uygulandığında embriyonik malformasyonların gözlemlendiğinden beri RA'nın aynı zamanda teratogenik kapasiteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Son çalışmalar, RA'nın embriyonik gelişimi düzenleyici bir hormon gibi fonksiyon gördüğünü açığa çıkarmıştır (Rohwedel 1999).

Embriyo gelişimi sırasında RA verildiğinde; başlıca aksial iskelet, ekstremiteler ve merkezi sinir sistemini içeren kraniofasial yapılarda şiddetli defektler görülmüştür. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, meydana gelen malformasyonların çoğunluğu merkezi sinir sisteminde, kraniofasial yapılarda, kalpte ve timusta gözlemlenmiştir. Farelerde iskelet malformasyonları sadece kraniofasial yapılarla sınırlı olmayıp, aynı zamanda ekstremiteler ve vertebrada da gözlemlenmiştir (Rohwedel 1999, Bolton 1999, Wohl 1998).

In vitro şartlarda RA verildiğinde; EC ve EK hücrelerinin zaman ve konsantrasyon bağımlı yollarla spesifik hücre tiplerine farklılaşmaları sağlanır (Fraichard 1995, Strübing 1995, Rohwedel 1999). RA, EK ve EC hücrelerinden elde edilen embriyoid cisimlere ilk iki gün 10 – 100 nM konsantrasyonda uygulandığında, nörogenesi başlatır (Bain 1996, Strübing 1995, Gajovic1997, Bain 1995). RA'nın 1 nM konsantrasyonda uygulanması kardiyak farklılaşmayı başlatır. Kardiyak hücreleri, mezodermin anterior lateral plağından gelişir. Kültüre RA verildiğinde; kardiyomiyositlerin geliştiği mezodermal öncülleri ortadan kaldırır ve böylece posterior yapıların gelişmesini sağlayarak kardiyogenesisin oluşumunu engeller. (Rohwedel 1999).

Embriyoid cisimlere 2-5.günler arasında 10 nM RA uygulanması ile nörogenesis başlar (Strübing 1995, Wobus 1997). Embriyoid cisimlere 5.günden sonra 10 nM RA uygulanması; miyogenik ve adipogenik farklılaşmanın engellenmesini sağlarken , kardiyak ve vasküler düz kas hücrelerine farklılaşmanın başlamasına sebep olur (Wobus 1997).

RA'nın farklı izotipleri mevcuttur. Bunlar All-trans RA, 9-cis RA ve 13-cis RA'dır. Embriyo gelişimi ve farklılaşma sırasında RA'nın etkileri; RA reseptörlerinin çeşitli kombinasyonları yoluyla gen ekspresyonlarını düzenlemesi ile açıklanabilir (Guan 2001). Hücrel RA- bağlayan proteinlerin (CRABP) ve en önemlisi de nüklear RA reseptörlerinin keşfi, embriyo gelişimi sırasında RA'nın gen ekspresyonlarını nasıl düzenlediğini anlamamızda yardımcı olmuştur (Rohwedel 1999, Guan 2001, Tighe ve Gudas 2004). RA reseptörleri; retinoik asit reseptör (RAR) ve retinoid X reseptör (RXR) ve bunların α , β , γ alt izotipleridir (Bolton 1999). RA CRABP'ye bağlanarak nüklear RA reseptörleri ile etkileşir. All-trans RA, RAR'a , 9-cis RA ise RXR ve RAR nüklear reseptörlerine bağlanır (Guan 2001). RA'nın aktivasyon mekanizması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.



Çizelge 1.2. RA'nın aktivasyon mekanizması ve RA sinyal yolları (Rohwedel 1999).

1.6. Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü ve Besleyici Tabakalar

Fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilen fare EK hücrelerinin pluripotent özelliğini korumak güçtür (Loebel 2003). Primer teratokarsinoma explant kültürlerinde, EC hücrelerinin farklılaşmış hücre tipleri yanında daha iyi geliştiği gözlemlenmiştir. EC hücrelerinin, mitotik olarak inaktive edilmiş embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde kültüre edilmesi sonucu yüksek farklılaşma kapasitesine sahip kök hücreler elde edilmiştir (Martin ve Evans 1975). Fare EK hücreleri de embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde kültüre edilmiş ve çoğaltılmıştır (Martin 1981, Evans ve Kaufmann 1981). Embriyonik fibroblastlar, bazı kritik besleyici veya destekleyici faktörleri salgıladıklarından besleyici tabaka olarak adlandırılmaktadırlar (Smith 2001).

İnsan ve fare EK hücreleri, primer fare fibroblast hücreleri (Primer Mouse Embryonic Fibroblast; PMEF) üzerinde kültüre edilmektedirler. PMEF hücreleri üzerinde kök hücreler (KH) daha kararlı karyotip göstermişlerdir (Abbondazo 1993). Petri yüzeyini tamamen kapladıktan sonra mitotik olarak inaktive edilen bu hücreler LIF salgılayarak fare EK hücrelerinin farklılaşmadan kültürüne olanak sağlamıştır. Besleyici tabakalara ek olarak kültür ortamının rekombinant LIF ilavesi de gereklidir. (Thomson 1998, Reubinoff 2000). Ancak LIF, insan EK hücre hatları üzerinde aynı etkiye sahip değildir (Laslett 2003, Thomson 2000, Cetinkaya 2004)

İnsan EK hücrelerinin hayvan hücrelerinin üzerinde kültüre edilmesi retroviruslar ile kontaminasyon riskini arttırmaktadır (Smith 2001). Bunu engellemek için insan hücreleri besleyici tabaka olarak denenmiştir (Amit 2004). İnsan dokularından izole edilen; fetal kas hücreleri, yetişkin deri hücreleri, yetişkin kemik iliği hücreleri ve yeni doğan bebeklerin sünnet dokusundan elde edilen hücreler insan EK hücrelerinin kültürü için gereken ortamı sağlamıştır (Amit 2003, Gerecht-Nir ve Itskovitz 2004, Cetinkaya 2004).

Kök hücreler (KH) yenileyici ve tamir edici tıp alanında kullanılmak istenmektedir (Gerecht-Nir ve Itskovitz 2004). Bu nedenle bu hücrelerin büyük çapta üretilmeleri ve farklı hücre tiplerinden arındırılmaları gerekmektedir. Besleyici hücre tabakalarının kullanılmadığı alternatif kültür sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. İnsan KH tedavi amaçlı kullanımı için aynı zamanda hayvansal ürünlerden arındırılmış sentetik bir kültür ortamı gerekmektedir (Cetinkaya 2004). Öncelikle besiyerlerinden serumun ve besleyici hücre tabakasının uzaklaştırılması gereklidir. Fare EK hücreleri serumsuz besiyerinde LIF ve Bone Morphogenic Protein (BMP) kullanılarak (Ying 2003), insan EK hücreleri de matrigel ve laminin kaplı yüzeylerde farklılaşmadan kültüre edilebilmişlerdir. Fakat bu çalışmada da besiyeri MEF süpernatantlarıyla zenginleştirilmiştir (Xu 2001).

Vücutta bulunan birçok hücre yüzey bağımlıdır ve büyüme, bölünme, gelişme ve farklılaşma sırasında bir protein iskelete tutunurlar. Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix, ECM) olarak adlandırılan bu yapı, hücrelerin düzenlenmesinde üç boyutlu yapı sağlayan protein ve glikozaminoglikanlardan meydana gelir. Hücre kültüründe de serum içindeki proteinler petri ve flaskların yüzeyine absorbe olurlar ve ECM görevi görürler.

Hücrelerin matrikse tutunmaları için bir hücre yüzey reseptörü olan integrinin fibronektine bağlanması gerekir. Fibronektinde serum içerisinde mevcuttur. Fibronektinin polimerik malzemeye absorbe olmasıyla hücreler hücre-matriks etkileşiminde olduğu gibi petri yüzeyine yapışırlar (Webb 2000, Cetinkaya 2004).

Hücre kültüründe ECM fiziksel yapısı üç boyutlu polimerik malzeme ile oluşturulmaya çalışılmıştır. Üç boyutlu poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA ve poly (L-lactic acid) PLLA polimerlerinin üzerinde değişik yönlerde farklılaştırılan EK hücrelerin kültür gruplarında üç boyutlu yapıların geliştiği bildirilmiştir (Levenberg, 2003 , Hayman, 2004, Cetinkaya 2005)

1.7.Embriyonik Kök Hücreler ve Fenotip

Embriyonik kök hücre incelendiğinde; büyük bir çekirdeğe sahip olduğu görülür. Yuvarlak ve düzgün bir morfolojileri vardır. Kolonileri oluşturan hücrelerin sınırları ayırt edilemez fakat hücrelerin çekirdekleri kolaylıkla görülebilir. Koloniler faz-kontrast mikroskopla incelendiğinde koloni sınırları parlak görülür (Cetinkaya 2004).

Uzun dönem kültüre olmuş EK hücre popülasyonlarının hala pluripotent karakterde olduğunu anlamının en iyi ve en eski yöntemi kimerik hayvan oluşturmaktır. Bu yöntemde; EK hücreler morula veya blastosist aşamasındaki fare embriyolarına enjekte ve bu embriyolarda alıcı annelere transfer edilir. Eğer EK hücreler pluripotent özelliklerini korumuşlarsa; iç hücre kitlesine karışarak canlının çeşitli dokularına katılacaklardır. Doğan yavrularda kimerizm varlığı ve derecesi genellikle tüy rengine göre belirlenir. Bu nedenle EK hücre hatları pigmentli fare soylarından elde edilirler. Hücrelerin transfer edildiği fare soyları ise siyah veya albino fare soylarıdır. Doğan kimerik hayvanlarda iki renk tespit edilir. Bu çalışmada kullanılan R1 EK hücreler sekiz hücreli embriyolara enjekte edildiklerinde %73'ünün blastosiste katıldığı, %31'inin doğduğu, doğan yavruların %27'sinin kimerik olduğu tespit edilmiştir (Arat,1997).

Bir transkripsiyon faktörü olan Oct-3/4; totipotent, pluripotent ve germ hücre hatları tarafından eksprese edilir. Oct-4 ekspresyonunun dengeli olması, EK hücrelerin

pluripotensilerini korumaları açısından önemlidir (Gorba, 2003). Kök hücreler yüksek seviyede alkalın fosfotaz ve telomeraz aktivitesi gösterirler ve onların bu aktivitesi fare ve insan EK hücrelerinin pluripotensilerini göstermek için kullanılır (Vassilieva, 2000). Farklılaşmamış EK hücrelerin bir diğer belirteci de SSEA (Stage Specific Embryonic Antigen)'dir. Farklılaşmamış fare EK hücrelerin membranlarında SSEA-1, farklılaşmamış insan EK hücrelerinde ise SSEA-3 ve SSEA-4 antijenleri eksprese olur. Ayrıca insan EK hücreleri için TRA-1-60 ve TRA1-81 antijenleri de farklılaşmamış hücrelerin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Pera, 2000, Cetinkaya 2004).

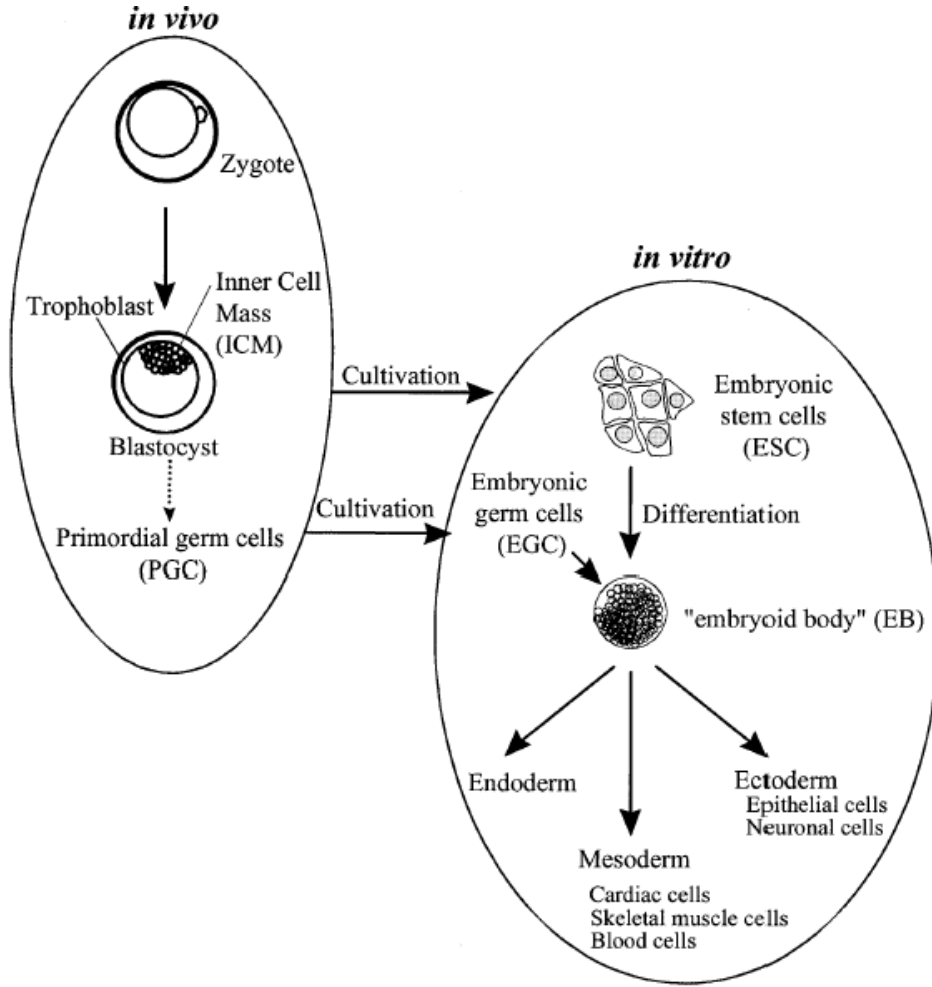
1.8. Embriyonik Kök Hücrelerin Farklılaşması

Embriyonik kök hücrelerin en önemli ve merak uyandıran yanlarından biri de; kültürde uygun uyarın verildiğinde farklı somatik hücre tiplerine farklılaşma yetenekleridir.

Farklılaşmanın başlatılabilmesi için kullanılan ortak yöntem; embriyoid cisim (Embryoid body, EB) olarak adlandırılan üç boyutlu hücre agregatlarının oluşturulmasıdır (Stravridis ve Smith, 2003). Embriyoid cisimler üç germ yaprağından türevlenen tüm hücre çeşitlerini içerirler (Martin 1981, Bain 1995, Fraichard 1995). EB'ler tüm hücre çeşitlerini içermelerine rağmen bir vücut planı veya kutuplaşma formlarını içermezler. Sonuç olarak canlı bir embriyo oluşturamazlar (Rippon 2004).

Embriyonik kök hücreler besleyici hücre tabakası ve LIF içermeyen kültür medyumunda bakteriyolojik petri kaplarına ekilirse EB'ler oluştururlar (Keller 1995). EB'ler kültür petri kaplarına ekildiklerinde yayılmaya ve ileri dönemde de farklılaşmaya başlarlar (Stravridis 2003, O'Shea 1999).

Farklılaşmamış kök hücrelerin gelişimsel kaderini; büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve ECM proteinlerini içeren bir mikro çevreye bağlıdır (Czys ve Wobus 2001). Bu mikro çevrede; Embriyoid cisim içerisindeki mezodermal ve endodermal öncül hücreler birkaç gün içerisinde oluşurken, ektodermal öncül hücreler daha geç bir dönemde oluşurlar. Kültürün ileri dönemlerinde EB'ler bir kaviteye sahip olurlar ve sistik bir görünüm alırlar (Ribbon 2004).



Şekil 1.1. Fare embriyonik kök Hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* gelişimi (Guan 1999).

În vitro fare EK hücreleri; kardiyojenik, miyojenik, nöronal, epitelial ve vasküler düz kas hücrelerine farklılaşabilirler ve dokuya özgü genleri, proteinleri ve iyon kanallarını ekspresse ederler.

EK hücrelerin atım gösteren kardiyomiyositlere farklılaşması, EB'lerin içerisinde spontan (kendi kendine gerçekleşme) olarak meydana gelir. İlk atım gösteren hücreler 7-10 günlük EB'lerde görülür (Wobus 2001, Mummery 2002).

EK hücrelerin besiyerine, transferrin, BSA (sığır serum albumin) ve sodyum selenit ilavesinin ardından kültüre edildiklerinde miyojenik (iskelet kas hücreleri) hücrelere

farklılaşırlar. EB'lerin ekiminin ardından 5-7 .günler arasında ilk miyoblast/miyositler ortaya çıkmaktadır (Wobus 2001).

Karışık bir hücre tipi olan vasküler düz kas hücrelerine farklılaşma için Drap ve arkadaşları tarafından RA ve cAMP'nin kullanıldığı bir protokol geliştirilmiştir. Bu yöntemde ilk vasküler düz kas hücreleri EB'lerin ekiminden 14 gün sonra görülmüştür (Drap 1997, Wobus 2001). Sistik EB'lerin içerisinde ilk tanımlanan endotelial hücre serileridir ve kan adacıklarına benzer yapılar içerisinde primitif eritrositler tanımlanmıştır (Keller 1995).

1.9.Embriyonik Kök Hücrelerin Nöral Farklılaşması

Memelilerin sinir sisteminin karmaşık gelişimi, embriyogenesis ve erken postnatal hayat sırasında bir dizi epigenetik ve hücrel endojen sinyalleri ile kontrol edilir (Luskin 1994). Normal embriyo gelişimi sırasında, iç hücre kitesinden primitif ektoderm gelişir. Gastrulasyon sırasında ise primitif ektodermden, mezoderm, endoderm ve ektoderm gelişir. Ektodermden sinir sistemini oluşturan nöroektoderm meydana gelir (Smith ve Beddington 1993, Bain 1995).

Embriyonik kök hücrelerin *in vitro* farklılaşma kapasiteleri çok yüksektir. EB'lerin spontan farklılaşma süreci boyunca nöron benzeri hücreler tüm hücrelerin küçük bir yüzdesini oluştururlar. *In vitro* da nöral farklılaşma ilk olarak EC hücrelerinde denenmiştir. P19 (EC hücre hattı) hücrelerinin Retinoik asit ile muamele edilmesi sonucu bu hücreler nöral hücrelere farklılaşmışlardır (Bain 1995).

In vitro olarak RA uygulanması ile EK hücrelerin nöral farklılaşmaları başlatır. EK ve EC hücrelerine retinoik asidin zaman ve konsantrasyon bağımlı uygulanması ile nöral, kardiyak, miyojenik ve adipojenik farklılaşma indüklenir (Guan 2001). EK hücrelerinden oluşan agregatlarda, nöroektodermal hücrelerin oluştuğu gelişimin erken aşamasında yüksek konsantrasyonda RA (1µM-100 nM) uygulanmasıyla nöronal farklılaşmada anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Fraichard 1995, Bain 1995, Strübing 1995, Gajovic 1997).

RA ile indüklenen hücreler, postmitotik sinir hücrelerinin kompleks elektrofizyolojik ve immunositokimyasal özelliklerini gösterirler ve nöron-spesifik genleri eksprese ederler (Rohwedel 1998). Nöronal farklılaşma faktörlerinin varlığında, EK hücrelerinde türeyen nöral prekürsör hücreler serotonerjik, glutamaterjik, GABAerjik ve dopaminerjik nöronlara ve glial hücrelere farklılaşırlar (Okabe 1999, Lee 2000, Liour 2003).

Fare EK hücrelerinde başarı ile uygulanan nöral farklılaşma insan EK hücreleri üzerinde de uygulanmıştır. İnsan EK hücrelerine RA uygulanması sonucunda nöral hücreler elde edilmiştir (Schuldiner 2000, Schuldiner 2001). RA haricinde nöral farklılaşmanın uyarılması için β NGF (Beta Nerve Growth Factor, beta sinir büyüme hormonu), FGF (Fibroblast growth factor, fibroblast büyüme faktörü), N2 medyumu da kullanılmıştır (Schuldiner 2001, Calhoun 2003, Schulz 2003).

2. AMAÇ ve KAPSAM

Bu bölümde sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerin yapılarıyla ilgili açıklamalara yer verilecektir. Deneyin ilk aşamasında EK hücreleri fare embriyonik fibroblastları üzerinde ve LIF varlığında kültüre edilerek, pluripotent hücre özelliklerini korumaları sağlanmıştır. İkinci aşamada, EK hücrelerin spontan farklılaşma özellikleri incelenmiştir. Son aşamada ise, EK hücrelerin kontrollü nöral farklılaşması incelenmiştir. Nöral farklılaşmayı başlatabilmek için RA kullanılmıştır. Ra'ın kültüre uygulanma zaman ve konsantrasyonları değiştirilerek nöral farklılaşma üzerine etkileri incelenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Besleyici Hücre Tabakalarının Hazırlanması

Çalışmada 13,5 günlük gebe farelerden elde edilen embriyolardan hazırlanmış olan fare embriyonik fibroblastları (Primer Mouse Embryonic Fibroblast; PMEF) kullanılmıştır. Dondurulmuş olan PMEF hücrelerinin 37 °C su banyosunda çözülmesi sağlandı ve hücreler DMEM'li besiyeri (Ek 1) içeren 100 mm'lik petri kaplarına ekildi. Fibroblastların 100 mm'lik

petri yüzeyini tamamen kaplamasının ardından hücrelerin mitotik aktivasyonunun durdurulması için besiyeri uzaklaştırılıp 10 ml mitomisinli besiyeri (Ek 2) uygulandı ve %5 CO₂ li 37 °C inkübatörde 2,5 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler, PBS (Ek 3) çözeltisi ile yıkandı ve %0,25 Tripsin-EDTA (Sigma) solüsyonu uygulandı ve 5 dakika %5 CO₂ li 37 °C inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin üzerine DMEM çözeltisi uygulandı ve tek hücre süspansiyonu elde edildi. Tek hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplere alındı. 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre peleti 1 ml besiyeri ile sulandırıldı. Fibroblastlar tomla lamı yardımıyla ışık mikroskobunda sayıldıktan sonra mililitrede 400 000 olacak şekilde besiyeriyle sulandırıldı. Ekim yapılacak olan 60 mm'lik ve 4 kuyulu petrilere üzerine önceden uygulanan jelatin (Ek 4) çözeltisi (en az yarım saat oda sıcaklığında beklemiş olmak koşuluyla) uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu jelatinli petrilere ekildi. Hazırlanan besiyeri bir hafta içerisinde kullanıldı. Bir haftadan sonra yeni besleyici tabakalar oluşturuldu.

3.2. Besleyici Tabakalar Üzerinde EK Hücrelerin Kültürü

Deneyisel çalışmada kullanılan besiyeri ve bileşenlerinin oranları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. EK hücre besiyeri ve bileşenleri

EK Hücre Besiyeri Bileşenleri
-DMEM (yüksek glikozlu ve sodyum piruvat içeren)
-%15 FCS (EK hücre için özel)
-% 1,2 MEM aminoasit çözeltisi
-%1,2 L-glutamin
-%0,01 Mercaptoethanol
-%0,3 Antibiyotik solüsyonu
- Lösemi İnhibe Edici Faktör (LIF)

Çalışmamızda, farklılaşmayı önlemek için LIF geni ile transfeksiyona uğramış COS hücrelerinin süpernatantları kullanılmıştır.

Çalışmada Andras Nagy'den temin edilen ve TÜBİTAK-GMBAE'de (Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü) çoğaltılan R1 embriyonik kök hücre hattı kullanıldı. Hücreler, 60 mm'lik petrilere hazırlanan besleyici tabakalar üzerine ve LIF uygulanarak 5 ml besiyerinde 2,000,000 sayıda ekildi. Bu hücreler deney çalışması boyunca kullanılacak olan stok hücreleri oluşturdu. EK hücrelerin besiyerleri her gün değiştirildi ve hücreler gün aşırı pasajlandılar.

3.3. DENEY GRUPLARI

3.3.1. EK HÜCRELERİN KÜLTÜRÜ

Deney grubunda R1 EK hücreleri besleyici tabakalar üzerinde kültüre edildiler. Hücrelerin farklılaşmasını önlemek için LIF geni ile transfekte edilmiş COS hücrelerin süpernatantları kullanıldı. COS süpernatantının 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 ve 1/2000 dilüsyonları test edildi. 1/200 dilüsyonda hücrelerin koloni morfolojilerini korudukları tespit edildi.

Besleyici tabakalar 4 kuyulu petrilere hazırlandı. Hücreler 4 kuyulu petrilere hazırlanan besleyici tabakaların üzerine kuyu başına 300,000 olacak şekilde ekildi. 1/200 dilüsyonda COS süpernatantı besiyerine eklendi. Hergün besiyeri değiştirildi ve kültürün ikinci gününde EK hücreler % 4 paraformaldehit ile fikse edildi.

Pluripotensiyi göstermek için, SSEA-1 ve Oct-4 immunreaktivite ve ALP aktivite kontrol edildi. İmmunreaktivite kontrolleri Axivert 35 M İnvirt Mikroskopta (Zeiss) 5X, 10X, 20X, 40X büyütmelemlerde incelendi (Oküler büyütme 10X).

3.3.2. EK HÜCRELERİN FARKLI LAŞMASI

EK hücrelerin spontan ve kontrollü nöronal farklılaşması incelenmiştir. Farklılaşma sonucunda oluşan hücreler immunositokimyasal ve histolojik boyama yöntemleriyle tespit edildi.

Yapılacak olan immunositokimya boyamaları, EB'lerin ekimi takiben 2., 5., 7 ve 9. günlerde hücrelerin % 4 paraformaldehit ile fikse edilmelerinin ardından Nestin, Creysl Violet, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM), Aktin, Vimentin ve GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ile yapıldı.

Spontan farklılaşma deneyinde ise 2., 5., 7, 9, 12 ve 15. günlerde boyamalar yapılmıştır. 12 ve 15.günde de fikse edilen EB'ler, Nestin, GFAP, NCAM, Aktin ve Vimentin boyaları ile analiz edildiler.

Aşağıdaki boyama protokolü tüm deney gruplarına uygulanmıştır.

2. günde fikse edilen EB'ler, Nestin ve Creysl Violet boyaları ile analiz edildiler.

5. günde fikse edilen EB'ler, Nestin, Creysl Violet, NCAM, Aktin ve Vimentin boyaları ile analiz edildiler.

7. günde fikse edilen EB'ler, Nestin, GFAP, NCAM, Aktin ve Vimentin boyaları ile analiz edildiler.

9. günde fikse edilen EB'ler, Nestin, GFAP, NCAM, Aktin ve Vimentin boyaları ile analiz edildiler.

Kontrollü nöronal farklılaşma esnasında membrandaki değişimleri göstermek amacıyla spektrometrik analiz yapılmıştır. 2 günlük EB'lerin ekimi sonrası 3 gün RA uygulanmış gruba 2 ve 11.günlerde spektrometrik analiz yapıldı.

3.3.2.1. Embriyoid Cisim (Embryoid Body, EB) Oluşumu

Besleyici tabakaların üzerindeki EK hücreleri tripsinlenerek petri yüzeyinden kaldırıldı ve tek hücre süspansiyonu haline getirildiler. Ortamdan besleyici hücre tabakasının uzaklaştırılması için, önceden jelatinlenmiş 100 mm'lik kültür petrilere hücre süspansiyonu ekildi ve 20 dakika %5 CO₂ li 37 °C inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler besiyeri ile birlikte 15 ml'lik falkon tüpe alındılar ve santrifüj edildiler. Elde edilen pelet toma lamı ile sayılarak, 60 mm'lik bakteriyolojik kültür petrilere 5 ml'de 2,000,000 olacak şekilde ekildiler. Çalışmada, hücrelerin yüzeye yapışmalarına olanak vermeyerek birbirleri ile birleşerek EB'lerin oluşmasını sağlayan bakteriyolojik petri kapları kullanıldı.

Böylece süspanse EB kültürü elde edilmiş olur. Oluşturulan EB'lerin, yapılan çalışmaya göre farklı günlerde kültür petrilere ekimleri yapıldı.

3.3.2.2.EK Hücrelerin Spontan Farklılaşması

Süspanse kültürde EB'ler hazırlandı. EK hücrelerin bakteriyolojik petri kaplarına ekildikleri gün kültürün birinci günü olarak kabul edildi. Süspanse kültürdeki EB'lerin dört gün boyunca LIF içermeyen besiyeri ile kültürleri yapıldı. Kültürün dördüncü gününde EB'ler, önceden jelatinlenmiş 4 kuyulu petrilere her kuyusuna, stereo mikroskop altında seçilerek kuyu başına 3-4 adet olacak şekilde ekildi. 4 kuyulu petrilere hazırlanan deney gruplarının haricinde jelatinlenmiş iki adet 100 mm'lik petri kabına 50'şer EB ekildi. Bir adet 100 mm'lik petri içerisindeki EB'ler, kültürlerinin 12. gününde fikse edilerek Hematoksilin-eozin (H-E) boyaması yapıldı ve hücre morfolojileri gösterildi. Diğer 100 mm'lik petri içerisindeki EB'lere boyama işlemi yapılmadan 30 gün boyunca kültürleri devam ettirildi ve hücrelerin gelişimi kontrol edildi. Ekim sonrasında LIF içermeyen besiyeri ile kültürlere devam edildi. Besiyerleri her gün değiştirildi.

3.3.3. Nöral Farklılaşma

Süspanse kültürde elde edilen EB'ler, kültürün farklı günlerinde ve farklı konsantrasyonlarda RA ile muamele edilerek nöral farklılaşmanın başlaması sağlandı. Farklılaşan hücreler immunositokimya ile gösterildi.

3.3.3.1. 4 Gün -/4 Gün + RA Uygulanması

Süspanse kültürdeki EB'lerin dört gün boyunca LIF ve RA içermeyen besiyeri ile kültürleri yapıldı. Besiyeri her gün değiştirildi. 4. gün taze besiyerine 10 mM stok RA (Ek 5) çözeltisinden final konsantrasyonu 1 μ M olacak şekilde ilave edildi. RA içeren besiyeri ile EB'ler 4 gün daha kültüre edildiler. RA içeren besiyeri gün aşırı değiştirildi. Sonuç olarak EB'ler 4 gün RA içermeyen, 4 gün de RA içeren besiyeri ile kültürleri yapıldı.

Süspanse EB kültürünün 8.günüde EB'ler, önceden jelatinlenmiş 4 kuyulu petrilerin her kuyusuna, stereo mikroskop altında seçilmiş olan 3-4 adet EB ekildi. Ekim sonrasında LIF ve RA içermeyen besiyeri ile kültür devam ettirildi. Besiyerleri her gün değiştirildi.

Ekimin ardından 2, 5, 7 ve 9. günlerde hücreler fikse edilerek immunositokimyasal ve histolojik boyama işlemleri yapıldı.

3.3.3.2. 0-2 Günler Arasında RA Uygulanması

Süspanسیون EB kültürü için hazırlanan EK hücreler, bakteriyolojik petrilere ekildiler. Ekildikleri gün kültürün 0. günü olarak kabul edildi ve 0-2. günler arasında EB kültürüne LIF içermeyen besiyeri içine 10 mM stok RA (Ek 5) çözeltisinden final konsantrasyonu 1 μ M olacak şekilde ilave edildi. RA içeren besiyeri her gün değiştirildi. 2. günün sonunda oluşan EB'ler önceden jelatinlenmiş 4 kuyulu petrilerin her kuyusuna 3-4 adet EB ekildi. Ekim için 2 günlük EB'ler kullanılmıştır. Ekim sonrasında LIF ve RA içermeyen besiyeri ile kültürleri yapıldı.

Ekimin ardından 2, 5, 7 ve 9. günlerde hücreler fikse edilerek immunositokimyasal ve histolojik boyama işlemleri yapıldı.

3.3.3.3. 2 Günlük EB'lerin Ekilmesi ve Ekim Sonrası 3 Gün RA Uygulanması

Süspanse kültürde hazırlanan 2 günlük EB'ler önceden jelatinlenmiş kültür petrilere ekildi ve ekildikleri günden itibaren üç gün boyunca besiyerine 10 mM stok RA (Ek 5) çözeltisinden final konsantrasyonu 1 μ M olacak şekilde ilave edildi. RA içeren besiyeri her gün değiştirildi. Üçüncü günün sonunda besiyerinden RA uzaklaştırıldı. RA ve LIF içermeyen besiyeri her gün değiştirildi. RA'ın uzaklaştırılmasının ardından 2, 5, 7 ve 9. günlerde ekilmiş olan EB'ler fikse edilerek immunositokimyasal ve histolojik boyama işlemleri yapıldı.

3.3.3.4. 2 Gün -/3 Gün + Farklı Konsantrasyonlarda RA Uygulanması

Süspanse kültürdeki EB'lerin iki gün boyunca LIF ve RA içermeyen besiyeri ile kültürleri yapıldı. Besiyeri her gün değiştirildi. 3. gün taze besiyerine 10 mM stok RA (Ek 5) çözeltisinden final konsantrasyonu 50 nM, 100 nM, 1 µM ve 3µM olacak şekilde ilave edildi. RA içeren besiyeri ile EB'ler 3 gün daha kültüre edildiler. RA içeren besiyeri her gün değiştirildi. Süspanse EB kültürünün 5. günündeki EB'ler, jelatinlenmiş kültür petrilere 3-4 adet olacak şekilde ekildiler. Ekim sonrasında LIF ve RA içermeyen besiyeri ile kültürleri yapıldı. RA'ın konsantrasyon değişiminin nöral farklılaşma üzerindeki etkileri araştırıldı.

Her konsantrasyon grubu için , ekimin ardından 2, 5, 7 ve 9. günlerde hücreler fikse edilerek immunositokimyasal ve histolojik boyama işlemleri yapıldı.

4. ANALİZ METODLARI

4.1. SSEA-1 İmmünohistokimyasal boyanması

Dört kuyulu petrilere mitomisin uygulanmış fibroblastlar ekilerek besleyici tabakalar hazırlandı. Besleyici tabakalar üzerine ekilen EK hücreler COS süpernatanı içeren besiyeri ile iki gün kültüre edildikten sonra % 4 paraformaldehit (PFA) ile 20 dakika muamele edilerek fikse edildiler.

Bu çalışmada % 5 keçi serumu içeren PBS blok çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor SSEA-1 (Santa Crus Sc-21702) dilüsyonu 1:50; sekonder antikor anti-mouse IgM FITC (SİGMA F-9259) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan , oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra PBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C'de inkübe edildiler. Ertesi gün PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.2. Alkalın Fosfataz Aktivitesi Tayini

Dört kuyulu petrillerdeki besleyici tabakalar üzerine ekilen hücreler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Fast red tabletler (SIGMA F-4523) tris tamponda (Ek 6) çözüldükten sonra örneklerin yüzeyini kaplayacak miktarda kuyulara uygulandı. Bir saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra kuyular PBS ile yıkandı ve mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.3. Oct-4 İmmünohistokimyasal boyanması

Dört kuyulu petrillerdeki besleyici tabakalar üzerine ekilen hücreler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Bu çalışmada %3 keçi serumu, % 0,1 TritonX-100 ve %1 polivinilprolin (PVP) (Ek 7) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (Ek 8) çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor Oct-4 (Santa Crus Sc-5279) dilüsyonu 1:100; sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan, oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra HBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C’de inkübe edildiler. Ertesi gün Yıkama çözeltisi (Ek 9) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.4 . NCAM İmmünohistokimyasal boyanması

Nöral hücre adhezyon molekülü (NCAM); nöronların hücrelerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Dört kuyulu petrilere ekilen EB’ler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Bu çalışmada %3 keçi serumu, % 0,1 TritonX-100 ve %1 polivinilprolin (PVP) (Ek 7) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (Ek 8) çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor NCAM (SIGMA C-9672) dilüsyonu 1:150; sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan , oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra HBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C’de inkübe edildiler. Ertesi gün

Yıkama çözeltisi (Ek 9) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.5. Aktin İmmünohistokimyasal boyanması

Aktin; kültürdeki mezenşimal hücrelerin, özellikle kas hücrelerinin; belirlenmesi için kullanılmıştır. Dört kuyulu petrilere ekilen EB'ler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Bu çalışmada %3 keçi serumu, % 0,1 TritonX-100 ve %1 polivinilpropolin (PVP) (Ek 7) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (Ek 8) çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor Aktin (SIGMA A-2066) dilüsyonu 1:150; sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan, oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra HBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C'de inkübe edildiler. Ertesi gün Yıkama çözeltisi (Ek 9) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.6. Vimentin İmmünohistokimyasal boyanması

Vimentin boyası kültürdeki mezenşimal hücrelerin varlığını göstermek için kullanılmıştır. Dört kuyulu petrilere ekilen EB'ler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Bu çalışmada %3 keçi serumu, % 0,1 TritonX-100 ve %1 polivinilpropolin (PVP) (Ek 7) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (Ek 8) çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor Vimentin (SIGMAC-9080) dilüsyonu 1:200; sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan, oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra HBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C'de inkübe edildiler. Ertesi gün Yıkama çözeltisi (Ek 9) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.7. GFAP İmmünohistokimyasal boyanması

Glial fibriller asidik protein (GFAP); kültürde oluşan glial hücrelerin (asositler, mikroglialar v.b) belirlenmesi için kullanılmıştır. Dört kuyulu petrilere ekilen EB'ler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Bu çalışmada %3 keçi serumu, % 0,1 TritonX-100 ve %1 polivilinpropolin (PVP) (Ek 7) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (Ek 8) çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor GFAP (Neomarkers MS-1376-P) dilüsyonu 1:300; sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan , oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra HBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C'de inkübe edildiler. Ertesi gün Yıkama çözeltisi (Ek 9) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.8. Nestin İmmünohistokimyasal boyanması

İntermediyet filament olan nestin ile kültürdeki nöral öncüller belirlenmiştir. Dört kuyulu petrilere ekilen EB'ler % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildiler. Bu çalışmada %3 keçi serumu, % 0,1 TritonX-100 ve %1 polivilinpropolin (PVP) (Ek 7) içeren yüksek tuzlu tampon (High Salt Buffer; HBS) (Ek 8) çözeltisi kullanıldı. Aynı blok çözeltisi kullanılarak primer antikor Nestin (BD Bioscience Phar. 611658) dilüsyonu 1:200; sekonder antikor anti-mouse IgG FITC (SIGMA F-5262) dilüsyonu 1:128 oranında hazırlandı. Fikse edilen örnekler PBS çözeltisi ile yıkandıktan , oda sıcaklığında 45 dakika blok çözeltisinde bekletildikten sonra HBS ile yıkandı. Primer antikor ile gece boyu + 4 ° C'de inkübe edildiler. Ertesi gün Yıkama çözeltisi (Ek 9) ve HBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor dilüsyonunda bir saat oda sıcaklığında bekletildiler. Yıkamanın ardından mikroskopta boyamalar kontrol edildi.

4.9. Histolojik Boyamalar

Krezil Violet ve Hematoksilen-Eozin (H-E) boyamaları yapılmıştır. Krezil Violet boyaması için; % 4 PFA ile 20 dakika fikse edildilen EB'ler PBS ile yıkandı. %95 etil alkol %5 Glasial Asetik asit çözeltisi ile -20 ° C'de 20 dakika inkübe edildi. Yıkamanın ardından 2 dakika krezil violet boya solüsyonu ile EB2ler boyandı. PBS ile yıkandıktan sonra

mikroskopta incelemeler yapıldı. Boyama sonucunda sinir hücrelerindeki nissl tanecikleri mavi renkte, sitoplazma ise eflatun renkte gözlemlendi.

H-E boyaması için; % 4 PFA ile 20 dakika fikse edilen EB'ler PBS ile yıkandı. Dehidratasyon işlemlerinden geçirilen (%100 alkolden %70 alkole azalan oranlarda geçiş yapılması) EB'ler hematoksilin boyası ile 3 dakika muamele edildi. PBS ile yıkamanın ardından eozin boyası ile 3 dakika boyandı ve %70, %80, %90 ve %100 alkollerden geçirildi. Son olarak PBS ile yıkandıktan sonra mikroskopta inceleme yapıldı. Boyama sonucunda hücrelerin sitoplazmaları pembe renkte, çekirdek ise mavi renkte gözlemlendi. H-E boyası ile kültürdeki hücrelerin genel morfolojileri belirlendi.

4.10. Spektrometrik Analiz

2 - / 3 + RA uygulanan EB'ler önceden jelatinlenmiş 35 mm'lik petrilere ekildiler. Ekimin sonrası LIF ve RA içermeyen besiyeri ile kültür devam ettirildi. Kültürün 2 ve 11.günü hücreler tripsin ile petri yüzeyinden kaldırıldı. 1 ml PBS içerisinde 1,000,000 hücre olacak şekilde hazırlandılar. Negatif kontrol için farklılaşmamış EK hücreler hazırlandı.

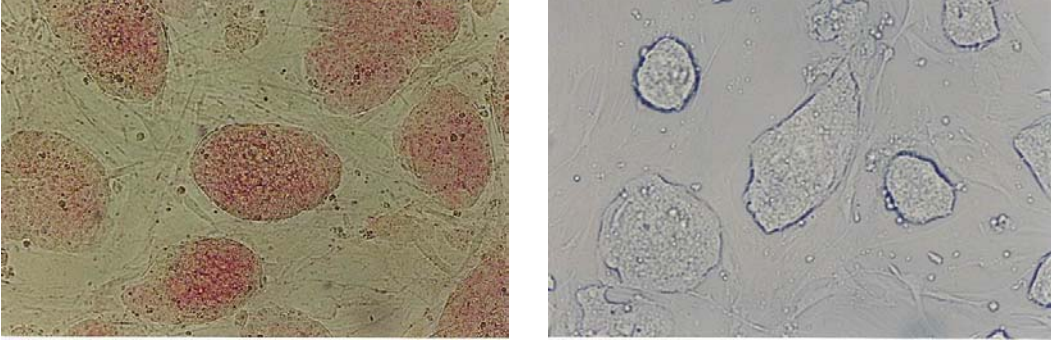
Spektrometrik analiz için, aborbans 0,1'e ayarlandı. PBS içerisindeki hücreler F4A1 probu ile flouresans yoğunlukları kontrol edildi. Membranlarda meydana gelen polarite farkı gösterildi.

5. SONUÇLAR

5.1. EK Hücrelerin Kültürü

5.1.1. Alkalin Fosfataz Aktivitesi Tayini

Besleyici hücre tabakası üzerinde kültüre edilen EK hücre kolonilerin tamamı ALP aktivitesi gösterdi.



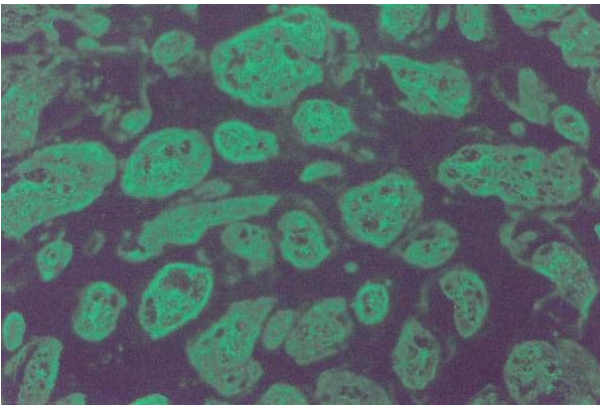
A)

B)

Şekil 5.1. Besleyici tabaka üzerindeki R1 kolonileri (20X).A)ALP fosfataz aktivitesi (+) B) MEF üzerindeki boyanmamış koloniler.

5.1.2. SSEA-1 Immunboyaması

Besleyici hücre tabakası üzerinde kültüre edilen EK hücre kolonileri SSEA-1 immün reaktivitesi gösterdi. Kolonilerin çevreleri daha parlak tonda boyandı.



Şekil 5.2. Besleyici tabaka üzerindeki R1 kolonilerinin SSEA-1 immünboyaması (20X)

5.1.3. Oct-4 Immunboyaması

Besleyici hücre tabakası üzerinde kültüre edilen EK hücre kolonileri Oct-4 immün reaktivitesi gösterdi. Koloniler çok parlak tonlarda boyanmadığı için görüntü alınamadı.

5.2. EK Hücrelerin Farklılaşması

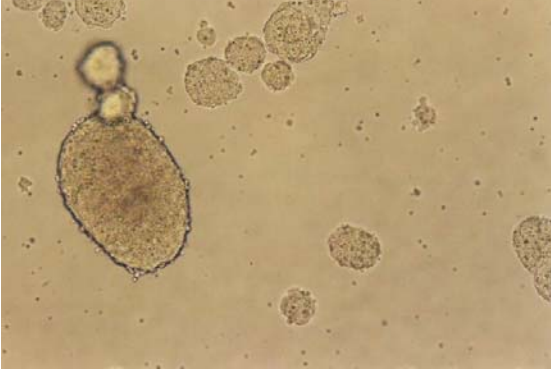
5.2.1. Embrioid Cisim (Embryoid Body, EB) Süspansiyon Kültürü

Süspansiyon kültürde RA ilave edilmeden oluşturulan EB'ler, kültürün ilk gününden itibaren kontrol edildi ve çapları ölçüldü. Birinci gün EB'lerin çapları 70- 300 µm arasında değişim gösterdi. İkinci gün çaplar; 150-470 µm arasında değişim gösterdi. Üçüncü günde çaplar; 200-500 µm ve dördüncü günde ise 200-600 µm arasında değişim gösterdi.

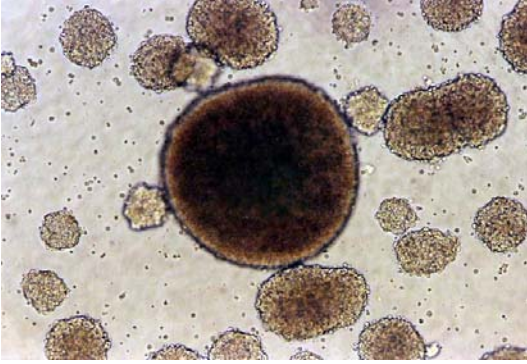
Dördüncü günden sonra EB'lerin çaplarının ölçümü yapılmadı fakat kültürde devam eden yapısal değişiklikler gözlemlendi. EB'ler kültürün sekizinci güne kadar kompakt görünümünü, yuvarlak ve düzgün morfolojilerini kaybetmediler. Kültürün sekizinci gününde EB'ler morfolojik özelliklerini kaybetmeye ve blastosist görünümüne benzeyen bir görünüm sergilemeye başladılar.

Kültürün onuncu gününde; EB'lerin iç kısımlarında kalp atımına benzer şekilde atımlar gözlemlendi. Bu atımlar kültürün devam eden günlerinde de gözlemlendi. İlerleyen dönemlerde kompakt yapılarını tamamen kaybettikleri; şeffaf ve şişmiş bir balonu andıran yapılar oluşturdukları gözlemlendi. Bu yapılar içerisinde de atımların devam ettiği görüldü.

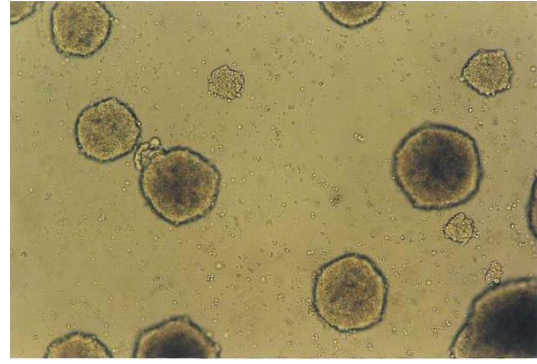
Aynı deneme RA verilen EB'lere de uygulandı. RA verilen EB'lerin ilk dört günündeki çapları RA verilmeyen EB'ler ile aynı idi. Kültürün devam eden günlerinde EB'ler de atım gözlemlenmedi. EB'ler kültür boyunca kompakt görünümünü, yuvarlak ve düzgün morfolojilerini korudular.



Şekil 5.3. Süspanse kültür 1 günlük EB'ler. 70-300 μm çaplarındaki EB'ler (10X)



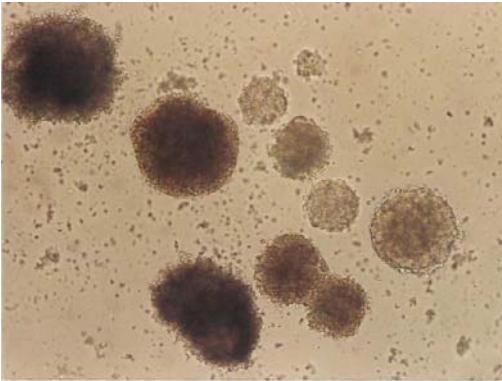
A)



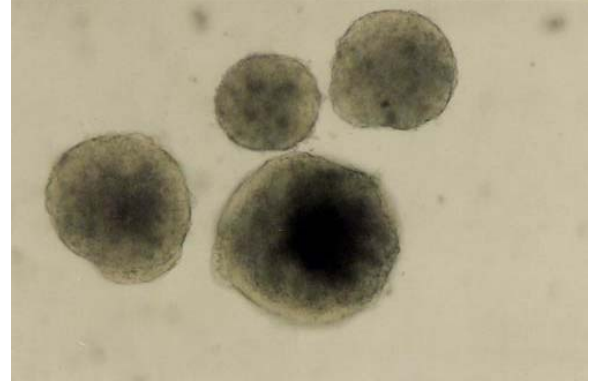
B)

Şekil 5.4. Süspanse kültür EB'ler. A) 2. gün 150-470 μm çaplarındaki EB'ler (10X)

B) 3. gün 200-500 μm çaplarındaki EB'ler (10X).



A)



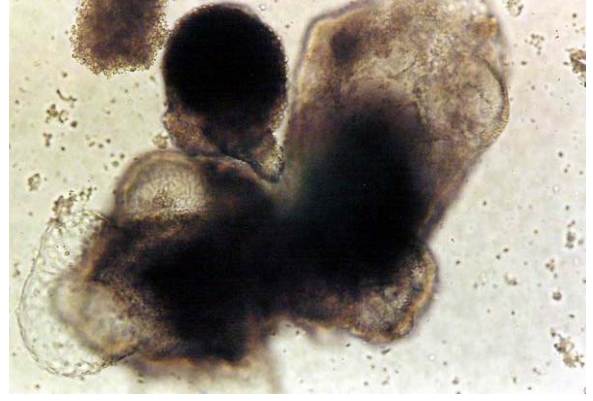
B)

Şekil 5.5. Süspanse kültür EB'ler. A) 4. gün 200-600 μm çaplarındaki EB'ler (10X)

B) 6. gün 600 μm çaplarındaki EB'ler (10X).

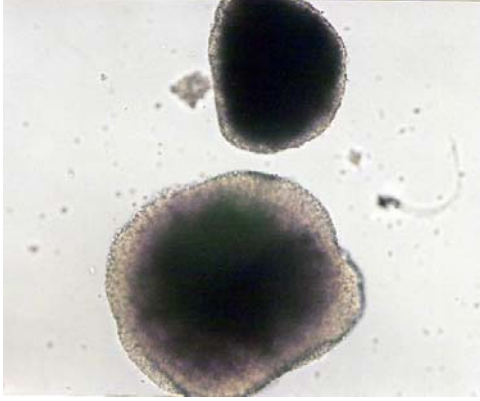


A



B

Şekil 5.6. Süspanse kültür EB'ler. A) 8. gün blastosist görünümündeki EB'ler (10X)
B) 10. gün atım gösteren EB (10X).



Şekil 5.7. Süspanse kültür EB'ler. A)12. gün 4-/4+ RA uygulanmış EB.Kompakt görünüm korunmaktadır (10X).

5.2.2. EK Hücrelerin Spontan Farklılaşması

4 günlük EB'lerin petrilere ekimlerinin ardından 2, 5, 7, 9, 12 ve 15. günlerde immun boyamalar ve histolojik boyama yapıldı. 100 mm'lik petriye 50 adet EB ekildi ve kültürün 17. gününde H-E boyaması yapılarak hücrelerin morfolojileri gösterildi. Bir başka 100 mm'lik petrideki EB'ler ise 30 gün boyunca kültüre edildiler.

2. günde; Nestin ile yapılan boyama sonucu hücrelerin uç kısımlarında nestin pozitif alanlara rastlandı. Nestin immunreaktivitesi kuvvetli değildi. Nöronların sitoplazmalarında

bulunan nissl taneciklerini göstermek için kullanılan krezil violet boyaması yapıldı. Creysl violet boyama sonucunda; az sayıda hücrede pozitiflik gözlemlendi.

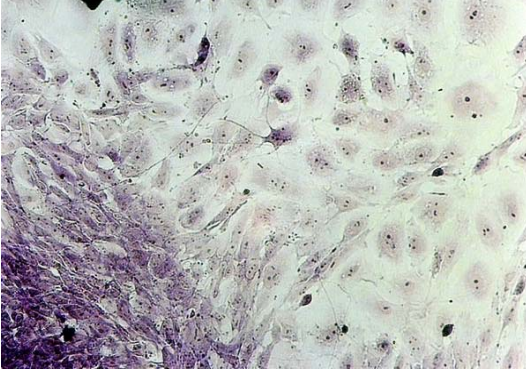
5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesi artış göstermesine rağmen, parlak bir boyanma gözlemlenmedi. Yapılan krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. NCAM ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. Zayıf sinyal vermesine rağmen vimentin pozitif hücreler görüldü.

7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi. Nestin pozitif hücreler kolaylıkla ayırt edildi. Zayıf sinyal vermesine rağmen NCAM, Aktin, Vimentin ve GFAP pozitif hücreler görüldü.

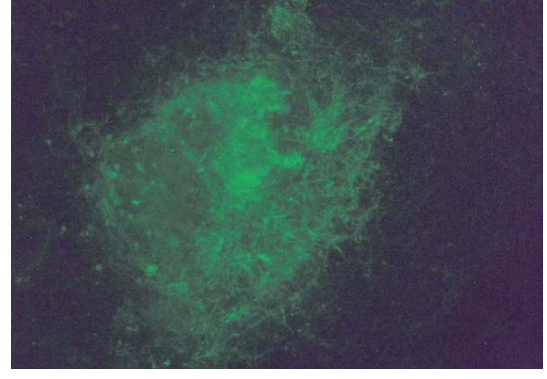
9. günde; Nestin kuyusunda, kuvvetli bir immunreaktivite gözlemlendi. Ancak bugünde nöral öncül hücreler tam olarak gözlemlenmiştir. Nöral öncül hücrelerin (nestin pozitif hücreler) hücre sınırları ayırt edilebiliyordu. Zayıf sinyal vermesine rağmen NCAM, Aktin, Vimentin ve GFAP pozitif hücreler görüldü.

12. ve 15. günde; Nestin kuyusunda immunreaktivitesi 9. güne oranla azalmış olarak gözlemlendi. Sadece kenar kısımlarda bulunan hücrelerde pozitiflik görüldü. NCAM, Aktin, Vimentin ve GFAP kuyularında ise 9. güne oranla immunreaktivite artış göstermiş fakat parlak tonda bir boyanma tam olarak gözlemlenmedi.

Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama sonucu; 17. gününde kültürleri durdurulan kontrolsüz farklılaşma petrisinde hücre morfolojileri H-E ile boyanmıştır. Boyama sonucunda, farklı hücre tiplerine rastlanmıştır. Farklılaşan hücrelerin çoğunluğu mezenşimal kökenli hücrelere benzemektedirler. Hücrelerin bir kısmı, içsi yapılarıyla fibroblast benzeri hücrelere, atım gösteren hücreler ise kalp kası hücrelerine benzemektedirler. Sinir hücrelere benzer hücreler görüldü. Bu hücreler birbirleri arasında sinir ağları oluşturmuşlardı.

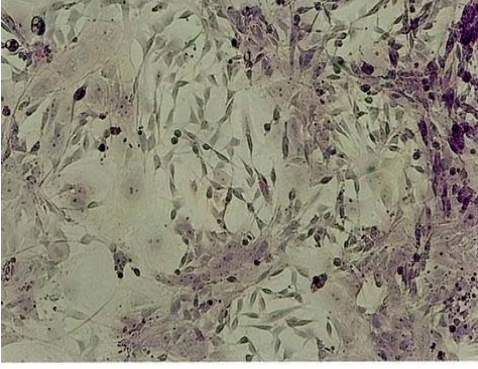


A



B

Şekil 5.8. Kontrolsüz farklılaşma. A) 5. gün Creyls Violet boyası. Nöron benzeri hücreler sinir ağları oluşturmuş (20X) B) 9. gün Nestin (+) EB (10X).

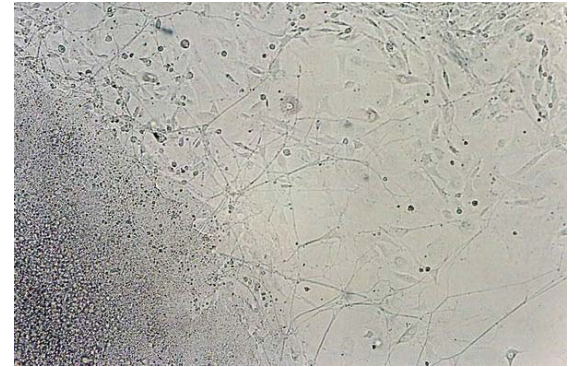


A

Şekil 5.9. Kontrolsüz farklılaşma. A) 17. gün H-E boyası Mezenşimal orijinli hücreler (20X).

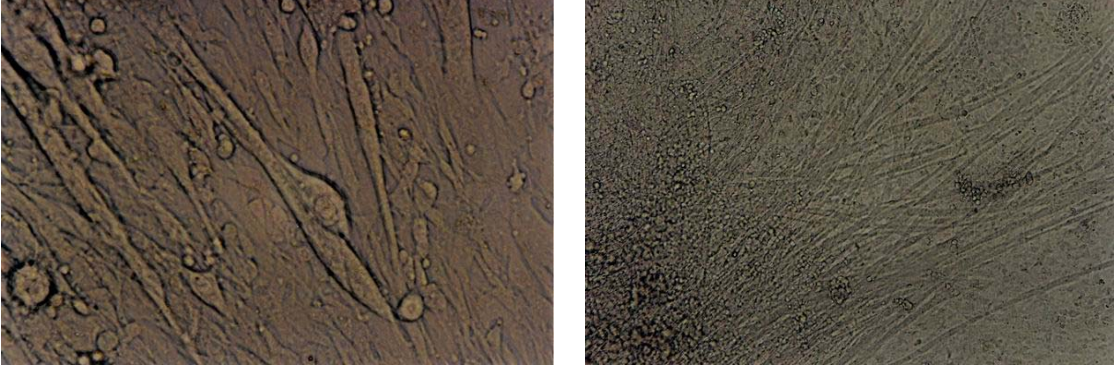


A



B

Şekil 5.10. Kontrolsüz farklılaşma. A) 17. gün H-E boyası Nöron benzeri hücreler ve sinir ağları (20X). B) 8. gün Nöron benzeri hücreler sinir ağları oluşturmuş (20X)



A

B

Şekil 5.11. Kontrolsüz farklılaşma, atım gösteren hücreler A) 17. gün kalp kası hücreleri (10X). B) 30. gün kalp kası hücreleri (10X)

5.3. Nöral Farklılaşma

5.3.1. 4 Gün -/4 Gün + RA Uygulanması

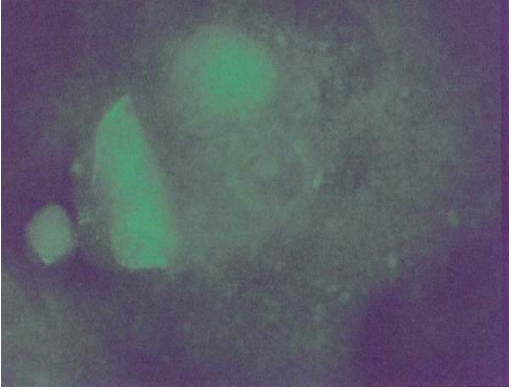
4 gün RA içermeyen besiyeri ile oluşturulan EB'lere 4 gün RA uygulanmasının ardından, EB'ler petrilere ekilmiş ve 2, 5, 7 ve 9. günlerde immünohistokimyasal ve histokimyasal boyamalar yapıldı.

2. günde; Nestin ile yapılan boyama sonucu hücrelerin büyük kısmında kuvvetli immunreaktivite gözlemlendi. Nöral öncül hücreler tek tek gözlemlenmiştir. Uygulanan RA, EB'lerin nöronal farklılaşmasını uyarmıştır. Nöronların sitoplazmalarında bulunan nissl taneciklerini göstermek için kullanılan krezil violet boyaması yapıldı. Krezil violet boyama sonucunda; hücrelerin çoğunluğunda pozitiflik gözlemlendi.

5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesinde azalma gözlemlenmedi. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda ise immunreaktivite gözlemlendi fakat parlak tonda bir boyanma görülmedi.

7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivite zayıf olarak gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda ise immunreaktivite 5. güne oranla daha parlak bir boyanma gözlemlendi. GFAP kuyusundaki EB'lerde immunreaktivite görüldü.

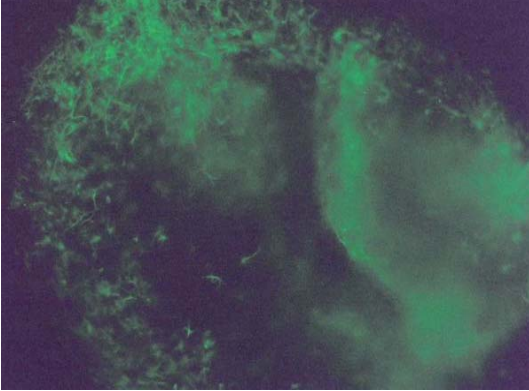
9. günde; Nestin kuyusunda, immunreaktivite gözlemlenmedi. Aktin ve Vimentin kuyularında boyanma görülmedi. NCAM kuyusundaki immunreaktivitede azalma görüldü. Buna rağmen GFAP kuyusunda ise kuvvetli bir immunreaktivite gözlemlendi. Glial hücrelerin öncülleri ilk olarak 7. günde oluşmaya başlamıştır. 9. günde ise olgun glial hücreler meydana gelmiştir.



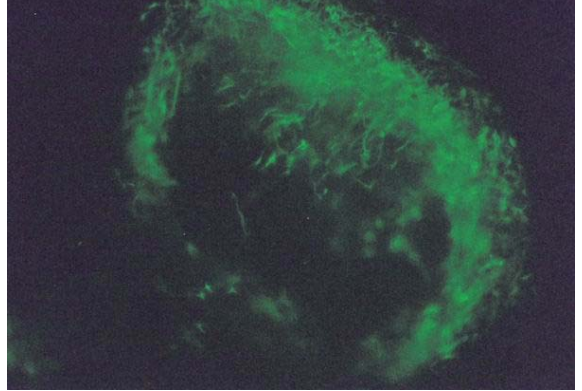
A



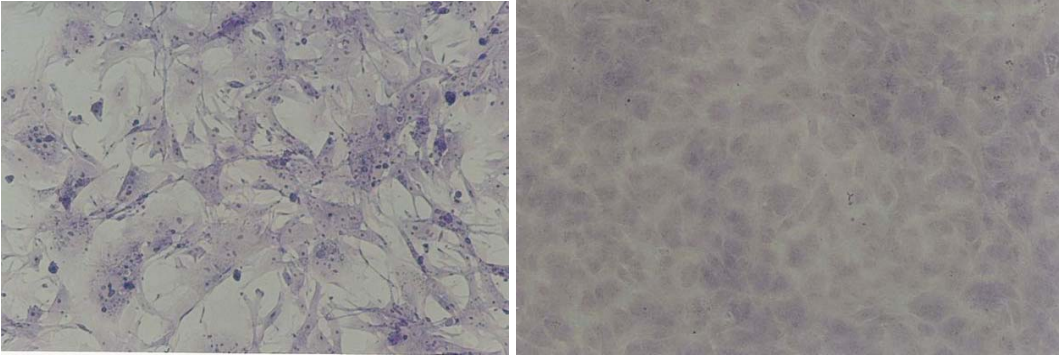
B



C



D



E

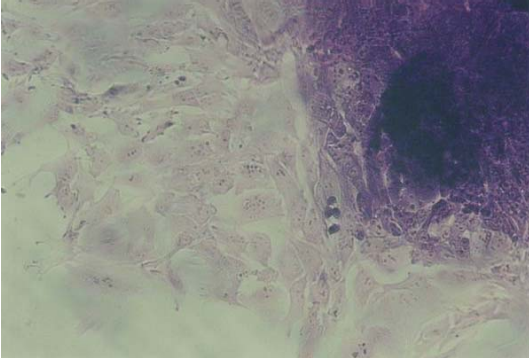
F

Şekil 5.12. 4-/4+ RA uygulaması. A) 2. gün boyama Nestin (+) EB. B) 7. gün NCAM (+) EB C) 7. gün GFAP (+) EB D) 9. gün GFAP (+) E) 5. gün Creysl Violet (+) hücreler F) Kıkırdak hücreleri Creysl Violet boyama, negatif kontrol

5.3.2. 0-2 Günler Arasında RA Uygulanması

EK hücrelerin bakteriyolojik petrilere ekimleri ile birlikte RA 0-2 günler arasında uygulanmıştır. Oluşan EB'ler petrilere ekilmiş ve 2, 5, 7 ve 9. günlerde immun ve histolojik boyama yapılmıştır.

2. günde; Nestin boyaması sonucu zayıf bir immunreaktivite gözlemlendi. Krezil violet boyama sonucunda; az sayıda hücrede pozitiflik görüldü.



Şekil 5.13. 0-2 gün RA uygulaması.2. gün Creysl Violet boyası (20X)

5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesinde artış görüldü yine parlak tonda bir boyanma mevcut değildi.. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda

immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda zayıf bir immunreaktivite gözlemlendi.

7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda zayıf bir immunreaktivite gözlemlendi. GFAP kuyusundaki EB'lerde zayıf bir immunreaktivite görüldü.

9. günde; Nestin kuyusunda zayıf immunreaktivite gözlemlendi. Aktin ve Vimentin kuyularında boyanma görülmedi. NCAM kuyusundaki immunreaktivitede artış görüldü, bazı hücrelerin NCAM pozitifliği daha kuvvetli şekilde görüldü. GFAP kuyusunda boyanma parlak bir tonla gözlemlenmedi.

5.3.3. 2 Günlük EB'lerin Ekilmesi ve Ekim Sonrası 3 Gün RA Uygulanması

Süspanse kültürde oluşturulan iki günlük EB'ler jelatinlenmiş petrilere ekildikten sonra RA uygulanmıştır. Kültür petrilere ekilen EB'lere ekimi takiben 2, 5, 7 ve 9. günlerde immun ve histolojik boyama yapılmıştır.

2. günde; Nestin boyaması sonucu immunreaktivite gözlemlendi. Krezil violet boyama sonucunda; az sayıda hücrede pozitiflik görüldü.

5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesinde artış görüldü yine de parlak tonda bir boyanma mevcut değildi. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi. NCAM pozitif hücreler tek olarak ayırt edilebilmektedirler.

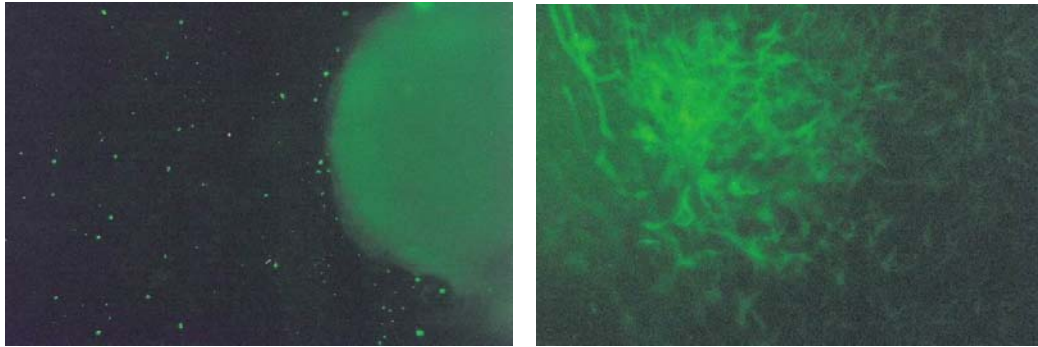
7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda zayıf bir immunreaktivite gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda

immunreaktivitenin devam ettiği gözlemlendi. GFAP kuyusundaki EB'lerde immunreaktivite görüldü.

9. günde; Nestin kuyusunda zayıf immunreaktivite gözlemlendi. Aktin ve Vimentin kuyularında boyanma görülmedi. NCAM kuyusundaki immunreaktivite görüldü, bazı hücrelerin NCAM pozitifliği daha kuvvetli şekilde görüldü. GFAP ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi ve 7. güne oranla immunreaktivitede artış gözlenmiştir.

Yapılan denemeler sonucunda, RA'ın zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak nöronal farklılaşmayı uyardığı gösterilmiştir. Erken dönemdeki EB'lere RA uygulanan grupta nöronal farklılaşma düşük seviyede görülmüş. Kültürün ancak 7. gününde nöral öncül hücreler (nestin pozitif) ortaya çıkmaya başlamıştır. Düşük konsantrasyonda RA uygulanan gruplarda ise, nöronal farklılaşma görülmüş fakat bunun yanı sıra mezenşimal farklılaşmada görülmüştür. Yüksek konsantrasyon uygulanan gruplarda ise mezenşimal farklılaşmaya rastlanmamıştır.

EB'lerin petrilere ekimlerinin ardında RA uygulanması, EB'lere RA uygulanıp ekim yapılan denemelerle benzer sonuçlar vermiştir. Bu grupta da mezodermal ve mezenşimal farklılaşmaya rastlanmamıştır.



A

B

Şekil 5.14. 2 günlük EB'lere RA uygulaması.A) 5. gün NCAM(+) B) 9. gün GFAP

5.3.4. 2 Gün -/3 Gün + Farklı Konsantrasyonlarda RA Uygulanması

İki gün boyunca süspansiyon kültürde oluşturulan EB'lere üç gün RA uygulanmıştır. RA'nın 50 nM, 100 nM, 1 µM ve 3 µM konsantrasyonları denenmiştir. Kültür petrilere ekilen EB'lere ekimi takiben 2, 5, 7 ve 9. günlerde immun boyamalar ve histolojik boyama yapılmıştır.

50 nM RA uygulanan grup :

2. günde; Nestin boyaması sonucu immunreaktivite gözlemlendi. Hücre grubunun orta kısımlarında immun pozitiflik daha yoğun olarak görüldü. Krezil violet boyama sonucunda; az sayıda hücrede pozitiflik görüldü.

5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesinde artış görüldü yine parlak tonda bir boyanma mevcut değildi.. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Aktin ile boyanan kuyuda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda zayıf bir immunreaktivite gözlemlendi. Vimentin ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi. Vimentin pozitif hücreler tek olarak ayırt edilebiliyordu.

7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivitede azalma görüldü. Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda immunreaktivitede 5. güne oranla artış gözlemlendi. Vimentin kuyusunda, 5. güne oranla immunreaktivitede azalma görüldü. GFAP kuyusundaki hücrelerde immunreaktivite görüldü.

9. günde; Nestin kuyusunda immunreaktivite gözlemlenmedi. Aktin ve Vimentin kuyularında boyanma görülmedi. NCAM kuyusundaki immunreaktivitede artış görüldü, bazı hücrelerin NCAM pozitifliği daha kuvvetli şekilde görüldü. GFAP kuyusunda immunreaktivite gözlemlendi.

100 nM RA uygulanan grup :

2. günde; Nestin boyaması sonucu immunreaktivite gözlemlendi. 50 nM RA uygulanan gruba göre nestinde daha parlak tonda bir boyanma görüldü. Krezil violet boyama sonucunda; az sayıda hücrede pozitiflik görüldü.

5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesinde azalma görüldü. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Aktin ile boyanan kuyuda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi. NCAM pozitif hücreler tek olarak ayırt edilebilmektedirler. Vimentin ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi. Vimentin pozitif hücreler tek olarak ayırt edilebiliyordu.

7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivitede azalma görüldü. Aktin ile boyanan kuyuda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda immunreaktivitede 5. güne oranla bir azalma gözlemlendi. GFAP kuyusundaki hücrelerde kuvvetli bir immunreaktivite görüldü.

9. günde; Nestin kuyusunda immunreaktivite gözlemlenmedi. Aktin kuyusunda boyanma görülmedi. Vimentin ile boyanan kuyuda immunreaktivitenin devam ettiği görüldü. NCAM kuyusundaki immunreaktivite varlığı korumuş fakat parlak tonda bir boyanma görülmedi. GFAP kuyusundaki immunreaktivitede 7. güne göre artış gözlemlendi.

1 μ M RA uygulanan grup :

2. günde; Nestin ile yapılan boyama sonucu hücrelerin tamamına yakın kısmında kuvvetli immunreaktivite gözlemlendi. Nöral öncül hücreler tek tek görülmüştür. Nöronların sitoplazmalarında bulunan nissl taneciklerini göstermek için kullanılan krezil violet boyaması yapıldı. Krezil violet boyama sonucunda; hücrelerin çoğunluğunda pozitiflik görüldü.

5. günde; 2. güne oranla nestin immunreaktivitesinde azalma gözlemlenmedi. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi.

Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda ise immunreaktivite gözlemlendi.

7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivite zayıf olarak gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda ise immunreaktivite 5. güne oranla daha parlak bir boyanma gözlemlendi. GFAP kuyusundaki hücrelerde immunreaktivite görüldü.

9. günde; Nestin kuyusunda, immunreaktivite gözlemlenmedi. Aktin ve Vimentin kuyularında boyanma görülmedi. NCAM kuyusundaki immunreaktivite devam etmektedir ve tek olarak hücreler görülmektedir. GFAP kuyusunda ise kuvvetli bir immunreaktivite gözlemlendi.

3 μ M RA uygulanan grup :

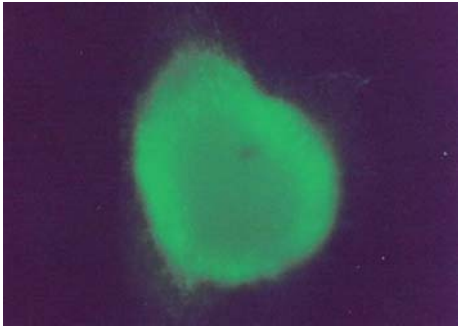
2. günde; Nestin ile yapılan boyama sonucu hücrelerin büyük kısmında kuvvetli immunreaktivite gözlemlendi. Nöral öncül hücreler tek tek gözlemlenmiştir. RA'ın diğer konsantrasyonlarına göre daha kuvvetli bir immunreaktivite gözlemlendi. Nöronların sitoplazmalarında bulunan nissl taneciklerini göstermek için kullanılan krezil violet boyaması yapıldı. Krezil violet boyama sonucunda; hücrelerin çoğunluğunda pozitiflik gözlemlendi.

5. günde; Nestinin immunreaktivitesinin devam ettiği gözlemlenmedi. Krezil violet boyamasında da pozitif boyanma gösteren hücrelerin sayısında artış gözlemlendi. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda immunreaktivite gözlemlendi.

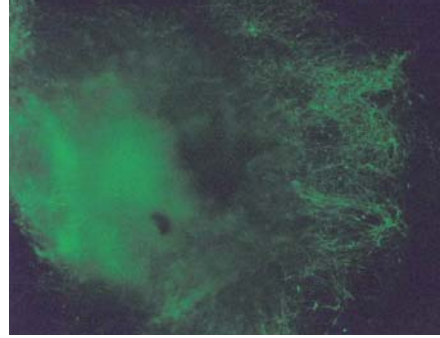
7. günde; Nestin ile boyanan kuyuda immunreaktivite devam etmektedir. Vimentin ve Aktin ile boyanan kuyularda immunreaktivite görülmedi. NCAM ile boyanan kuyuda ise immunreaktivite 5. güne oranla daha parlak bir boyanma gözlemlendi. GFAP kuyusundaki EB'lerde immunreaktivite görüldü ve hücreler tek olarak ayırt edilebilmektedir.

9. günde; Nestin kuyusunda, immunreaktivite gözlemlenmedi. Aktin ve Vimentin kuyularında boyanma görülmedi. NCAM kuyusundaki immunreaktivitede 7. güne oranla azalma görüldü. Buna rağmen GFAP kuyusunda ise kuvvetli bir immunreaktivite gözlemlendi.

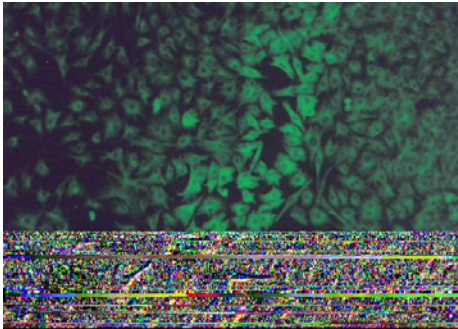
Uygulanan farklı RA konsantrasyonları EK hücrelerin nöronal farklılaşması üzerine etki etmiştir. RA'ın düşük konsantrasyonlarında (50 ve 100 nM) nöronal farklılaşma yanında mezenşimal farklılaşmada görülmüş. Mezenşimal farklılaşma ise vimentin antikoru ile gösterilmiştir. RA yüksek konsantrasyonlarında (1 ve 3 μ M) mezenşimal ve mezodermal farklılaşma görülmemiştir. Nöronal farklılaşma oranları ise düşük konsantrasyonlara göre daha yüksek seviyede tespit edilmiştir.



A



B

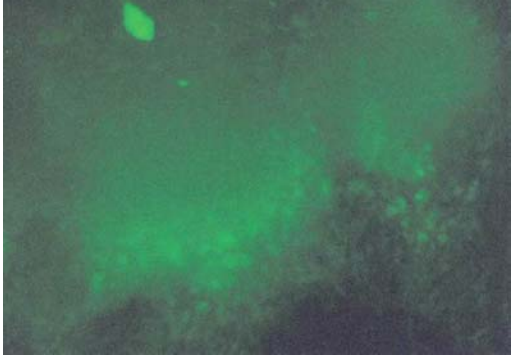


C

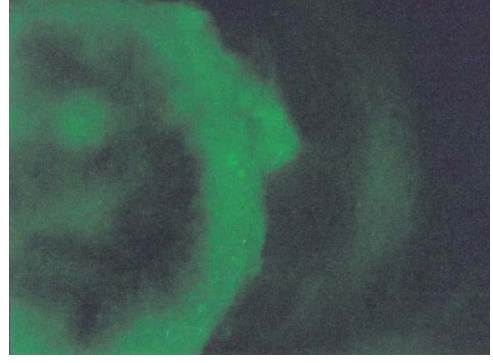


D

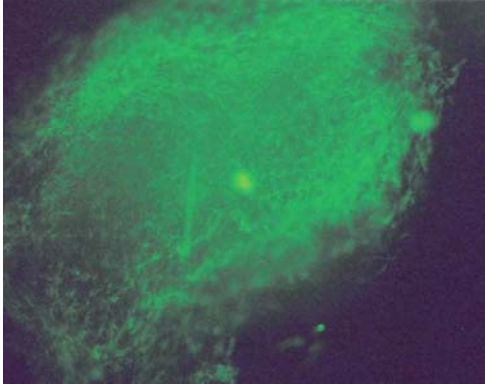
Şekil 5.15. 2-/3+ 50 nM RA uygulaması. A) 2. gün Nestin (+) B) 5. gün Vimentin (+) C) Kıkırdak hücreleri Vimentin, pozitif kontrol D) 9. gün NCAM (+)



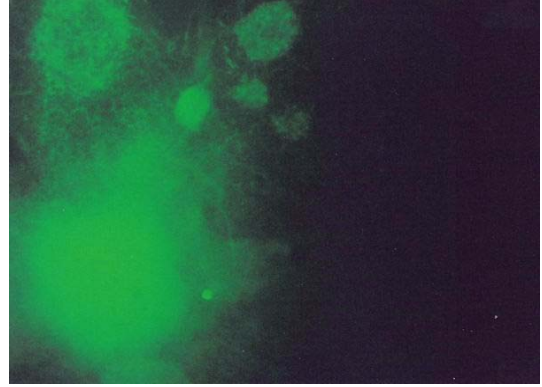
A



B

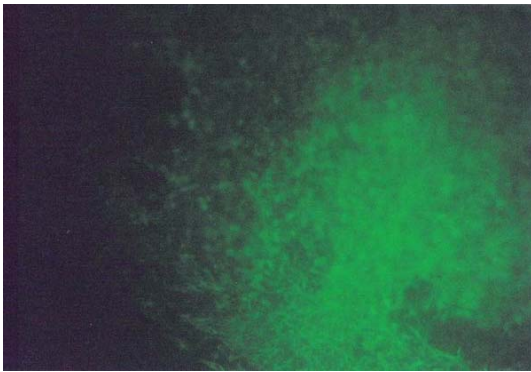


C

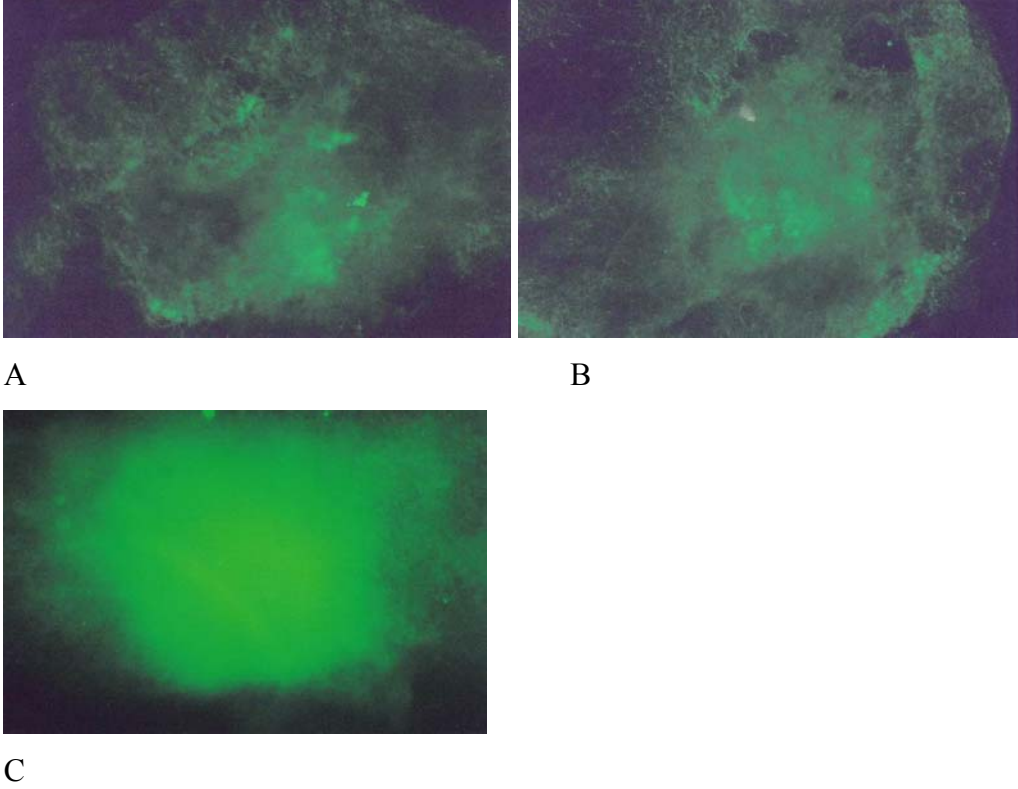


D

Şekil 5.16. 2-/3+ 100 nM RA uygulaması. A) 2. gün Nestin (+) B) 5. gün NCAM (+) C) 7. gün GFAP (+) D) 9. gün Vimentin



Şekil 5.17. 2-/3+ 1µM RA uygulaması. 9. gün NCAM (+)



Şekil 5.18. 2-/3+ 3µM RA uygulaması. A) 5. gün Nestin (+) B) 5. gün NCAM (+)
C) 7. gün GFAP (+)

Denemelerde en iyi sonucu RA'nın 1 ve 3 µM konsantrasyonunda ve 4 günlük EB'lere 4 gün daha RA uygulanan grupta elde edilmiştir.

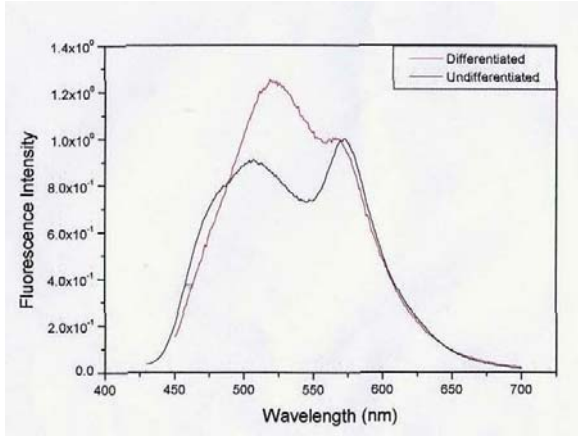
5.3.5. Spektrometrik Analizler

Tripsinlenerek petri yüzeyinden kaldırılan farklılaşmış hücreler PBS içerisinde hazırlandı. Spektrometrik analiz için dimetilsulfoksit içerisinde çözülen flouresans boyanın absorbansına bakıldı. Absorbans 0,1' e yakın bir değer bulundu. Hücreler 430 nm dalga boyunca uyarılmaya başlandı. F4A1 flouresans probu kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak farklılaşmamış EK hücreler kullanıldı.

Denemeler farklılaşmanın ikinci ve on birinci günlerinde yapıldı. Her iki denemede de benzer sonuçlar elde edildi. Denemenin sonucunda farklılaşmamış ve farklılaşmış hücreler arasında polarite farkı gözlemlendi. Farklılaşan hücreler, flouresans boyayı hücre içine daha

fazla aldılar ve daha polar bir özellik sergilediler. Flouresans deęiřimi, grafięin Flouresans Yoęunluk eksenini boyunca devam etmiřtir ve daha yoęun olarak ortaya çıkmıřtır. T bandı, N bandı boyunca uzanmıř ve daha dūřuk bir sonuę vermiřtir. Farklılařmamıř hūcrelerin flouresans yoęunluęu, farklılařan hūcelere oranla daha dūřuktur.

Bu yapılan spektrometrik analiz bir Őn ęalıřma niteliğindedir. Spektrometrik analizler ile ęalıřmalara devam edilecektir..



řekil 5.19. 2 gūnlük EB'lere RA uygulaması. Kūltūrūn 11. gūnūndeki Spektrometrik analiz grafięi

Çizelge 5.1. Deneysel Sonuçları

Deneysel Grupları	Kontrolsüz Farklılaşma	4-/4+ RA Uygulaması	0-2 Günler Arasında RA Uygulaması	2 Günlük EB ekimi sonrası 3 Gün RA	2-/3+ Farklı Konsantrasyonda RA Uygulaması				Spektrometrik Analizler
	Kontrolsüz Farklılaşma	4 -/4 + Gün 1 μ M RA	0-2 Gün 1 μ M RA	Ekim sonrası 3 Gün 1 μ M RA	50 nM RA	100 nM RA	1 μ M RA	3 μ M RA	
Günler									
2 Gün	Nestin: + krezil violet: +	Nestin: +++	Nestin: + krezil violet: +	Nestin: + krezil violet: +	Nestin: ++ krezil violet: +	Nestin: ++ krezil violet: +	Nestin: +++ krezil violet: +	Nestin: +++ krezil violet: +	Farklılaşan EK hücreler daha polar yapı gösterdi.
5 Gün	Nestin: + Vimentin: + Aktin: - NCAM: -	Nestin: + NCAM: + Vimentin: - Aktin: -	Nestin: + NCAM: + Vimentin: - Aktin: -	Nestin: ++ NCAM: ++ Vimentin: - Aktin: -	NCAM: ++ GFAP: - Vimentin: ++ Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: - Vimentin: ++ Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: - Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	Nestin: ++ NCAM: ++ Vimentin: - Aktin: -	
7 Gün	Nestin: ++ Vimentin: - Aktin: - NCAM: - GFAP: +	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: + GFAP: + Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: + Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	
9 Gün	Nestin: +++ Vimentin: - Aktin: - NCAM: - GFAP: +	GFAP: +++ NCAM: + Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: + GFAP: + Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: ++ Aktin: - Nestin: -	GFAP: +++ NCAM: + Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	NCAM: ++ GFAP: ++ Vimentin: - Aktin: - Nestin: -	
11 Gün									Farklılaşan EK hücreler daha polar yapı gösterdi

12 Gün	Nestin: - NCAM: + Aktin: + Vimentin: + GFAP: +								
15 Gün	Nestin: - NCAM: + Aktin: + Vimentin: + GFAP: +								
17 Gün	H-E boyama, kalp kası hücreleri görüldü								
30 Gün	Kalp kası hücreleri								

- +: zayıf pozitif
 ++: pozitif
 +++: kuvvetli pozitif
 -: boyanma yok

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, fare embriyonik kök hücrelerin nöronal farklılaşma kapasitesi incelenmiştir. Nöral farklılaşma RA ile başlatılmış, RA'nın zaman ve konsantrasyon bağımlı etkileri incelenmiştir. Bugüne kadar EK hücrelerin nöronal farklılaşma ile ilgili çalışmalar yapılmasına karşın birçok koşulun aynı anda karşılaştırılmalı olarak incelendiği çalışma sayısı azdır. Çalışmamızda; EK hücrelerin pluripotent karakteri korunmuş, EK hücrelerin spontan farklılaşma ve nöronal farklılaşma özellikleri incelenmiştir.

Embriyonik gelişim süresince kök hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını belirleyen en önemli faktörlerden biri bulunduğu çevredir. Hücre içinde bulunduğu çevre maruz kaldığı sinyal moleküllerine göre farklılaşmaya başlar. Bu sinyal molekülleri hücrenin mikroçevresini oluşturur. Watt ve Hogan (2000); kök hücrelerin mikroçevre ile etkileşimini 3 grupta toplamıştır: 1) Diğer hücreler tarafından salgılanan faktörler (parakrin etkileşim) 2) İntegral membran proteinleri tarafından düzenlenen hücre-hücre etkileşimleri (juktakrin etkileşim) 3) Hücrelerarası matriks ve integrinler (matriksel etkileşim) (Watt 2000). Mikroçevresindeki yapılanmaya ve bazı iç faktörlere göre kök hücreler, simetrik ve asimetrik bölünmelerle hücre

havuzunu büyütebilir, farklı hücre hatlarına dönüşebilir veya programlı hücre ölümüne gidebilirler (Sommer 2002).

Çalışmamızda; besleyici hücreler ve jelatinize kültür petripleri ile mikroçevre oluşturulmuş, LIF ve RA gibi sitokinler kullanılarak hücrelerin fiziksel koşulları değiştirilmiş ve hücrelerin bu değişkenlere verdikleri cevaplar incelenmiştir.

Çalışmanın ilk kısmında besleyici hücre tabakası üzerinde ve LIF uygulanarak EK hücrelerin pluripotent özelliklerinin korunması sağlanmıştır. Pluripotent özelliklerinin korunduğu, SSEA-1 ve Oct-4 antikoru ve ALP aktivitesi ile gösterilmiştir. Besleyici tabakaların üzerinde kültürleri yapılan R1 EK hücre kolonilerinin %95 'inin farklılaşmadığı gösterilmiştir. Bu yönüyle elde ettiğimiz veriler benzer çalışmalar ile uyum sağlamaktadır (Ward 2004, Zandstra 2000, Martin 1981, Gorba 2003, Cetinkaya 2004).

Çalışmanın ikinci kısmında, besleyici tabaka ve LIF yokluğunda EK hücrelerden hücre agregatları (EB'ler) oluşturulmuştur. EB'lerin süspanse kültürdeki gelişmeleri incelenmiştir. Kültür petriplerine ekilen EB'ler LIF içermeyen besiyeri ile kültürleri yapılmış ve spontan farklılaşma özellikleri incelenmiştir.

Süspanse EB kültürü incelendiğinde; kültürün 7. gününe kadar EB'ler kompakt ve düzgün morfolojilerini korurken 8. günden itibaren bu özelliklerini kaybettikleri görülmüştür. Süspanse kültürün 10. gününde ise EB'lerin iç kısımlarında kalp kası gibi atan kümelere rastlanmıştır. Dört günlük EB'lerin petrilere ekimlerinin ardından kültür incelendiğinde, ilk atan hücre kümeleri 7. günde ortaya çıkmış, kültürün 17. gününde ise atım gösteren hücreler tespit edilmiştir. Guan ve arkadaşlarının(1999) yaptıkları çalışmada; EB'lerin iç kısımlarında ilk atan kümeler kültürün 7.gününde görülmesine rağmen maksimum atım 7-10 günlük EB'lerde görülmüştür. EB'lerin ekimleri sonrasında 5-7 günler arasında atımlar gözlemlenmiştir (Guan 1999). Bir başka benzer çalışmada da EB'lerde atımların kültürün 8. gününde başladığı gösterilmiştir (O'Shea 1999). EB'ler ile ilgili veriler her iki çalışma ile de uyum sağlamaktadır. Ekim sonrası, kardiyomiyositlerin kaçınıcı günde oluştuğu ile ilgili

veriye rastlanmamıştır. Spontan farklılaşma esnasında, nöronal hücreler ve mezenşimal kökenli hücrelerinde varlığı gösterilmiştir.

Nöronal farklılaşma, EB'lerin spontan farklılaşması esnasında düşük oranda meydana gelmektedir. Fare EK hücrelerinde nöronal farklılaşmayı başlatılabilmek için en çok kullanılan sitokin RA'dır. Çalışmamızda da nöronal farklılaşmayı uyarmak amacıyla RA kullanılmıştır. RA'nın EB'lere verilme zamanları ve konsantrasyonları değiştirilerek farklılaşma üzerine etkileri incelenmiştir. Nöral hücre öncülleri; nestin, nöronlar; NCAM, glial hücreler ise GFAP antikorlarıyla belirlenmiştir. Elde ettiğimiz farklılaşan hücre popülasyonunun içinde mezenşimal ve/veya mezodermal hücre olup olmadığı sırasıyla vimentin ve aktin antikorlarıyla gösterilmiştir.

RA'nın uygulanma süresinin etkisinin araştırıldığı 4-/4+ RA denemesinde, 4 gün RA ve LIF içermeyen besiyeri ile EB oluşturulmuş, 4 gün daha 1 µM RA uygulanmıştır. RA uygulamasının ardından EB'ler petrilere ekilmiştir. Kültürün 2. günü, EB'lerin tamamına yakın kısmı nestin pozitif immunreaktivite göstermiştir. Kültürün 5. gününde ise nestin pozitiflik zayıflarken, NCAM'ın immunreaktivitesi artış göstermiştir. Kültürün 7. günde nestin pozitiflik iyice azalmış fakat NCAM ve GFAP immunreaktivitesi belirgin seviyede artış göstermiş, 9. günde GFAP pozitiflik kuvvetlenmiştir. Aktin ve vimentin ile yapılan boyamalar sonucunda immunreaktiviteye rastlanmamıştır.

Çalışmanın 4-/4+ RA denemesinde alınan sonuçlar literatür bilgileri ile uyumaktadır (Bain 1995, Gajovic 1997, Liour 2003). Gou ve arkadaşları (2001), EK hücrelerin nöronal farklılaşma sırasında vimentin immunreaktivitesinin azaldığını göstermiştir. Çalışmamızda da vimentin immunreaktivitesine rastlanmamıştır (Guo 2001).

Çalışmanın 0-2 gün RA denemesinde, EK hücrelerin EB oluşumları için süspanse kültüre alındıkları sadece ilk iki günü 1 µM RA uygulanmış ve ardından ekim yapılmıştır. 5. günde creysl violet boyası ile az sayıda nöron benzeri hücre tespit edilebilmiştir. Nöronal öncül hücreler ancak kültürün 7. gününde ortaya çıkmış ve 9. günde immunreaktivite artmıştır. 7. günde NCAM pozitif EB'ler görülmüş fakat parlak tonda bir boyanma elde edilememiştir. Benzer bir çalışmada, 4-5. günlerde krezil violet ve NCAM'in pozitifliğinin

arttığı rapor edilmiştir. Dokuzuncu günde ise GFAP pozitif hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Fraichard 1995). Verilerin tutarlılık göstermemesi kültür koşullarının veya kullanılan KH hattının farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmanın 2-/3+ RA denemesinde, 2 günlük EB'lere 3 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda RA uygulanmıştır. Uygulanan RA konsantrasyonları, 50 nM, 100 nM, 1 µM ve 3 µM'dır. RA'nın 50 ve 100 nM konsantrasyonlarında 5.günde nestin pozitiflik görülmüştür. Aynı zamanda vimentin pozitif hücrelerde tespit edilmiştir. Vimentinin pozitifliği 7. günde devam etmiştir. Düşük dozda RA uygulamasının ardından vimentin boyamasından elde edilen sinyalin spontan farklılaşmadakinden daha kuvvetli olarak görülmesi RA'in düşük dozlarda mezenşimal farklılaşmayı uyardığını göstermektedir. RA'in 1 µM ve 3 µM konsantrasyonlarında ise 2. günde nestin, 5. günde ise NCAM pozitif olarak tespit edilmiştir fakat vimentin pozitifliği bu konsantrasyonlarda görülmemiştir. Kültürün 7 ve 9. günde, tüm gruplarda NCAM ve GFAP pozitiflik görülmüştür. En yoğun boyanma 1 µM ve 3 µM konsantrasyonlarda gözlemlendi. Sonuç olarak, RA'in düşük konsantrasyonları nöronal farklılaşmayı uyarmasına rağmen diğer hücre hatlarına farklılaşmanın önüne geçememiştir. Gajovic ve arkadaşları(1997) benzer çalışmada, 1 µM, 100 nM, 10 nM ve 1 nM RA konsantrasyonlarını denemişlerdir. En ideal farklılaşmanın ise 1 µM RA konsantrasyonunda elde ettiklerini bildirmişlerdir (Gajovic 1997, Chandrasekaran 2000).

Çalışmanın diğer bir deney grubunda 2 günlük EB'lerin ekimlerinin ardından 3 gün boyunca 1 µM RA uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Kültürün 2. günü nöral öncül hücreler nestine karşı immunreaktivite göstermişlerdir. 2' den 9. güne doğru nestinin immunreaktivitesi azalma göstermiştir. 5. günde NCAM pozitif hücreler görülmüş 7. günde pozitiflik artış göstermiştir. Glial hücrelerin ilk öncülleri de 7. günde tespit edilmiş 9. günde ise immunreaktivite artış göstermiştir. Aktin ve vimentin ile yapılan boyamalar sonucunda immunreaktivite görülmemiştir. Benzer araştırmalar incelendiğinde, RA EB'lere uygulandığı, ekim sonrasında RA uygulaması yapılmadığı görülmüştür. Elde ettiğimiz veriler, bu yöntemde de nöronal farklılaşmanın desteklendiğini göstermektedir.

Farklılaşan EK hücreler ve farklılaşmamış EK hücrelerin membran polarite farklarını incelemek amacıyla spektrometrik analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, farklılaşmış EK hücrelerin daha polar oldukları gösterilmiştir. Yapılan denemeler kesin bir sonuç belirtmek için yetersiz olmasına karşın farklılaşmış ve farklılaşmamış hücre yapısında tespit edilir bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Bu yapılan çalışma bir ön çalışma özelliğindedir ve bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada, kullandığımız yöntemlerin tüm nöronal hücrelere farklılaşmayı uyardığı immünohistokimya yöntemi ile gösterilmiştir. RA'nın nöronal farklılaşmayı zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak etkilediği de elde edilen diğer bir sonuçtur.

7. SONUÇ

EK hücrelerin izolasyonunun ve değişik hücre tiplerine farklılaşma kapasitelerinin keşfi ile hastalıkların tedavilerinde yeni ufuklar açabileceği düşünülmüştür. Özellikle sinir sisteminde meydana gelen hasarların tedavisinin güçlüğü, nöronal farklılaşma çalışmalarını ön plana çıkarmıştır. Fare EK hücreleri üzerindeki farklılaşma çalışmaları, belirlenen hedefler için geliştirilecektir.

Çalışmanın ilk kısmında, EK hücrelerin pluripotent özellikleri korunmuştur. İkinci olarak EK hücrelerin spontan farklılaşma özellikleri incelenmiştir. EB'lerin spontan farklılaşmaları esnasında ilk olarak atan kümeler görülmüş, kültürün 17. gününde ise kardiyomyositler görülmüştür. Kültürde az sayıda nöral hücrenin varlığı da gösterilmiştir.

EK hücrelerin nöronal farklılaşması RA ile başlatılmıştır. Süspanse kültürde oluşturulan EB'lere farklı zamanlarda ve farklı konsantrasyonlarda RA uygulanmıştır. RA'nın 3 µM konsantrasyonda ve 4-/4+ RA uygulanan EB'lerde iyi sonuçlar elde edilmiştir. EB'lere ekim sonrası RA uygulaması da nöronal farklılaşmayı uyarmıştır.

Çalışmamızda, EK hücrelerin pluripotent karakterleri SSEA-1 ve Oct-4 antikoları ve ALP aktivitesi ile gösterilmiştir. Nöronal hücre karakterizasyonları ise Nestin, NCAM, GFAP, mezenşimal kökenli hücreler vimentin, mezodermal kökenli hücreler ise aktin antikolarıyla gösterilmiştir.

Bu çalışma ülkemizde embriyonik kök hücrelerin nöronal farklılaşması üzerine RA'ın zaman ve konsantrasyona bağımlı değişimlerini gösteren ilk çalışma olduğu için önemlidir. Elde edilen sonuçlar, EK hücrelerin nöronal farklılaşması sonucunda saf bir hücre popülasyonu elde etmeye yönelik çalışmalara ışık tutacaktır.

8. ÖNERİLER

Çalışmamızda; EK hücrelerin nöronal farklılaşma kapasiteleri gösterilmiştir. RA ile uyarılan kök hücreler nöronal hücrelere farklılaşmışlar ve oluşan hücreler immun boyama yöntemi ile gösterilmiştir. İmmun boyama ile meydana gelen nöronal hücrelerin kesin yüzdelerini vermek mümkün olmamıştır.

Farklılaşmış hücrelerin yüzde oranlarını verebilmek için flow sitometri analizinden yararlanılabilir. Farklılaşan hücrelerdeki protein ekspresyonlarının analizleri için western blot ve RT-PCR analizleri ile yapılan çalışma desteklenebilir. Çalışmamızın bir sonraki basamağında flow sitometrik analizler yapılarak farklılaşmış hücrelerin yüzde oranları ölçülecektir.

Bu çalışmada tek bir mikroçevre denenmiştir. Jelatinlenmiş petri yüzeylerine EB'lerin yapışmaları ve üremeleri sağlanmıştır. Nöronal farklılaşma çalışması farklı mikroçevrelerde denenerek farklılaşma üzerine etkileri incelenebilir. Fare EK hücre farklılaşma çalışması üç boyutlu polimerler üzerinde denenebilir.

Çalışmamızın 0-2 gün RA uygulaması yapılan grubunda nöronal hücrelerle birlikte mezenşimal kaynaklı hücrelerin de bulunduğu tespit edilmiştir. Saf bir nöral hücre popülasyonu elde etmek, farklılaşma çalışmalarının en önemli sorunlarından birini oluşturmaktadır. Kültür ortamının farklı hücre tiplerinden arındırılması için, kültür ortamına çeşitli inhibitörler eklenerek homojen bir popülasyon elde edilebilir.

EK hücrelerin farklılaşmaları membranda polarite değişikliği meydana geldiğini spektrometrik analiz ile gösterdik. Negatif kontrol olarak farklılaşmamış EK hücreleri kullandık. RA ile farklılaştırılan hücreler incelendiğinde farklılaşmamış EK hücelere göre daha polar yapıda olduğu tespit edildi. Fakat yapılan çalışmada pozitif kontrol kullanmadık. Çalışmanın bir sonraki aşamasında, pozitif kontrol olarak fare embriyolarından elde edilecek olan nöronlar kullanılacaktır. RA'ın zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak meydana getirdiği değişimlerin her biri içinde spektrometrik analizler yapılacaktır.

Çalışmamızın bir sonraki basamağında bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda yukarıda bahsedilen yöntemler denenecektir.

REFERANSLAR

Abbondanzo S.J, Gadi I, Stewart JL. 1993; Derivation of embryonic stem cell lines. *Methods in Enzymology* Vol 225, Guide to techniques in mouse development, Nassarman PM, DePamphilis ML (eds)

Albano R.M, Groome N and Smith J. C. 1993; Activins are expressed in preimplantation mouse embryos and in ES and EC cells and are regulated on their differentiation. *Development* 117, 711-723

Amit M, Shariki J, Marguletz M, Itskovitz-Eldor J. 2004; Serum and feeder free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70 (3) : 837-45

Amit M, Itskovitz-Eldor J. 2002; Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. . *J. Anat.* 200 : pp225–232

Arat S, Gibbons J, Rzucidlo JS, Respass DS, Tumlin M, Stice S. 2002; In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol. Reprod.* 66 : 1768-1774

Arat S. 1997; Production of chimeric mouse by injection of embryonic stem cells to morulae from outbred mouse. *Turk Jour Vet Anim Sci* 21 : 431-37

Bain G, Ray W, Yo M, Gottlieb D. 1996; Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Reserch Commu.* 223: 691-694

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner J.E, Gottlieb D. 1995; Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Developmental Biology* 168: 342-357

Balasubramaniyan V, de Haas AH, Bakels R, Koper A, Boddeke HW, Copray JC. 2004 ;Functionally deficient neuronal differentiation of mouse embryonic neural stem cells in vitro. *Neurosci Res Jun*;49(2):261-5.

Barres B, Barde Y. 2000; Neuronal and glial cell biology. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 642-648

Bolton J.A, Wood S.A, Kennedy D, Don R.H, Mattick J.S, 1999; Retinoic acid-dependent upregulation of mouse folate receptor- α expression in embryonic stem cells and conservation of alternative splicing patterns. *Gene* 230: 215-224

Brannvall K, Hjelm H, Korhonen L, Lahtinen U, Lehesjoski A, Lindholm D, 2003; Cystatin-B is expressed by neural stem cells and differentiated neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:369-374

Brehm A, Ohbo K, Scholer H. 1997; The carboxy-terminal transactivation domain of Oct-4 acquires cell specificity through the POU domain. *Mol. And Cell. Biol. Jan*; 17(1): 154-162

Calhoun J.D, Lambert N.A, Mitalipova M.M, Noggle S.A, Lyons I, Condie B.G, Stice S.L. 2003; Differentiation of rhesus embryonic stem cells to neural progenitors and neurons. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 306: 191-197

Cetinkaya G. 2004; Fare embriyonik kök hücrelerin NWPF disklerde üretilmesi ve kültürasyonu. Yüksek Lisans Tez Çalışması. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü.

Cetinkaya G, Arat S, Odaman Mercan H, Onur MA, Tumer A.2005; Culture of murine embryonic stem cells on NMPF discs. *Reproduction, Fertility and Development* 17 (1,2) : 235

Chandrasekaran V, Zhai Y, Wagner M, Kaplan P, Napoli J, Higgins D, 2000; Retinoic acid regulates the morphological development of sympathetic neurons. *J.Neurobiol.* 42:383-393

Coleman A.B, Taylor P. 1996; Regulation of acetylcholinesterase expression during neuronal differentiation. *The American Society for Biochemistry and Mol. Biology* 271(8), Issue of february 23, 4410-4416

Czyz J, Wobus A.M. 2001; Embryonic stem cell differentiation : the role of extracellular factors. *Differentiation* 68: 167-174

D'Amour K, Gage F. 2003; Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *PNAS* 100(1) : 11866-11872

Dani C., Smith A. G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G. 1997 ; Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro . *Journal of Cell Science* 110, 1279-1285

Demchenko, Klymchenko, Pivovarenko, Ercelen, Duportail, Mely. 2003, Multiparametric color-changing fluorescence probes. *Journal of Fluorescence* 13 (4) : 291-295

Dinsmore J, Ratliff J, Jacoby D, Wunderlich M, Lindberg C. 1998; Embryonic stem cell as a model for studying regulation of cellular differentiation. *Theriogenology* 49: 145-151

Draper J, Fox V, 2003; Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Archives of Medical Research* 34: 558-564

Evans M.J, Kaufman M.H. 1981; Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156

Feng L, Heintz N. 1995; Differentiation neurons activate transcription of brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* 121: 1719-1730.

Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, savatier P, Samarut J. 1995; In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of Cell Science* 108: 3181-3188

Gajovic S, St-Onge L, Yokota Y, Gruss P.1997; Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Differentiation* 62: 187-192

Gardner R.L. 2002; Stem cells : potency, plasticity and public perception . *J. Anat.* 200: 277-282

Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J. 2004; Cell therapy using human embryonic stem cells. *Transplant Immunology* 12: 203-209

Goldstein R, Drukker M, Reubinoff B, Benvenisty N,2002; Integration and differentiation of human embryonic stem cells transplanted to the chick embryo. *Dev. Dynamics* 225: 80-86

Gorba T, Allsopp T. 2003; Pharmacological potential of embryonic stem cells. *Pharmacological Research* 47: 269-278

Greenlee A.R., Kronenwetter-Koepel T.A, Kaiser S.J., Ellis T.M, Liu K. 2004 ; Combined effects of Matrigel™ and growth factors on maintaining undifferentiated murine embryonic stem cells for embryotoxicity testing. *Toxicology in Vitro* 18 (2004) 543–553

Gregg C.T, Chojnacki A.K, Weiss S. 2002; Radial glial cells as neuronal precursors: the next generation ?. *Journal of Neuroscience Research* 69: 708-713

Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus A.M, 2001; Embryonic stem cell-derived neurogenesis , Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissues Res* 305:171-176

Guan K, Rohwedel J, Wobus A.M. 1999; Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30:211-226

Guo X, Ying W, Wan J, Hu Z, Qian X, Zhang H, He F, 2001; Proteomic characterization of early-stage differentiation of mouse embryonic stem cells into neural cells induced by all-trans retinoic acid in vitro. *Electrophoresis* 22: 3067-3075

Hancock C ,Wetherington J, Lambert A.N, Condie B.G,2000; Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Reserch Commu.* 271:418-421

Heather A. Cameron, Thomas G. Hazel, Ronald D. G. McKay. 1998; Regulation of Neurogenesis by Growth Factors and Neurotransmitters. *J Neurobiol* 36: 287–306, 1998

Harrisona, J. , Pattanawongb, S., Forsytheb J.S.,. Grossb K.A, Nisbeth D.R., Behc H. Scottb T.F., Trounsond A.O., Mollarda R. 2004; Colonization and maintenance of murine embryonic stem cells on poly(a-hydroxy esters). *Biomaterials* 25 : 4963–4970

Hayman M.W, Smith K.H, Cameron N.R,Przborski S.A, 2004; Enhanced neurite outgrowth by human neurons grown on solid three-dimensional scaffolds. *Biochem Biophysical Research Commu;* 314: 483-488

Hochedlinger K, Jaenisch R. 2003; Nuclear Transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. *The New England Journal of Medicine.* 349(3): 275-286

Kato M, Yoshimura S, Kokuzawa J, Kitajima H, Kaku Y, Iwama T, Shinoda J, Kunisada T, Sakai N. 2004 ; Hepatocyte growth factor promotes neuronal differentiation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. *Neuroreport.* Jan 19;15(1):5-8.

Kawai H, Sango K, Mullin K.A, Proia R. 1998; Embryonic stem cells with a disrupted GD3 synthase gene undergo neuronal differentiation in the absence of b-series gangliosides. The Journal of Biological Chemistry Vol 273, No31, Issue of July 31: 19634-19638

Kawamorita M, Suzuki C, Saito G, Sato T, Sato K. 2002; In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells after activation by retinoic acid. Hum Cell. Sep ;15(3): 178-82

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa S, Sasai Y. 2000; Induction of midbrain dopaminergic neurotechnique neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Neuron 28: 31-40

Keller M G,1995; In vitro differentiation of embryonic stem cells. Current Opinion in Cell Biology 7: 862-869

Kuo H, Francis Pau K, Yeoman R, Mitalipov M, Okano H, Wolf D, 2003; Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. Biology of Reproduction 68 : 1727-1735

Laslett A.L, Filipczyk A.A , Pera M. F. 2003; Characterization and culture of human embryonic stem cells . TCM Vol 13, No : 7 295-301

León-Quinto T. Jones J. · Skoudy A. · Burcin M. ·Soria B. 2004; In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. Diabetologia 47:1442–1451

Levenberg S, Huang N.F, Lavik E, Rogers A.B, Itskovitz-Eldor J, Langer R. 2003; Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. Developmental Biology 100(22) : 12741-12746

Liour S.S, Yu K.R, 2003; Differentiation of radial glia-like cells from embryonic stem cells. Glia 42:109-117

Liu S, Qu Y, Stewart T, Howard M, Chakraborty, Holekamp T, McDonald J. 2000; Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. PNAS 97(11) : 6126-6131

Loebel D, Watson C, De Young A, Tam P. 2003; Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Dev. Biol. 264: 1-14

Marchant L, Linker C, Mayor R, 1998; Inhibition of mesoderm formation by follistatin. Dev Genes Evol 208: 157-160

Martin G, 1981; Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci 78(12): 7634-7638

Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. 2004; Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. Biotech and Bioengineer. 88(3) : 279-391

Mueller-Klieser W. 1997; Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. The American Physiological Society C1109-1123

Mummery C, Ward D, van den Brink C, Bird S, Doevendans P, Opthof T, Brutel de a Riviera A, Tertoolen L, van der Heyden M, Pera M. 2002; Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. J. Anat 200: 233-242

Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Owensby JP, Sierpinski PL, Tatko LM, Fletcher PL. 2004; Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal interneurons. FASEB
Nov15

Murray P, Edgar D. 2001; The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor(LIF). Differentiation 68: 227-234

Nichols J, Evans EP, Smith AG. 1990; Establishment of germ-line competent embryonic stem cells using differentiation inhibiting activity, *Development* ; 110 : 1341-1348

Niwa H. 2001; Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Structure and Function* 26 : 137-148

Odorico J. S, Kaufman D. S., Thompson J.A .2001; Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells* ;19:193-204

Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. 2004; Retinoic-acid-concentration dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.. *Dev Biol.* Nov 1;275(1):124-42.

Okano H. 2002; Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J. Med.* 51(3) : 115-28

O'Shea K.S. 1999; Embryonic stem cell models of development. *The Anatomical Record(New Anat.)* 257: 32-41

O'Shea K. S. 2004 ; Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction* 71, 1755–1765

Otero J.J, Fu W, Kan L, Cuadra A.E , Kessler J. A. 2004; Beta-Catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development* 131, 3545-3557

Pachernick J, Esner M, Bryja V, DvorakP, Hampl A. 2002; Neural differentiation of mouse embryonic stem cells grown in monolayer. *Reprod. Nutr. Dev.* Jul-Aug; 42(4): 317-26

Pease S, Williams RL. 1990 ; Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp. Cell. Res.* Oct 190 (2) : 209-211

Pera M. F, Reubinoff B, Trounson A. 2000 ; Human embryonic stem cells . Journal of Cell Science 113 : 5-10

Plachta N, Bibel M, Tucker K, Barde Y. 2004; Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. Development 131, 5449-5456

Poltavtseva RA, Rzhainova AA, Revishchin AV, Aleksandrova MA, Korochkin LI, Repin VS, Sukhikh GT. 2001; In vitro development of neural progenitor cells from human embryos. Bull Exp. Biol. Med. Sep; 132(3) : 861-3

Prelle K, Zink N, Wolf E.2002; Pluripotent stem cells-Model of embryonic development, tool for gene targeting and basis of cell therapy. Anat. Histol. Embryol 31: 169-186

Price PJ, Goldborough MD, Tilkins ML. 1998 ; Embryonic stem cell serum replacement. International Patent Application WO98/30679.

Przyborski S.A, Morton I.E, Wood A, Andrews P.W,2000; Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTREA-2. European J. Neuroscience 12 : 3521-3528

Rathjen J, Haines B.P, Hudson K.M, Nesci A, Dunn S, Rathjen P.D. 2002; Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of neuroectoderm population. Development 129: 2649-2661

Reubinoff B, Itsykon P, Turetsky T, Pera M, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. 2001; Neural progenitors from human embryonic stem cells. Nature Biotechnology 19 : 1134-1140

Reya T, Morrison S, Clarke M, Weismann L.L. 2001; Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature 414 : 105-111

Richards LJ, Kilpatrick TJ, Dutton R, Tan SS, Gearing DP, Bartlett PF, Murphy M. 1996; Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal

and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* Feb;8(2) : 291-9

Rippon H.J, Bishop A.E, 2004; Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 37:23-34

Register B, Ben-Hur T, Dubois-Dalcq M. 1999; From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol. Cell Neurosci.* Oct-Nov; 14(4-5) : 287-300

Rohwedel J, Guan K, Wobus A.M, 1999; Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165: 190-202

Ruhnke M, Unferroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fandrich F. 2003; Long term culture and differentiation of rat embryonic cell- like cells into neuronal,glial, endothelial and hepatic lineages. *STEM CELLS* ;21: 428-436

Schiectt K, Madarasz E. 1997; Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *Journal of Neuroscience Research* 47:405-415

Schuldiner M,Eiges R,Eden A,Yanuka O,Itskovitz –Eldor J,Goldstein R, Benvenisty N,2001; Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Research* 913: 201-205

Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton D.A, Benvenisty N. 2000; Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Developmental Biology* 97(21) : 11307-11312

Schulz T.C, Palmarini G.M, Noggle S.A, Weiler D.A, Mitolipova M, Condie B.G,2003; Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neuroscience* 4:27

Smith A.G, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. 1998; Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature , Dec 15 , 336 (6200) : 688-90

Smith A.G. 2001; Embryo-derived stem cells : of mice and men. Annu.Rev. Cell Dev. Biol. 17: 435-462

Sommerer L, Raob M. 2002 ; Neural stem cells and regulation of cell number. Neurobiology 66 : 1–18

Stavridis M.P, Smith A.G, 2003; Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. Biochemical Society 31(1) :45-49

Steward CJ, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondonza SJ.1992 ; Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. Nature 359 , 6390: 76-79

Suh M, Lee Y, Kim J.Y, Kim S, Moon S, Lee J, Cha K, Chung H, Yoon H, Moon S.Y, Kim V.N, Kim K.S, 2004; Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Dev Biol 270: 488-498

Tighe A.P, Gudas J.L,2004;Retinoic acid inhibits Leukemia Inhibitory Factor signaling pathway in mouse embryonic stem cells. J.Cellular Physiology 198:223-229

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et.al . 1998; Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282 : 1145-1147

Thomson JA, Odorico JS. 2000; Human embryonic stem cell and embryonic germ cell line. Focus 18:53-57

Vassilieva S, Guan K, Pich U, Wobus A.M. 2000; Establishment of SSEA-1 and Oct-4 expressing rat embryonic stem cell-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Experimental Cell Research* 258: 361-373

Vats A, Tolley NS, Polank JM, Buttery LDK. 2002; Stem cells: Sources and applications. *Clin. Otolaryngol* 27: 227-232

Vrana K, Hipp J, Goss A, McCool B et al, 2003; Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *PNAS* 100(1) : 11911-11916

Wakayama T, Rodriguez I, Perry A, Yanagimachi R, Mombaerts P. 1999; Mice cloned from embryonic stem cells. *PNAS* 96(26) : 14984-14989

Ward C, Barrow K, Stern P. 2004; Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions. *Experimental Cell Research* 293: 229-238

Wartenberg M, Wolf S, Budde P, Grünheck F, Acker H, Hescheler J, Wartenberg G, Sauer H, 2003; The antimalaria agent artemisinin exerts antiangiogenic effects in mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Laboratory Investigation* 83(11) : 1647-1655

Westmoreland J, Hancock C, Condie B.G, 2001; Neuronal development of embryonic stem cells : A model of GABAergic neuron differentiation . *Biochem Biophys Res Commun.* 284:674-680

Wohl C.A, Weiss S, 1998; Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J. Neurobiol* 37:281-290

Xu H, Fan X, Wu X, Tang J, Yang H. 2004 ; Neural precursor cells differentiated from mouse embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of

Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun. Dec 31;326(1):115-22

Yau L, Litchie B, Zahradka P, 2004; MIGB, an inhibitory of arginine-dependent mono(ADP-ribosyl)ation, prevents differentiation of L6 skeletal myoblasts by inhibiting expression of myogenin and p21^{cip1}. Experimental Cell Research 301: 320-330

Zandstra P, Le H-V, Daley G, Griffith L.G, Lauffenburger D.A.2000; Leukemia Inhibitory Factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation. Biotech and Bioengineer. 69(6) : 607-617

EKLER

EK 1. DMEM çözeltilisi

DMEM / F12 (SIGMA D 05-47) bir litre saf suda çözüldükten sonra pH 7,2 olacak şekilde ayarlandı. 0,22 µm'lik membran filtrelerinde süzöldü. Hazırlanan çözeltiliye %15 oranında fetal dana serumu (FCS SIGMA), %1 oranında antibiyotik çözeltilisi uygulandı. Besleyici tabakaların kültürü aşamasında bu çözeltili kullanıldı.

EK 2. Mitomisinli besiyeri

% 5 FCS içeren 195 ml DMEM/F12 çözeltilisi hazırlandı. 5 ml'de çözülen 2 mgr mitomisin (SIGMA M 0503) hazırlanan DMEM üzerine eklendi. Mitomisinli DMEM, on mililitrelik oligotlara bölünerek -20 ° C'de saklandı.

EK 3. PBS çözeltilisi

Dulbesco's PBS (SIGMA D-1408) bir litre saf suda çözüldükten sonra pH 7,2 ve osmolaritesi 0,280-0,300 mOsm olacak şekilde ayarlandı. 0,22 µm'lik membran filtrelerinde süzöldü.

EK 4. Jelatin çözeltilisi

500 mgr jelatin (SIGMA G-1393) 500 ml PBS içinde ısıtılarak çözüldü. Çözelti berraklaşınca hücre kültür kabına aktarılan çözelti otoklavlandı.

EK 5. 10 mM RA

30,45 mgr RA (SIGMA R 2625), 10 ml DMSO içinde çözüldü. 500 mikrolitrelik oligotlara bölünerek – 20 ° C’de saklandı.

EK 6. ALP solüsyonu

Fast Red Tablet (SIGMA F-4523); Tris-Cl tableti 10 ml suda çözülerek hazırlanırlar. Bu hazırlanan çözeltiye Fast Red tableti konularak çözünmesi sağlanır. ALP aktivitesini göstermek amacıyla kullanılır.

EK 7. Block çözeltilisi

0,5 gr polivinilpropoid 48 ml HBS çözeltisi içinde çözülür. % 3 keçi serumu ve % 0,1 Triton X-100 hazırlanan çöeltiye eklenir. +4 ° C’de saklanır. 48 saat içinde kullanılmalıdır.

EK 8. HBS çözeltisi

14,61 gr sodyum klorid 50 ml 1 M Tris içerisinde çözülür ve bir litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında iki hafta süresince saklanır.

EK 9. Yıkama çözeltisi

50 ml HBS içerisinde % 0,05 olacak şekilde Tween 20 eklenir ve +4 ° C’de saklanır.

EK 10. Kullanılan cihazlar

- 80 ° C dondurucu
- +4/-18 ° C buzdolabı
- -20 ° C dondurucu
- Su Banyosu (Nüve BM 400)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Karıştırıcı (Ikamag)
- Osmometre (Gonate, Osmomat 030)
- PH metre (Hanna)
- 37 ° C % 5 CO₂ etüv (Sanyo)
- Steril kabin
- Stereo mikroskop (Solf)

- Axiovert 25 M İvert mikroskop (Zeiss)

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Arzu TAŞ
Doğum yeri ve tarihi : Kocaeli; 14 Eylül 1980
Ev adresi : Çenesuyu 1. Erim Geçidi No: 24/A Kat:2
Derince/ KOCAELİ
İş adresi : Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve
Embriyoloji AD, Derince/Kocaeli 41900
E-Mail : tas_arzu@yahoo.com
Yabancı dil : İngilizce
Eğitim durumu :
1994-1998 İzmit Süper Lisesi
1998-2002 Lisans, Ege Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji
2002- Yüksek Lisans, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Bilimsel Araştırma ve Tecrübeleri

Deneysel nazal mukozal fleplerde histopatolojik değişikliklerin ve mukosilier aktivitenin değerlendirilmesi ile ilgili çalışma.

Değişik gruplardaki termde insan plasentasında Igf'lerin immunositokimyasal olarak incelenmesi ile ilgili çalışma.

Ekklamptik, diabetik ve IUGR olan gebelerden elde edilen plasenta, kordon ve fetal zarların histopatolojik olarak incelenmesi.

Histokimyasal çalışmalar ve İmmunohistokimya çalışmaları.

Sığır ve farelerden oosit ve embriyo eldesi. Oosit ve embriyo kültürleri.

Hücre kültürü ve besleyici tabaka hazırlanması

Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürasyonu, Farklılaşması ve Karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi).

Bilimsel Aktiviteler

"Yardımcı Üreme teknikleri ve Transgenik Hayvan Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitim Kursu" 05-09 Temmuz 2004 TÜBİTAK- Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Gebze

"Gamet ve Somatik Hücre Mnipulasyon Teknikleri, Çekirdek Transferi ve Embriyonik Kök Hücrelerin Tanımlanması" adlı kurs.07-09 Mayıs 2004 Memorial Hastanesi İstanbul VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Katılımcı, 18-21 Mayıs 2004, Mersin

I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi, Katılımcı, 07-09 Mayıs, İstanbul

IX. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi, Katılımcı, 16-18 Mayıs, 2003, Kayseri