

**MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERDEN FARKLILAŞTIRILMIŞ
İŞARETLİ KARDİYOMİYOSİTLERİN *in vivo*
İMLANTASYON SONRASI EKTOPIK GÖÇ
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF ECTOPIC MIGRATION POTENTIAL
OF LABELED CARDIOMYOCYTES DIFFERENTIATED
FROM MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER *in vivo*
IMPLANTATION**

ESİN AKBAY

Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Hacettepe Üniversitesi

BiYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2015

ESİN AKBAY'ın hazırladığı '**Mezenşimal Kök Hücrelerden Farklılaştırılmış İşaretli Kardiyomiyositlerin *in vivo* İmplantasyon Sonrası Ektopik Göç Potansiyelinin İncelenmesi**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Başkan

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Danışman

.....

Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN

Üye

.....

Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN

Üye

.....

Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım dedem MEHMET KİLİSLİ'ye

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez kapsamında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

...../...../.....

Esin AKBAY

ÖZET

MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERDEN FARKLILAŞTIRILMIŞ İŞARETLİ KARDİYOMİYOSİTLERİN *in vivo* İMPLANTASYON SONRASI EKTOPIK GÖÇ POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

ESİN AKBAY

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Haziran 2015, 110 sayfa

Bu çalışma kapsamında, sıçan yağ dokusundan izole edilen mezenşimal kök hücreler 5-Aza ile kardiyomiyosite farklılaştırıldıktan sonra BrdU ile işaretlenmiştir. İyonik olan ve olmayan deterjanlar ile muamele sonucunda aselülerize edilmiş kalp doku iskelelerine bu farklılaştırılmış işaretli hücrelerin uygulanması ve bu hücre ekili yapı malzemesi kompozitinin sıçan retroperitoneumuna implantasyonu ve implante edilen hücrelerin ektopik göçü incelenmiştir.

Çalışmanın ilk bölümünde sıçan gonadal ve subkutan yağ dokusu izole edilmiştir. Kardiyomiyojenik farklılaştırma faktörü olarak kimyasal ajan olan 5-Aza kullanılmıştır. Farklılaştırma prosedürü sırasında besi ortamı haftada iki kez değiştirilmiş ve hücreler dört hafta boyunca 37°C'de ve %5CO₂-%95O₂'de standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Hücre farklılaşmasını takiben karakterizasyon için kardiyomiyositlere özgül moleküllerle floresan boyaması yapılmıştır. Kardiyak genlerin ifadesinin araştırılması için RT-PCR analizi yapılmıştır. Kardiyomiyosite farklılaştırıldığı düşünülen kök hücreler BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin) ile kültür ortamında 24 saat süre ile inkübe edilerek işaretlenmiştir. Hücrelerin işaretlenmesinden sonra tripsinizasyon ile süspansiyon halinde elde edilen hücreler aselülerize edilmiş kalp doku iskeleleri ile 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında (a) hücre içeren doku iskelesi (b) hücre içermeyen doku iskelesi ve (c) kontrol grubu olacak şekilde üç farklı grup ile *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Anesteziye alınan tüm deney hayvan grupları implantasyonu takiben 1., 2. ve 4.

haftalarda sakrifiye edilmiştir. İmplant edilen doku iskelesi ile bazı dokular (karaciğer, dalak, abdominal aorta, böbrek ve kalp) toplanmıştır. Elde edilen dokular immünohistokimyasal tekniği ve RT-PCR ile incelenmiştir.

Sonuç olarak; kardiyomiyosite farklılaşan hücrelerin kardiyogenezis öncülü olan genleri (MEF2B, GATA-4, ACTC-1) ifade ettiği gösterilmiştir. AdMSC'ler için BrdU işaretleme yöntemi optimize edilmiştir. 1µM BrdU ile 24 saat inkübasyonun işaretleme için ideal olduğu gösterilmiştir. Aselülerize doku yapı iskelesinin eldesinde, hücre uygulaması için düşük konsantrasyonlardaki iyonik ve iyonik olmayan deterjan solüsyonlarını içeren yöntemin en verimli yöntem olduğu gösterilmiştir. İmplant edilen doku iskelelerinin herhangi bir immünolojik reaksiyona neden olmadığı, implantasyon bölgesinde enfeksiyona yol açmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda doku iskelesi üzerine uygulanan hücrelerin zaman içerisinde kardiyomiyosite özgü genleri ifade etme potansiyellerinin arttığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenşimal kök hücre, 5-Aza, kardiyomiyosit, BrdU işaretleme, deterjan, aselülerizasyon, ektopik göç.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ECTOPIC MIGRATION POTENTIAL OF Labeled CARDIOMYOCYTES DIFFERENTIATED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER *in vivo* IMPLANTATION

ESİN AKBAY

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

June 2015, 110 pages

In this study, mesenchymal stem cells were isolated from the rat fat tissue. Obtained cells were labeled by BrdU after mesenchymal stem cells were differentiated by 5-Aza to cardiomyocytes. Acellularised cardiac tissue scaffolds were acquired by applying of ionic and non ionic detergents and labeled differentiated cells were implemented to the obtained asellularized scaffolds. Implantation of these cells structure material composite to the rat retroperitoneum and ectopic migration of the implanted cells were examined by different techniques.

The rat gonadal and subcutaneous adipose tissue was isolated in the first part of the study. 5-Aza, a chemical agent, was used as a cardiomyogenic differentiation factor. The medium was changed twice per week during the differentiation procedure and the cells were incubated for four weeks at 37 °C and 5%CO₂-95%O₂ in standard culture conditions. Fluorescent staining with specific molecules for cardiomyocytes were selected for characterization following the cell differentiation. RT-PCR analysis was performed to investigate the expression of cardiac specific genes. The stem cells which were expected to differentiate to the cardiomyocytes were labeled using the BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) by incubation for 24 hours in standart culture medium. After the labeling the cells, the cells which are obtained as suspended by trypsinization were incubated with the acellularised cardiac tissue scaffolds for 24 hours. After incubation, three different groups are worked with as (a) tissue scaffold comprising cells (b) cell-free tissue

scaffolds and (c) control group. All experimental animal groups which received anesthesia were sacrificed at 1st, 2nd and 4th weeks following the implantation. The implanted tissue scaffolds and some tissues (liver, spleen, abdominal aorta, kidney and heart) were collected. The collected tissues were examined by immunohistochemical techniques and RT-PCR.

In conclusion, it had been shown that differentiated cardiomyocytes expressed the genes (MEF2B, GATA-4, ACTC-1) which are known as cardiomyocyte precursors. BrdU labeling method was optimized for AdMSCs. It had been found that 1 μ M BrdU with 24 hour incubation time is ideal for marking. Also, the method comprising the ionic and non-ionic detergent solution at low concentrations for cell application had been shown as the most efficient method to obtain acellularized tissue scaffold. Implanted tissue scaffolds did not cause any immunological reaction and infection around implantation area. In addition, cardiomyocyte specific gene expression potential increased over time by the cells applied on the tissue scaffolds.

Keywords: Mesenchymal stem cells, 5-Aza, cardiomyocytes, BrdU labeling, detergent, acellularization, ectopic migration.

TEŞEKKÜR

Mesleki eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, bana değerli vaktini ayırarak her türlü konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam sayın **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın planlanması ve tamamlanması sürecindeki bilimsel katkıları için Tez İzleme Komitesi hocalarım **Prof. Dr. Petek KORKUSUZ** ve **Doç. Dr. Ö. Aylin GÜRPINAR**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin Histoloji çalışmalarını yapabilmem için her türlü imkân ve olanaklarını bana sunan Biyoloji Bölümü **Zooloji Ana Bilim Dalı**'na ve çalışmamın liyofilizasyon kısmında bana yardımcı olan Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Hocalarımızdan **Prof. Dr. Adil Denizli** ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın pek çok aşamasında desteğini gördüğüm değerli arkadaşlarım Araş. Gör. **Handan Sevim**, Araş. Gör. **Gizem Ertürk**, Araş. Gör. **G. Hanife Tanır Dönmez**, Araş. Gör. **Sevcan Aldemir**, Araş. Gör. **Seçil Karahisar Turan** ve çok sevgili **Uzm. Ş. Remma Gülsoy**'a teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca **Dilara Perver**, **Özbeyen Atalay** ve **Salih Güdücüler**'e de yardımlarından dolayı tek tek teşekkür ederim.

Deneyleyim boyunca gece gündüz demeden daima yanımda olarak yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşım, kardeşim **Araş. Gör. Çiğdem Özenirler**'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmam boyunca her anımda sevgisiyle yanımda olduğunu hissettiren **Osman Murat Çetin**'e gösterdiği sabır ve anlayış için, tüm akademik hayatım ve eğitimim boyunca bana en büyük maddi-manevi desteği veren, bana inanan **CANIM AİLEMİN GÜZEL FERTLERİNE** ayrı ayrı sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Tezimin en zor, en kaotik zamanında yanımda olarak bana ayrıca destek olan biricik, değerlim kızkardeşim **Berna Akbay As**'a ayrıca tüm içtenliğimle teşekkür ederim. Bu süreçte kaybettiğim, bana her zaman doğru yolda olduğumu hissettiren en büyük destekçim canım dedem **Mehmet KİLİSLİ**'yi sevgi ve saygıyla anıyorum.

Bu çalışma 0130161002 Proje numarası ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimince desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kalp Doku.....	1
1.1.1. Koroner Arterlerin Fizyolojisi.....	2
1.2. Kalp Doku Hasarları	2
1.3. Kalp Doku Mühendisliği Yaklaşımları	3
1.3.1. Hücresel Yaklaşım	3
1.3.1.1. Kök Hücreler.....	5
1.4. Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücreler.....	6
1.4.1. Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Avantajları	6
1.4.2. Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Kullanım Alanları	6
1.4.2.1. Yumuşak Doku Hacimlendirilmesi	7
1.4.2.2. Yara İyileşmesi	7
1.4.2.3. AdMSC'lerin Doku Mühendisliğinde Kullanımı	7
1.5. Mezenşimal Kök Hücreden Kardiyomiyosit Farklılaştırma Yöntemleri.....	8
1.6. Hücre İşaretleme Yöntemleri	12
1.7. Yapı İskelesi Olarak Biyomateryaller ve Doku Aselülerizasyon Yöntemleri.....	13

1.7.1. Fiziksel Metodlar	17
1.7.2. Kimyasal Metodlar	17
1.7.2.1. Alkalin ve Asit Uygulamaları	17
1.7.2.2. İyonik Olmayan Deterjanlar	18
1.7.2.3. İyonik Deterjanlar	19
1.7.2.4. Zwitterionik Deterjanlar	20
1.7.2.5. Tri(n-butyl) phosphate (TBP)	20
1.7.2.6. Hipotonik ve Hipertonik Uygulamalar.....	21
1.7.2.7. Şelatlayıcı (chelating) Deterjanlar	21
1.7.3. Enzimatik Yöntemler.....	21
1.7.4. Proteaz İnhibitörleri.....	22
1.7.5. Antibiyotikler	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
2.1. Materyal.....	24
2.1.1. Deney Hayvanları	24
2.1.2. Cerrahi Operasyon ve Hücre Kültürü İçin Kullanılan Madde ve Malzemeler ...	25
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	25
2.2.1.1. AdMSC'lerin İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi.....	25
2.2.1.2. AdMSC'lerin Karakterizasyon Çalışmaları	27
2.2.1.2.1. İmmunofloresan Boyama.....	27
2.2.1.2.2. Akış Sitometri Analizi (FACS).....	28
2.2.1.3. Oil-red O Boyama.....	28
2.2.1.4. AdMSC'lerin Farklılaşma Potansiyeli Çalışmaları	29
2.2.1.4.1. Adipojenik Farklılaşma	29
2.2.1.4.2. Kondrojenik Farklılaşma	29
2.2.1.5. AdMSC'lerin Kardiyomiyosite Farklılaştırılması	29
2.2.1.6. Kardiyomiyosite Farklılaştırılan Hücrelerin Karakterizasyonu.....	31
2.2.1.7. Eşzamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizi	32
2.2.2. Hücre İşaretleme Çalışmaları	33
2.2.2.1. BrdU ile İşaretleme	34
2.2.3. Kalp İzolasyonu ve Aselülerizasyon Yöntemi	34
2.2.3.1. Aselülerize Kalp Matrislerinin Histolojik İncelemeleri	35

2.2.3.2. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) Uygulaması.....	35
2.2.4. <i>İn vitro</i> Biyomateryal-Hücre Etkileşimi Çalışmaları	36
2.2.4.1. MTT Analizi	36
2.2.4.2. Akridin Orange-Propidium İodid (AO/PI) Boyama	37
2.2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	37
2.2.5. <i>İn vivo</i> İmplantasyon Uygulaması.....	37
2.2.6. Dokuların ve Biyomateryal-Hücre Kompozitinin Vücuttan Toplanması ve İncelenmesi	39
2.2.6.1. anti-BrdU İmmunohistolojik Boyama.....	41
2.2.6.2. Eşzamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizi.....	41
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
3.1. Sonuçlar	43
3.1.1. AdMSC Kültürü.....	43
3.1.2. AdMSC Karakterizasyonu	43
3.1.2.1. İmmunofloresan Boyama.....	43
3.1.2.2. Akış Sitometrik Analiz Sonucu (FACS).....	45
3.1.3. Oil-red O Boyama.....	47
3.1.4. AdMSC Farklılaşma Potansiyeli	48
3.1.5. Kardiyomiyosit Farklılaştırılması (5-Aza uygulaması).....	50
3.1.6. Kardiyomiyosit Karakterizasyonu	52
3.1.7. RT-PCR.....	54
3.1.8. Hücrelerin BrdU ile İşaretlenmesi	55
3.1.9. Aselülerize Kalp Matrikslerinin Eldesi.....	56
3.1.10. Aselülerize Matriks-Hücre Etkileşim Çalışmaları	60
3.1.11. Perfüzyon Fiksasyonu ve Doku İncelemeleri.....	67
3.1.12. RT-PCR.....	83
3.2. Tartışma	86
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	106

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1.1 Rejeneratif Doku Yaklaşımında Kullanılan Hücre Tipleri.....	4
Çizelge 1.2 Embriyonik Kök/Progenitor Hücrelerle, Fetal ve Yetişkin Kök/Progenitor Hücrelerin Kardiyomiyosite Farklılaşmasında Kullanılan Çeşitli Sitokin/Büyüme Faktörü ve Sentetik Kimyasallar	10
Çizelge 1.3 <i>In vitro</i> Kardiyomiyojenik Farklılaşma İçin Farklı Kök Hücre Kaynakları İçin Kullanılan Bazı Teknik ve Yaklaşımlar.....	11
Çizelge 1.4 Hücre Takip Metodları ve Referansları	13
Çizelge 1.5 Kardiyak Doku Mühendisliği İçin Kullanılan Materyaller.....	14
Çizelge 2.1 Deney ve Kontrol Grupları İle Yapılan <i>in vivo</i> Uygulamaların Özeti ..	24
Çizelge 2.2 Hedef Genler ve Primer Dizileri.....	33
Çizelge 2.3 Deney Grupları ve Deney Düzeninde Tekrar Sayıları İle Toplam Kullanılan Hayvan Sayısının Özeti.	38
Çizelge 3.1 Farklı Dozlardaki 5-Aza'nın AdMSC'lerin Üzerine Etkisinin Zamana Göre MTT Analizi Sonuçları.	50
Çizelge 3.2 Farklı Konsantrasyondaki 5-Aza Grupları İle Kontrol Hücrelerinin Total RNA Miktarlarının Nanodrop Ölçüm Sonuçları.	54
Çizelge 3.3 Kontrol, 5µm 5-Aza ve 10µm 5-Aza Örneklerinde HPRT-1'e Göre Rölatif ACTC-1, GATA-4, GJA1, MEF2B ve Nkx2,5 İfadeleri.....	54
Çizelge 3.4 Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Doku İskelelerinin Hücre Tutunumlarının Farklı Zamanlardaki MTT Analiz Sonuçları.....	66
Çizelge 3.5 ESM+Hücre Grubu Deneklerinden Farklı Zamanlarda Explante Edilen Hücre Uygulamalı Aselülerize Matriksler ve Kontrol Matriksinden Elde Edilen Total RNA Miktarlarının Nanodrop Ölçüm Sonuçları.	83
Çizelge 3.6 Kontrol Matriks İle ESM+Hücre Örneklerinden Elde Edilen İmplante Matrikslerin HPRT-1'e Göre Normalize Edilmiş Rölatif GJA-1 İfadeleri.....	84
Çizelge 1.7 Kontrol Matriks İle ESM+Hücre Örneklerinden Elde Edilen İmplante Matrikslerin HPRT-1'e Göre Normalize Edilmiş Rölatif MEF2B, ACTC-1, GATA-4 ve Nkx2,5 İfadeleri.....	84

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1 24 Kuyucuklu Kültür Kabında Gonadal Adipoz Doku Parçalarının Yerleştirilmesi.....	26
Şekil 2.2 Sıçanda Perfüzyon Fiksasyonu Metodunun Şematik Görüntüsü.	40
Şekil 3.1 Dokudan Kültür Kabı Yüzeyine Göç Eden Hücreler (A) ve Konfluensiye Ulaşmış Kültür Kabı Görüntüsü (B) (X200).	43
Şekil 3.2 P/2'deki Adipoz Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin CD13 (A,B), CD29 (C,D), CD54 (E,F), CD90 (G,H) Moleküllerine Ait TR Floresan İşaretleme Görüntüleri (490-520 Nm) ve Işık Mikroskopi Görüntüleri (X200).....	45
Şekil 3.3 Sıçan Kökenli AdMSC'lere Ait Akış Sitometri Analiz Sonuçları. Fenotip Pozitif Antijenler (\geq %95): CD54, CD90, CD29, MHC Sınıf I ve Fenotip Negatif Antijenler (\leq %2): CD45, CD34, CD106 ve MHC Sınıf II.	47
Şekil 3.4 P/1 (A) ve P/2' deki (B) Hücrelerin Oil-Red O ile Boyanması (X200). ...	48
Şekil 3.5 (A) Yağ Damlacıklarının Oil-Red O İle Boyanması (X40) (B) Kondrojenik Farklılaşmayı Gösteren Safranin O Boyanması (X40).	49
Şekil 3.6 5-Aza Uygulanmamış Kontrol Grubu (A) ve Farklı Konsantrasyonlardaki 5 μ m (B) ve 10 μ m (C) 5-Aza Uygulanmış Hücrelerinin Işık Mikroskop Görüntüleri (X200).....	51
Şekil 3.7 Farklılaştırılmış Mezenşimal Kök Hücrelerin (A) Kardiyak Troponin I, (B) MHC, (C) Cnx-43, (D) Kaderin ve (E) Alfa-SMA Antikorları ile Floresan Boyama Görüntüleri (X200).....	53
Şekil 3.8 BrdU İşaretili Hücrelerin Işık Mikroskop Görüntüleri (A, B, C X100 Büyütme, D X40 Büyütme).....	56
Şekil 3.9 (A) Kalp Dokusunun Aselülerizasyon Uygulaması İçin Eşit Parçalara Bölünmüş Hali (B) Kalp Doku Parçalarının Aselülerizasyon İşlemine Tabi Tutulmasından Sonraki Hali.	57
Şekil 3.10 Kontrol (A) ve Aselülerize Kalp (B) Dokularının H&E Boyaması (X200).	58
Şekil 3.11 Kontrol (A) ve Aselülerize Kalp Matrikslerinin (B) Masson Trichrom Boyaması (X200).	58
Şekil 3.12 Aselülerize (A) ve Kontrol Kalp Matrikslerinin (B) DAPI ile Boyaması (X100).	59

Şekil 3.13 (A) Aselülerize Kalp Matrikslerinin Liyofilize Edilmesi ve (B) Çalışmada Kullanılan Liyofilize Edilmiş Aselülerize Kalp Matrikslerinin Milimetrik Boyutu	59
Şekil 3.14 Liyofilize Kalp Matrikslerine Farklılaştırılmış İşaretli Hücrelerin Uygulanması (A). Matrikslerin Sterilizasyonu İçin 24 Kuyucuklu Kültür Kaplarına Yerleştirilmesi (B). Matrikslere Hücre Uygulamasının İlk Basamağı (C). Tüm Hücre Süspansiyonunun (500 Ml)	60
Şekil 3.15 24. Saat Doku İskelesi+Hücre Uygulaması Işık Mikroskop Görüntüsü (A) X100 ve (B) X200.	61
Şekil 3.16 (A) 24 ve (B) 48. Saat Doku İskelesi+Hücre Uygulamasının AO/PI Boyama Görüntüsü (X100). Oklarla Gösterilen Alanlarda Hücre Yoğunlukları Gözlenmektedir.	62
Şekil 3.17 (A) 24 ve (B) 48. Saat Doku İskelesi+Hücre Uygulamasının DAPI Boyama Görüntüsü (X100). Oklarla Gösterilen Bölgelerde Çekirdek Boyanması Sonucunda Uygulanan Hücrelerin İskeleye Tutunmuş Gözlenmiştir.	62
Şekil 3.18 Kontrol Kalp Doku İskelelerinin (Aselülerize/Hücre Uygulamasız) Farklı Büyütmelerdeki SEM Görüntüleri A (X1.00), B (X3.00)).....	63
Şekil 3.19 Aselülerize Kalp Doku İskelelerinin Hücre Uygulanmasının 24. Saatinde Farklı Büyütmelerdeki SEM Görüntüleri A (X1.00), B (X4.00), C (X8.00).....	64
Şekil 3.20 Aselülerize Kalp Doku İskelelerinin Hücre Uygulanmasının 48. Saatinde Farklı Büyütmelerdeki SEM Görüntüleri A (X1.00), B (X4.00), C (X8.00).....	65
Şekil 3.21 Boş ESM Grubu Deneklerinden 1. Hafta (A), 2. Hafta (B) ve 4. Hafta (C) İmplant Doku İskelelerinin Vücut Dışına Alınması.....	67
Şekil 3.22 ESM+Hücre Grubu Deneklerinden 1. Hafta (A), 2. Hafta (B) ve 4. Hafta (C) İmplant Doku İskelelerinin Vücut Dışına Alınması.....	67
Şekil 3.23 Kontrol Grubu Deneklerinden Alınan Farklı Dokuların Anti-Brdu İle Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	69
Şekil 3.24 Boş ESM 1.Hafta Deneklerinden Alınan Dokuların Anti-Brdu ile Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	71

Şekil 3.25 Boş ESM 2.Hafta Deneklerinden Alınan Dokuların Anti-BrdU İle Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	73
Şekil 3.26 Boş ESM 4.Hafta Deneklerinden Alınan Dokuların Anti-BrdU İle Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	75
Şekil 3.27 ESM+Hücre 1.Hafta Deneklerinden Alınan Dokuların Anti-BrdU İle Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	78
Şekil 3.28 ESM+Hücre 2.Hafta Deneklerinden Alınan Dokuların Anti-BrdU İle Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	80
Şekil 3.29 ESM+Hücre 4.Hafta Deneklerinden Alınan Dokuların Anti-BrdU İle Boyanması (A) Abdominal Aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (X200).	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
pH	Hidrojen İyon
±	Artı Eksi İşareti
B	Beta

Kısaltmalar

ACL	Anterior Cruciate Ligament
ACTC-1	Actin Alpha Cardiac Muscle 1
AdMSC	Adipoz Doku Kökenli Hücre
AO/PI	Akridin Orange-Propidium Iodid
BrdU	Bromodeoxyuridine
Ca ⁺²	Kalsiyum
CD	Cluster Designation
cDNA	Komplementer DNA
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonia]-1-pro-panesülfat
cm	Santimetre
Cnx -43	Konneksin 43
CO ₂	Karbondioksit
CT	Compuomted Tomograghy
Cx	Sirkumfleks Koroner Arter
DAB	3'3-diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagles Medium F12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
ESM	Ekstraselüler Matriks
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF-1	Fibroblast Growth Factor 1
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
GAG	Glikozaminoglikanlar
GATA-4	GATA Binding Protein 4
GFP	Green Fluorescent Protein
GJA-1	Gap Junction Protein Alpha 1
gr	Gram
H&E	Hematoksilen Eosin

H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCL	Hidroklorik Asit
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMDS	Hekzametildisilazin
HPRT-1	Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase 1
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1
IgG	Immunoglobulin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
kg	Kilogram
LAD	Left Anterior Descending Coronary Artery
M	Molar
MEF2B	Myocyte Enhancer Factor 2B
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum
MHC	Miyosin Ağır Zincir
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Millimolar
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
n	Numara
NaCl	Sodyum Klorid
ng	Nanogram
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
Nkx2,5	NK2 Homobox 5
nm	Nanometre
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
PAA	Perasetik Asit
PBS	Phosphate-buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEG	Polietilen Glikol
PET	Positron Emission Tomography
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poliaktik-ko-glikolik Asit
PMSF	Fenilmetilsülfoniflorid
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonükleik Asit
RNAaz	Ribonükleaz
Rpm	Revolutions Per Minute
RT-PCR	Eşzamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyon
SAM	S-Adenozil Metionin
SB-10	Sülfabetani-10
SB-16	Sülfabetani-16
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
SEM	Scanning Electron Microscope

SIS	İntestinal Submukoza
SPECT	Single Photo Emission Computed
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TBP	Tri(n-butyl) Phosphate
TGFβ (1)	Transforming Growth Factor-Beta
TR	Texas Red
VEGF	ascular Endothelial Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α-SMA	Alfa Düz Kas Aktin
μL	Mikrolitre
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
5-aza	5 Azacytidine

1. GİRİŞ

1.1. Kalp Dokusu

Kalp, düzenli bir pompa olarak çalışmak üzere katlanmış, duvarı kalınlaşmış bir endotel tüpüdür. Kalbin büyüklüğü şahsa, cinsiyete ve yaşa göre değişiklik göstermektedir. Memeli hayvanlarda göğüs boşluğu içerisine yerleşmiş olup sternum ve 3., 4. ve 5. kostal kartilajlar ile örtülü halde bulunmaktadır [1].

Kalbin içinde yerleştiği kese olan perikard iki tabakadan oluşur. Dıştaki fibröz tabaka perikard boşluğunu komşu organlardan ayırır. Fibröz perikard yukarıda önde aort, pulmoner arter, geride vena kava superior, sol atriyum sol üst pulmoner venler arasındaki transvers sinüsü, aşağıda ise sol atriyum arkasındaki vena kava inferior ve pulmoner venler arasındaki oblik sinüsü oluşturduktan sonra kalbe yönelerek visseral epikardı oluşturur [1],[2].

Atriyum ve ventrikül duvarları muhtelif yönlerde dizilen kas liflerinden (miyokardiyum) oluşmaktadır. Atriyumda kas lifleri dışta dairesel, içte longitudinal yönde seyrederek. Atriyumlarla, ventriküller arasındaki fibro-tendinöz bir halkadan başlayan ventrikülün kas lifleri spiral bir yönde kıvrılarak papiller kaslarda ya da atrio-ventriküler bölgede sonlanmaktadır. Bu iki bölge arasında üçüncü bir kas tabakası daha mevcuttur. Bu dizilimin avantajı kontraksiyonun daha kuvvetli olması ve boşluğun muntazam bir şekilde küçülmesinin sağlanmasıdır [3].

Miyokardiyum üç tip hücreden oluşmaktadır. Bunlar kasılabilir kardiyomiyositler ki bu hücreler kanı dolaşıma pompalamak için kasılırken, miyoendokrin kardiyomiyositler atriyal natriüretik faktörünü üretirler ve nodal kardiyomiyositler de kalbin ritmik olarak kasılmasını kontrol etmek için özelleşmiş hücrelerdir [3].

Kalbin iç kısmını kaplayan tabaka ise endokardiyumdur. Bu tabaka oldukça ince olup, yapısı itibarıyla boşluklara bakan tek sıralı yassı endotel hücreleri ile bunun altında yer almış kollajen ve elastik lifleri içeren bağ dokusundan oluşmaktadır. Endokard tabakası genellikle kas yapısı bol olan kısımlarda ve sürtünmelerin az olduğu yerde incedir. Endokardın en kalın olduğu yer aortun ağzıdır. Bu bağ dokuların arasındaki düz kas lifleri ise longitudinal bir yönde dizilmiş olup bir ağ meydana getirirler. Bu düz kas lifleri kas boşluğunun küçülme ve genişleme sırasında endokardın elastiki gerginliğini düzenler. Kalbin atım hacminin değişmesi sırasında da endokardın gerginliğini ayarlarlar.

Mediastenden aşağı doğru inen vagus ve frenik sinirler kalp ile yakın ilişkilidir [2],[3].

1.1.1. Koroner Arterlerin Fizyolojisi

Koroner arterler, aorta ve miyokard içindeki kapiller yataklar arasındaki damar yollarıdır. Sağ ve sol olmak üzere iki büyük koroner damar bulunmaktadır. Sağ ve sol koroner arterler karşılıklı aort kapak liflerinin arkasından çıkarlar [1].

Koroner sirkülasyon baskınlığı, kalbin posterior yüzünü besleyen artere göre isimlendirilir. Bunlar özetlenirse;

- a) Sol ana koroner arter (sol ön inen koroner arter (LAD), sirkumfleks koroner arter (Cx))
- b) Sağ koroner arter
- c) Balanse koroner arter olarak özetlenebilir.

1.2. Kalpteki Doku Hasarları

Kalp ve kan damarlarında rastlanan hastalıklar, kalp dokusunda ve damarlarda ciddi, geri dönüşümsüz hasarlara neden olmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar çok farklı sebeplerle gözlenebilirken, en sık rastlanan nedenler arasında ateroskleroz ve hipertansiyon sayılabilir.

Görülen kardiyovasküler rahatsızlıklar;

- Koroner kalp hastalığı
- Kardiyomiyopati
- Hipertansif kalp hastalığı
- Kalp yetmezliği
- Kardiyak aritmiler
- İnflamatuar kalp hastalıkları (endokardit, miyokardit, kardiyomegali)
- Kalp kapak hastalıkları
- Periferik arter hastalıkları olarak sıralanabilir.

Bu kalp ve damar hastalıklarından sonra görülen kalp doku hasarlarının tedavisi için günümüzde birçok yöntem geliştirilmektedir. Gelişmekte olan en önemli tedavi yaklaşımları doku mühendisliği yaklaşımları olmaktadır.

1.3. Kalp Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Kalp yetmezliği gibi birçok kalp rahatsızlığı sanayileşmiş ülkelerde mortalite nedeni olarak ilk sırada sayılır. Miyokardiyal enfarktüs tipik olarak fibrotik doku oluşumu ve iskemi sonrasında çok sayıdaki hücre ölümü sonucunda daimi kardiyak fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanmaktadır. Kalp yetmezliğinin son aşamasındaki hastalar için kaçınılmaz son, kalp donörü beklemektir. Ancak organ donör azlığı ve immünsüpresif tedavi sonucunda oluşan komplikasyonlar, doktorları ve araştırmacıları hasarlı kalbin rejenerasyonunu sağlamak için yeni tedavi stratejilerine yöneltmiştir [4].

Tarihsel olarak tüm yeni stratejilerin başlangıcı açık kalp ameliyatları sırasında kanın dolaşımını sağlamak amacıyla kalp-akciğer makinasının Miller ve ekibinin [4] keşfi ile olmuştur. Bir sonraki basamak kadavralardan alınan mitral kapakçığın replasmanının sağlanmasıdır. Bu operasyonlar sonrasında hastanın hayatta kalma oranı tamamen operatöre bağlı iken otolog doku kullanılarak yapılan operasyonlar sonrasında hayatta kalma süresi maksimum 20 yıl olarak belirlenmiştir. İlk yapay kalp replasmanı Kwan-Gett ve çalışma arkadaşları tarafından 1969 yılında yapılmıştır [4]. 1970'li yılların başında kalp üzerine ilk mühendislik çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada köpek sol ventrikülünün geometrik modeli oluşturularak yapılmıştır.

1990'ların ortalarında hasarlı kalp için hücre implantasyonunu takiben gen aktarım teknikleri uygulamaları başlamıştır [4]. Başlangıçta miyokardiyumun genetik olarak modifiye edilen hücreler ile tedavi edilebileceği düşünülmüştür. Aynı yıllarda sentetik biyobozunur materyaller ve hücreler kullanılırken, daha sonraki birçok çalışmada çeşitli sentetik materyaller ve farklı hücre tipleri denenmiştir [5]. En yeni yaklaşım ise; biyobozunur doku ile farklı hücre ve kök hücre tiplerinin kombine halde kullanılmasıdır.

1.3.1. Hücresel Yaklaşım

Fonksiyonel miyokardiyal doku rejenerasyonu için ilk olarak ventrikül duvarına ya da koroner damarlara enjeksiyon ile hücre nakli denenmiştir. İlk deneme yaklaşık 20 yıl önce genetik olarak modifiye edilmiş embriyonik kök hücrelerden elde edilmiş kardiyomiyositlerin enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir [6]. Bundan sonraki çalışmalar implante edilen hücrelerin sağlıklı kalpte ve hasarlı kalpteki akıbetlerini

araştırmıştır. Özellikle son yıllarda birçok çalışmada yetişkin kök hücrelerden örneğin kemik iliği kök hücrelerinin farklı hücrelere, kardiyomiyosit dahil, farklılaşma özelliğine sahip oldukları gösterilmiştir. Çalışmaların çoğu miyokardiyal enfarktüsle hayvan modellerinde hücre aşılmasının kasılabilir fonksiyonunu geliştirdiği göstermiştir [7]. Ancak hematopoietik ya da miyoblastik yetişkin kök hücrelerin implantasyonu sonrasında kardiyak fenotipi gösteremediği açıklanmıştır [8]. Enjeksiyon yaklaşımının olumsuz yanı enjekte edilen hücrenin %90'dan fazlasının kaybedilmesi ya da hedeflenen bölgeye aşılanamamasıdır. Bu nedenle günümüzde doku mühendisliği yaklaşımı olan hücre tutunumunu sağlayan biyomateryaller geliştirilmektedir [9].

İmplantasyonda kullanılacak hücre çeşidinin seçiminde dikkat edilmesi gereken özellikler:

- Enjekte edilen hücre sayısı
- Enjekte edilen hücreden ne kadarının tutunduğu
- Aritmiye neden olup olmadığıdır.

Son yıllarda kullanılan farklı hücre tipleri tablo halinde Çizelge 1.1.' de verilmiştir.

Çizelge 1.1 Rejeneratif doku yaklaşımında kullanılan hücre tipleri.

Hücre tipi	Ref
Kardiyomiyosit (Embriyonik ya da neonatal)	[10],[11]
Embriyonik kök hücre	[12]
İskelet kas hücreleri	[4], [13], [14]
Monositler	[4]
Kemik iliği hücreleri	[15]
Mezenşimal kök hücreler	[4], [16]
Aortik kapak intestinal hücreleri	[4]
Endotelial progenitor hücreler	[4], [17]
Göbek kordon hücreleri	[18]
Vasküler düz kas	[19]

1.3.1.1. Yetişkin Kök Hücreler

Günümüzde kullanılan medikal tedavilere rağmen gelişmiş ülkelerde kalp hastalıkları önemli bir mortalite ve morbidite sebebi olarak kalmıştır. Kardiyak onarımı için kök ya da progenitor hücre implantasyonu ümit verici bir strateji haline gelmiştir. İnsan embriyonik kök hücre elde edilmesi konusunda gün geçtikçe karşıt görüşler artmasına karşın otolog yetişkin kök hücrelerle alakalı herhangi bir major etiksel ya da immünolojik bir problem gözlenmemektedir. Yetişkin hücre kaynakları arasında kas, kemik iliği, kan, epidermis, beyin, karaciğer ve son zamanlarda adipoz doku sayılmaktadır [20].

İskemik kalp hastalıklarında klinik olarak kullanılan ilk hücre 'iskelet miyoblast'ıdır [21]. Deneysel çalışmalarda enjekte edilen miyoblastların post-enfarktüs skarında stabil kaldığı ve sol ventrikül fonksiyonunda iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir [22]. Ancak iskelet kası; deri, beyin, karaciğer ve kemik iliği gibi önemli bir organdır. Bu organlardan hücre elde etme prosedürü acı veren ve pahalı bir yöntemdir. Örnek olarak kemik iliği aspirasyonu; klinik uygulama için gerekli *ex vivo* büyüme basamağında yeterli miktarda hücre eldesini sağlayamamaktadır. Bu nedenle araştırmalar farklı kök hücre kaynağı arayışına girmiştir. Bu bağlamda adipoz doku ideal bir kaynak olarak görülmeye başlanmıştır. Bunun nedenleri arasında; hastadan eldesinin kolaylığı ve kültür ortamında elde edilen hücre sayısının yeterli miktarda olması sayılabilir [20],[23], [24].

İnsan adipoz dokusundan kollajenaz ile parçalanarak elde edilen kök hücre popülasyonunun birçok hücre hattına farklılaştığı gösterilmiştir. Bunların arasında adipoz doku, kıkırdak, kemik, iskelet kası, nöronal hücre, endotelial hücre, kardiyomyosit ve düz kas hücreleri sayılabilir. Literatürde adipoz doku stroması multipotent kök hücrelerine verilen çok sayıda farklı isimle karşılaşılabılır. Adipoz doku kökenli kök hücre (AdMSC) en yaygın kullanılan terimdir ve vasküler (perisit ve endotelial progenitor hücre)/adiposit progenitor hücre (preadiposit) ve yetişkin multipotent hücrelerin yanısıra dolaşım kan hücreleri, fibroblastlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve immün hücreleri (makrofaj ve lenfositler gibi) içermektedir [25].

1.4. Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücreler

1.4.1. Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Avantajları

İskemik hastalara kemik iliği hücre transplantasyon yöntemini kullanan çalışmalar, insan angiojenik hücre terapisi için periferel kan ya da kord kanından elde edilmesi gereken minimum endotelial hücre sayısını 10^7 ya da 10^9 olarak bildirmiştir [20]. Periferel kanda bu progenitor hücrelerin seyrek olarak bulunması pro-angiojenik ve pro-vaskülogenik etki için ihtiyaç duyulan endotelial hücre popülasyonunun eldesi için gerekli donör sayısını arttırmaktadır [26]. Periferel kan ve adipoz dokudaki endotelial hücre elde edilebilirlik potansiyelleri karşılaştırıldığında adipoz dokunun çok daha büyük bir potansiyele sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada; aynı hastadan alınan kemik iliği stromal hücrelerle adipoz doku kökenli kök hücrelerin gerekli olan miktar elde edilebilirliği karşılaştırılmış ve bir hafta içinde istenilen hücre miktarının eldesi için gerekli olan kemik iliği stromal hücrelerinin %5'i kadar AdMSC gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile AdMSC'nin kuvvetli bir proliferasyon gücüne sahip olduğu anlaşılmaktadır [20].

Son çalışmalar *in vivo* ve *in vitro* uygulamalarda AdMSC'nin immünoregülatör özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Birbirinden bağımsız çalışmalar taze elde edilmiş SVF (stromal vasküler fraksiyon) hücreleri ve erken pasaj sayısında bulunan AdMSC'nin tersine kültüre edilen AdMSC'nin yüzey histokompatibilite antijenlerinin ifadesinin gittikçe azaldığını ve zamanla T-hücrelerinin proliferasyonuna engellediklerini göstermiştir [27], [28]. Bu çalışmalarla ilerde yaşlı hastalarda, malignan hastalıklara sahip ya da obez hastalara allojenik donörlerden elde edilen ve yeterli miktarda kültüre edilmiş AdMSC'lerin kullanımı söz konusu olabilecektir.

Tüm bu özelliklerle AdMSC elde edilebilirlik ve immün cevap oluşturmama güvenliğini sağlaması açısından allojenik kullanım potansiyeline sahip önemli bir mezenşimal kök hücre kaynağı olarak görülmüştür.

1.4.2. Adipoz Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Kullanım Alanları

AdMSC transplante edildikleri bölgede proliferasyon özelliklerine devam edebilen ve multipotent özelleşme kapasitesine sahip olduklarından uygulandıkları alanda, alanın gereksinimlerine uygun bir şekilde muamele edilerek ihtiyaca göre cevap vermesi sağlanabilen hücrelerdir. Özellikle plastik cerrahide AdMSC'ler genelde

stromal vasküler fraksiyon halinde veya izole edilmiş ancak kültüre edilmemiş hücreler olarak kullanılırlar. Bu hücrelerin kullanım alanları genel başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

1.4.2.1. Yumuşak Doku Hacimlendirilmesi

Otolog adipoz doku implantasyonları, sıklıkla plastik cerrahide rekonstrüktif ve estetik amaçla ve daha yaygın olarak ise adipoz doku transferi ile meme estetik ameliyatları son dönemde popülerite kazanmıştır. Bununla birlikte transplante edilen adipoz dokusunun büyük oranda atrofiye olması nedeniyle seansların tekrar edilmesine ihtiyaç duyulur. AdMSC'lere ihtiyaç bu noktada ortaya çıkmaktadır. AdMSC'lere göre olgun kök hücrelerin dayanıklı olmaması ve hipoksik ortam gibi olumsuz koşullara olan duyarlılıklarının fazla olması nedeniyle, matür adipoz dokusu kök hücreden zenginleştirilerek uygulanır [29].

1.4.2.2. Yara İyileşmesi

Adipoz doku izolasyonu sonrası santrifüj edilen ve saflaştırılan yağ dokusunun tekrarlayan seanslarla radyoterapiye bağlı hasarlanmış dokulara uygulanmasını takiben, radyasyon hasarlı dokunun iyileşmesi lipoaspirat içindeki kök hücrelere bağlanmıştır. Lendeckel ve ark. [30] çalışmasında AdMSC'ler geniş travmatik kalvarial defekti olan bir hastada kanselöz kemik greftleriyle birlikte uygulanmış ve post-operatif üçüncü ayda çekilen tomografik incelemede belirgin ossifikasyon tespit edilmiştir.

Son dönemde AdMSC'lerin neovaskülarizasyonu arttırarak rastgele paternli fleplerin yaşayabilirliğini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [29].

1.4.2.3. AdMSC'lerin Doku Mühendisliğinde Kullanımı

AdMSC'lerin doku mühendisliği alanında kullanımıyla ilgili başarılı olgu sunumları yayınlanmış olsa da literatür incelendiğinde deneysel amaçlı uygulamaların yaygın olduğu görülür.

Doku mühendisliği uygulamasının başarılı olabilmesi için kök hücreler ve bu hücrelerin yaşamlarını sürdürebilecekleri uygun üç boyutlu biyolojik mikro çevre ve biyomoleküllere (sinyal sistemleri) ihtiyaç vardır. Bu nedenle seçilecek iskelet yapının kök hücrelerin ortama yapışabilme (adezyon) ve bütünleşmelerini sağlayabilmesi yanı sıra çoğalma ve farklılaşmalarına da imkân tanıyabilir olması

gerekmektedir. Literatürde, kollajen mikro boncuklar, Tip I kollajen, hiyaluronik asit bazlı sünger yapılar, hücreden arındırılmış plasental matriks, enjekte edilebilir polilaktik ve glikolik kürecikler, ipek-kitosan doku iskelesi, poliglikolik ve polipropilen doku mühendisliği amacıyla kullanılan biyomateryallerdir.

Bununla birlikte, Tip I kollajen içeren süngerimsi matriks yapıların, poliglikolik asit veya hiyaluronik asit bazlı jel matrikslere göre daha fazla yağ doku benzeri yapı oluşturabildiği bildirilmiştir. Kök hücrelerin üç boyutlu matrikslere tutunması sonrası bu yeni ortamda çoğalmaları ve istenilen tipte hücrelere dönüşebilmeleri ayrıca yeni damar dokularının oluşabilmesi, kök hücrelerle birlikte ortama eşzamanlı olarak uygulanan biyomoleküllerle de ilişkilidir.

Son dönemde yapılan çalışmalar trombositten zengin plazmanın içerdiği yoğun büyüme faktörleri sayesinde AdMSC'lerin çoğalma ve parakrin fonksiyonları üzerinde olumlu etki yaptığını göstermektedir. Pickard ve arkadaşlarının, biyomateryaller çevresinde oluşan biyofilm tabakasını kök hücreler kullanarak önlemeye yönelik yaptıkları bir çalışmada damar endoteli büyüme faktörlerinin (Vascular endothelial growth factor-VEGF), AdMSC'lerle birlikte uygulandığında kök hücrelerin poliüretan implant yüzeyine yapışabilirliklerini ve implantın çevre dokuya entegrasyonunu arttırdığını tespit etmiştir. Bu çalışmada plastik cerrahi açısından ilginç olabilecek bir başka sonuç daha ortaya çıkmıştır. AdMSC'lerin her ne kadar poliüretan ve poliamid üzerindeki biyofilm tabakasının oluşumunu azaltıyor ve entegrasyonu arttırıyorsa da, silikon materyaller çevresine yapışmadıkları ve kapsül formasyonunu önlemeye katkıları olmadığı tespit edilmiştir.

Literatürde AdMSC'lerle doku mühendisliği uygulamalarında, hücrelerin çoğalma ve değişime uğrama veya damarlanmanın arttırılması amacıyla üzerinde çalışılan büyüme faktörleri şu şekilde sıralanabilir; FGF2, PDGF, TGF β , VEGF, HGF, granülosit ve makrofaj koloni stimüle edici faktör, stroma kökenli faktör-1 α .

1.5. Mezenşimal Kök Hücreden Kardiyomiyosit Farklılaştırma Yöntemleri

İskemik hayvan modeli çalışmaları, kök hücre implantasyonu ile hasarlı miyokardiyum rejenerasyonunda ümit verici olmasına rağmen kısıtlı bir başarının olduğunu göstermiştir [31]. En önemli kısıtlama farklılaşmamış kök hücrelerin implantasyonuna odaklanması ve sonuçta kardiyomiyosit farklılaşmasının *in vivo* ortamda implantasyon sonrası alıcı vücudunda gerçekleşmesinin beklenmesidir

[32], [33]. Ancak bu durumda sadece çok az transplante edilen hücre istenilen hücreye (örneğin kardiyomyosite) farklılaşabilmektedir. Bu da miyokardiyal rejenerasyonun klinik uygulamasının etkinliğini düşürmektedir. Transplantasyon öncesi, farklılaşmamış kök hücrelerin kardiyomyojenik kökenli hücrelere farklılaşması *in vitro* ortamda yönlendirilmesi ile hem klinik verimlilik hem de transplante edilen hücre grubunun etkinliği artırılabilir.

Diğer bir önemli karşılaşılan sorun ise farklılaşmamış kök hücrelerin implantasyon terapisinde “güvenlik” durumudur. Örneğin embriyonik kök hücreler, *in vivo* implantasyon sonrasında teratoma oluşumuna neden olabileme potansiyeline sahiptir. Farklılaşmamış hücrelerin bu olasılığı düşük olsa da transplante edildikleri dokuda farklı, istenmeyen hücre grubuna farklılaşabilirler [34].

In vivo hayvan modelinde kök hücrelerin kardiyomyosit farklılaşmasını düzenleyen sinyal yollarının ve moleküler mekanizmaların açıklanması son derece zordur. Bu nedenle *in vitro* ortamda kök hücrelerin kardiyomyosite farklılaşması için etkin bir şekilde yönlendirilmesi, genetik manipulasyon ve moleküler karakterizasyonun daha kolay izah edilmesi bakımından önem kazanmaktadır [35].

Günümüzde farklı kaynaklı kök hücrelerin kardiyomyosite farklılaştırılması için kullanılan yöntemler Çizelge 1.2’ de ve teknikler Çizelge 1.3’ te verilmiştir.

Çizelge 1.2 Embriyonik kök/progenitor hücrelerle, fetal ve yetişkin kök/progenitor hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşmasında kullanılan çeşitli sitokin/büyüme faktörü ve sentetik kimyasallar.

Sitokinler / Büyüme faktörleri/ Sentetik kimyasallar	Kök Hücre Çeşidi		
	Embriyonik kök/progenitor hücreler	Fetal kök/progenitor hücreler	Yetişkin kök/progenitor hücreler
TGF- β 1 ailesi	+	+	
IGF-1	+	+	
FGF	+	+	
Oksitosin	+		
Eritropoietin	+		
5-Aza	+	+	+
Askorbik asit	+		
Retinoik asit	+		
DMSO	+		
Dynorphin B	+		

Çizelge 1.3 *In vitro* kardiyomyojenik farklılaşma için farklı kök hücre kaynakları için kullanılan bazı teknik ve yaklaşımlar.

	Embriyonik kök/karsinoma hücreler	Fetal kök/progenitor hücreler	Yetişkin kök/progenitor hücreler	Neonatal/yetişkin primer kardiyomyositler
Serumsuz/ tanımlanmış kültür ortamları	+			
Ko-kültür/besi ortamı	+		+	
ESM				+
Serbest radikaller /reaktif oksijen türleri	+	+		+
Elektriksel stimülasyon	+			+
Mekaniksel stimülasyon				+
Yüksek ısı / sıcaklık şoku				+

Tez kapsamında bu yöntemlerden 5-azasitidin (5-Aza) kullanılmıştır.

5-Aza bir sistidin analogu olup, DNA metiltransferazla kovalent bağ kurarak DNA'nın inhibisyonuna neden olur. Toksik bir anti-metabolit olan 5-Aza hücrelere uygulandığı zaman hücrelerde sessiz genlerin ifadesinin ve DNA replikasyon zamanının değişmesini sağlar [36].

DNA metilasyonunun hücredeki görevi; gen regülasyonu, genomik içgüdüleme, X kromozomunun inaktivasyonunu sağlama, viral DNA'ların inaktivasyonu ve hücre

farklılaşması sırasında dokuya özgü spesifik genlerin transkripsiyonel düzenlenmesidir.

DNA'daki c halkasına DNA metiltransferazın metil aktarımı ile DNA metilasyonu gerçekleşmiş olur. Bu reaksiyon sırasında S-adenozil metionin (SAM) bir metil donörü olarak davranır. 5-Aza ortamda olduğunda DNA metiltransferazın SAM grubu 5-Aza'nın altıncı karbonu ile kovalent olarak bağlanarak, DNA'dan DNA metiltransferazın tekrar kullanımı için ayrılması engellenmiş olur. Bu nedenle hücredeki DNA metiltransferazında azalma oranı ile orantılı olarak DNA metilasyonunda da azalma gerçekleşir [37].

5-Aza'nın tez kapsamındaki kullanım amacı elde edilen adipoz doku kökenli kök hücrelerin kardiyomyosite farklılaştırılmasını sağlamaktır. Farklılaşmanın gerçekleşmesi için gerekli 5-Aza miktarı farklı konsantrasyonlar denenerek bulunmuş ve 5-Aza uygulamasını takip eden dördüncü haftada kardiyomyosite özgü işaretleyicilerle inceleme yapılmıştır. Uygun doz seçildikten sonra deney grupları için gerekli hücre farklılaştırılması yapılmıştır.

1.6. Hücre İşaretleme Yöntemleri

Son yıllarda kök hücre aracılı tedavi çok sayıda hastalığın potansiyel tedavisi olarak gündeme gelmiştir. Ancak bu tedavi yaklaşımlarında karşılaşılan en önemli olumsuzluk, transplante edilen hücrenin vücut içindeki akıbetidir. Transplante hücre uzun periodlarla *in vivo* ortamda güvenilir bir şekilde takip edilmelidir.

Günümüzde birçok takip metodu geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak immünohistokimyasal, floresan hücre boyaları ve proteinleri verilebilir. Aynı zamanda Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve Quantum Dotlar diğer takip yöntemleridir [38]. Günümüze kadar kullanılan hücre işaretleme ve takip metodları referansları ile birlikte Çizelge 1.4' te özetlenmiştir.

Çizelge 1.4 Hücre takip metodları ve referansları.

Hücre takip metodları:	Ref:
1. Histokimyasal Teknikler	
1. Timidin analogu: BrdU	[39], [40]
2. İmmünohistokimyasal işaretleyiciler	[41]
3. Y-kromozom işaretleyicisi	[42]
4. Lac-Z raportör molekülü	[43]
2. Floresan Hücre Boyaları	
1. Çekirdek ve sitosolik boyalar: DAPI, Hoecht boyası, Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	[44]
2. Floresan Membran boyaları: CM-DiL, CM-DiO	[44], [45]
3. Floresan proteinler: GFP (Yeşil floresan proteini, RFP (kırmızı floresan proteini)	[46], [47]
3. Quantum Dotlar: Q-Tracker 655	[48]
4. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI)	[41], [49]

Tez kapsamında histokimyasal teknikler içerisinde sınıflandırılan timidin analogu (BrdU) ile hücrelerin işaretlenmesi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin seçilmesindeki amaç, transplante olacak hücrelerin proliferasyonu ile yeni oluşan hücrelerin de bu molekül tarafından işaretlenebilmesidir.

BrdU, hücre döngüsünün DNA sentez fazı sırasında yeni sentezlenen replike DNA ile birleşmektedir. Bu şekilde proliferen hücreler de işaretlenmektedir.

1.7. Yapı İskelesi Olarak Biyomateryaller ve Doku Aselülerizasyon Yöntemleri

Organ implantasyonu günümüzde son dönem organ hastalıklarında altın standart tedavi yöntemi haline gelmiştir [50]. Amerikada yaklaşık 27.000 hastanın son dönem karaciğer hastalıklarından, 120.000 hastanın son dönem akciğer hastalıklarından, 112.000 hastanın son dönem böbrek rahatsızlıklarından ve 425.000 kişinin kalp hastalıklarından öldüğü bildirilmiştir [50]. Bununla birlikte

implantasyon için uygun organ veya dokuya olan talep hali hazırdaki donör sayısından çok daha fazladır. Bu kritik donör sıkıntısı implantasyonda kullanılacak sağlam organ elde edilmesine yönelik laboratuvar koşullarında doku mühendisliği ve rejeneratif tıp tabanlı stratejiler gibi yeni teknolojilerin keşfine yöneltmiştir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın amacı; hasar gören vücut bölgelerinde doku ve organların yeniden yapılandırılmasıdır. Doku mühendisliği yaklaşımının başlıca bileşenleri arasında doku spesifik hücreleri, biyomateryaller ve doku oluşumunu destekleyici uygun çevre sayılabilir.

Kalp doku mühendisliğinde kullanılan ilk materyaller hidrolitik olarak bozunabilen biyouyumlu bileşiklerden polilaktik asit, poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimerleri olan polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)' lerdir [5]. Sonradan araştırmacılar kullanılan materyallerin mekanik özelliğinin kalp dokusunun elastikiyetine adapte olması gerektiğine karar vermiştir. Bunun üzerine farklı sentetik/doğal polimerlerden yapılmış hidrojeller üzerine yoğunlaşmıştır.

Son yıllarda yapılan farklı çalışmalardaki kalp rejenerasyonunda kullanılan çeşitli materyaller Çizelge 1.5' te verilmiştir.

Çizelge 1.5 Kardiyak doku mühendisliği için kullanılan materyaller.

Materyaller	Ref
Doğal	
Jelatin yapı iskelesi	[51]
Asellüler domuz yapı iskelesi	[52]
Porlu alginat yapı iskelesi	[53]
Alginat-jelatin-PEG yapı iskelesi	[53]
Kollajen yapı iskelesi	[54], [55]
Fibrin glue	[56]
Sentetik	
PLA-PGA	[57]
Poly-l-laktit-jelatin-PGA	[58]
Polivinil alkol	[4]
PGA-co-polihidrobutirat	[59]
ϵ -kaprolakton-ko-l-laktit	[19]
Poliüretan	[60]
TMC-ko- ϵ -kaprolakton-ko-D-L-laktit	[11]

Birçok çalışma grubu doğal polimerlerden özellikle kollajen yapı iskelelerinden elde edilen materyal üzerine yoğunlaşmıştır [61],[62]. Bu çalışmalar sonucunda kalp ekstraselüler matriks kullanımı önem kazanmıştır.

Doku mühendisliği yaklaşımında kullanılacak üç boyutlu yapı iskelesinde aranan özellikler:

- Doğal ya da sentetik bileşimi olmalıdır.
- Hücreler kolaylıkla tutunabilmelidir.
- Tutunan hücrenin, hücre sel canlılığını ve farklılaşma potansiyelini devam ettirebilmelidir.
- Bir cm kalınlıktan fazla olmamalıdır (hipoksik koşul oluşumunun engellenmesi için) [63]

Bu özelliklere bakıldığı zaman günümüzde hücrelerden arındırılmış (aselülarize) dokulardan elde edilen doğal yapı malzemeleri üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında kalp rejenerasyonunda kullanılmak üzere farklılaştırılan işaretli kök hücreler için yapı malzemesi olarak kalp aselülarizasyonu ile elde edilen yapı iskeleleri implantasyon için seçilmiştir.

Aselülarize doku ve organlar biyomateryaller arasında çok sayıda doku mühendisliği/rejeneratif tıp uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmakta olup kullanılan aselülarizasyon metodları, ilgili organ ve dokuların çeşidine göre değişmektedir. Dokuların ve organların aselülarizasyonu sonucunda elde edilen biyolojik doku iskeleleri hem pre-klinik hayvan çalışmalarında hem de insan klinik uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [50], [64]. Dokudan ya da organdan hücrelerin uzaklaştırılması ekstraselüler matriksi (ESM) oluşturan yapısal ve fonksiyonel kompleks protein karışımının elde edilmesini sağlamaktadır. ESM'nin hangi dokudan elde edildiği, doku orijininin türü, aselülarizasyon yöntemi ve elde edilen biyolojik doku iskelesinin son sterilizasyon metodları çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Tüm bu faktörler ESM'nin bileşimini ve en küçük yapısını buna bağlı olarak da ESM'nin implantasyonu sonrasında alıcının bu yapıya immünolojik tepkisini oluşturmaktadır.

ESM'nin aselülarize edilmesinin gerekçelerine bakıldığında; xenogenik ve allogenic hücre sel ajanlar, tanıma göre, alıcı tarafından yabancı olarak kabul edilmekte ve bu nedenle inflamatuvar cevaba veya dokunun immün olarak reddine neden olmaktadır. Ancak ESM'nin komponentleri türler arasında korunmuştur hatta xenogenik alıcının dahi tolere ettiği bilinmektedir [65]. Bugüne kadar kalp

kapakçıkları [66],[67], kan damarları [68], [69], deri [70], sinirler [71], iskelet kası [72], tendon [73], ligament [74], küçük intestinal submukoza (SIS) [75], idrar kesesi [76] ve karaciğerinde bulunduğu çok sayıdaki dokudan elde edilen ESM'nin doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıp uygulamalarında çalışıldığı bilinmektedir. Aselülerizasyon metodlarının amacı tüm hücrelerin ve nükleer materyallerin en iyi şekilde ortadan kaldırılması ve elde edilen ESM'nin kompozisyonunda, biyolojik aktivitesinde ve mekanik bütünlüğünde karşılaşılabilecek olumsuz etkilerin en aza indirgenmesidir.

Hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik kullanılan yöntemlerden herhangi birinin işlem basamaklarına bakıldığında ESM'nin mimarisinin doğal üç boyutunu değiştirdiği bilinmektedir. Doku aselülerizasyonu için yararlanılan yöntemlerden en çok tercih edilenleri fiziksel ve kimyasal uygulamaların birlikte kullanımınıdır. Fiziksel muamele yöntemleri agitasyon veya sonikasyon, mekaniksel basınç, veya dondurma ve çözündürme olarak sıralanabilir. Bu teknikler hücre membran bütünlüğünü bozarak, hücre içeriğinin salınmasını ve sonraki aşamalarda çalkalama ve ESM'den hücre içeriğinin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırılmaktadır. Bu fiziksel yöntemler genellikle tamamen aselülerizasyon için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle de mutlaka kimyasal tekniklerle desteklenmektedir. Tripsin gibi enzimatik uygulama ve iyonik solüsyonların veya deterjanlar gibi kimyasal uygulamalar hücre membranını tahrip ederek intraselüler ve ekstraselüler bağlantılardan sorumlu zincirlerin kırılmasını sağlarlar. Dokular, dokunun kaynağına göre hücre materyali ve ESM'nin farklı yoğunluklardaki bileşiminden oluşmaktadır. ESM'nin aselülerizasyon işlemi ile kimyasallar kullanılarak üzerinde barındırdığı tüm hücrelerin zarar görmesi sağlanır ve bu şekilde doku tüm hücrelerinden arındırılarak boş ESM elde edilir. Aselülerizasyon işleminin asıl amacı, ESM'nin en az şekilde zarar görmesi, doğal mekanik ve biyolojik özelliklerinin bozulmadan korumasını sağlamaktır.

Aselülerizasyon protokollerinin tanımlanmasında en güçlü ve etkili aselülerizasyon protokolleri fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemleri kapsayan yaklaşımlardır. Genelde aselülerizasyon yöntemleri öncelikle fiziksel yöntem veya iyonik solüsyonlar kullanılarak hücre membranının lizisi, sonrasında enzimatik yöntemler kullanılarak ESM'den nükleer hücre materyallerinin ayrılması, sitoplazmik ve nükleer hücre materyallerinin çözülmesi için deterjanlar kullanılması ve son olarak da hücre kalıntılarının dokudan tamamen arındırılmasını kapsar. Bu

basamaklar mekaniksel agitasyon yöntemi ile desteklenebilmektedir. Aselülerizasyonu takiben tüm rezidüel kimyasallar ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Aksi takdirde alıcıda bu kimyasallar nedeni ile doku cevabı oluşabilmektedir.

1.7.1. Fiziksel Metodlar

Doku aselülerizasyonunu sağlayan fiziksel metodların içinde dondurma, direk basınç, sonikasyon ve agitasyon yöntemleri bulunmaktadır. Dondurarak patlatma yöntemi aselülerizasyonda sıklıkla kullanılır. Özellikle bu yöntemlerin tendon ve ligament dokusu [77], [78] ile sinir dokuda [79] kullanıldığı bilinmektedir. Bir dokunun hızlı bir şekilde dondurulması ile hücre membran bütünlüğünü bozan ve hücrenin lizisine neden olan hücre içi buz kristalleri oluşur. Sıcaklık değişiminin derecesi çok dikkatlice kontrol edilmelidir. ESM yapısının bozulmasına yol açabilecek buz kristallerinin oluşumu engellenmelidir. Dondurma yöntemi hücre lizisi için etkili bir metod olsa da hücre materyallerin dokudan uzaklaştırılması için dondurma sonrasında farklı işlemlerin uygulanması gerekmektedir.

Hücre lizisi için ayrıca direk basınç yöntemi kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem sadece ESM organizasyonu yoğun olmayan dokularda (karaciğer, akciğer gibi) etkilidir. Mekanik güç aynı zamanda mesane ve ince bağırsakta kullanılan aselülerizasyon yöntemlerindedir. Bu yöntemler efektif olup ESM'nin üç boyutlu yapısına minimal düzeyde hasar veren yöntemlerdir.

Mekanik agitasyon ve sonikasyon yöntemlerinden, hücre lizisi ve hücre atıkların uzaklaştırılmasında kimyasal yöntemlerle birlikte eşzamanlı olarak yararlanılmaktadır. Mekaniksel agitasyon, manyetik karıştırıcı tabla veya orbital karıştırıcılar ile uygulanmaktadır. Sonikasyonun hücre hasarlanmasında kullanımı için gerekli olan optimal genlik ve sıklığın belirlendiği herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte standart ultrasonik temizleyicilerin hücre materyallerin uzaklaştırılmasında, dokuların orbital karıştırıcılar üzerinde yerleştirilmesi yöntemi ile etkili bir şekilde kullanımı söz konusudur.

1.7.2. Kimyasal Metodlar

1.7.2.1. Alkalın ve Asit Uygulamaları

Alkalın ve asit uygulamaları aselülerizasyon protokollerinde hücrenin sitoplazmik komponentlerini çözmek ve aynı zamanda RNA ve DNA gibi nükleik asitleri

uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Örneğin asetik asit, perasetik asit (PAA), hidroklorik asit, sülfürik asit ve amonyum hidroksit (NH₄OH) hücre membranını ve intraselüler organelleri etkili bir şekilde parçalarlar [76], [80]. Ancak bu kimyasallar aynı zamanda glikozaminoglikanlar (GAG) gibi ESM'nin komponenti olan önemli bazı molekülleri de ESM'den ayırmaktadır.

Domuzdan elde edilen SIS (small intestinal submucosa) ve mesane tabakaları (submukozal tabaka veya bazal membran ile tunika propria) gibi çok farklı dokuları yaklaşık %0,10-0,15 (w/v) konsantrasyonda PAA ile aselülerize edilmiştir. Bu uygulama yöntemi bu tür ince ESM yapılarından hücre materyallerinin ortadan kaldırılmasında yüksek bir etkiye sahip olmasının yanı sıra mikroorganizmaları etkileyerek ve mikrobiyal enzimleri okside ederek materyalin dezenfeksiyonunu da sağlamaktadır [81], [82]. PAA uygulamasının ESM komponentleri üzerine etkisi yaygın olarak çalışılmıştır. SIS ve/veya mesane tabakalarında PAA uygulaması sonrasında kollajenin birçok tipi (I, III, IV, V,VI ve VII gibi) tanımlanmıştır [83]. Aynı zamanda bu uygulama sonrasında ESM'de birçok doğal yapıdaki GAG'lar korunmaktadır. Bunlara hiyaluranik asit, heparin, heparin sülfat, kondroitin sülfat A ve dermatan sülfat örnek olarak verilebilir [84]. Aynı zamanda laminin ve fibronektinin ESM doku yapısında bulunduğu gösterilmiştir [85]. Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), temel fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi ESM'de yer alan büyüme faktörlerinin yapısal ve fonksiyonel yapılarının bozulmadan kaldığı bildirilmiştir [86]. PAA'nın biyolojik yapı malzemelerinin mekaniksel davranışlarına herhangi olumsuz bir etkisi olmadığı bilinmektedir [76]. SIS ve mesane tabakaları ile *in vitro* hücre kültürü çalışmaları bu materyallerin kullanım açısından mükemmel bir yapı iskelesi olduğu tekrarlı çalışmalarla gösterilmiş olup [85], [87] PAA ile aselülerize edildikten sonra *in vivo* doku mühendisliği yaklaşımında kullanıldığı bildirilmiştir.

1.7.2.2. İyonik Olmayan Deterjanlar

İyonik olmayan deterjanlar aselülerizasyon protokollerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bunun en önemli nedeni göreceli olarak diğer yöntemlere göre doku yapısı üzerine daha hafif bir etkisi olmasıdır. İyonik olmayan deterjanlar lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimini bozar ancak protein-protein bağlantısını etkilemeyerek doku ya da organdaki proteinin fonksiyonel konformasyonunu bozmamaktadır [88].

Triton-X100 aselülerizasyon protokolünde en yaygın olarak kullanılan iyonik deterjanlar arasındadır. Dokunun Triton-X100'e maruz bırakılma süresi birkaç saatten 14 güne kadar değişmektedir [73], [74]. Dokuların Triton-X100 ile muamele edilerek aselülerize edilmesi ile çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. Kalp kapakçığının 24 saat Triton-X100 ile aselülerize edilmesi ile valvular yapı korunabilmekte ve tüm nükleer materyal uzaklaştırılabilmektedir. Ancak komşu miyokardiyum ve aortik duvarda hücresele materyallere rastlanabilmektedir [66]. Diğer çalışmalarda dört saatin üzerindeki Triton-X100 ile muamele gören kan damarları, tendon ve ligamentler de hücresele kalıntıların tamamen dokudan uzaklaştırılmadığı gösterilmiştir [73], [74]. Tüm dokularda histolojik boyama sonucunda nükleer materyallere rastlanmış ve Triton-X100 ile muamele edilen ön çapraz bağlarında immunohistolojik boyama sonucunda bir hücre iskeleti proteini olan vimentin görülmüştür. Triton-X100 ile aselülerizasyon çalışmalarında glikozaminoglikanlar (GAG) bileşiminde de dokular arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kalp kapakçığında 24 saat muamele sonrasında GAG'lar tamamen uzaklaştırılırken, ön çapraz bağlar üzerine dört günlük uygulama sonucunda sülfat GAG'larının içeriğinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Triton-X100 etkili bir aselülerizasyon yöntemi olmakla birlikte, etkili olmasındaki en önemli nokta aselülerizasyon protokolündeki diğer yardımcı metodlarla desteklenmesidir.

1.7.2.3. İyonik Deterjanlar

İyonik deterjanlar sitoplazmik ve nükleer hücre membranının çözünmesinde etkili bir yöntemdir, ancak protein-protein etkileşimini bozarak protein denatürasyonuna eğilim göstermektedir [88]. En çok kullanılan iyonik deterjanlar sodyum dedosil sülfat (SDS) ve sodyum deoksiolat ile Triton-X200' dür [67], [70], [74].

SDS dokudan selüler komponentlerin uzaklaştırılmasında çok etkili bir yöntemdir. Diğer deterjanlara kıyasla SDS, vimentin gibi sitoplazmik proteinler dahil tüm nükleer kalıntıların tamamen ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır [74]. SDS doğal doku yapısını bozarak GAG konsantrasyonunda azalmaya ve kollajen birlikteliğinin bozulmasına neden olmaktadır. Ancak SDS ile dokudan kollajen uzaklaştırılması gerçekleşmemektedir.

Sodyum deoksiolatta aynı şekilde hücresele kalıntıları uzaklaştırmada çok etkili bir yöntem olmasıyla birlikte doku yapısına SDS'e göre çok daha fazla zarar vermektedir. Bu yöntemin tek başına kullanıldığı herhangi bir rapor

bulunmadığından dokudan elde edilen ESM'de sodyum deoksiolatın etkisinin ne kadar olduğu bilinmemektedir. Sodyum deoksiolat sinir dokusu aselülerizasyonunda çok sayıda Zwitterionik deterjanı ile kombin bir şekilde kullanıldığı ancak bu kombinasyona mutlaka Triton-X200'ünde eklenmesiyle kompleks aselülerizasyonun başarıldığı açıklanmıştır [71].

1.7.2.4. Zwitterionik Deterjanlar

Zwitterionik deterjanlar hem iyonik hem de iyonik olmayan deterjan özellikleri gösteren bir ajandır. Bu deterjanların protein denatüre etme gücü iyonik olmayan deterjanlara göre çok daha fazladır. CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonia]-1-pro-panesülfat) karaciğer aselülerizasyonunda [89], sülfabetani-10 (SB-10) ve -16 (SB16) ise sinir aselülerizasyonunda kullanılan Zwitterionik deterjanlardır [90]. CHAPS ile muamele edilen arter dokusunun histolojik incelemesinde kollajen ve elastin morfolojisinin normal olduğu ve doğal damar yapısındaki kollajen yapısının korunduğu gösterilmiştir. Perifal sinir aselülerizasyonunda SB-10 ve SB-16'nın iyonik bir deterjan olan Triton-X200 ile kombin edilerek kullanılmaktadır. Bu kombinasyonun uygulanması sinir ESM yapısına Triton-X100 ve sodyum deoksiolatın birlikte uygulanmasından daha az bir zarar vermektedir [90].

1.7.2.5. Tri(n-butyl) phosphate (TBP)

TBP organik bir çözücü olup koagülasyon faktör aktivitesini etkilemeden kanda virüs inaktivasyonunda kullanılmaktadır. Son zamanlarda TBP kosmotropik ajan olarak tendon ve ligament greftlerinin aselülerizasyonunda kullanılmaktadır. TBP uygulaması sonucunda rat kuyruk tendonunda ve ön çapraz bağ (ACL) greflerinde tüm nükleer kalıntıların uzaklaştırıldığı, ancak kemik ligament bağlanma noktalarında bu uzaklaştırma işleminde eksiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir. TBP uygulaması ile rat kuyruk tendonundan izole edilen kollajen fibrelerinin gerilme gücünde herhangi bir kayıp gözlenmezken, ACL'den izole edilenlerde kollajen bileşiminde azalmaya neden olduğu bilinmektedir [73],[74]. TBP kosmotropik ajan olarak aselülerizasyon işleminde elde edilen ESM'de mekaniksel davranışına minimal bir etkisi olması bakımından ümit verici bir yöntemdir.

1.7.2.6. Hipotonik ve Hipertonik Uygulamalar

Deiyonize su ya da düşük iyonik güçlü solüsyonlar gibi hipotonik ve hipertonik solüsyonlarla yapılan osmotik şokla organ ve dokularda hücre lizise uğratılmaktadır [74],[91]. 11 saat hipotonik solüsyon (10 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA) muamelesi sonrasında 11 saatlik hipertonik solüsyon (50 mM Trizma HCl, 1 mM NaCl, 10 mM EDTA) uygulaması sonucunda hücre lizise edilebilmekte ancak dokulardan ortaya çıkan hücre kalıntılarının tamamen uzaklaştırılmamaktadır. Bu yönteme ek olarak enzimatik ve kimyasal uygulamalar selüler kalıntılarının uzaklaştırılması için gereklidir. DNA kalıntılarının dokudan uzaklaştırılmasının zorluğu, DNA'nın yapışkan özelliği sebebiyle ESM'ye sıkı bir şekilde bağlanma özelliği göstermesidir.

1.7.2.7. Şelatlayıcı (chelating) Deterjanlar

Etilen diamino tetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı ajanlar halka şeklinde moleküler bir kompleks yapıya sahip olup merkezi metal iyonlara kararlı bir şekilde bağlanarak bu iyonların izole edilebilmesini sağlamaktadırlar. Divalent katyonların, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi, kollajen ve fibronektinin hücre bağlanmasında Arg-Gly-Asp reseptörünün gerekliliği bazı çalışmalarca bildirilmiştir [92],[93]. Hücre-ESM adhezyonunda görevli divalent katyonların bağlanmasıyla bu ajanlar dokudan hücre materyallerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır. EDTA genellikle tripsin kombinasyonu ile kullanılan bir yöntemdir.

1.7.3. Enzimatik Yöntemler

Aselülerizasyon uygulamasında kullanılan enzimatik tekniklere proteaz dijesyonu, kalsiyum şelatlayıcı ajanlar ve nükleazlar örnek verilebilir [94],[95],[96]. Aselülerizasyon protokollerinde proteolitik enzimlerden en çok kullanılanı; Tripsindir. Tripsin, prolinin yan residü olduğu durumlarda arjinin ve lizininin karbon tarafından peptid bağlantılarını ikiye ayırma özelliği taşır. Tripsinin maksimal enzim aktivitesi 37°C'de ve pH:8'de olduğu bilinmektedir. Nükleazlardan endonükleazların ribonükleotid ve deoksiribonükleotidlerin interio bağlantılarının hidrolizini katalizlediği ancak ekzonükleazların ribonükleotid ve

deoksiribonükleatidlerin terminal bağlantılarının hidrolizini katalizleyerek RNA ve DNA'nın degradasyonuna neden olduğu gösterilmiştir [97].

Enzimatik uygulamaların hücrel materyallerin uzaklaştırılması ve ayrılmasındaki etkinliği birçok farklı dokuda çalışılmıştır. Bazı çalışmalar domuz pulmoner kapakçıklardan 24 saatlik agitasyon yöntemi ile birlikte %0.05 tripsin/ %0.02 EDTA muamelesi sonrasında hücrel kalıntıların uzaklaştırılmasındaki başarısını gösterirken [98], bazı çalışmalar etkinlik derecesinin daha az olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalara örnek, domuz aortik kapakçıklarda ultra saf su içinde %0.5 tripsin, %0.05 EDTA, %0.02 gentamisin, %0.02 mg/ml Dnase ve 20 µg/ml Rnase ile yaklaşık 17 saat 37°C'de agitasyon yöntemi ile desteklenerek yapılan aselülerizasyon çalışması sonucunda hücrelerin tamamen ortamdan uzaklaştırıldığı ancak hücrel kalıntıların dokudan uzaklaştırılmadığı bildirilmiştir [66].

Enzimatik yöntemler, doku ve organlardaki ESM bileşenlerine zarar veren bir etkiye sahiptir. Uzun süreli tripsin/EDTA uygulamasının normal pulmoner kapakçıklardaki ESM yapısına zarar verdiği ancak dokudaki kollajen miktarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir [98]. Aynı zamanda tripsin/EDTA uygulamasından sonra ESM'deki laminin ve fibronektin bileşenlerinin büyük ölçüde azaldığı bildirimler arasındadır. Elastin ve GAG'lar üzerinde de zamanla önemli derecede bir gerileme, özellikle de o-sülfatlı GAG'larda (kondrotin sülfat, keratin sülfat ve dermatan sülfat) gözlemlendiği bildirilmiştir. Bazı uygulamalar sonucunda gerilme gücünde %50 oranda gerileme gözlenmiştir. Enzimatik aselülerizasyon protokolleri sonrasında elde edilen ESM'nin *in vitro* ortamda endotelial hücre büyümesini desteklediği açıklanmıştır [66],[98].

1.7.4. Proteaz İnhibitörleri

Aselülerizasyon protokolleri sırasında hasar gören hücrelerden çok sayıda proteaz salınabilmektedir. Uzun süreli kimyasal uygulamaları sonrasında ortamda beliren proteazlar ESM'nin doğal yapısına zarar verebilir. Bu nedenle dokuların aselülerizasyonu için kullanılan solüsyonları içine proteaz inhibitörlerinden fenilmetilsülfoniflorid (PMSF), aprotonin veya leupeptin eklenebilir. Tampon solüsyonunun pH'ı 7-8 arasında tutulursa yine proteaz aktivitesi durur. Bunlara ek olarak lizis solüsyonunun sıcaklığının ve süresinin kontrolü de proteaz aktivitesini sınırlamaktadır.

1.7.5. Antibiyotikler

Uzun süreli kimyasal aselülerizasyon uygulamaları sonrasında endişe edilebilecek bir diğer sorun elde edilen ESM materyalinin kontaminasyonuna yol açacak bakteri varlığının ortaya çıkma ihtimalidir. Bu nedenle uygulanan birçok protokolda kullanılan aselülerizasyon solüsyonları içine penisilin, streptomisin veya amphotericin-B eklenmektedir [74],[99],[100]. Ancak aselülerizasyon protokolünden sonra antibiyotik ya da antibiyotik kalıntısının yapı malzemesinde kalması daha sonra bu malzemenin medikal bir gereç olarak kullanımından çok ilaç olarak kullanımını gündeme getirerek kısıtlayıcı bir etkenin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir.

Bu açıklamaların ışığında bu tez kapsamında; kalp dokusunun aselülerizasyonu için bahsi geçen yöntemlerden iyonik olmayan ve iyonik olan deterjanların farklı konsantrasyonları farklı zamanlarda uygulanmış ve bu uygulamalardan elde edilen ekstraselüler matrikslerden hücre ekimi için en elverişli olanı çalışmanın sonraki basamaklarında seçilerek yöntem optimize edilmiştir.

Bu tezin amacı ve bu amaç doğrultusundaki kapsamında;

1. Mezenşimal kök hücre kaynağı olarak gonadal ve subkutan adipoz dokusu tercih edilmiş ve adipoz dokusundan elde edilen kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir.
2. Farklılaştırılan hücrelerin işaretlenmesi için BrdU boyama yöntemi optimize edilmiştir.
3. Hücre uygulamasını kolaylaştırmak amaçlı geliştirilmesi düşünülen doku iskelesi için "kalp dokusu" seçilmiştir. Kalp dokusunu hücrelerinden arındırmak amacıyla çeşitli yöntemler denenmiş ve hücre tutunumunu sağlayacak en verimli aselülerizasyon yöntemi bulunmuştur.
4. Ektopik göçü incelemek üzere işaretli farklılaştırılmış hücreler aselülerize edilmiş kalp doku iskelesi üzerine kültür ortamında uygulanmıştır. Doku iskelesi ile işaretli farklılaştırılmış hücreler sıçan retroperitoneumuna implante edildikten sonra süreye bağlı olmak üzere hayvanların hedef dokularındaki işaretli hücrelerinin varlığı histopatolojik ve moleküler düzeyleri incelenerek tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Deney Hayvanları

Çalışma kapsamında uygulanan tüm cerrahi işlemler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan izin ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın hücre kültürü, aselülerize matriks izolasyonu ve cerrahi uygulamaları için toplam 84 adet erkek *Rattus norvegicus* türüne ait Wistar albino ırkı sıçan kullanılmıştır.

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan sıçan gruplarında örneklem sayıları ve yapılan uygulamalar Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Deney ve kontrol grupları ile yapılan *in vivo* uygulamaların özeti.

Deney grubu	Uygulama
Grup 1. (n:10)	Yağ izolasyonlarının yapıldığı grup
Grup 2. (n:20)	Aselülerize kalp dokularının elde edildiği grup
Kontrol grubu (n:18)	Boş kontrol grubu (herhangi bir operasyon geçirmen grup)
ESM grubu (n:18)	Boş aselülerize matriksin retroperitoneuma transplante edilen grup
ESM+Hücre grubu (n:18)	Aselülerize matriks+ Farklılaştırılmış işaretli hücrelerin retroperitoneuma implante edilen grup

Kullanılan sıçanların ortalama yaşı 24 hafta, ortalama ağırlığı ise 400 ± 50 gr'dır. Sıçanlar uygulama gruplarına göre rastgele dağıtılmıştır. Cerrahi uygulama tüm hayvanların retroperitoneum bölgesinde abdominal aorta sol tarafındaki yağ bölgesine implantasyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tüm sıçanlara günlük olarak ad libitum su ve sıkıştırılmış pelet yem verilmiştir. Özel diyet uygulanmamıştır. Deney boyunca sıçanlar paslanmaz çelik kapaklı ve polikarbonat otoklavlanabilir kafesler içerisinde; özel havalandırılmalı odada $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de ve %45 nem bulunan ortamda, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık koşullarında barındırılmıştır.

2.1.2. Cerrahi Operasyon ve Hücre Kültürü İçin Kullanılan Madde ve Malzemeler

Cerrahi operasyonlarda anestezi uygulaması için anestezi solüsyon olarak ksilazin HCl (Alfamin, Ata-Fen, İzmir, Türkiye) ve ketamin HCl (Alfamin, Ata-Fen, İzmir, Türkiye) hayvanların ağırlıklarına göre hesaplanarak uygulanmıştır. 6-0 absorbe edilmeyen ip (Doğsan) aselülerize matriks implantasyonu için, 3-0 absorbe edilmeyen ip (Doğsan) deri kapatması için ve 3-0 absorbe edilebilen ip (Boz) kası kapatmak için kullanılmıştır. Tüm cerrahi operasyonlar boyunca kullanılan cerrahi malzemeler steril edilerek kullanılmıştır.

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) proliferasyon analizi için, akridin orange/propidium iodid hücre canlılık testi için, Hekzametildisilazin (HMDS) ve glutraldehit taramalı elektron mikroskopik (SEM) analiz için, Triton X100 ve SDS (Sodyum dedosil Sülfat) aselülerizasyon için kullanılan malzemeler olup hepsi Sigma (Almanya)'dan temin edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan malzemelerden Dulbecco's Modified Eagles Medium F12 (DMEM/F12), Fetal bovine serum (FBS), penisilin/streptomisin ve amfoterisin-B aynı şekilde Sigma (Almanya)'dan temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

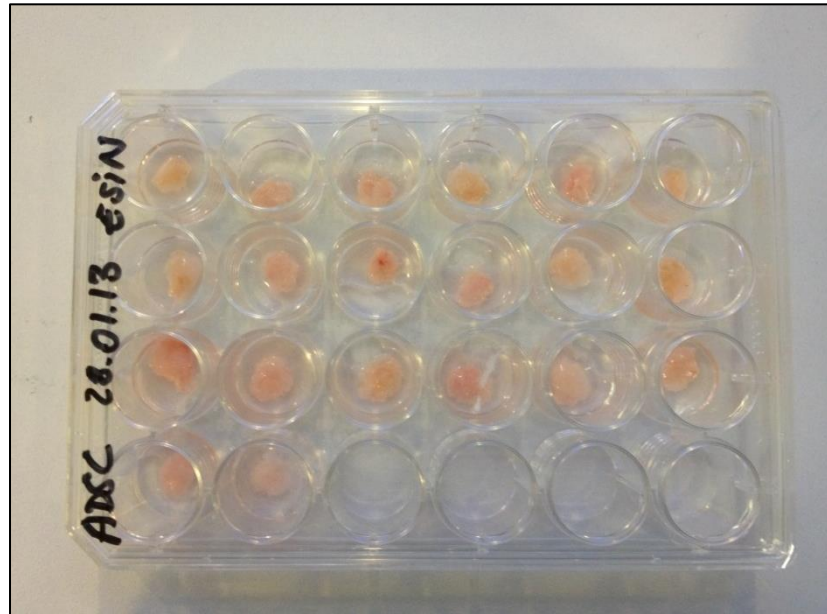
2.2.1.1. AdMSC' lerin İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi

Tez kapsamında Hacettepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurul iznini takiben, aynı koloni içinde yetiştirilmiş rastgele seçilen ve ortalama ağırlıkları 400-500 gr olan 24 haftalık erkek sıçanlar (Wistar albino) kullanılmıştır. İzolasyon öncesi kullanılacak tüm cerrahi malzemeler steril edilmiş ve izolasyonun yapılacağı laboratuvar temizlenerek ultraviyole ışığı ile bir saat süreyle steril edilmiştir.

Sıçanlara Ksilazin (10 mg/kg) (Alfamin, Ata-Fen, İzmir, Türkiye)/Ketamin (50 mg/kg) (Alfamin, Ata-Fen, İzmir, Türkiye) anestezisi uygulanıp, anestizi altına alınan hayvanların opere edilecek bölgeleri tıraşlandıktan sonra %10'luk batikon antiseptik solüsyon ile dezenfekte edilmiştir. Hayvanlardan steril koşullar altında hem flank adipoz hem de gonadal adipoz dokuları toplanmıştır. İzole edilen adipoz dokular; içinde yüksek oranda antibiyotik-antimikotik içeren taşıma besiyeri (%10 FBS ve %0.4 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12) olan santrifüj tüpü içinde

hücre kültürüne alınıp, tüm doku parçaları laminar kabin içinde taşıma besiyeri içeren petri kaplarında bistüri yardımıyla 4-5 mm olacak şekilde parçalara bölünmüştür (Şekil 2.1).

Elde edilen doku parçaları 24 kuyucuklu kültür kaplarının yüzeyine yapışmaları için öncelikle üzerlerine birer damla primer besiyeri (%20 FBS ve %0.2 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12) eklenmiş ve etüvde 15 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. 15 dakikanın bitiminde doku kurumayacak şekilde doku çevresini kaplayacak kadar primer besiyeri eklenmiş ve dokular 24 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarında inkübe edilmişlerdir (Şekil 2.1). 24 saatin sonunda her kuyucuğa bir ml primer besiyeri eklenerek 37°C'de ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Mezenşimal kök hücrelerden salgılanma ihtimali olan çeşitli sitokinlerin farklılaştırma etkisini ortadan kaldırmak için besiyeri her gün aynı miktardaki taze besiyeri ile bir hafta boyunca değiştirilmiş ve birinci haftanın sonunda dokular kültür kaplarından uzaklaştırılmıştır. Inkübasyon süresince hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler mikroskopik olarak incelenmiştir (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya).



Şekil 2.1 24 kuyucuklu kültür kabında gonadal adipoz doku parçalarının yerleştirilmesi.

2.2.1.2. AdMSC'lerin Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.1.2.1. İmmunofloresan Boyama

Hücreler, kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayıp yaygın hale geldikten sonra mezenşimal kök hücreleri için özgül olan pozitif işaretleyicilerden CD13, CD29, CD54 ve CD90 molekülleri için floresan boyama yapılmak üzere standart boyama yöntemi uygulanmıştır. Bunun için öncelikle kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tamponu (PBS, Santa Cruz Biotechn., ABD) ile yıkanmıştır. Fiksasyon için hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde soğuk metanol eklenerek beş dakika beklenmiştir. Ortamdan metanol havada kurutularak uzaklaştırılmış ve hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır. İmmunoglobulin G (IgG)'nin spesifik olmayan bağlantılarını engellemek için hücreler 20 dakikalık süreyle %10 engelleyici/sınırlandırıcı serum ile inkübe edilmiştir (%10 Normal Goat Serum: PBS). Bu sürenin sonunda serum uzaklaştırılarak, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde ortama konan PBS içinde 1:100 oranında hazırlanmış primer antikor solüsyonları (CD13, CD29, CD54 ve CD90, Santa Cruz Biotechn., ABD) eklenerek 60 dakika süreyle oda sıcaklığında karanlık ortamda laminar flow içerisinde inkübe edilmiştir (primer antikor oranı: 1.5% normal engelleyici/sınırlandırıcı serum içeren PBS içinde 0.5–5.0 µg/ml).

İnkübasyonun sonunda ortamdan primer antikor solüsyonları uzaklaştırılarak üç kez ve her seferde beş dakika süreyle beklenerek PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, PBS içinde 1:100 oranında hazırlanmış sekonder antikor (CD13, CD29, CD54 ve CD90 için goat anti-mouse TR (ABCAM, Türkiye)) ile 45 dakika süreyle inkübe edildi (sekonder antikor oranı: %1.5–%3 normal engelleyici/ sınırlandırıcı serum içeren PBS içinde 1–5 µg/ml). Bu işlemin sonunda sekonder antikorların ortamdan uzaklaştırılması için hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler tüm yüzeylerini kaplayacak şekilde UltraCruz™ mounting medium (Santa Cruz Biotechn., ABD) ile kapatılarak görüntüleme basamağına geçilmiştir. Tüm işlemler CD13, CD29, CD54 ve CD90 için altı kuyulu kültür kaplarında ikişer göz olacak şekilde pasaj iki için uygulanmıştır. Hücreler TR için 490-520 nm dalga boyunda floresan aydınlatma (Olympus, Japan) ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) görüntülenmiştir.

2.2.1.2.2. Akış Sitometrisi Analizi (FACS)

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki Fizyoloji Laboratuvarında daha önceki çalışmalarda AdMSC'lere uygulanan akış sitometrik hücre karakterizasyon sonuçlarına ek olarak bu tez kapsamında elde edilen kök hücrelere de kültürde çoğalırken fenotipik karakterlerini koruduğunu doğrulamak amacıyla farklılaştırılmamış mezenşimal kök hücrelere akış sitometri analizi yapılmıştır. Uygulanan protokolda AdMSC'ler yüzeyden kaldırılarak süspansiyon edilmiştir. Santrifüjden sonra yıkama tamponunda süspansiyon edilen hücrelere 300 µL floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge antikolar eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, AdMSC'lerin immüno-fenotiplenmesinde pozitif ve negatif işaretleyiciler olan CD29, CD90, CD54, CD45, CD106, MHC sınıf I ve MHC sınıf II antijenlerine uygun sıçan antikoları ve antikolar için önerilen izotip kontrolleri kullanılmıştır.

Flow sitometrik analiz Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Terapisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde (KOGEM) FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, ABD) cihazı ve Analizler BD CellQuest Pro programı ile yapılmıştır.

2.2.1.3. Oil-red O Boyama

Pasajlama basamaklarında her pasaj için ortamda mezenşimal kök hücreler ile adipositlerin oranının hangi yönde ilerlediğini gözlemlemek için Oil-red O ile boyama yapılmıştır. Boyama pasaj bir ve pasaj ikide olan hücrelere uygulanmıştır. Boyama sırasında izlenen protokol aşağıdaki gibidir;

1. Ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır.
2. PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır.
3. %10 formalin ile 10 dakika süreyle fiksasyon gerçekleştirilmiştir.
4. Su ile 1-10 dakika arasında yıkama yapılmıştır.
5. %60 isopropanol ile yıkama yapılmıştır.
6. Taze hazırlanmış Oil-red-O ile 15 dakika boyama yapılmıştır.
7. %60 isopropanol ile yıkama yapılmıştır.
8. Hematoksilin ile çekirdekler boyanmıştır.
9. Distile su ile yıkama yapılmıştır.

10. Mounting Medium ile kapama gerçekleştirilmiştir.

Boyama sonrasında kuyucuklar mikroskop (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.1.4. AdMSC'lerin Farklılaşma Potansiyeli Çalışmaları

Mezenşimal kök hücrelerin değişik hatlara farklılaşma potansiyelinin olup olmadığını göstermek amacıyla sırasıyla adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri test edilmiştir. Bu amaçla AdMSC'ler 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Her grup için tekrar sayısı altı olacak şekilde deney düzeneği tasarlanmıştır. Kontrol grubu standart kültür besi ortamı ile inkübe edilmiştir.

2.2.1.4.1. Adipojenik Farklılaşma

Kültür kabında %80-90 konfluent gözlemlendikten sonra hücrelerin adipojenik farklılaşma potansiyelleri incelenebilmesi için adipojenik besi ortamı (DMEM, %10 FBS, 10^{-7} M Deksametazon, 5µg/mL insülin, 60µM indometasin, 500µM 3-izobütill-1-metilksantin, %0,1 penisilin/streptomisin) ile indüklenmiştir. 21 gün boyunca iki günde bir olacak şekilde besi ortamı değiştirilmiştir.

Adipojenik farklılaşma potansiyeli, nötral lipid vakuollerinin oluşumunu gösteren Oil-red O boyaması ile gösterilmiştir.

2.2.1.4.2. Kondrojenik Farklılaşma

Kültür kabında %80-90 konfluent gözlemlendikten sonra hücrelerin kondrojenik farklılaşma potansiyelleri incelenebilmesi için kondrojenik besi ortamı (DMEM, %10 FBS, 10^{-7} M Deksametazon, 10ng/mL Dönüştürücü büyüme faktörü-β, 37,5 µg/mL L-Askorbik Asit, %1 ITS, %0,1 penisilin/streptomisin) ile indüklenmiştir. 21 gün boyunca iki günde bir olacak şekilde besi ortamı değiştirilmiştir.

Kondrojenik farklılaşma indükatörü olarak Safranin-O boyama yöntemi kullanılmıştır.

2.2.1.5. AdMSC'lerin Kardiyomiyosite Farklılaştırılması

Bu çalışma kapsamında, adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştırılması için literatürde kök hücrelerin kardiyomiyosite

farklılaştırılması için kullanılan ajanlardan 5-Azasitidin (5-Aza) farklılaştırma faktörü olarak tercih edilmiştir. Farklılaşma için gerekli olan derişimin seçilmesi için farklı derişim denemeleri yapılmıştır. Denenen derişimler 5µM ve 10µM olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu derişimlerin toksisitesini kontrol etmek için farklılaştırma deney düzeneğinden önce sitotoksosite testi yapılmıştır.

Farklılaştırma sırasında pasaj ikideki (P/2) hücreler kullanılmıştır. Farklılaştırılacak P/2'deki kök hücrelerin başlangıç sayısı farklılaştırma deneyi için 5×10^4 hücre/kuyucuk, sitotoksosite deneyi için 8×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde düşünülmüştür. Hücreler farklılaştırma için 24 kuyucuklu ve sitotoksosite testi için 96 kuyucuklu steril kültür kaplarına ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra hücreler belirlenen konsantrasyonlardaki 5-Aza içeren %10 FBS DMEM-F12 besi ortamı ile 24 saat inkübe edilmiştir. 5-Aza içermeyen besi ortamı ile inkübe edilen grup kontrol olarak değerlendirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda 5-Aza içeren besi ortamı uzaklaştırılarak %10 FBS içeren DMEM-F12 besi ortamı ile dört hafta inkübasyona devam edilmiştir. Haftada bir kez besi ortamları değiştirilmiştir.

Sitotoksosite testi için hücre canlılık testlerinden MTT analizi kullanılmıştır. Bu yöntem için 8×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde P/2'deki hücreler 96 kuyucuklu steril kültür kaplarına ekim yapılmıştır.

MTT protokol özeti aşağıda verilmiştir:

250 mg MTT (Applichem, Germany) 50 ml PBS içinde çözülerek stok MTT (5 mg/mL) hazırlanmıştır. Çözülen MTT solüsyonu, 0.2 µ' luk filtreden geçirilerek safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyu için 1:10 oranında MTT/serumsuz besi ortamı (DMEM) olacak şekilde MTT çözeltisi hazırlanmıştır.

- Hücre ekimini takiben 24. saatte hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler PBS ile yıkanmıştır.
- Kuyucuklara 200 µL MTT/besi ortamı çözeltisinden eklenmiştir.
- Kültür kapları alüminyum folyo ile sarılarak %5 CO₂' li nemli hava içeren inkübatörde 37 °C' de dört saat süreyle tutulmuştur.

- Dört saat inkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak ve oluşan formazan kristallerinin görünür hale getirmek için 100 µL izopropil alkol eklenmiştir.
- Kültür plağı ELISA plak okuyucusuna (Biochrom, EZ Read 400, Cambridge) konularak absorpsiyon değerleri 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

2.2.1.6. Kardiyomiyosite Farklılaştırılan Hücrelerin Karakterizasyonu

5-Aza uygulamasını takip eden dördüncü hafta içerisinde farklılaştırıldığı düşünülen hücreler, yüzeyi modifiye edilmiş coversliple kaplı 24 kuyucuklu kültür kaplarına pasajlanmıştır. Hücreler, kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayıp yaygın hale geldikten sonra coverslipler sıçan kardiyomiyosit hücreleri için özgül olan kardiyak troponin I, miyosin ağır zincir (MHC), konneksin 43 (Cnx-43), pan-kaderin ve alfa düz kas aktin (α -SMA) molekülleri için floresan boyama yapılmak üzere standart boyama yöntemi uygulanmıştır. Bunun için öncelikle kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tamponu (PBS, Santa Cruz Biotechn., ABD) ile yıkanmıştır. Fiksasyon için hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde soğuk metanol eklenerek beş dakika beklenmiştir. Ortamdan metanol havada kurutulularak uzaklaştırılmış ve hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır. İmmunoglobulin G (IgG)'nin spesifik olmayan bağlantılarını engellemek için hücreler 20 dakikalık süreyle %10 engelleyici/sınırlandırıcı serum ile inkübe edilmiştir (%10 Normal Goat Serum: PBS). Bu sürenin sonunda serum uzaklaştırılarak, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde ortama konan PBS içinde hazırlanmış primer antikor solüsyonları eklenerek 60 dakika süreyle oda sıcaklığında karanlık ortamda laminar flow içerisinde inkübe edilmiştir (kardiyak troponin I (1/50), MHC (1/100), Cnx-43 (1/150), pan-kaderin (1/100) ve α -SMA (1/200) (primer antikor oranı: 1.5% normal engelleyici/sınırlandırıcı serum içeren PBS içinde 0.5–5.0 µg/ml). İnkübasyonun sonunda ortamdan primer antikor solüsyonları uzaklaştırılarak üç kez ve her seferde beş dakika süreyle beklenerek PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, PBS içinde 1:100 oranında hazırlanmış sekonder antikor (goat anti-mouse IgG1 heavy chain FITC, Abcam, Türkiye) ile 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir (sekonder antikor oranı: %1.5-%3 normal engelleyici/sınırlandırıcı serum içeren PBS içinde 1–5 µg/ml). Bu işlemin sonunda sekonder antikorların ortamdan uzaklaştırılması için hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler tüm yüzeylerini kaplayacak şekilde UltraCruz™ mounting medium (Santa

Cruz Biotechn., ABD) ile kapatılarak görüntüleme basamağına geçilmiştir. Tüm işlemler her antikor için 24 kuyulu kültür kaplarında ikişer göz olacak şekilde uygulanmıştır. Hücreler FITC için 493-528 nm dalga boyunda floresan aydınlatma (Olympus, Japan) ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) görüntülenmiştir.

2.2.1.7. Eşzamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizi

Farklılaşmanın moleküler boyutunun incelenmesi için kardiyomyosite özgü, erken kardiyogenezis belirteçleri olan MEF2B (myocyte enhancer factor 2b), ACTC-1 (Actin, alpha cardiac muscle 1), GJA-1 (Gap junction protein alpha 1), GATA-4 (GATA binding protein 4) ve Nkx2,5 (NK2 homobox 5) genleri seçilerek bu genlere özel ortalama 20 baz olacak şekilde primerler dizayn edilmiştir ve bu primerler doğrultusunda farklılaştırılan hücreler analiz edilmiştir.

Moleküler karakterizasyon için farklılaştırılmış hücrelerden izole edilen RNA'lar, cDNA'ya (komplementer DNA) çevrilerek, ilgilenilen gen bölgelerinin transkripsiyon düzeyleri RT-PCR tekniği kullanılarak incelenmiştir.

Analiz için hücreler farklılaşmanın dördüncü haftasında soğuk PBS ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 300 µl Trizol eklenmiştir. Hücreler yüzeyden mekanik uygulama ile kaldırılmıştır. Pipetaj sonrasında her dört kuyucuk bir ependorf olacak şekilde toplanmıştır. Ependorflar vortkeslendikten sonra cDNA eldesine kadar -80°C' ye kaldırılmıştır.

İzole edilen total RNA miktarları Nanodrop cihazı (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. 5µg RNA DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla DNase I uygulaması (Ambion, Life Technologies, ABD) yapılmıştır. RNA'ların 2µg'ı kalıp olarak kullanılarak RevertAid Strand cDNA sentez kiti (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies, ABD) aracılığıyla üretici protokolüne göre cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinde incelenecek primerler; MEF2B, alfa kardiyak aktin (ACTC-1), connexin 43 (GJA-1), GATA-4 ve NKx-2,5 transkriptlerine özgü farklı ekzonlardan hareketle (intron sekanslarını içine alacak şekilde, DNA kontaminasyonunu bertaraf etmek üzere) primerler tasarlanmıştır. SYBR Green PCR Master Mix kiti ile Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Instruments, ABD) RT-PCR cihazında gen ifade yolları çıkarılmıştır. İç kontrol gen

HPRT-1, rölatif ekspresyon analizi için internal kontrol olarak kullanılmış olup RT-PCR reaksiyonları 10µl toplam hacimde ve her bir örnek için üçlü (triplicate) olarak çalışılmıştır.

Primer tasarımı: Primerler, Primer3 programı kullanılarak tasarlanmıştır. MEF2B, ACTC-1, GJA-1, GATA-4 ve NKx-2,5 ve HPRT-1 gen bölgelerine ait primer dizileri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Tüm primerlerin spesifiklik durumu erime eğrisinde tek bir amplifikasyon ürünü oluşturması ile kontrol edilmiştir.

Çizelge 2.2 Hedef genler ve primer dizileri.

Hedef Gen	Gen İsmi	Primer	Primer Dizileri
MEF2B	Myocyte enhancer factor 2B	Forward	--CTTGCAGACACTGAAGAGGAG--
		Reverse	--CTGGATAGATCCGAGGCGGG--
ACTC-1	Actin, alpha cardiac muscle 1	Forward	--CACGGCATTATCACCAACTG--
		Reverse	--ACAATGCCTGTGGTTCTCC--
GJA-1	Gap junction protein alpha 1	Forward	--CATTAAAGTGAAAGAGAGGTGCC--
		Reverse	--GGCAGACTGTTTCATCACCC--
GATA-4	GATA binding protein 4	Forward	--CTCCATGTCCCAGACATTTCAGT--
		Reverse	--TGGATAGCCTTGTGGGGAGA--
NKx-2,5	NK2 homobox 5	Forward	--CTTCGTGAACTTTGGCGTCG--
		Reverse	--CACAGTGGGAGCCTTTCCAT--
HPRT-1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Forward	--CTACTGTAATGACCAGTCAACGG--
		Reverse	--TGCAACCTTAACCATTTTGGGG--

2.2.2. Hücre İşaretleme Çalışmaları

BrdU için uygun konsantrasyon ve uygulama süresi için P/2' deki AdMSC'ler 5.10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin 24 saat inkübasyonu sonrasında eşit sayıdaki kuyucuklara pozitif ve negatif uygulamalarla birlikte, deneme amaçlı 1µM ve 5 µM BrdU solüsyonları taze DMEM ile eklenmiştir. Her denenecek grup için 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat uygulamalarına bakılmıştır.

2.2.2.1. BrdU ile İşaretleme

Yapılan pilot çalışma sonrasında 1 µM BrdU ile 24 saat uygulama süresine karar verilmiştir. Deney tekrarlanarak üç farklı hücre ekim ortamında (cover slip, kuyucuklu kültür kabı, cover slip kaldırıldıktan sonra kuyucuk üzerindeki hücreler) işaretleme yapılmıştır. İşaretlemeyi takiben BrdU için immün boyaması yapılmıştır.

BrdU boyasının pozitif boyama denemesi yapıldıktan sonra protokol standartize edilmiştir.

Bu boyama yöntemi aşağıdaki maddelere göre uygulanmıştır;

- %4 paraformaldehit ile fiksasyon yapılmıştır.
- PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır.
- Quencing solüsyonu (%0,03 H₂O₂) (5 dk) uygulanmıştır.
- PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Denatüre edici solüsyon uygulanmıştır (30 dk).
- PBS ilşe yıkama yapılmıştır.
- Bloke edici tampon ile muamele edilmiştir (10 dk).
- Dedektör Antikor uygulanmıştır (60 dk).
- PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Straptavidin-HRP Konjugatı uygulanmıştır (10 dk).
- PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Substrat Reaksiyon Tamponu / DAB konsantrasyon karışımı uygulanmıştır (10 dk).
- Distile su ile yıkama yapılmıştır.
- Hematoksilen ile boyama (1 dk) yapılmıştır.
- Akan su ile yıkama yapılmıştır.
- Alkol serisi yapılmıştır [%70 alkol (1 dk), %80 alkol (1 dk), %90 alkol (1 dk) ve 100 alkol (1 dk)].
- Gliserol ile kapama yapılmıştır.

2.2.3. Kalp İzolasyonu ve Aselülerizasyon Yöntemi

Anestezisi altına alınan sıçanların göğüs kısmı tıraşlanarak çalışma bölgesi kıllardan arındırılmıştır. Temizlenen bölge batikon solüsyonu ile silindikten sonra tüm kalp damarlarını açığa çıkarılacak şekilde hayvan disekte edilmiştir. Sol

femoral arter yoluyla sistemik heparinizasyon için 15 dk boyunca heparinize edilmiş fosfat tampon çözeltisi ile yıkama yapılmıştır. Kısa süreli perfüzyon sonrasında kalp vücut dışına alınmıştır.

Aselülerize kalp matriksi eldesi için vücut dışına alınan kalpler eşit olacak şekilde dört parçaya bölünmüştür. Öncelikle kalp parçaları %0,5 SDS solüsyonu içeren farklı cam şişeler içinde 48 saat bekletilmiştir. İkinci basamakta sonraki 24 saat boyunca kalp parçaları %1 SDS solüsyon içerisinde tutulmuştur. Aselülerizasyonun son basamağında kalp parçaları %0,5 TritonX-100 solüsyonu içerisinde bir saat tutulmuştur. Basamaklar arasında kalp parçaları PBS ile yıkanmıştır.

Kontrol kalp parçaları (aselülerize olmamış) ve aselülerize kalp parçaları hücrelerden arındırma işlemlerini takiben PBS içinde +4 °C'de saklanmıştır.

2.2.3.1. Aselülerize Kalp Matrikslerinin Histolojik İncelemeleri

Hücrelerinden arındırılmış kalp matriksleri ile kontrol (aselülerizasyon uygulanmamış) kalp doku parçalarının hücrelerden arındırıldığı çeşitli histolojik boyanmalar yapılarak incelenmiştir. Sırasıyla DAPI; çekirdek boyanması için, H&E (hematoksin eosin); hem çekirdek hem de sitoplazma boyanmalarının incelenmesi için ve Masson Trikrom ise ekstraselüler matriks elemanlarının incelenmesi için uygulanmıştır.

Aselülerizasyon yöntemi ile elde edilen matriks kompozitlerinin ve kontrol (aselülerize edilmemiş) materyallerin fiksasyonu için örnekler 18 saatlik süreyle %10'luk tamponlanmış formalinde tutulmuştur. Fiksasyon sonrasında aselülerize matriks ve kontrol dokusu doku takibi için alkol serisinden geçirilerek şeffaflaştırılma işlemine tabi tutulmuşlardır. Parafin bloklama yapıldıktan sonra 5µ kesitler elde edilmiştir. Elde edilen preparatlar deparafinize edilerek masson trikrom boyama yöntemi ile boyanıp ışık mikroskopunda incelenmiştir.

2.2.3.2. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) Uygulaması

PBS içinde +4 °C'deki aselülerize kalp örnekler dondurularak kurutma işleminden bir gün önce ependorflara alınarak -80°C'ye kaldırılmıştır. Liyofilizatöre (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) dikkatlice yerleştirilen örnekler 24 saat boyunca kurutulmuştur. Liyofilize edilen örnekler hücre uygulamasına kadar -20°C' de saklanmıştır.

2.2.4. *In vitro* Biyomateryal-Hücre Etkileşimi Çalışmaları

Hücre kültürü çalışması için, 5x1 mm boyutlarında olan her bir liyofilize doku iskelesi 24 gözlü hücre kültür kaplarına her göze bir iskele gelecek şekilde yerleştirilmiş ve ultraviyole ile bir saat süre ile steril edilmiştir. Sonrasındaki hücre kültür çalışmaları boyunca steril ortam gerektiren tüm işlemler Class II laminar akış kabininde yürütülmüştür.

Kültüre edilen AdMSC hücreleri P/2' de tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmışlardır. Elde edilen hücre süspansiyonu 800 rpm'de beş dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında süpernatant dökülmüş ve taze besi ortamı ile tekrar süspansiyon edilen hücreler, hemositometrik sayım sonrasında, hücre yoğunluğu 2×10^5 hücre/doku iskelesi olacak şekilde, her bir doku iskelesine zaman aralıklarıyla toplamda 500 µL hücre süspansiyonu enjekte edilerek hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, 37°C ve %5 CO₂-%95 O₂'de standart kültür koşullarında 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

2.2.4.1. MTT Analizi

Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri 24 ve 48. saatlerde 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözündüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenir. Elde edilen bu absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT analizi için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Ardından, her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Hücreler bu şekilde 37°C'deki etüvde üç saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra, doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropilaka okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüm ile optik yoğunluk belirlenmiştir.

2.2.4.2. Akridin Orange-Propidium İodid (AO/PI) Boyama

24 gözlü kültür kaplarındaki kalp iskeleleri görece küçük olduğu için boyama öncesinde 96 gözlü hücre kültür kaplarına alınmıştır. İskeleler PBS ile yıkandıktan sonra AO/PI boya karışımı ile yüzeyleri örtülecek şekilde kaplanmıştır. Ortalama 20 saniye ile bir dakika arasında beklenmiş, yıkaması PBS ile iki kez yapılmıştır. Işımanın solmaması için hızlıca görüntüleme yapılmıştır.

2.2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin, doku iskelelerindeki morfolojileri ve iskele içerisindeki yapışma ve yayılma potansiyellerinin görüntülenmesi için kültürün 24. ve 48. saatte alınan örneklerle SEM (Zeiss Evo 4750, Almanya) incelemesi yapılmıştır. Öncelikle, doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve ardından iskeleler ikişer kez PBS (pH: 7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra bir ml %2.5'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile karanlıkta ve 4°C'de 30 dakika boyunca fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve örnekler analiz yapılana kadar PBS içinde yine 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve ardından sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde ikişer dakika bekletilmesiyle gerçekleştirilen dehidrasyon işleminden sonra, iskeleler hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde de beş dakika bekletilmiştir. Örnekler, oda sıcaklığında kurutulup altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

2.2.5. *In vivo* İmplantasyon Uygulaması

Bu çalışmada ağırlıkları 300 ile 450 gr. arasında değişen 54 adet erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Deney süresince hayvanlar, standart laboratuvar koşullarında (polikarbon kafeslerde, %45 nem aralığında, 20±2°C) tutulmuş ve standart yem ile beslenmiştir. 12 saat aydınlık/12 saat karanlık koşullarında barındırılmıştır.

Ameliyat sonrası dört hafta yaşatılan denekler histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile perfüzyon uygulaması sırasında kanatılarak sakrifiye edilmiştir. Çalışmada denekler her iyileşme süresi için altı sıçan olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Deney grupları ve deney düzeneğinde tekrar sayıları ile toplam kullanılan hayvan sayısının özeti.

Deney ve Kontrol Grupları	Grup Başına Hayvan Adedi	Tekrar Sayısı	Kullanılan Toplam Hayvan Sayısı
Kontrol Grubu	6	3	18
ESM Grubu	6	3	18
ESM+Hücre Grubu	6	3	18

Tüm gruplarda (kontrol grubu hariç) hayvanların retroperitoneumlarına implantasyon gerçekleştirilmiştir. Erken ve geç dönem hücre göç etme potansiyellerinin ve hücre-hücre koordinasyonunun kurulmasının karşılaştırılması amacıyla 1., 2. ve 4. haftaların sonunda incelenecek dokular (karaciğer, kalp, böbrek, abdominal aorta ve dalak) toplanmıştır. Böylece her bir gruptan altı tanesi 1. hafta, altı tanesi 2. hafta ve diğer altı tanesi de 4. hafta olmak üzere migrasyon potansiyellerini tanımlayacak her grup için toplam 18 bağımsız doku örneği elde edilmiştir.

İmplantasyon işlemi; anestezi uygulamasını takiben, tüm gruplardaki hayvanların abdominal bölgelerinin tıraşlanmasından sonra periton bölgeleri batikon solüsyonu ile temizlenip steril bir şekilde yeşille örtülerek opere edilecek bölge açıkta bırakılmıştır.

Kontrol grubunda bulunan 18 denek implantasyon işlemi görmemiştir.

Boş ESM grubu (n:18) cerrahi protokolünde; steril koşullar altında bistüri yardımıyla 3 cm.'lik bir cilt insizyonundan sonra kasta da aynı boyutta bir alan makas yardımıyla açılmıştır. Liyofilize edildikten sonra -80°C'de saklanmış olan yüzeyinde hücre olmadığı bilinen aselülerize matriksler operasyon öncesinde yoğun antibiyotikli %10 FBS'li DMEM ile ıslatılmıştır. Bu matriksler insizyon sonrasında karın boşluğunda (retroperitoneal bölgede) abdominal aortanın sol lateral bölgesinde bulunan adipoz dokuya 6.0 stur yardımıyla dikilmiştir. Bu işlemden sonra kas emilebilir 3.0 stur ile sürekli-kilitli dikiş ile kapatılırken, cilt insizyonu ise kesikli dikiş ile 3.0 absorbe edilmeyen stur ile kapatılmıştır. Opere

edilen bölge tekrardan batikon solüsyonu ile temizlenerek hayvanlar post-operatif bakıma alınmıştır.

Çalışma planında ESM+Hücre grubunun (n:18) oluşturulmasının nedeni, kontrol grubu ile ESM+Hücre grubu arasında hücre göçü potansiyeli ve zamana bağlı ektopik doku oluşumu açısından bir farklılık olup olmadığını gözlemlemektir.

Steril koşullar altında bistüri yardımıyla 3 cm. lik bir cilt insizyonundan sonra kasta da aynı boyutta bir alan makas yardımıyla açılmıştır. ESM+Hücre grubu için elde edilen aselülerize kalp matrikslerin üzerine farklılaştırılmış işaretli hücreler ekilmiş ve ESM+Hücre kompozitleri elde edilmiştir. Bu elde edilen ESM' ler karın boşluğunda (retroperitoneal bölgede) abdominal aortanın sol lateral bölgesinde bulunan adipoz dokuya 6.0 stur yardımıyla dikilmiştir. Bu işlemden sonra kas emilebilir 3.0 stur ile sürekli-kilitli dikiş ile kapatılırken, cilt insizyonu ise kesikli dikiş ile 3.0 abzorbe edilmeyen stur ile kapatılmıştır. Opere edilen bölge tekrardan batikon solüsyonu ile temizlenerek hayvanlar post-operatif bakıma alınmıştır.

Post-operatif takipte hayvanlar operasyon sonrasında kafeslerine alınarak cerrahi sonrası ağrı tedavisi amacıyla içme sularına 2 mg/ml parasetamol eklenmiştir. Anestezi sırasında meydana gelebilecek hipotermi durumunu engellemek için tüm sıçanlar anesteziden çıkana kadar sıcak su torbası üzerinde tutulmuştur. Hayvanlar deney süreci boyunca ad libitum olarak standart yem ile beslenmiş; günlük olarak, genel durum, vücut ağırlığı, malnutrisyon, enfeksiyon bulguları yönünden değerlendirilmiştir.

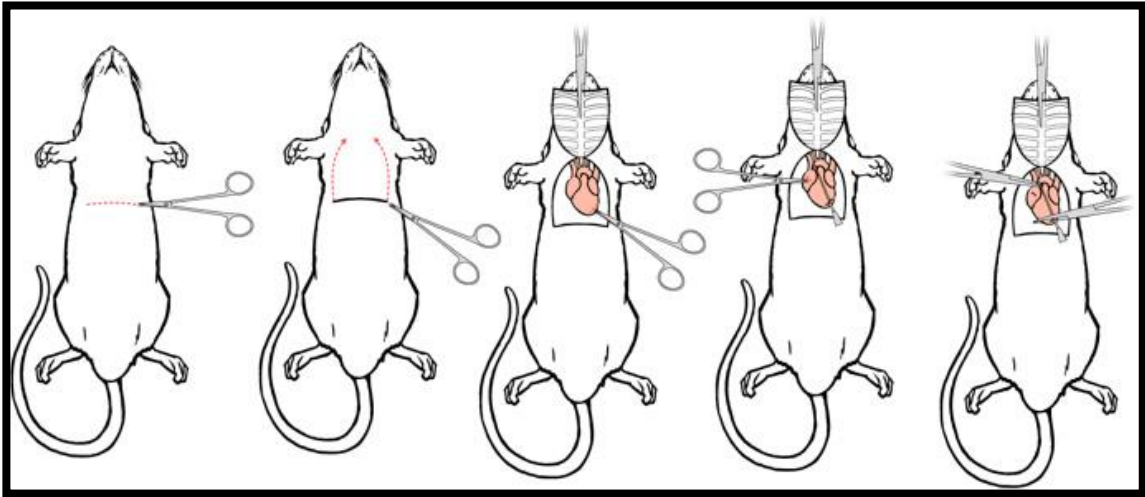
Deney süresinin bitirilmesi (ötenazi): Gruplarda deney sürecinin tamamlanmasını takiben deneyde kullanılan hayvanlara yüksek doz anestezik verilerek ötenazi uygulanmıştır.

2.2.6. Dokuların ve Biyomateryal-Hücre Kompozitinin Vücuttan Toplanması ve İncelenmesi

Çalışmada grupların deney sürecinin tamamlanmasını takiben (1.H, 2.H ve 4.H) kontrol grubu ve deney gruplarındaki tüm hayvanların dokularının ve transplante edilen matrikslerin toplanıp incelenmesi amacıyla öncelikle hayvanlarda perfüzyon fiksasyonu ile dokular fikse edilmiştir. Bu amaçla hayvanlar anestezi altına alındıktan sonra tüm göğüs ve abdominal bölgeleri tıraşlanarak kıllarından arındırılmıştır. Cerrahi müdahaleden önce hayvanlar buz akülerinin üzerine

yerleştirmiştir. Sadece göğüs kafesinin altındaki karın duvarı üzerinden 5-6 cm lateral insizyon yapılmıştır. Diyaframdan karaciğer dikkatle ayrılmıştır. Plevra boşluğunu açığa çıkarmak için göğüs kafesi diyafram boyunca lateral bir şekilde açılmıştır. Dikkatli bir şekilde akciğerlere zarar vermeden kostalar yukarı bir hat boyunca eğri, künt makas ile açılmıştır. Beyin perfüzyonunu engellemek için karotit arterler açığa çıkarılarak hemostat yardımıyla tıkanmıştır. Perikart uzaklaştırılarak kalp ortaya çıkarılmıştır. İris makası kullanılarak sol ventrikül posterior sonunda küçük bir kesi yapılarak perfüzyon pompasına bağlı enjektör ucu (15-gauge) bu kesi bölgesinden aortaya kadar yerleştirilerek hemostat yardımıyla sabitlenmiştir. Son olarak, inen aortaya zarar vermeden mümkün olduğunca büyük olacak şekilde iris makas yardımıyla hayvanın sağ atriyumu kesilmiştir (bkz Şekil 2.2). Perfüzyon pompasının hızı 5ml/dk olacak şekilde ayarlandıktan sonra ilk olarak PBS'in yardımıyla kanın vücuttan uzaklaştırılması ortalama bir saat, sonrasında %4 nötral formalin fiksatifi ile 45 dk perfüzyon yolu ile dokuların fiksasyonu gerçeleştirilmiştir.

Perfüzyon sonrasında kontrol grubunda; tüm hayvanlardan dalak, karaciğer, her iki böbrek, abdominal aorta ve kalp dokular toplanmıştır. Tüm dokular küçük parçalara bölünerek BrdU boyaması için %4 nötral formalin içeren şişelere konmuştur.



Şekil 2.2 Sıçanda perfüzyon fiksasyonu metodunun şematik görüntüsü.

Deney gruplarında da; kontrol grubundaki gibi dokular %4 nötral formalin içeren şişelere konmuştur. Biyomateryal ve biyomateryal+hücre kompozitleri ise dikkatlice retroperitoneal bölgeden alınarak çevreleri temizlendikten sonra RT-PCR analizi için -80°C'ye kaldırılmıştır.

2.2.6.1. anti-BrdU İmmunohistolojik Boyama

Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların doku örnekleri (dalak, karaciğer, böbrekler, abdominal aorta ve kalp) vakit kaybedilmeden %10'luk formol solüsyonuna alınarak gece boyunca tespit edilmiştir. Daha sonra dokular sırasıyla %70' lik, %80' lik, %95' lik, %100'lük alkol ve ksilen serilerinden geçirilmiştir. Parafin ile gece boyu bekletilen dokular ertesi gün parafine gömülmüşlerdir. Bloklar mikrotomda (LEICA RM2125RT) 5µm kalınlığında kesilmiştir. Deney kapsamında yer alan 54 hayvanın her birinden izole edilen karaciğer, dalak, kalp, abdominal aorta ve böbrekten tüm dokular kesilecek şekilde preparat hazırlanmış ve hazırlanan preparatlar BrdU ile işaretlenmiş hücrelerin tespiti için biyotinlenmiş anti-BrdU antikor kullanılmıştır. Çalışmanın tüm deneysel gruplarına ait doku preparatları ışık mikroskopta (LEICA) incelenerek göç etmiş işaretli hücre tayini yapılmaya çalışılmıştır.

2.2.6.2. Eşzamanlı – Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizi

Elde edilen aselülerize kalp matrikslerin boş iken ve üzerine işaretli farklılaşmış hücreler ekildikten sonra *in vivo* retroperitoneal implantasyonları sonucunda zaman içerisinde hücreler arasında, hücre-matriks arasında ve transplante edildikleri dokular ile aralarındaki iletişimin moleküler boyutu incelenmiştir. Bunun için kardiyomiyosite özgü seçilen primerler (MEF2B, ACTC-1, GJA-1, GATA-4 ve NKx-2,5) doğrultusunda analiz yapılmıştır. Hücre farklılaştırılmasında moleküler analiz için dizayn edilen primer dizileri çalışmanın bu aşamasında da kullanılmıştır. Bunun amacı ise aynı primerler ile *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların karşılaştırılabilmesidir.

Moleküler inceleme için perfüzyon fiksasyonu sonrasında retroperitoneal bölgeye transplante edilen boş ESM grubundaki aselülerize kalp matriksler ve aselülerize matriks+hücre grubundan elde edilen matriks+hücre komponentleri ependorf içinde -80°C'deye inceleme yapılana kadar kaldırılmıştır. İnceleme PRZ BioTech'te yapılmıştır.

Tüm çalışma sonuçları GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler tüm deney protokolleri için ortalama \pm standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Student's t-testi kullanılmış ve p-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

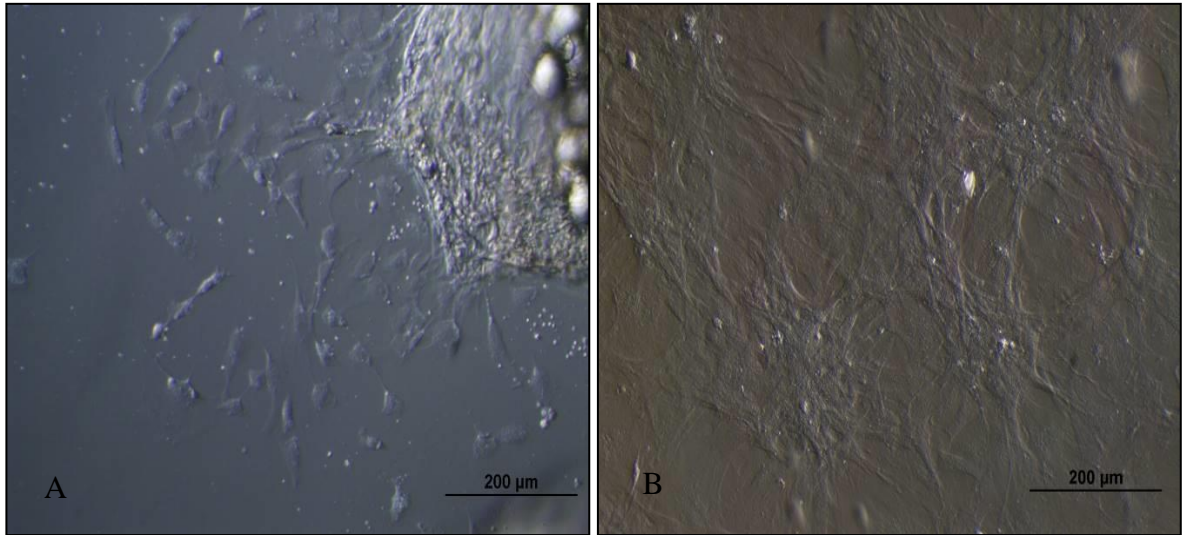
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Sonuçlar

3.1.1. AdMSC Kültürü

Sıçan flank ve gonadal adipoz dokuları steril koşullar altında izole edilmiştir ve kültür ortamına alınan adipoz doku parçaları uygun besi ortamında ve uygun koşullarda 24 kuyucuklu kültür kaplarında inkübe edilmiştir. Belirli günlerde dokulardan ayrılarak kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler ve dokuların ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra konfluent hale gelen hücreler mikroskop altında takip edilmiştir (Şekil 3.1).

Karakterizasyon ve farklılaştırılma potansiyeli çalışmaları için hücreler ikinci kuşağa (P/2) kadar pasajlanmıştır. P/2 hücreleri sonraki aşamalarda kullanılmak üzere dondurularak saklanmıştır.



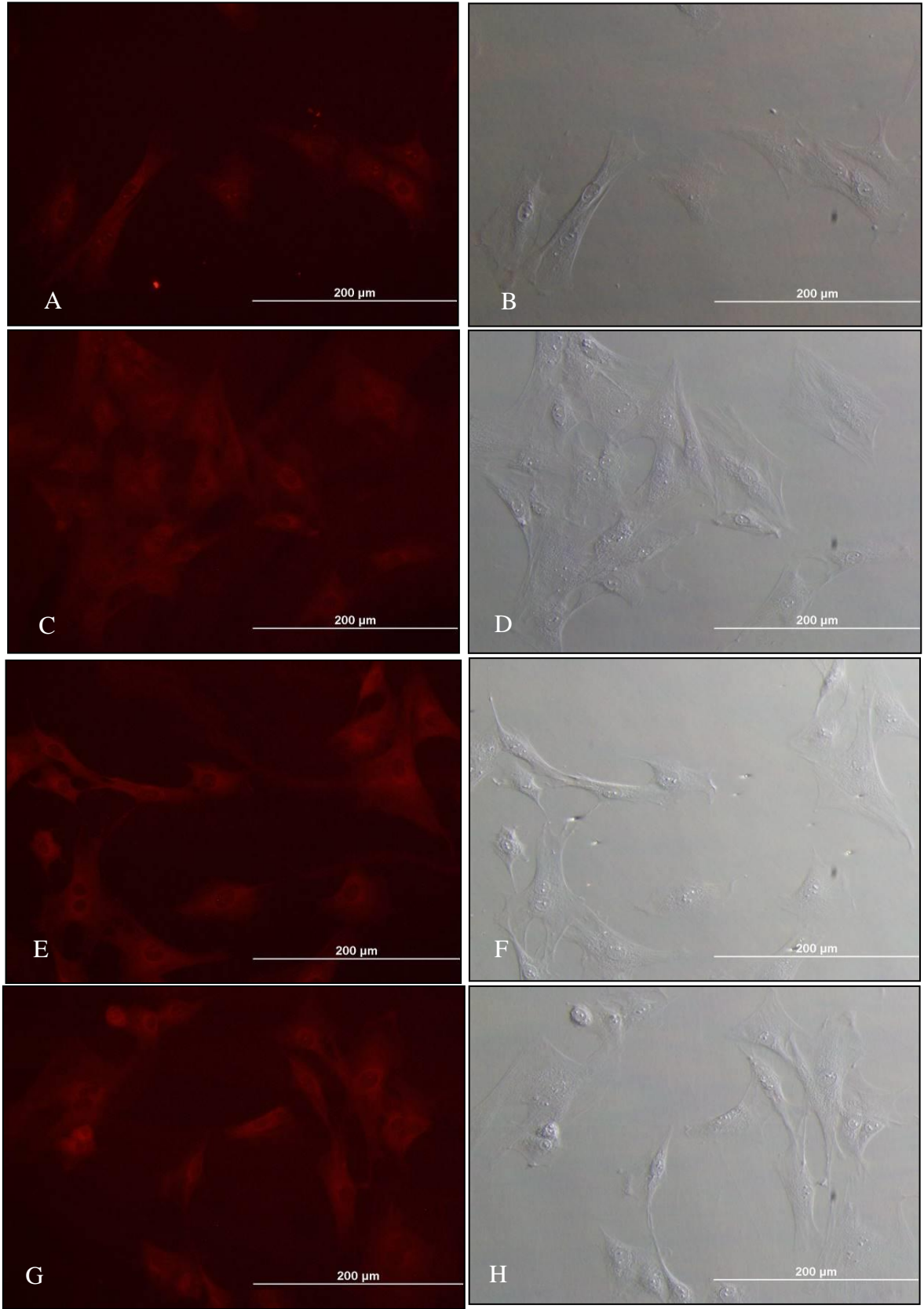
Şekil 3.1 Dokudan kültür kabı yüzeyine göç eden hücreler (A) ve konfluensiye ulaşmış kültür kabı görüntüsü (B) (x200).

3.1.2. AdMSC Karakterizasyonu

3.1.2.1. İmmunofloresan Boyama

Adipoz dokudan izole edilmiş mezenşimal kök hücrelerin karakterize edilmesi için P/2 hücreleri kullanılmıştır. Mezenşimal kök hücrelere özgül olan moleküllerden üç tanesi seçilmiştir. Bunlar CD13, CD29, CD54 ve CD90 molekülleridir. Bu moleküller ile yapılan floresan boyama sonucunda tüm hücrelerin mezenşimal kök

hücre olduğunu gösteren boyanmalar gözlenmiştir. Hücreler boyanma sonucunda TR için 490-520 nm dalga boyunda floresan aydınlatma ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan) görüntülenmiştir (Şekil 3.2).



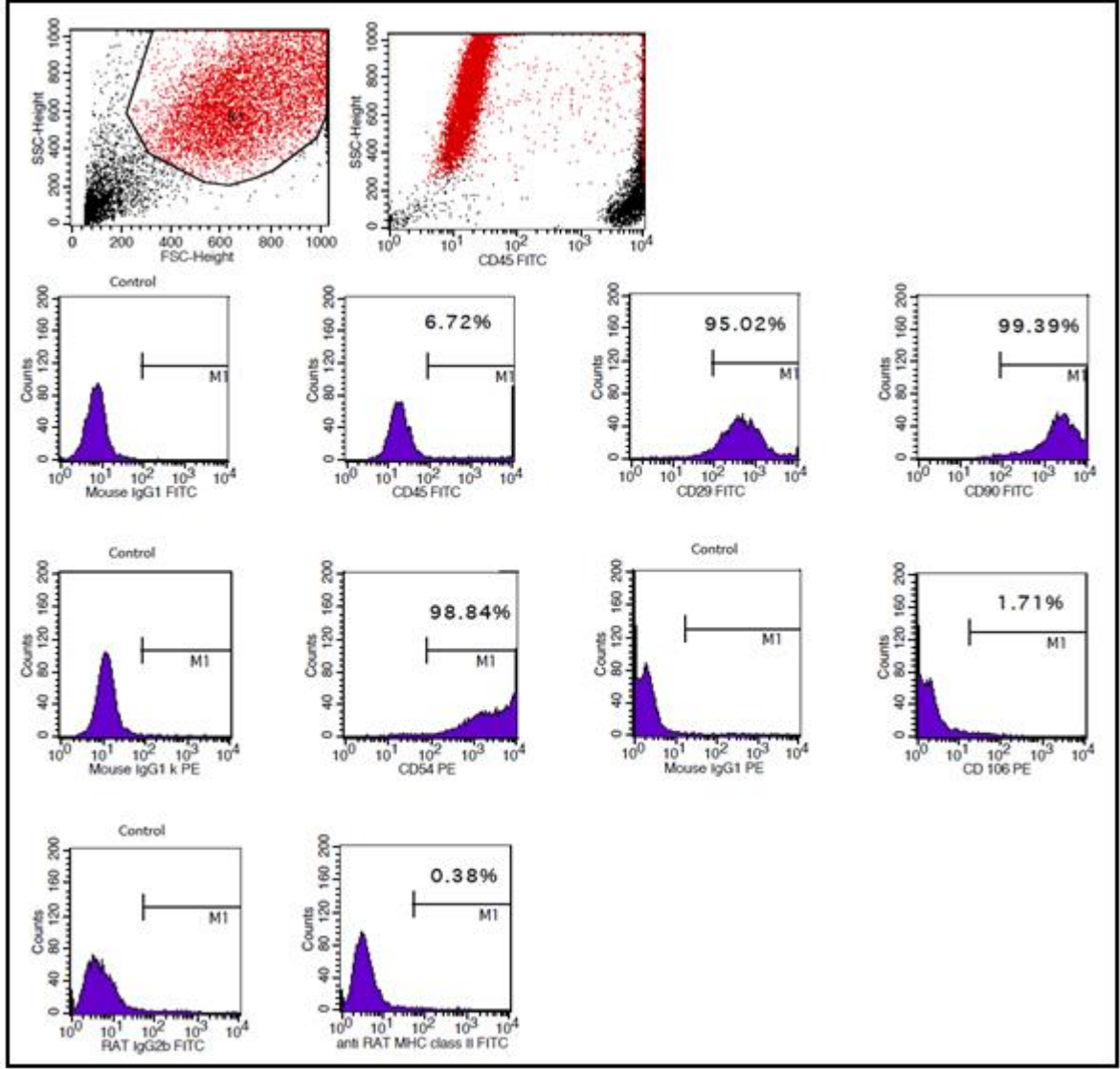
Şekil 3.2 P/2'deki adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerin CD13 (A,B), CD29 (C,D), CD54 (E,F), CD90 (G,H) moleküllerine ait TR floresan işaretleme görüntüleri (490-520 nm) ve ışık mikroskobu görüntüleri (x200).

3.1.2.2. Akış Sitometrik Analiz Sonucu (FACS)

Tez çalışmasında kullanılan adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerinin karakterizasyonu için bir diğer karakterizasyon yöntemi olan akış sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri analizi, hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Bu analiz ile bir süspansiyon halindeki hücreler lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi, hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.

Mezenşimal kök hücrelerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey antijenlerinden bazıları şu şekilde belirlenmiştir: fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD54, CD90, CD29, MHC sınıf I ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD106, ve MHC sınıf II.

Tez kapsamında kullanılan sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları Şekil 3.3' te verilmiştir.

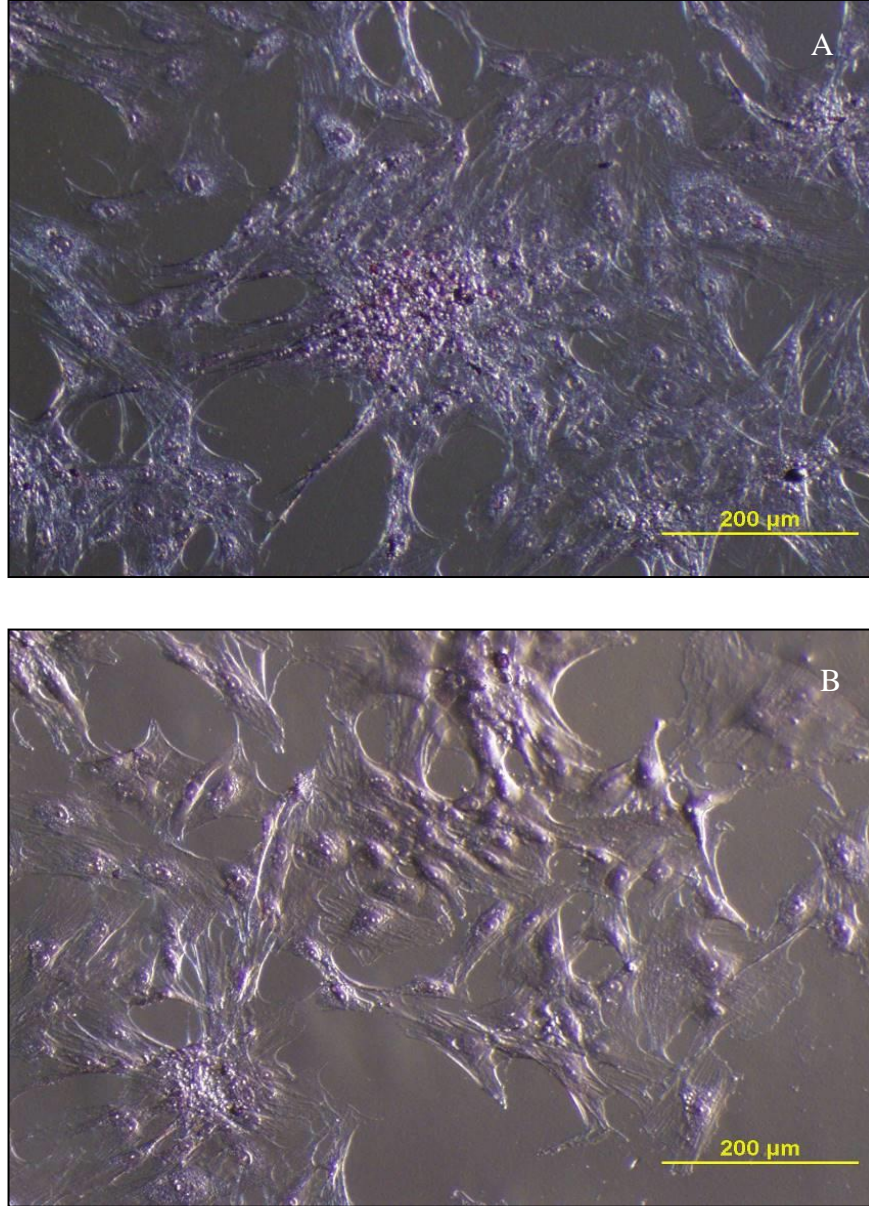


Şekil 3.3 Sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları. Fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD54, CD90, CD29, MHC sınıf I ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD106, ve MHC sınıf II.

3.1.3. Oil-red O Boyama

Tez kapsamında kullanılan mezenşimal kök hücreler adipoz doku kökenli olduğundan adiposite dönüşme potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu nedenle adipoze dokudan izole edilen hücrelerin pasajlanmaları sonucunda elde edilen hücrelerin hangi potansiyelde adipojenik özellik gösterdiğini gözlemlemek için adipositlerdeki yağ granüllerinin boyanmasında kullanılan Oil-red O boyası kullanılmıştır.

P/1' de gözlenen hücrelerdeki yağ damlacıkları Oil-red O ile boyanırken (Şekil 3.4 A), P/2' de hücrelerin biraraya gelmesi ve kök hücre oranındaki artış ile birlikte Oil-red O ile boyanma oranında da düşüş gözlenmiştir (Şekil 3.4 B).



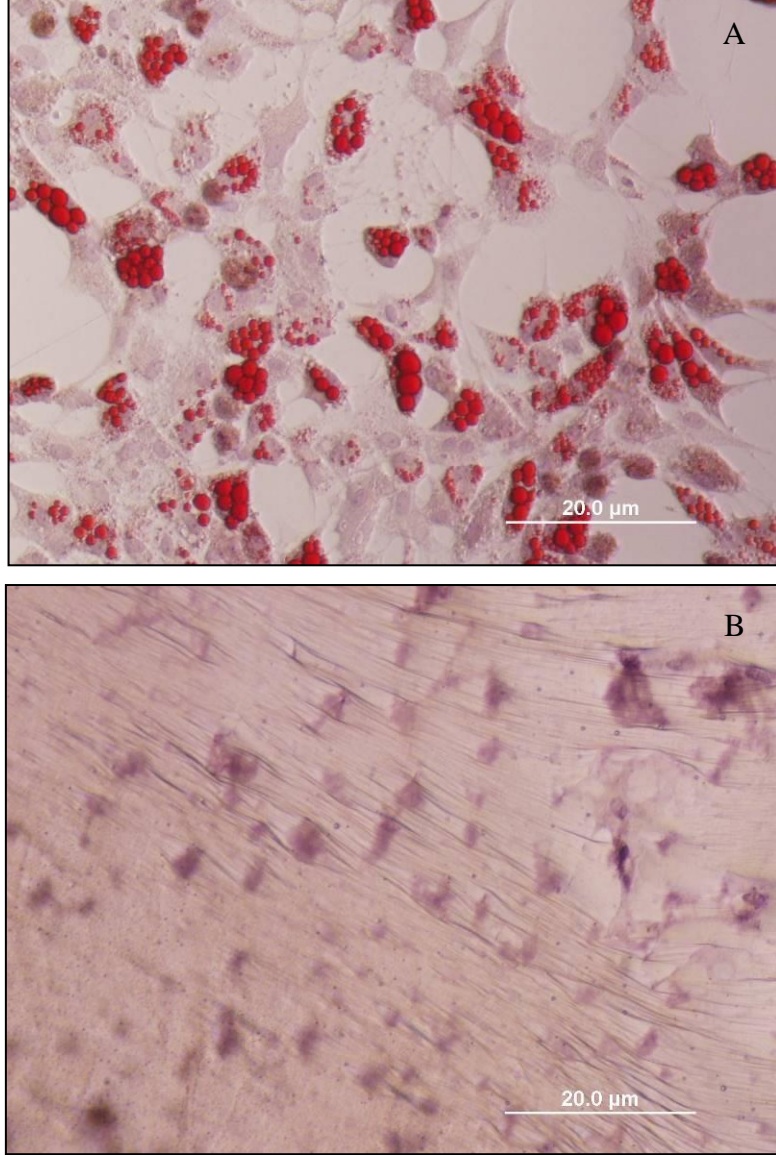
Şekil 3.4 P/1 (A) ve P/2' deki (B) hücrelerin Oil-red O ile boyanması (x200).

3.1.4. AdMSC Farklılaşma Potansiyeli

AdMSC'lerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir.

Adipojenik farklılaşma kapasitesi; nötral lipid vakuollerinin Oil-red O boyanması ile hücrelerdeki birikimi gösterilerek incelenmiştir. Adipojenik farklılaşma potansiyelleri hücrelerin yağ damlacıklarının kırmızı boyanması ile tespit edilmiştir (Şekil 3.5 A).

Kondrojenik farklılaşma kapasitesi; hücrelerin Safranin O boyanma potansiyelleri ile incelenmiştir. Farklılaşma potansiyeli kuyucuklardaki turuncu boyanma ile tespit edilmiştir (Şekil 3.5 B).

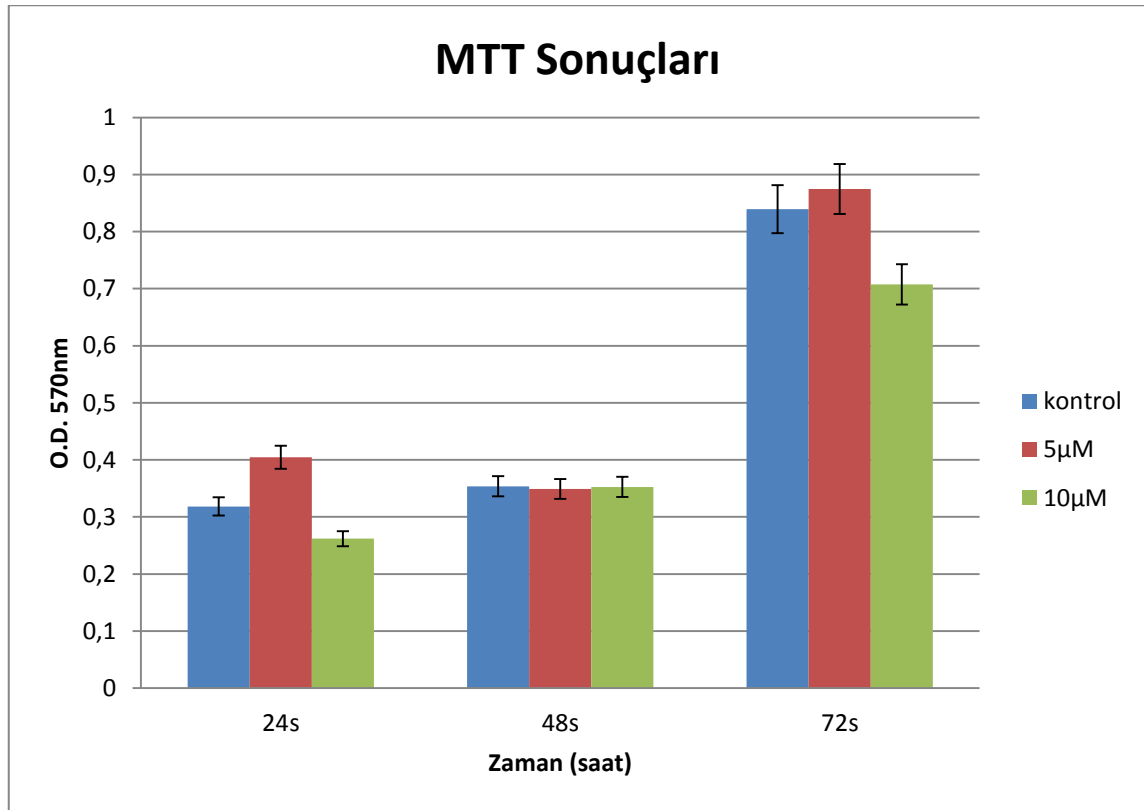


Şekil 3.5 (A) Yağ damlacıklarının Oil-red O ile boyanması (x40) (B) Kondrojenik farklılaşmayı gösteren Safranin O boyanması (x40).

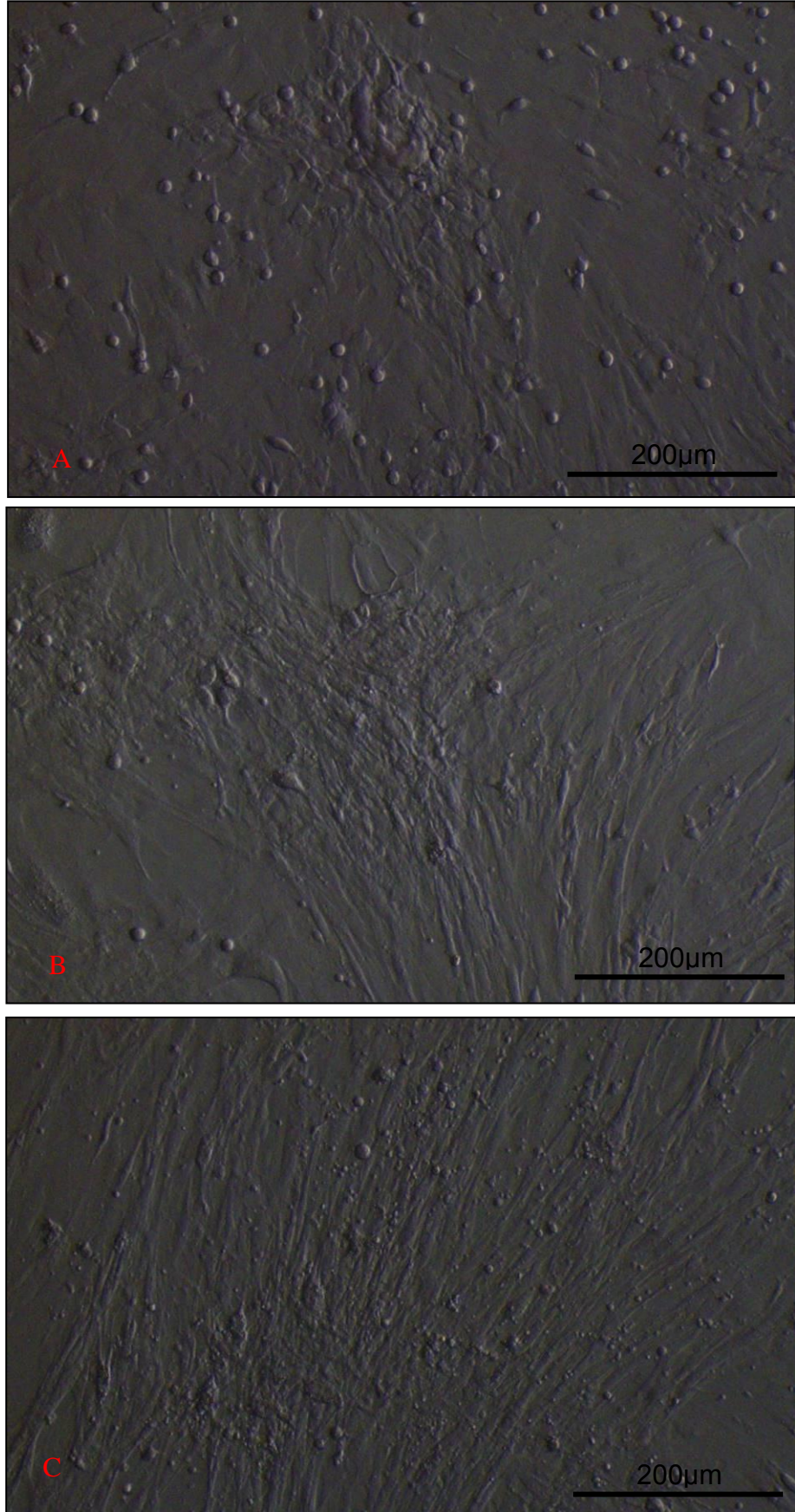
3.1.5. Kardiyomiyosit Farklılaştırılması (5-Aza uygulaması)

Adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücrelerinin kardiyomiyosite farklılaştırılması için kullanılan ajanın (5-Aza) seçilen iki farklı dozunun (5 μ M, 10 μ M) hücreler üzerindeki toksik etkisine bakılmıştır. 5-Aza'nın farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine farklı etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. MTT sonuçlarına göre seçilen dozların belirgin bir toksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir. 5-Aza deneme grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Farklı dozlardaki 5-Aza'nın AdMSC'lerin üzerine etkisinin zamana göre MTT analiz sonuçları. (İstatistiksel olarak gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir, $p>0,05$, $n:3$)



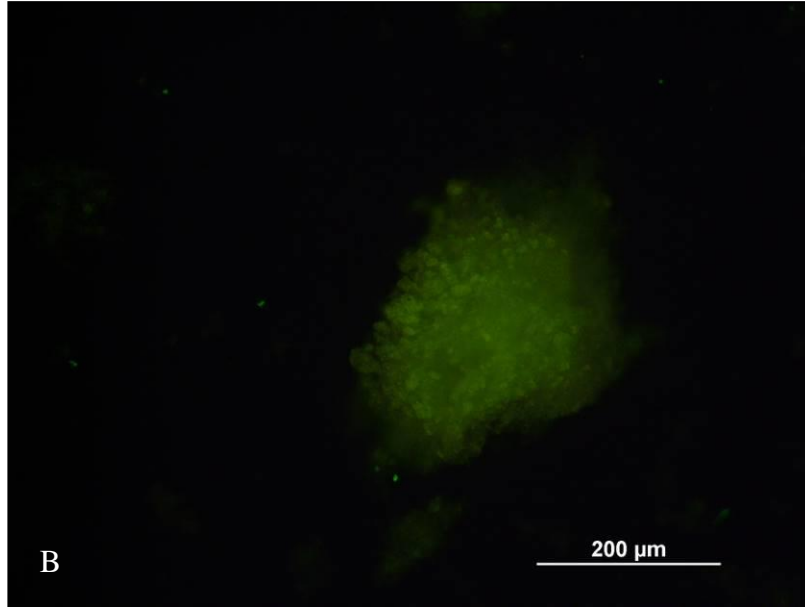
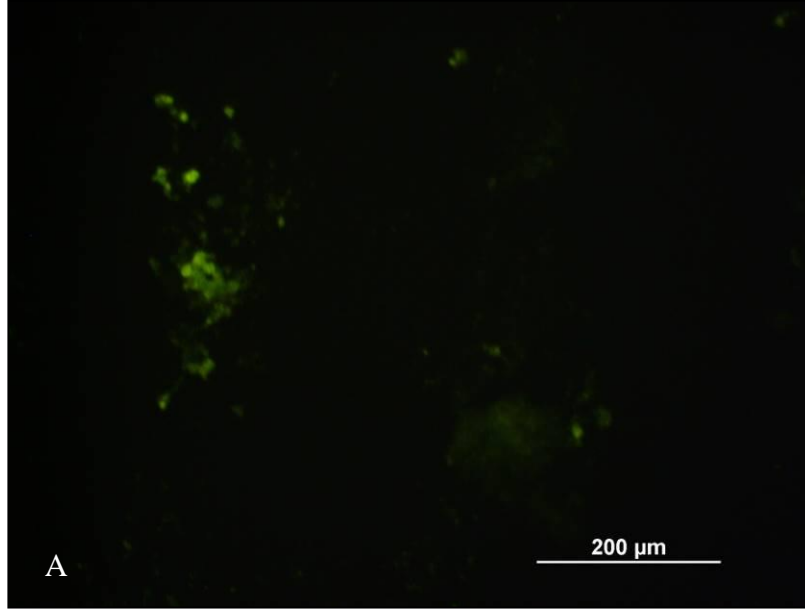
MTT analizinin 72. saatinde 5-Aza uygulanmamış kontrol grubu ve 5 μ M ve 10 μ M 5-Aza uygulanmış gruplardaki hücrelerin morfolojilerini gösteren ışık mikroskop görüntüleri Şekil 3.6 'da verilmiştir.

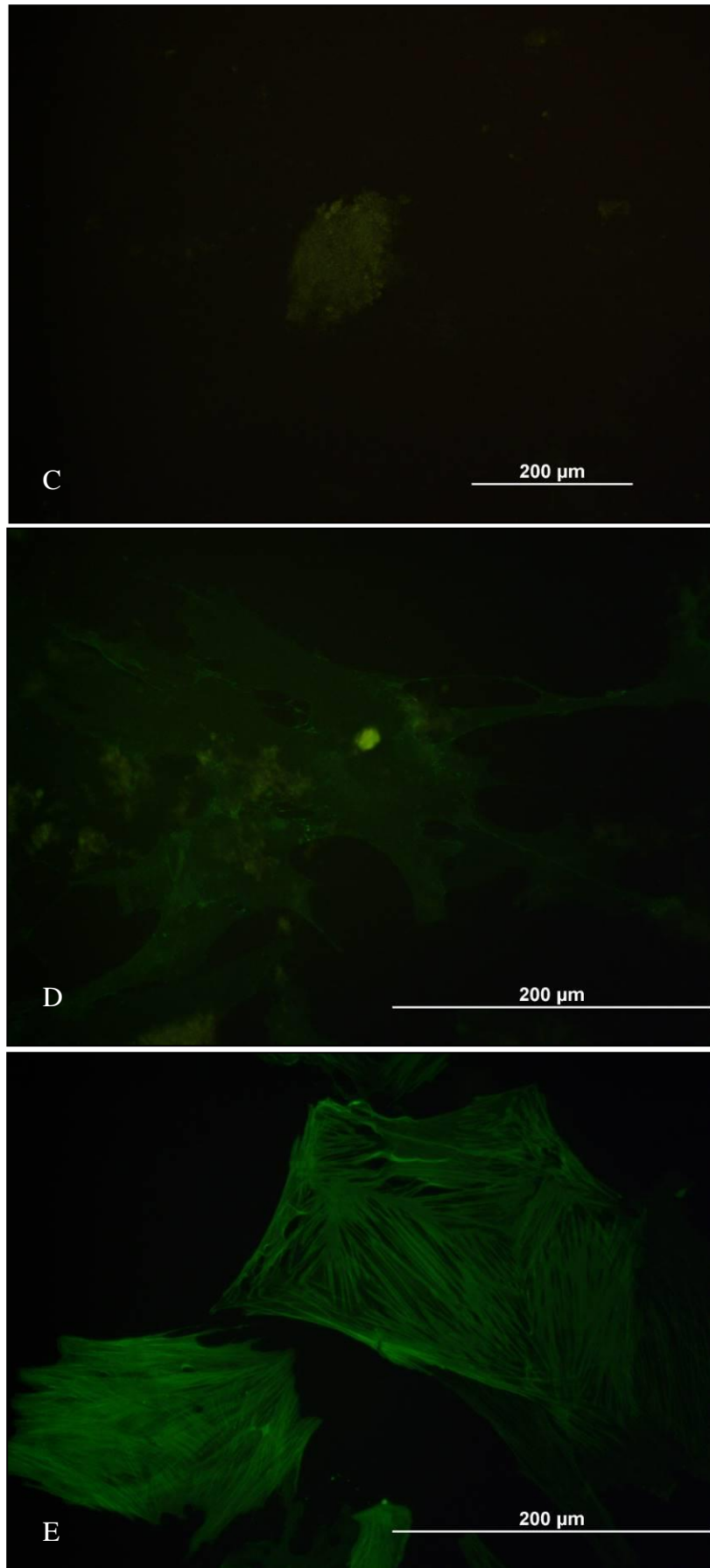


Şekil 3.6 5-Aza uygulanmamış kontrol grubu (A) ve farklı konsantrasyonlardaki 5µM (B) ve 10µM (C) 5-Aza uygulanmış hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri (x200).

3.1.6. Kardiyomiyosit Karakterizasyonu

Adipoz kökenli mezenşimal kök hücrelerden farklılaştırıldığı düşünülen hücrelerin karakterizasyonu için 5-Aza farklılaştırılmasını takip eden dördüncü haftanın sonunda kardiyomiyosite özgül olan kardiyak troponin I, miyosin ağır zincir (MHC), konneksin 43 (Cnx-43), pan-kaderin ve alfa düz kas aktin (α -SMA) antikorları ile floresan boyama yapılmıştır. FTIC immünofloresan boyama sonuçlarına göre hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştığı gösterilmiştir (Şekil 3.7).





Şekil 3.7 Farklılaştırılmış mezenşimal kök hücrelerin (A) kardiyak troponin I, (B) MHC, (C) Cnx-43, (D) pan-kaderin ve (E) α -SMA antikolları ile floresan boyama görüntüleri (x200).

3.1.7. RT-PCR

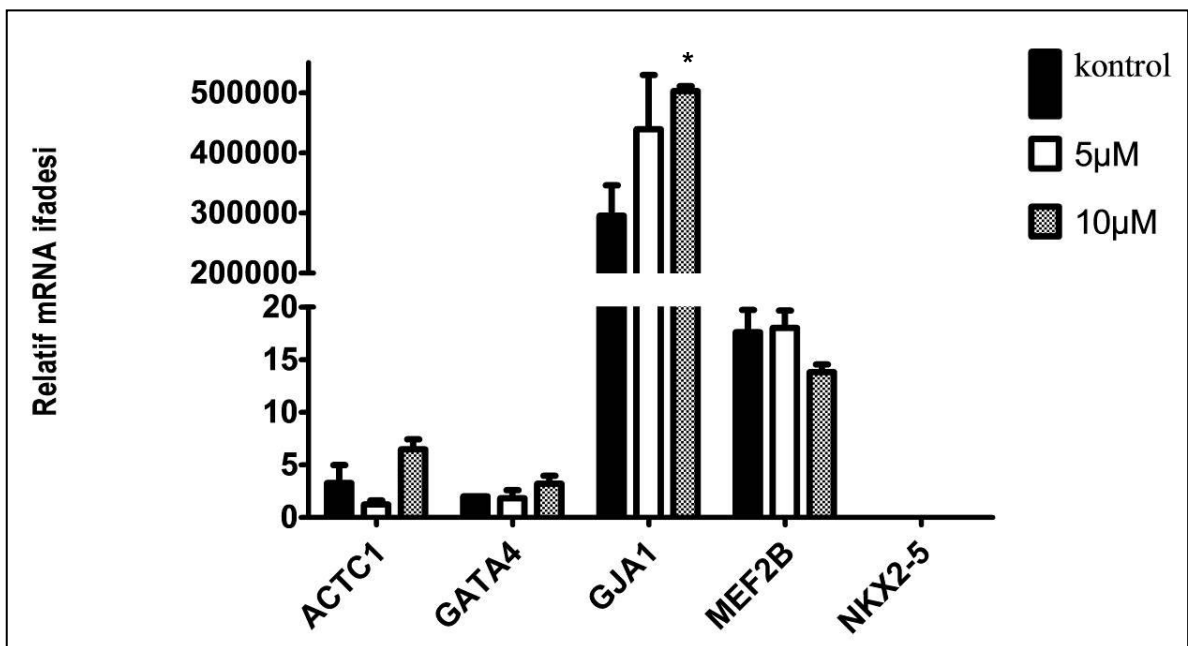
Kültür kaplarından elde edilen total RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Farklı konsantrasyondaki 5-Aza grupları ile kontrol hücrelerinin total RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları.

Örnek	Total RNA miktarı (ng/ul)
Kontrol	377.4
5µM 5-Aza	295.5
10µM 5-Aza	294.2

RT-PCR analizi sonucunda elde edilen veriler $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct) methodu kullanılarak değerlendirilmiştir. İç kontrol geni olan HPRT-1, kullanılan metod sonucunda elde edilen verilerin normalizasyonu için kullanılmıştır. Normalizasyon sonucunda elde edilen veriler ile genlerin relatif ifade profilleri karşılaştırılmıştır. Hesaplama sonuçlarına ait grafik Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Kontrol, 5µM 5-Aza ve 10µM 5-Aza örneklerinde HPRT-1'e göre relatif ACTC-1, GATA-4, GJA1, MEF2B ve NKx2,5 ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n:3, *: P<0.05)



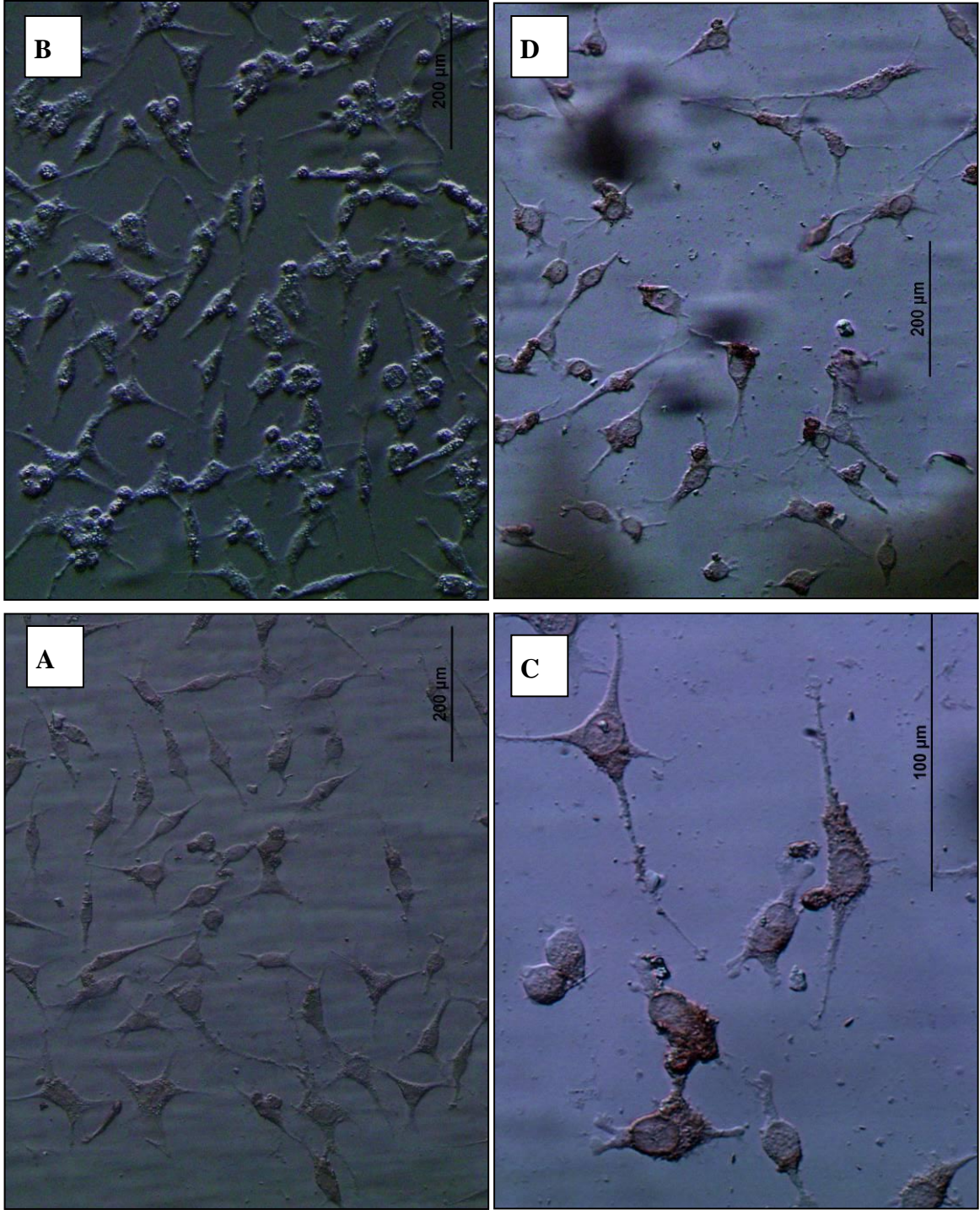
Genlerin ifade grafikleri incelendiğinde; NKx2,5 hariç diğer tüm genlerin örneklerde ifadelerinin olduğu gözlenmiştir. NKx2,5 geni hariç tüm genlerin ifadeleri için istatistiksel olarak kontrol grupları ile 5-Aza grupları kıyaslandığı zaman sadece GJA-1 geni için kontrol grubu ile 10 µM 5-Aza uygulama grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Bu sonuca göre farklılaştırma deneylerinin devamında 10 µM 5-Aza ile devam edilmiştir.

3.1.8. Hücrelerin BrdU ile İşaretlenmesi

BrdU için uygun konsantrasyon ve uygulama süresi için P/2' deki AdMSC'ler kullanılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında eşit sayıdaki kuyucuklara pozitif ve negatif uygulamalarla birlikte, 1µM ve 5µM BrdU solüsyonları taze DMEM ile eklenmiştir. Her grup için 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saat uygulamalarına bakılmıştır. 6 ve 12. saatlerde istenilen boyanma gözlenmezken 24. saat uygulamasında boyanma gözlenmiştir. 48. saatten itibaren 72. ve 96. saatler dahil olmak üzere her iki konsantrasyonda da (1µM ve 5µM) hücre ölümleri gözlemlendiği için BrdU'nun toksik etki süresinin 48 saat olduğuna karar verilmiştir.

Çalışmaların devamında farklılaştırılmış mezenşimal kökenli kök hücrelerin işaretlemelerinde BrdU'nun uygulama dozu 1µM ve süresi ise 24 saat olacak şekilde devam edilmiştir.

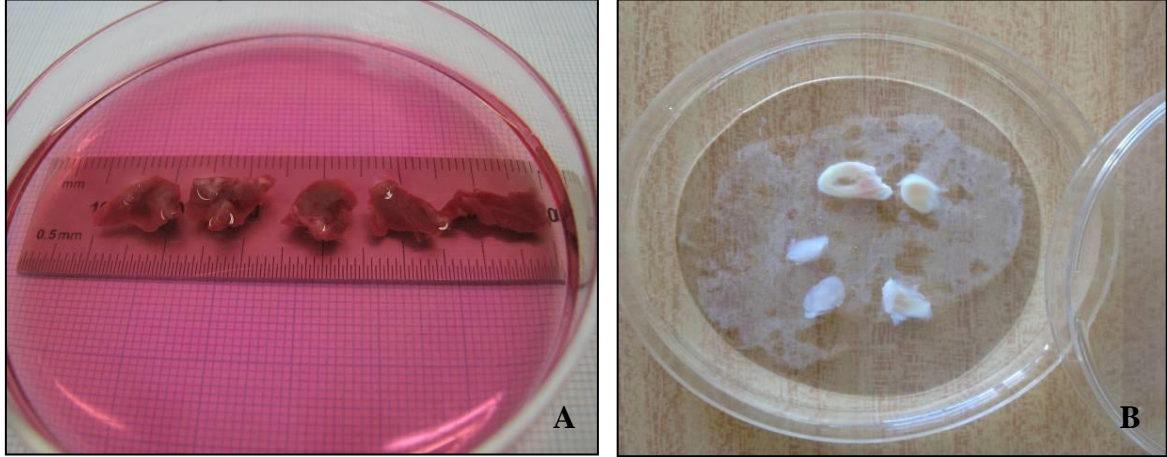
Farklılaştırılmış mezenşimal kökenli hücrelerin BrdU ile işaretlenmelerinin 24. saatinde hücreler fikse edilmiştir. BrdU için anti-BrdU immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Boyama sonucunda işaretli hücreler mikroskop altında tespit edilerek fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 BrdU işaretli hücrelerin ışık mikroskop görüntüleri (A, B, C x100 büyütme, D x40 büyütme).

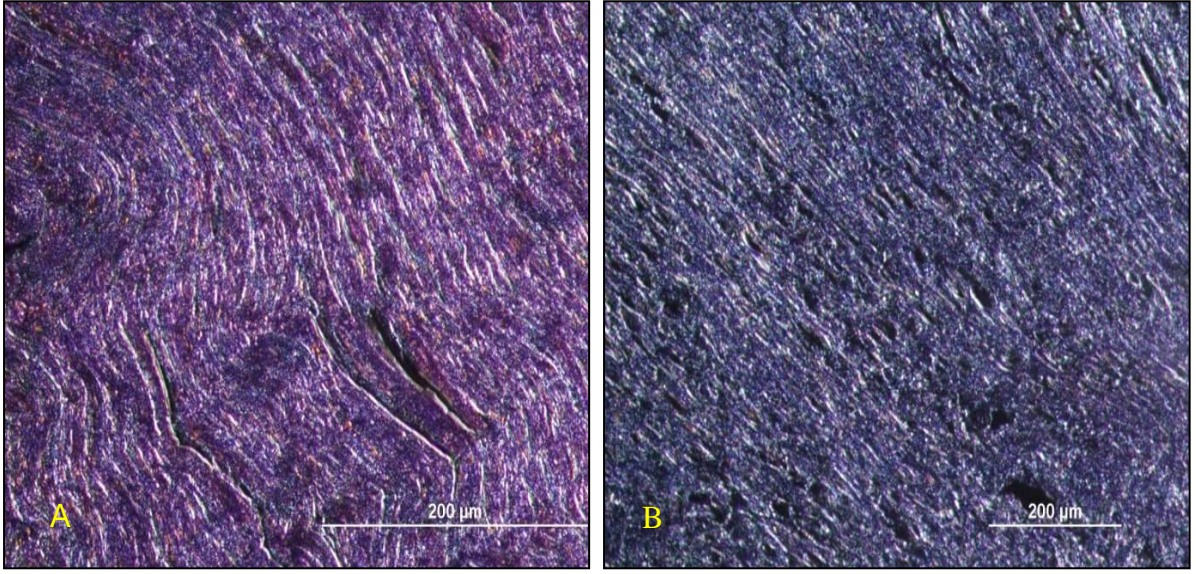
3.1.9. Aselülerize Kalp Matrikslerinin Eldesi

Kısa süreli perfüzyon sonrasında vücut dışına alınan kalp dokuları eşit büyüklüklerde (1-1,5 mm) olacak şekilde 5-6 parçaya bölünmüştür (Şekil 3.9 A). Kalp doku parçalarının aselülerizasyon işleminden sonraki görüntüleri Şekil 3.9 B'de verilmiştir.

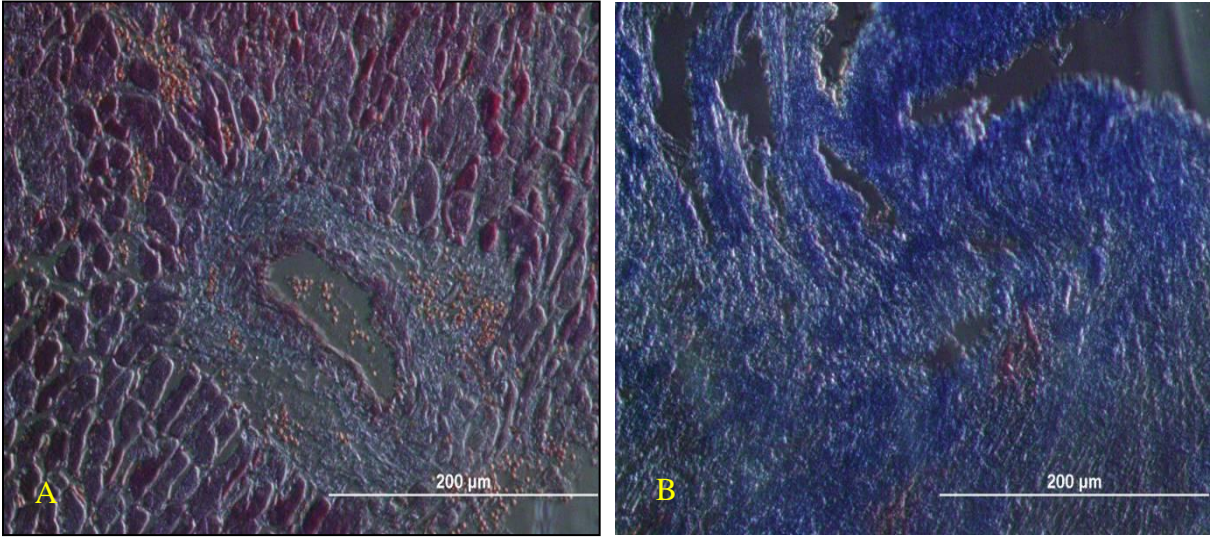


Şekil 3.9 (A) Kalp dokusunun aselülerizasyon uygulaması için eşit parçalara bölünmüş hali (B) Kalp doku parçalarının aselülerizasyon işlemine tabi tutulmasından sonraki hali.

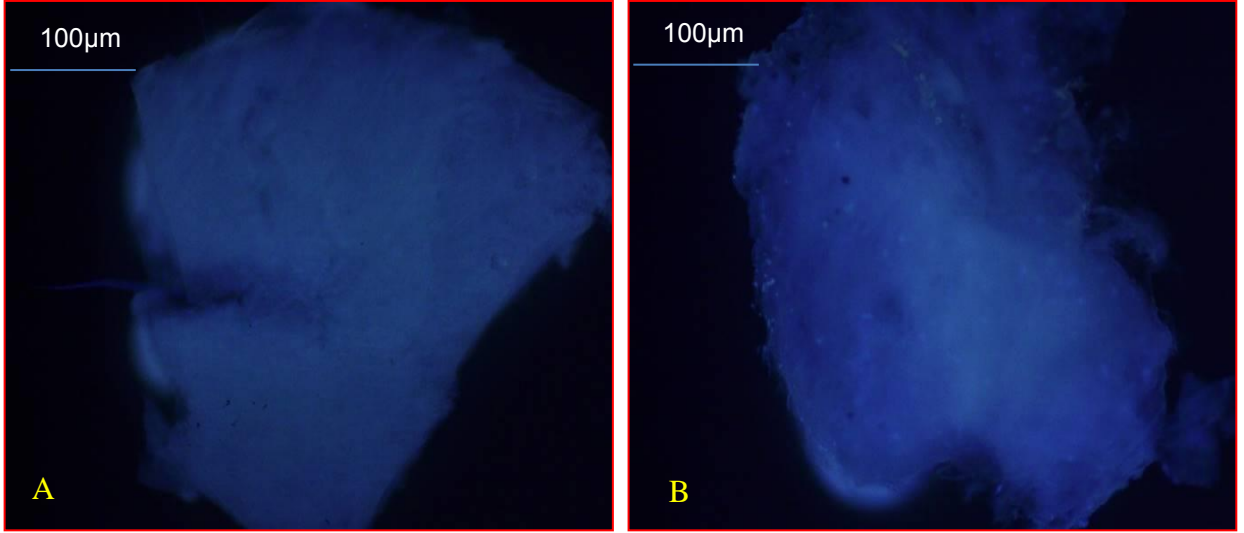
Aselülerize kalp matrikslerinin hücrelerden tamamen arındırıldığından emin olunması için farklı histolojik boyamalar kullanılmıştır. Kontrol (işlem görmemiş doku parçaları) ve aselülerize edilmiş doku parçaları histolojik incelemelerden H&E ve Masson Trichrom için parafine gömülmüştür. Gömme işleminden sonra matrikslerden 5 μ kesitler alınmıştır. Boyamalardan sonra ışık mikroskop görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.10-3.11). Aselülerize kalp matriksleri ayrıca DAPI ile boyanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.10 Kontrol (A) ve aselülerize kalp (B) dokularının H&E boyaması (x200).

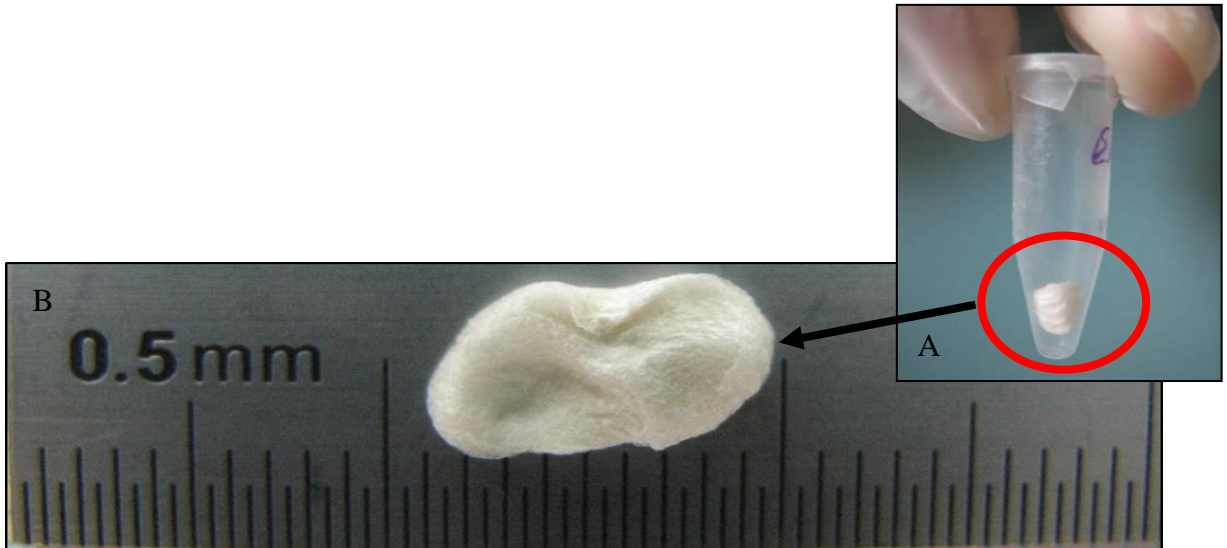


Şekil 3.11 Kontrol (A) ve aselülerize kalp matrislerinin (B) Masson Trichrom boyaması (x200).



Şekil 3.12 Aselülerize (A) ve Kontrol kalp matrislerinin (B) DAPI ile boyaması (x100).

Hücrelerinden arındırıldığından emin olunan matrisler hücre uygulaması için uygun hale getirilmek üzere liyofilize işleme tabi tutulmuştur. Liyofilizasyon için parçalara bölünmüş herbir doku ayrı ependorfa alınmıştır (Şekil 3.13 A). Liyofilize edilen aselülerize matrislerin boyutlarında herhangi bir değişim olmamıştır (Şekil 3.13 B). Elde edilen liyofilize matrisler hücre uygulamasına kadar -20°C'de saklanmıştır.

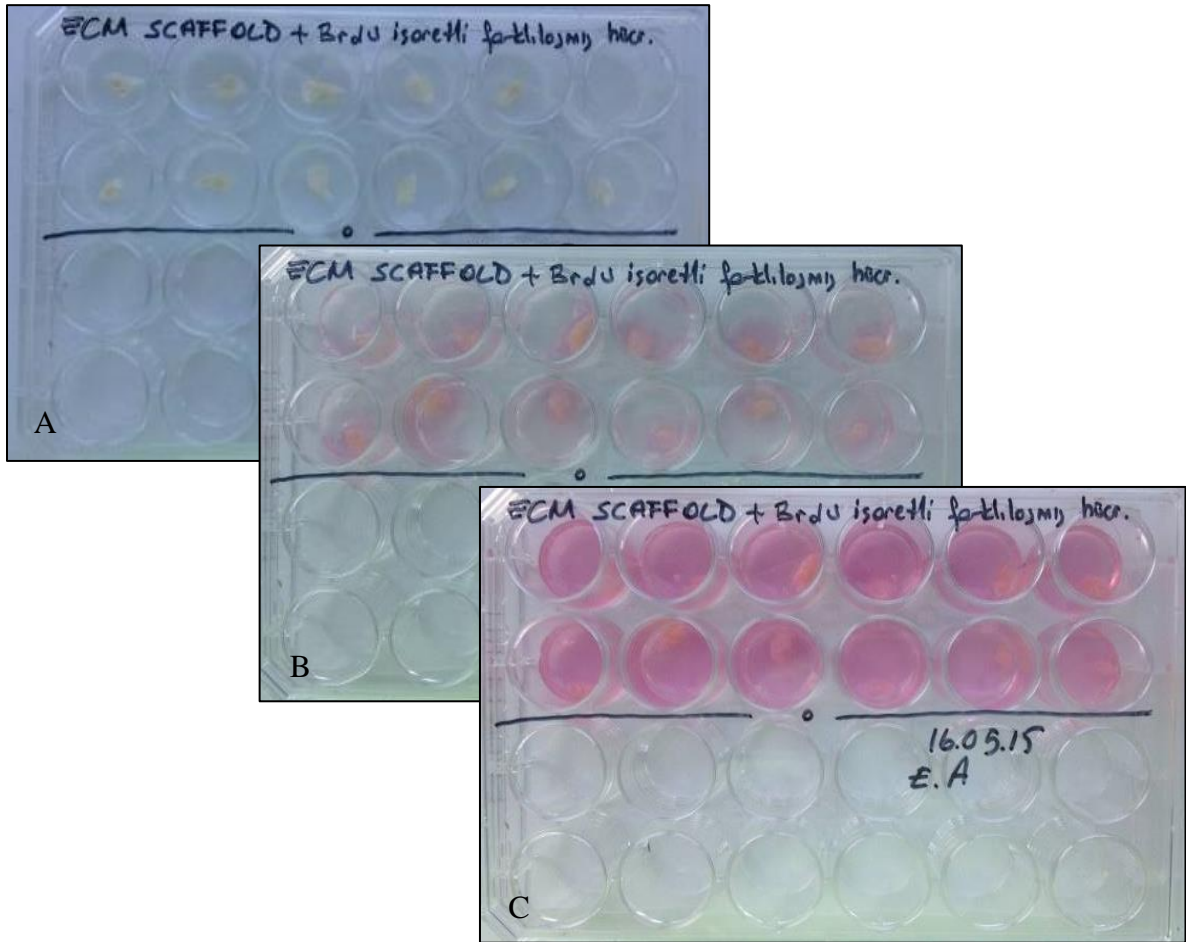


Şekil 3.13 (A) Aselülerize kalp matrislerinin liyofilize edilmesi ve (B) çalışmada kullanılan liyofilize edilmiş aselülerize kalp matrislerinin milimetrik boyutu.

3.1.10. Aselülerize Matriks-Hücre Etkileşim Çalışmaları

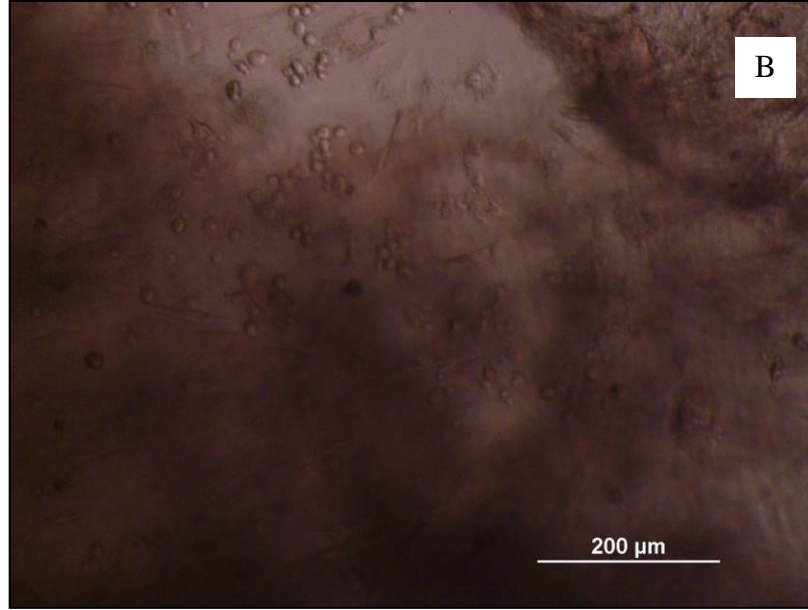
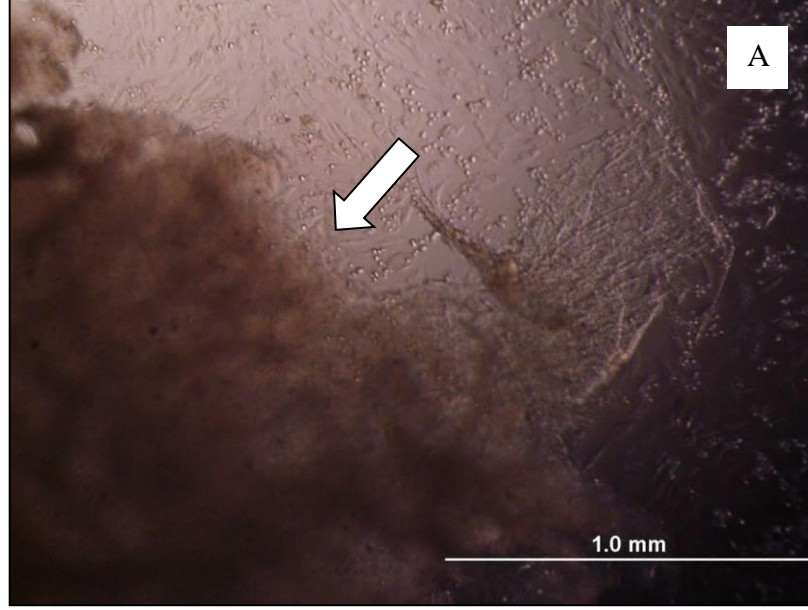
Liyofilize edilmiş aselülerize kalp matrikslerine hücre uygulaması yapılmadan önce matriksler -20°C 'den çıkarılmıştır. Çıkarılan örnekler 24 gözlü hücre kültür kaplarına her göze bir matriks gelecek şekilde laminar kabın içinde yerleştirilmiştir (Şekil 3.14 A). Matrikslerin sterilizasyonu için 30 dk ultraviyole uygulanmıştır.

Farklılaştırılmış işaretli mezenşimal kök hücreler 2×10^5 hücre/doku iskelesi olacak şekilde, her bir doku iskelesine zaman aralıklarıyla toplamda $500 \mu\text{L}$ hücre süspansiyonu enjekte edilerek hücre uygulaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14 B-C).



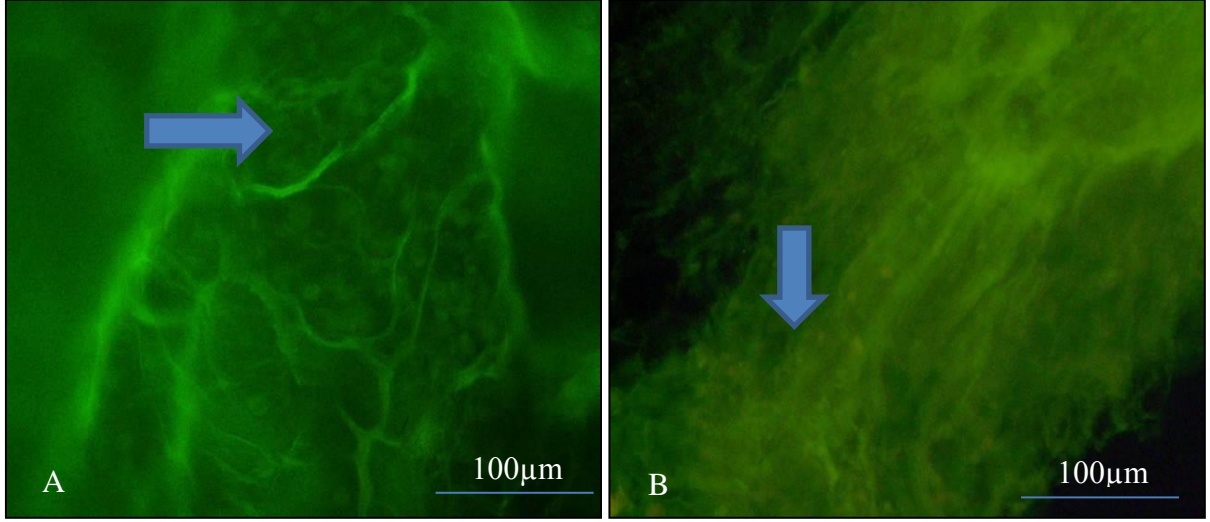
Şekil 3.14 Liyofilize kalp matrikslerine farklılaştırılmış işaretli hücrelerin uygulanması (A). Matrikslerin sterilizasyonu için 24 kuyucuklu kültür kaplarına yerleştirilmesi (B). Matrikslere hücre uygulamasının ilk basamağı (C). Tüm hücre süspansiyonunun ($500 \mu\text{L}$).

Hücre uygulamasını takip eden 24. saatteki doku iskelelerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskop görüntüleri Şekil 3.15' te verilmiştir.

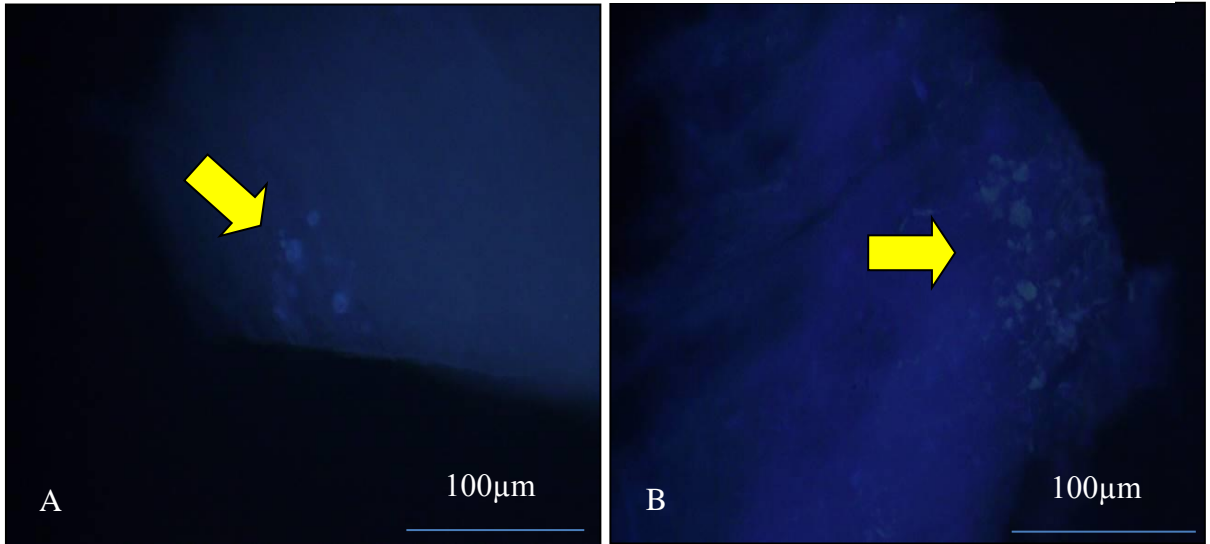


Şekil 3.15 24. saat doku iskelesi+hücre uygulaması ışık mikroskop görüntüsü (A) x100 ve (B) x200.

Doku iskelelerine hücre uygulamasından sonra hücrelerin 24 ve 48. saatlerdeki hücre tutunma potansiyellerini göstermek amacıyla AO/PI (hücre canlılığını göstermek amacıyla) ve DAPI (hücre çekirdeklerinin varlığının tespiti için) boyamaları yapılmıştır. Hücrelerin zaman içinde doku iskeleleri üzerinde tutundukları her iki boyama yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 3.16- 3.17).

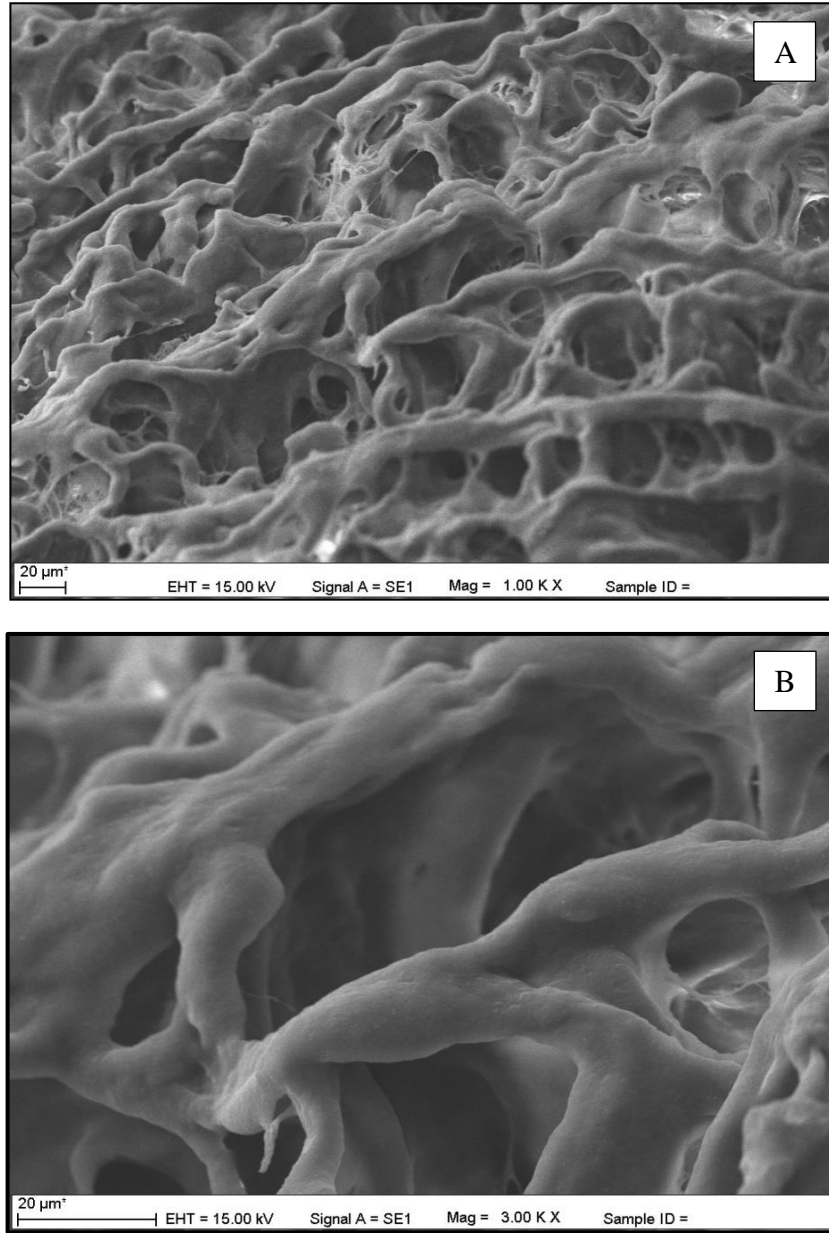


Şekil 3.16 (A) 24 ve (B) 48. saat doku iskelesi+hücre uygulamasının AO/PI boyama görüntüsü (x100). Oklarla gösterilen alanlarda hücre yoğunlukları gözlenmektedir.

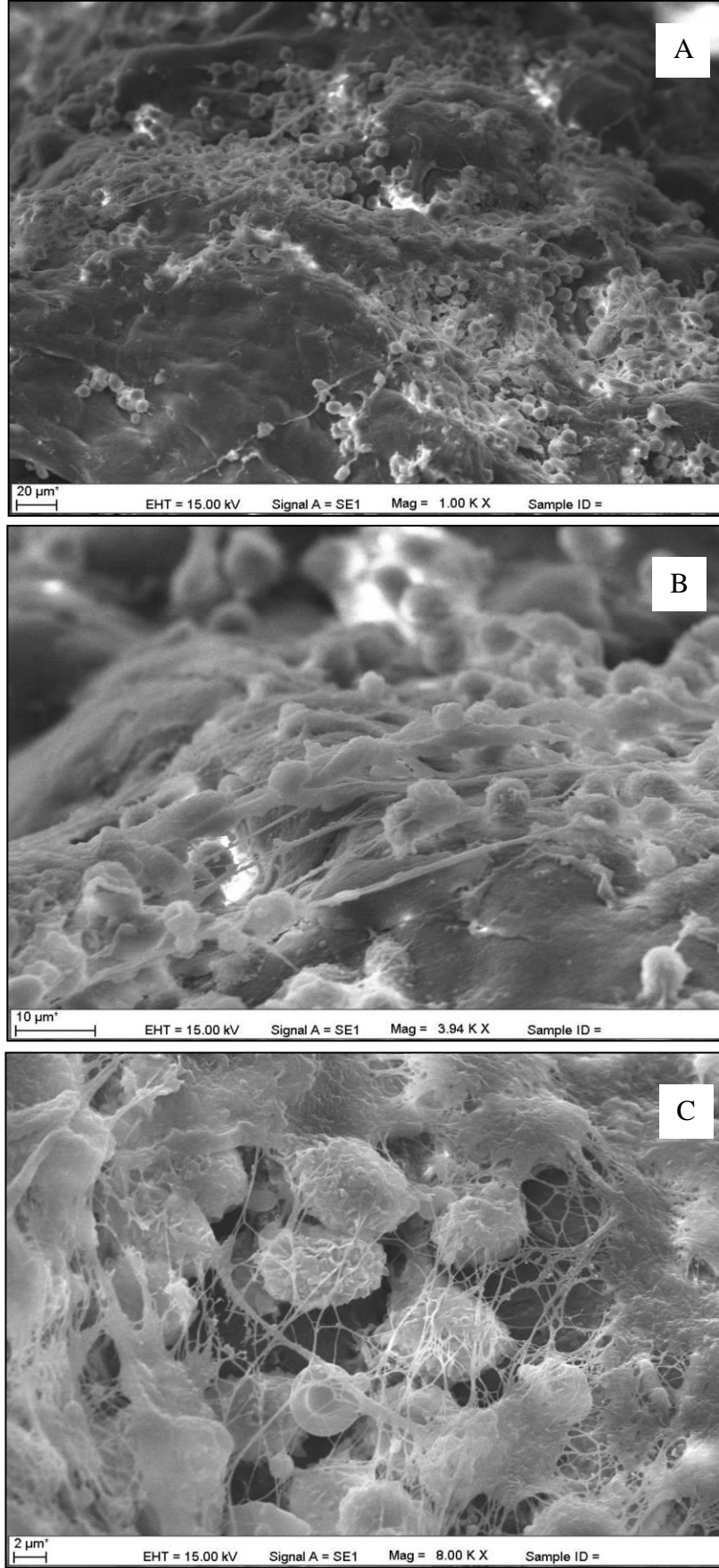


Şekil 3.17 (A) 24 ve (B) 48. saat doku iskelesi+hücre uygulamasının DAPI boyama görüntüsü (x100). Oklarla gösterilen bölgelerde çekirdek boyanması sonucunda uygulanan hücrelerin iskeleye tutuntuğu gözlenmiştir.

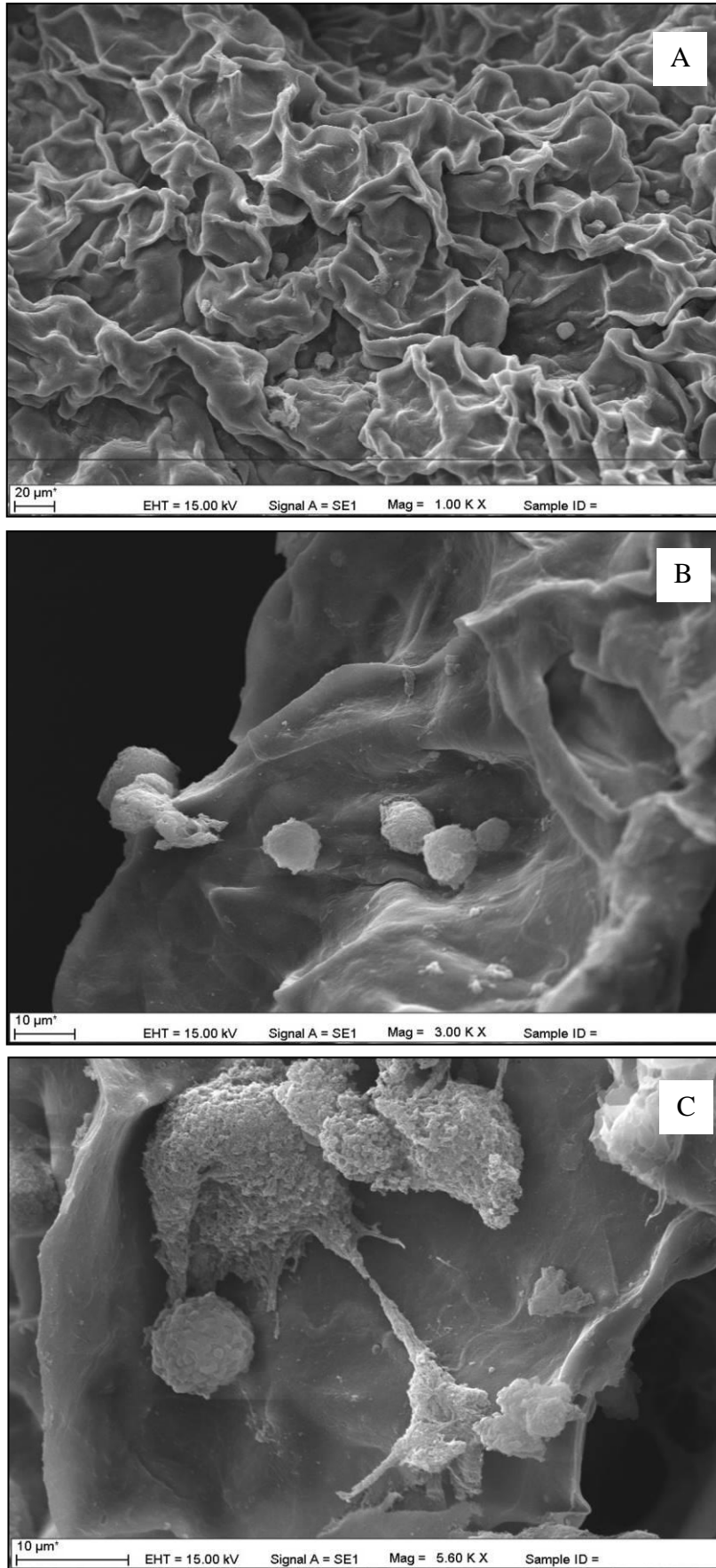
Kontrol (hücre uygulanmamış) kalp doku iskeleleri ile birlikte farklılaştırılmış işaretli hücre uygulanan aselülerize kalp doku iskelelerini içeren gruplarda, hücre uygulamasının 24 ve 48. saatlerinde hücre tutunumlarının gözlemlenebilmesi için SEM analizi yapılmıştır. Uygun şekilde fikse edilen ve hazırlanan örnekler farklı büyütmelerde incelenmiştir. Kontrol grubunda aselülerize kalp doku iskelesinin hücrelerden arınmış olduğu net bir şekilde gösterilmiştir (bkz Şekil 18). İnceleme sonucunda 24. saatte aselülerize kalp matrisine tutunan hücreler (bkz Şekil 3.19) ve 48. saat sonunda bu matrislerde yayılım gösteren hücreler görüntülenmiştir (bkz Şekil 3.20).



Şekil 3.18 Kontrol kalp doku iskelelerinin (aselülerize/hücre uygulamasız) farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri A (x1.00), B (x3.00)).



Şekil 3.19 Aselülerize kalp doku iskelelerinin hücre uygulanmasının 24. saatinde farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri A (x1.00), B (x4.00), C (x8.00).

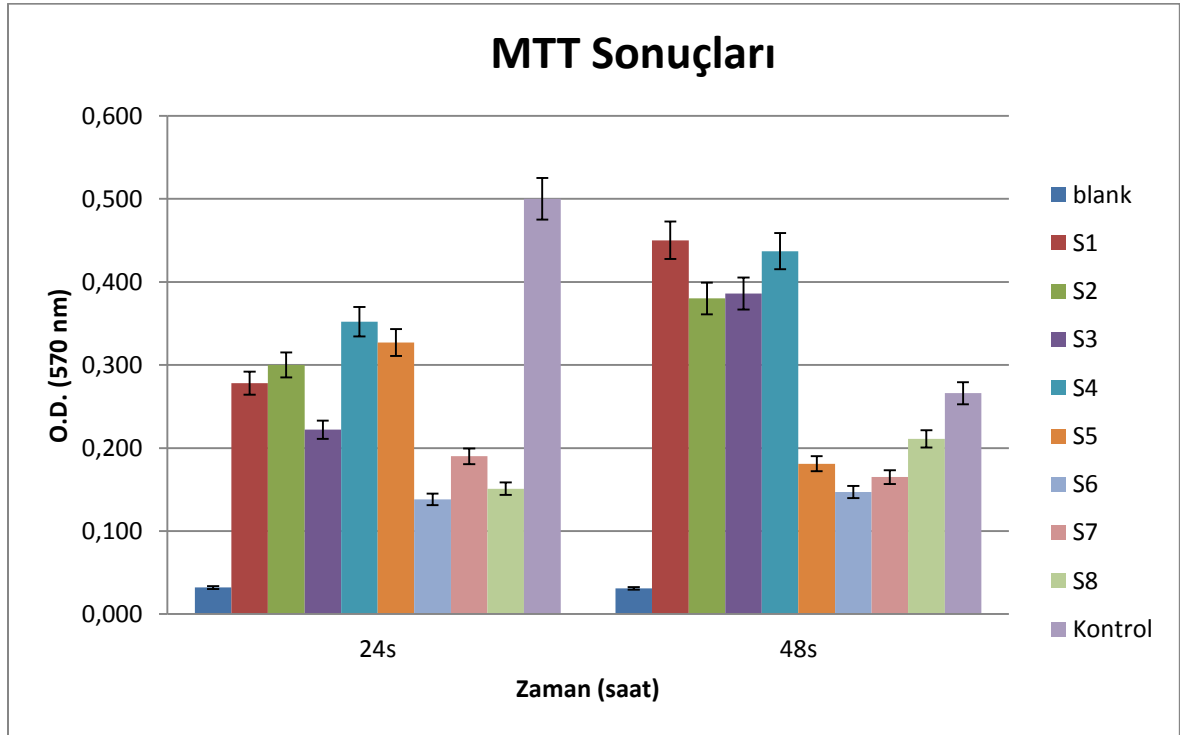


Şekil 3.20 Aselülerize kalp doku iskelelerinin hücre uygulanmasının 48. saatinde farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri A (x1.00), B (x4.00), C (x8.00).

Yapılan MTT analizi sonucunda farklı aselülerize basamaklarına (S1-S8) tabi tutulan kalp dokularından, hangi yöntem ile elde edilen kalp doku iskelesinin en iyi hücre tutunumuna sahip olduğu belirlenmiştir. 24 ve 48. saat sonuçları grafiğe döküldüğünde 1., 2., 3. ve 4. örneklerin kontrole göre ikinci günde hücre sayısının daha fazla olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Diğer örneklerde de hücre tutunumu gözlenmesine rağmen kontrol ile kıyaslandığı zaman yeterli oranda tutunum gözlenmemiştir.

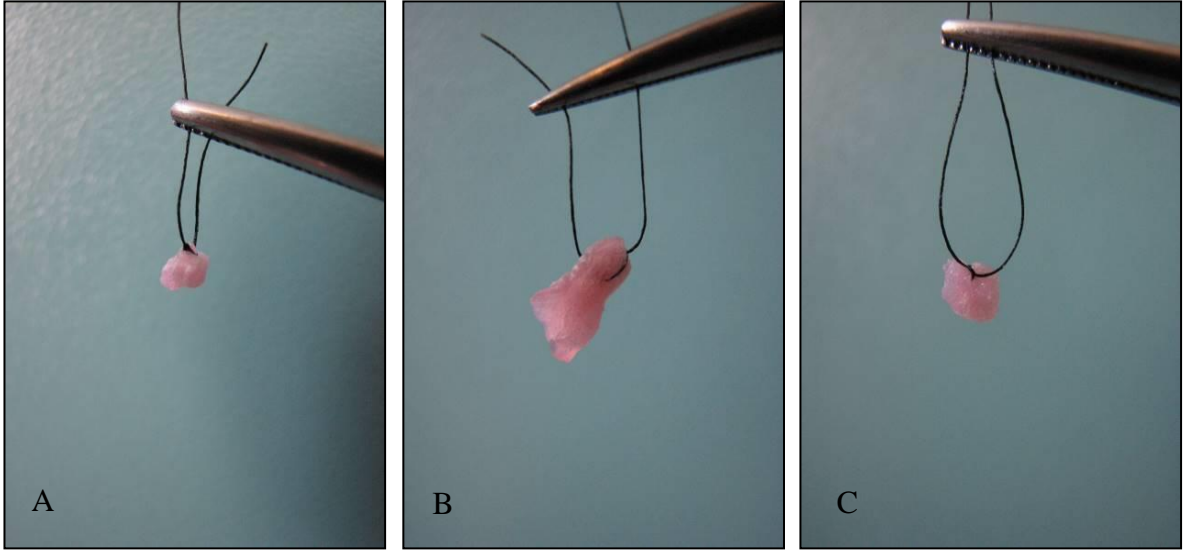
MTT analiz sonuçları, yapılan histolojik boyamalardan elde edilen sonuçlar ile birlikte değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarında aselülerizasyon yöntemlerinden dördüncü yöntemin (S4) kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 3.4 Farklı yöntemlerle elde edilen doku iskelelerinin hücre tutunumlarının farklı zamanlardaki MTT analiz sonuçları.

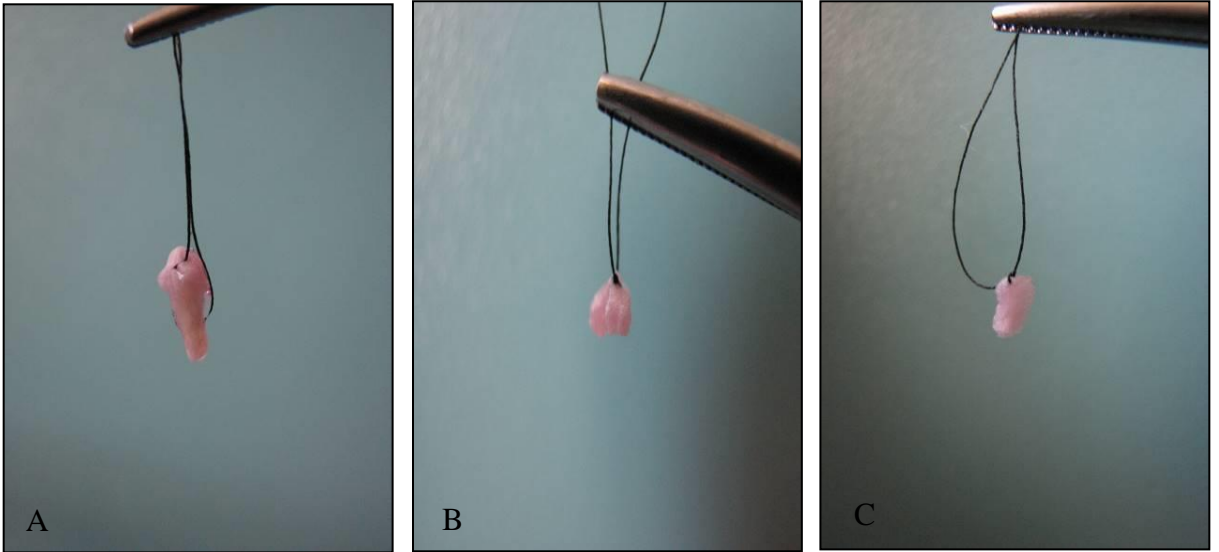


3.1.11. Perfüzyon Fiksasyonu ve Doku İncelemeleri

Çalışmada kullanılan denekler 1., 2. ve 4. haftaların sonunda kardiyak perfüzyon yolu ile kanatılarak sakrifiye edilmiştir. Opere edilen eski skar bölgeleri kullanılarak implante bölgeleri açığa çıkarılmıştır. Doku iskelelerinin implante edildikleri bölge incelenmiştir. Bölgede herhangi bir enfeksiyon bulgusuna rastlanmamıştır. Tüm gruplarda (kontrol hariç) implante matrisler etrafındaki adipoz dokudan dikkatlice temizlenerek vücut dışına alınmıştır (Şekil 3.21 ve 3.22).



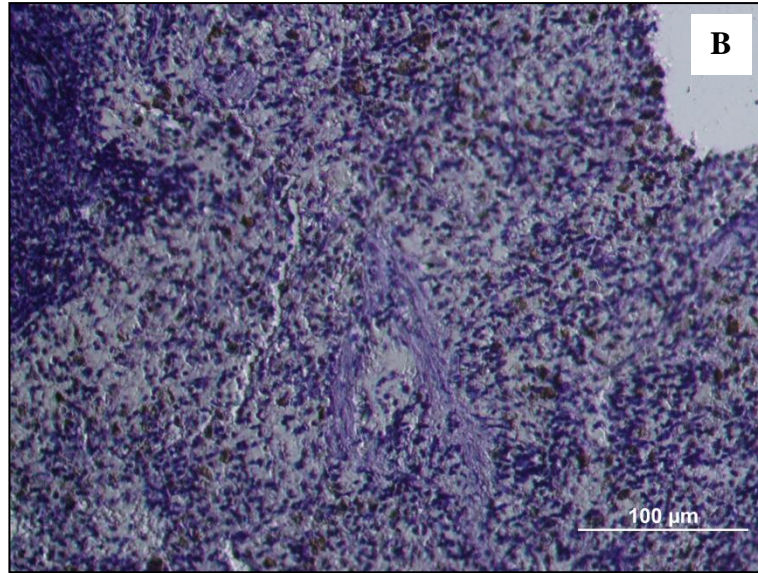
Şekil 3.21 Boş ESM grubu deneklerinden 1. hafta (A), 2. hafta (B) ve 4. hafta (C) implante doku iskelelerinin vücut dışına alınması.

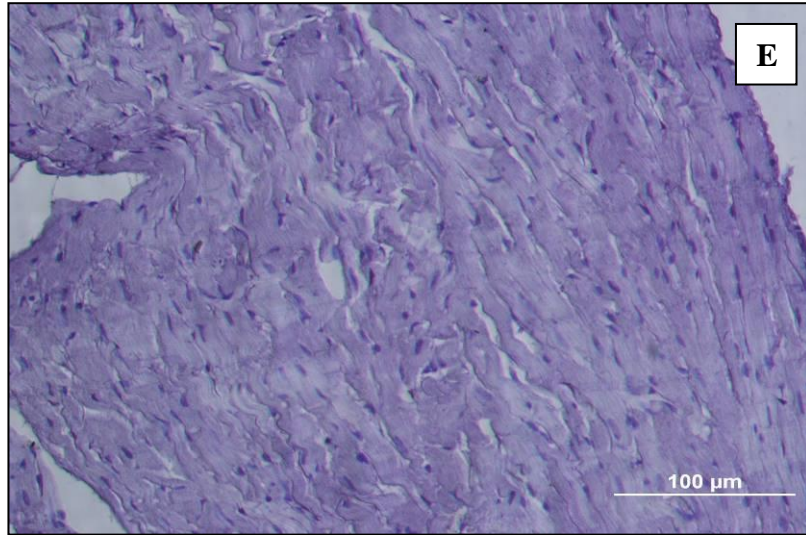
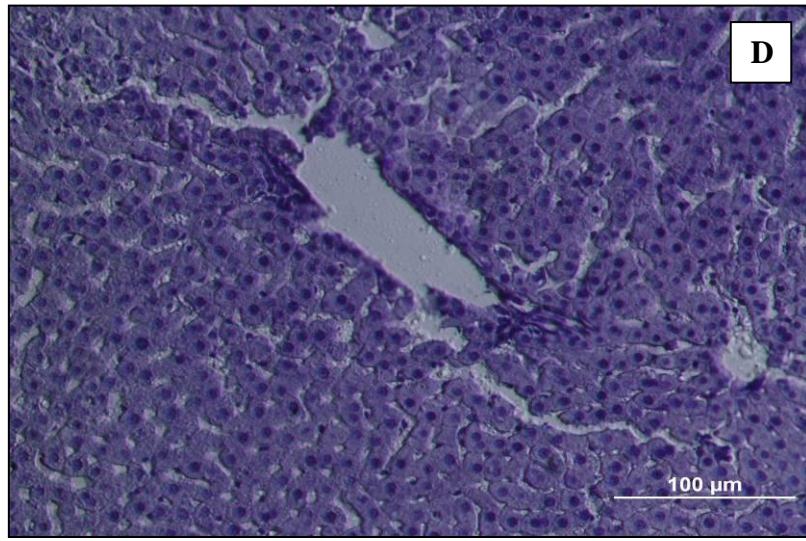
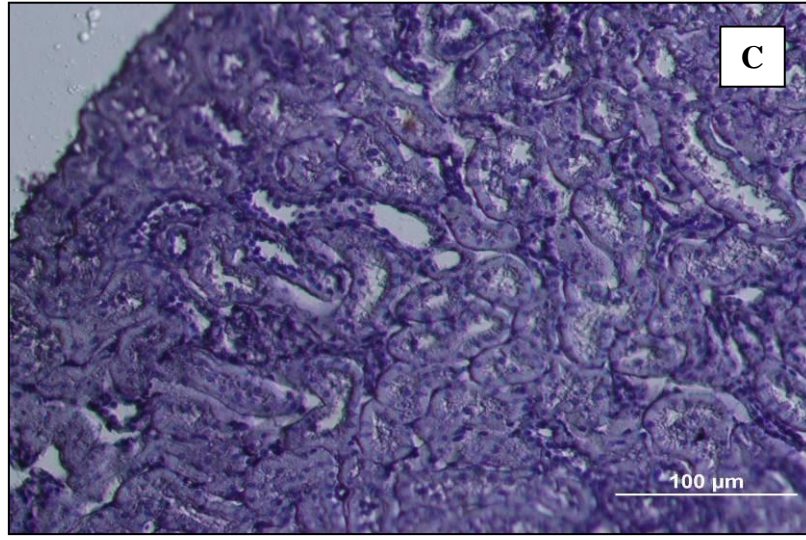


Şekil 3.22 ESM+Hücre grubu deneklerinden 1. hafta (A), 2. hafta (B) ve 4. hafta (C) implante doku iskelelerinin vücut dışına alınması.

Perfüzyon sonrasında farklı dokularda (karaciğer, dalak, kalp, abdominal aorta ve böbrek) BrdU ile işaretli farklılaşmış mezenşimal kök hücrelerin ektopik göçünün incelenmesi amacıyla hedef dokular vücut dışına alınmıştır. Dokulardaki BrdU işaretli hücrelerin tespiti için kontrol grubu dokuları ile Boş ESM ve ESM+Hücre gruplarındaki dokulardan hazırlanan preparatlar biyotinlenmiş anti-BrdU antikor ile boyanarak immünohistolojik olarak incelenmiştir.

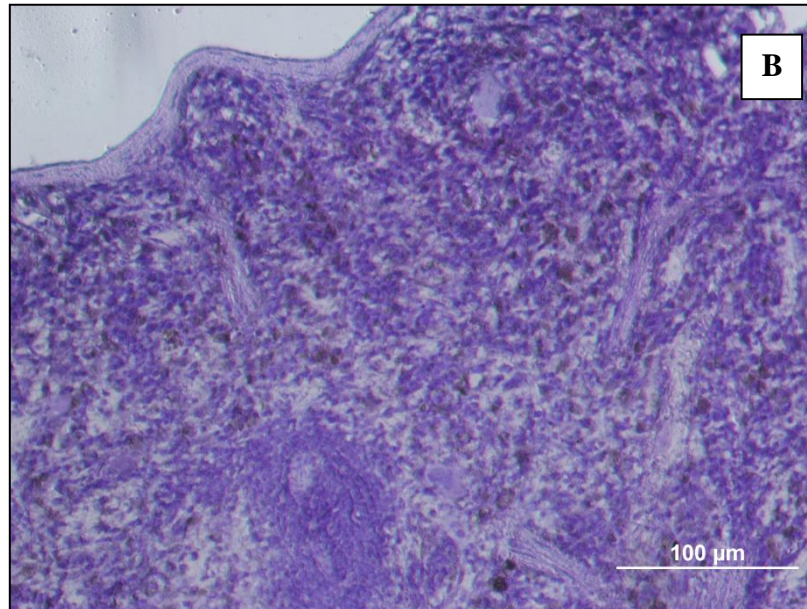
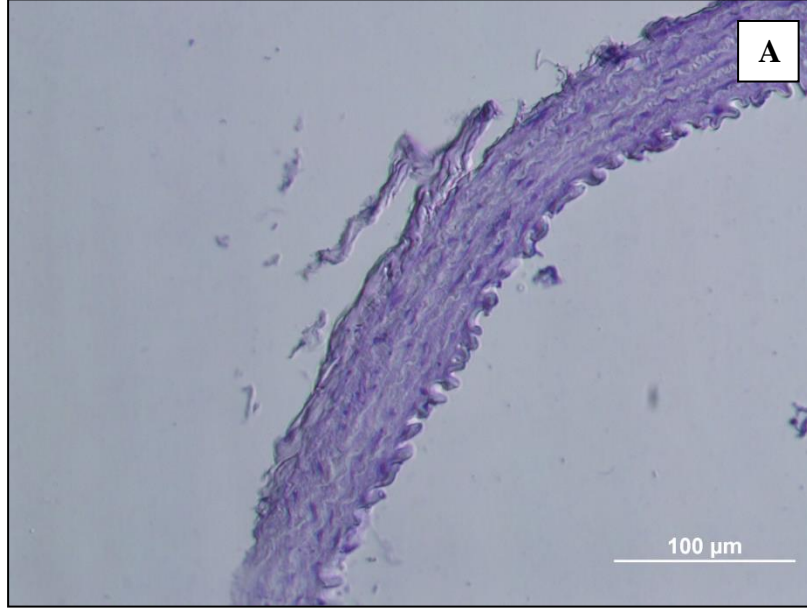
Kontrol grubundan alınan dokuların (abdominal aorta, dalak, böbrek, karaciğer ve kalp) anti-BrdU ile immünohistolojik boyanma görüntüleri Şekil 3.23' te verilmiştir.

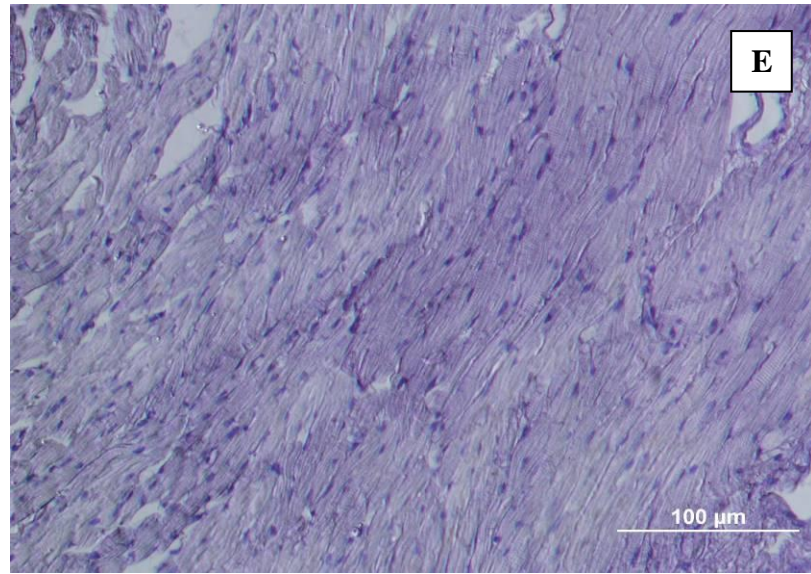
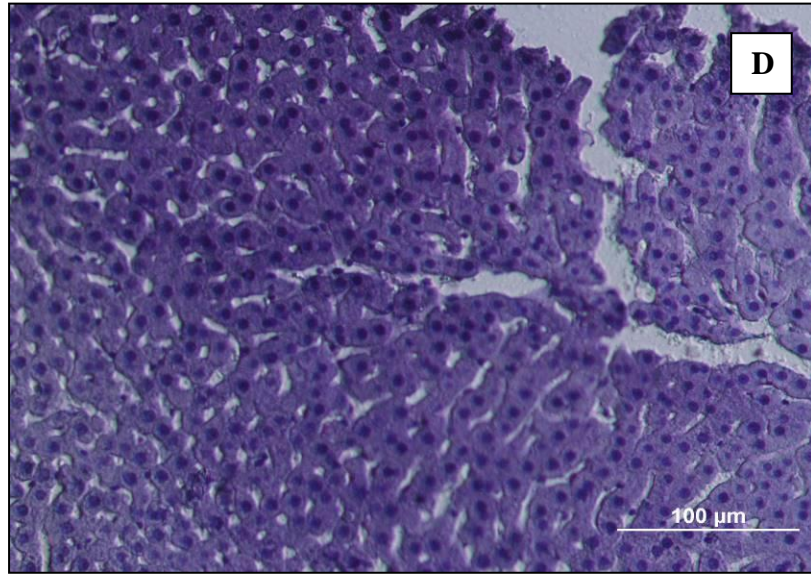
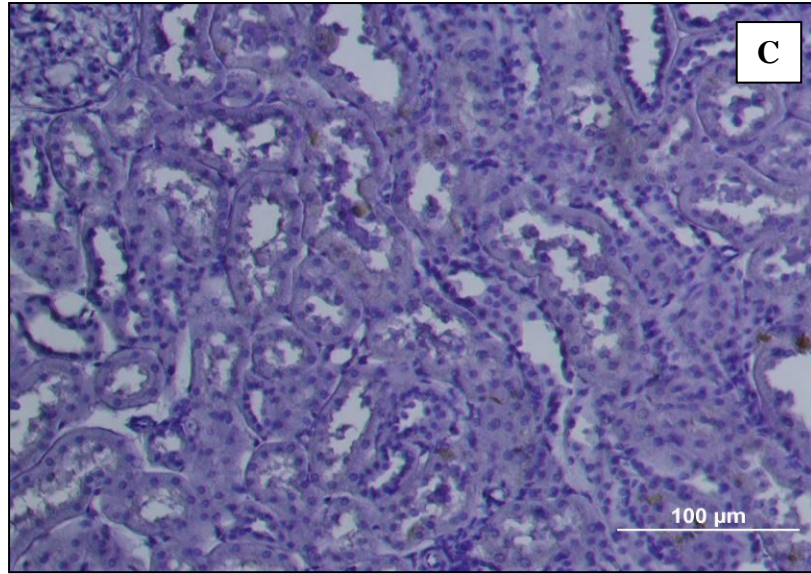




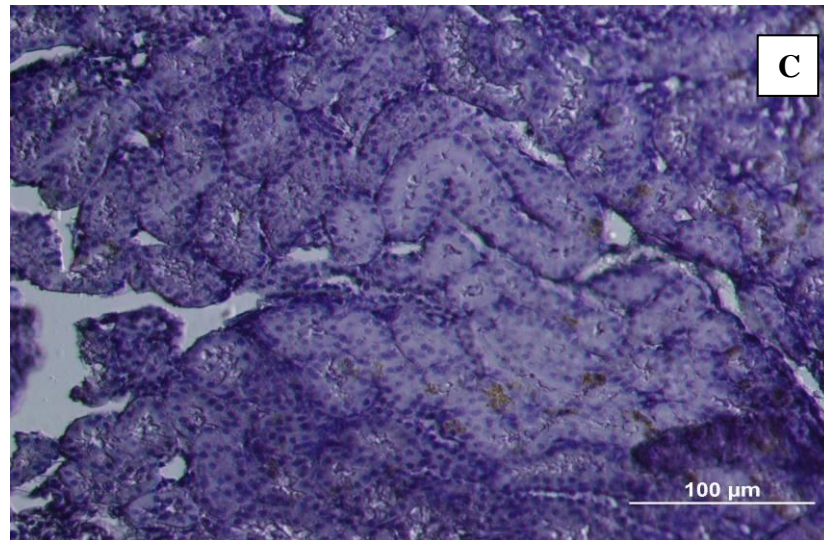
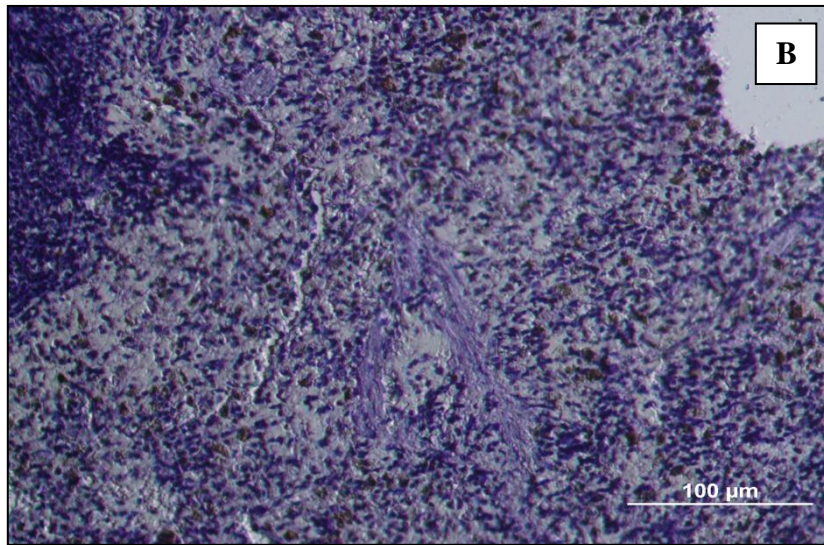
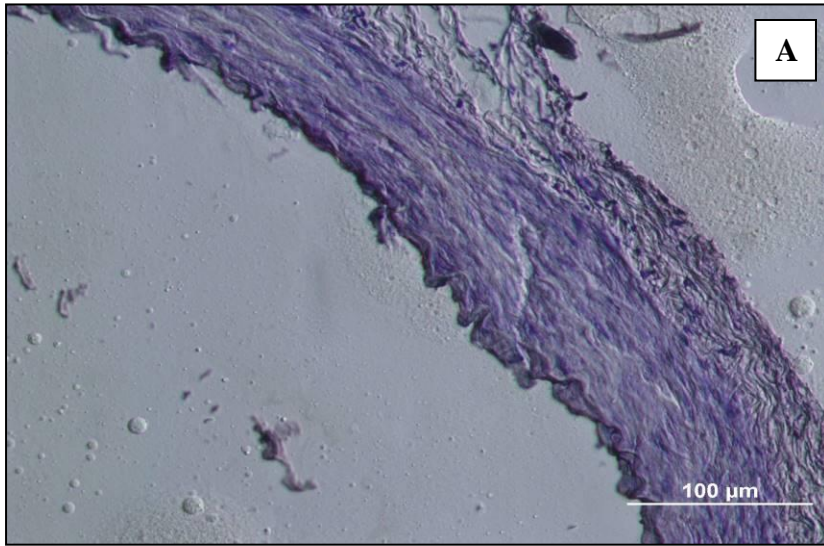
Şekil 3.23 Kontrol grubu deneklerinden alınan farklı dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).

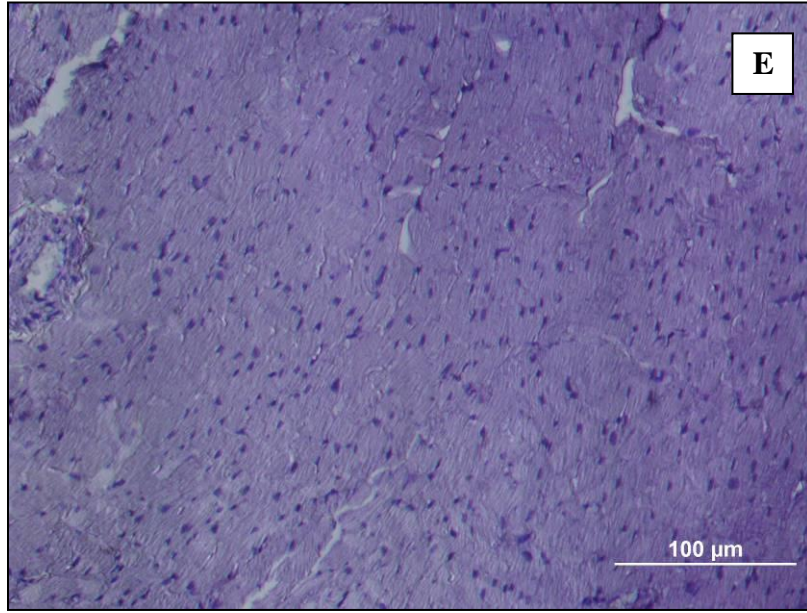
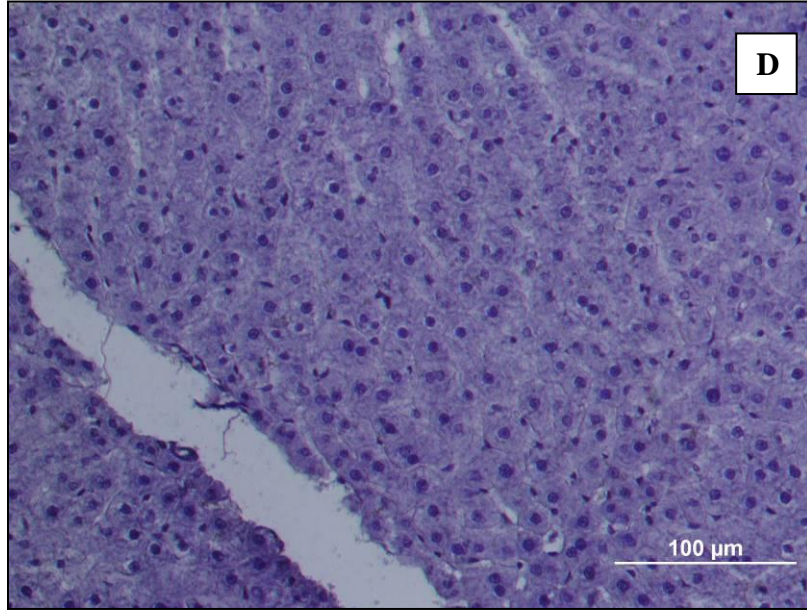
Boş ESM grubu deneklerinin farklı zaman periyotlarındaki (1., 2. ve 4. hafta) doku incelemelerinin anti-BrdU immünohistolojik preparat görüntüleri sırasıyla Şekil 3.24, 3.25 ve 3.26' da verilmiştir. Boş ESM grubunun 1., 2. ve 4. hafta doku kesitlerinde genel doku organizasyonlarının kontrol grubu kesitleri ile karşılaştırıldığında normal doku genel yapıları ile uyumlu (fizyolojik ve sitolojik) oldukları gözlenmiştir. Taranan tüm doku kesitlerinde herhangi işaretli hücre tespiti olmamıştır.



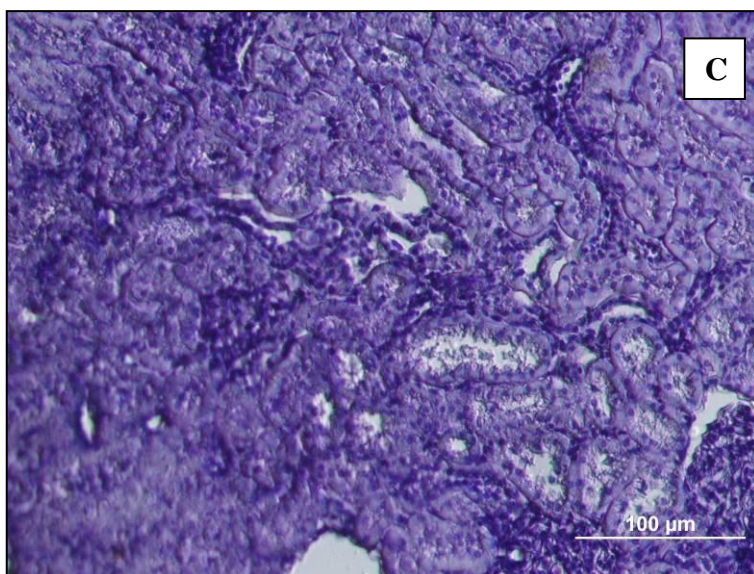
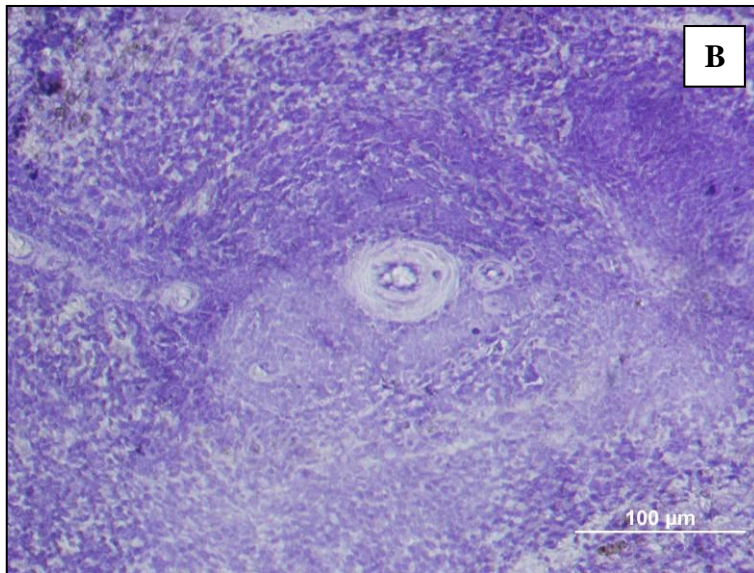
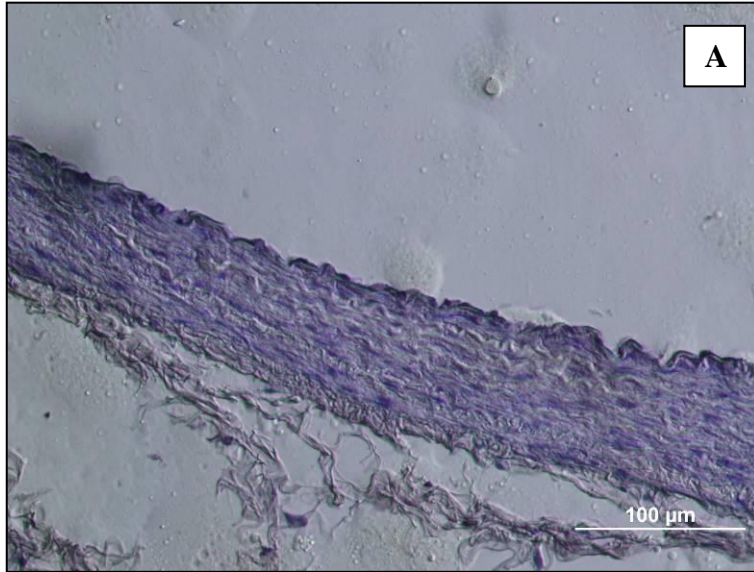


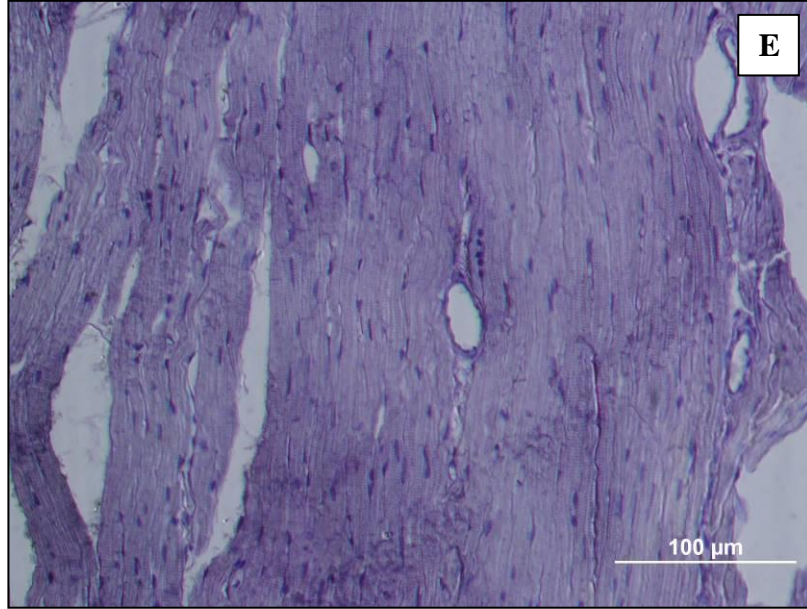
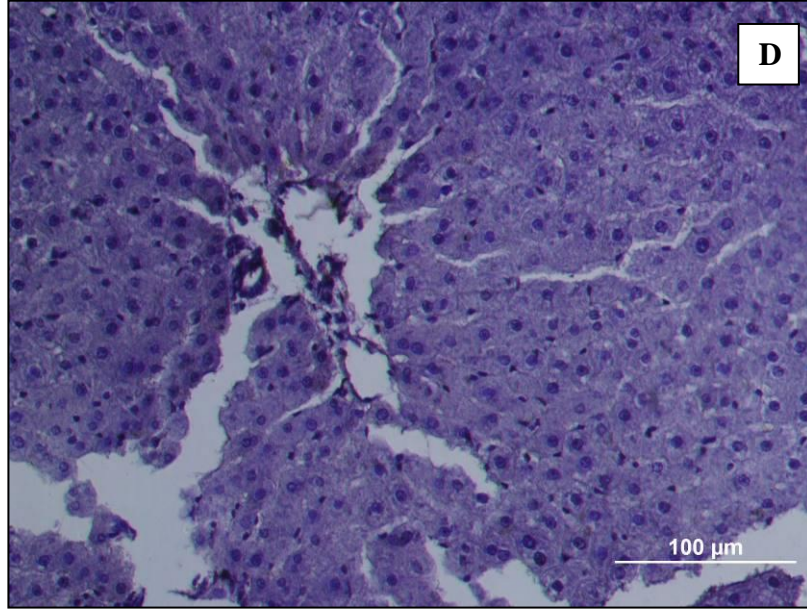
Şekil 3.24 Boş ESM 1.hafta deneklerinden alınan dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).





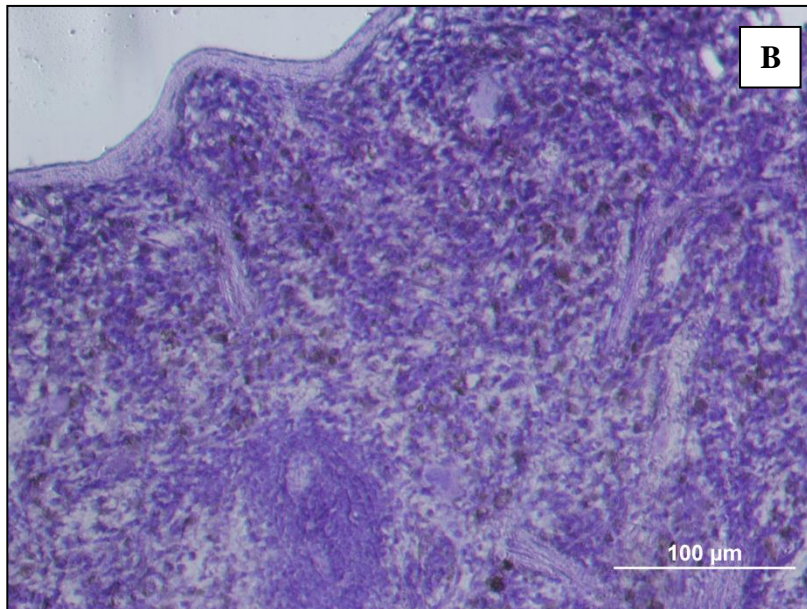
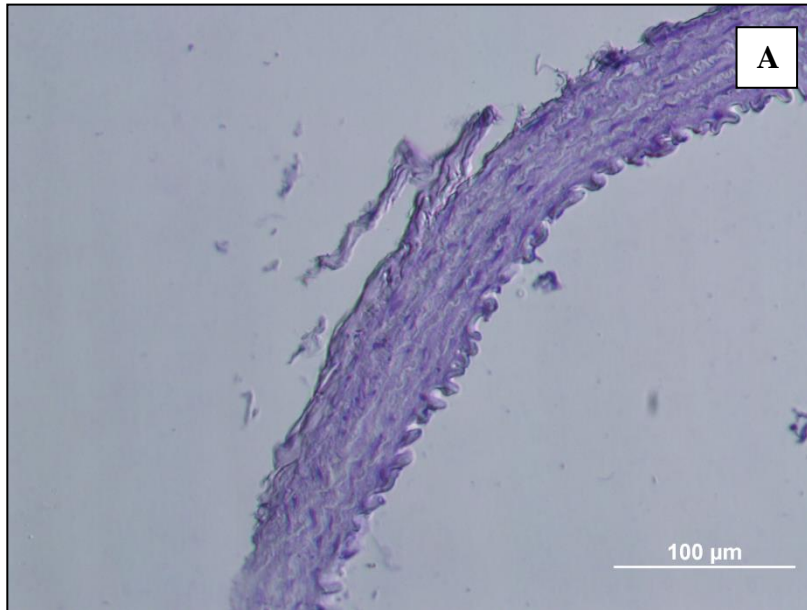
Şekil 3.25 Boş ESM 2.hafta deneklerinden alınan dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).

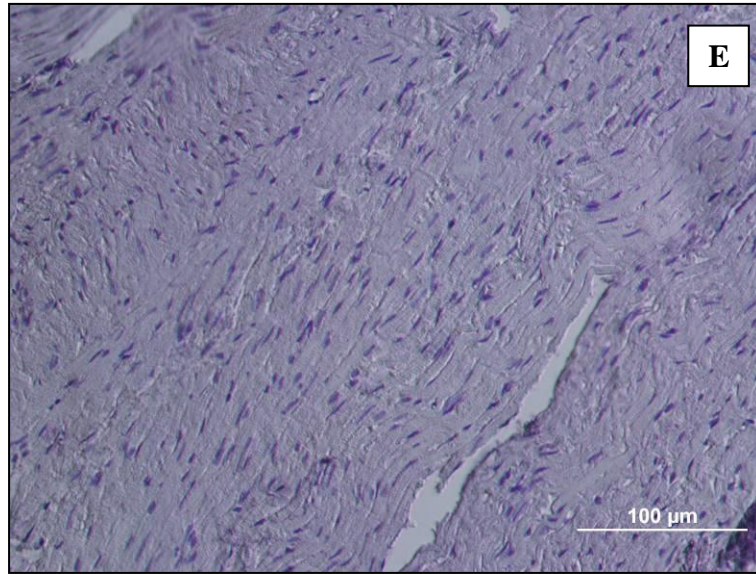
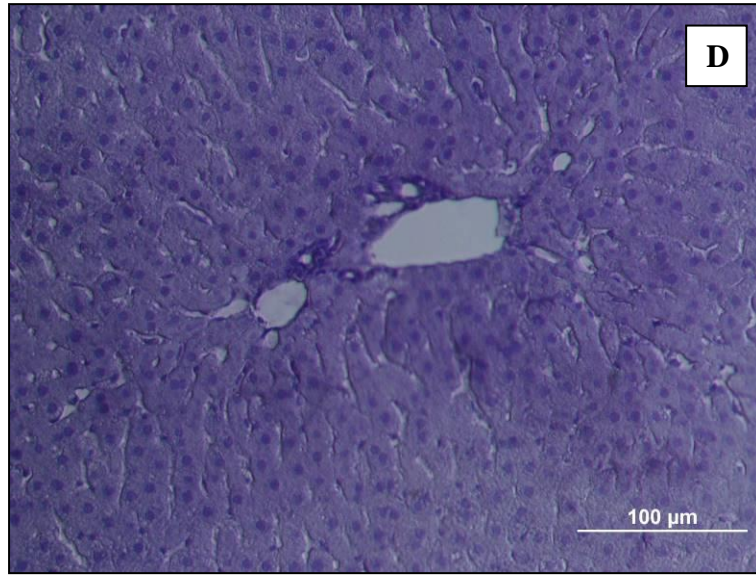
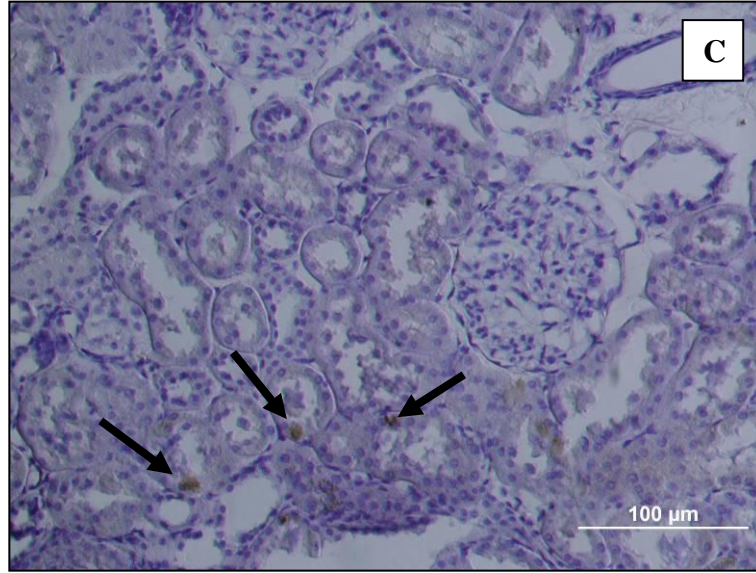




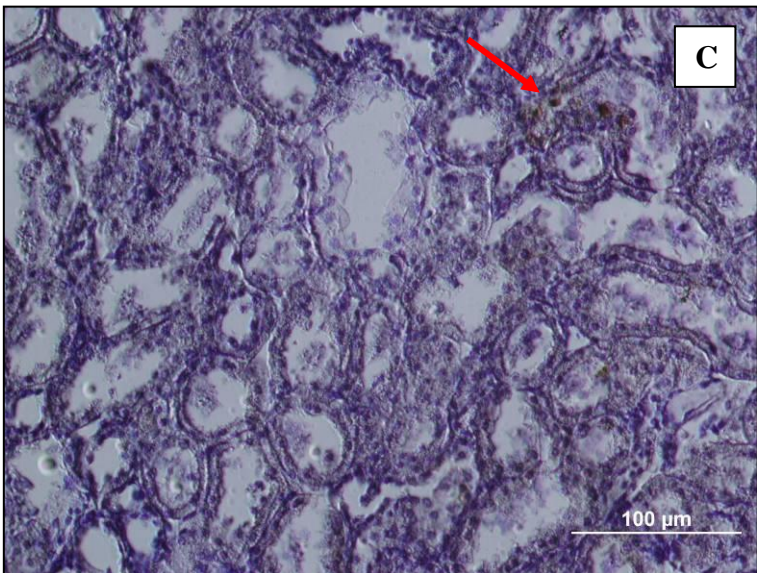
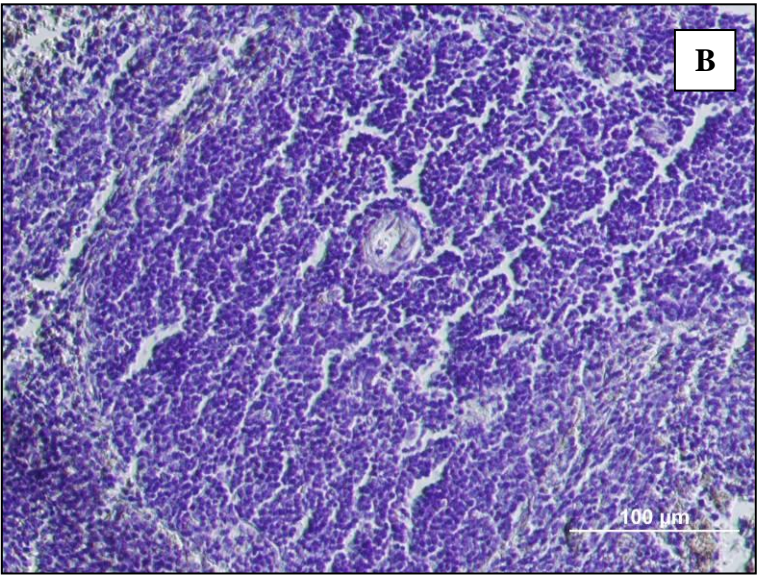
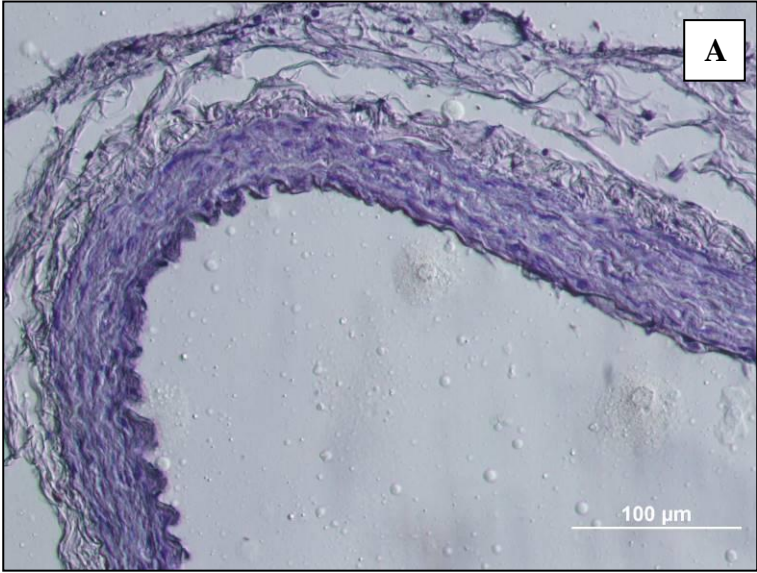
Şekil 3.26 Boş ESM 4.hafta deneklerinden alınan dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).

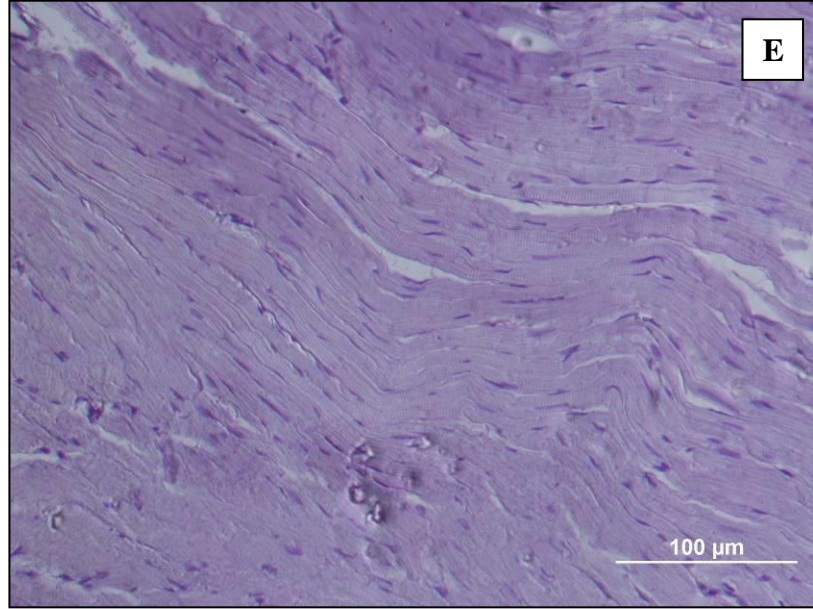
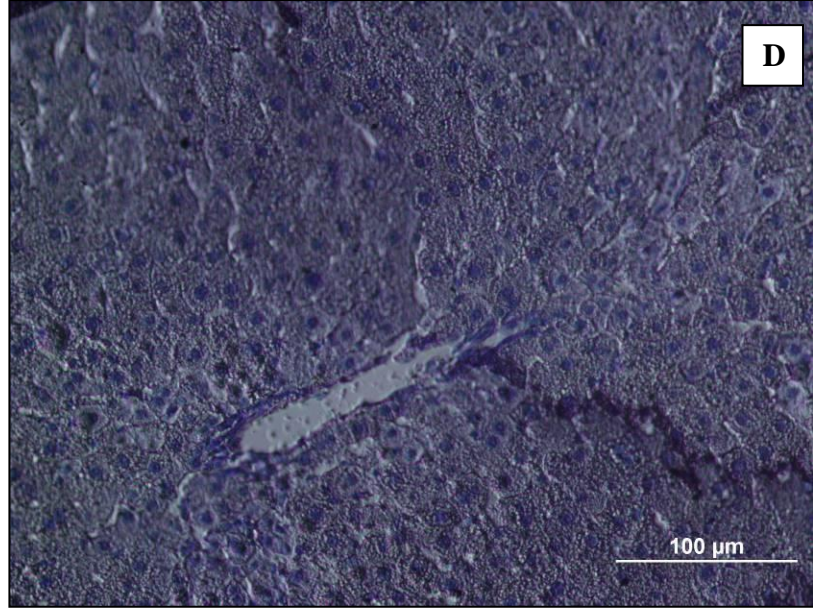
ESM+Hücre grubu deneklerinin farklı zaman periyotlarındaki doku incelemelerinin anti-BrdU immünohistolojik preparat görüntüleri Şekil 3.27, 3.28 ve 3.29' da verilmiştir. ESM+Hücre grubunun 1., 2. ve 4. hafta doku kesitlerinde genel doku organizasyonlarının kontrol grubu kesitleri ile karşılaştırıldığında normal doku genel yapıları ile uyumlu (fizyolojik ve sitolojik) oldukları gözlenmiştir. İmplantasyonu takip eden 1. hafta deneklerinden elde edilen dokulardan böbrek toplama kanallarında bazı hücrelerde BrdU pozitif boyanması gözlenmiştir (Şekil 3.27 C). Aynı şekilde 2. hafta doku örneklerinden böbrek toplama kanallarında BrdU boyanması için pozitif olan hücreler tespit edilmiştir (Şekil 3.28 C). Ancak 1. ve 2. haftada böbrek dokusu hariç kalan doku örnekleri ile 4. hafta doku örneklerinde herhangi işaretli hücre gözlenmemiştir.



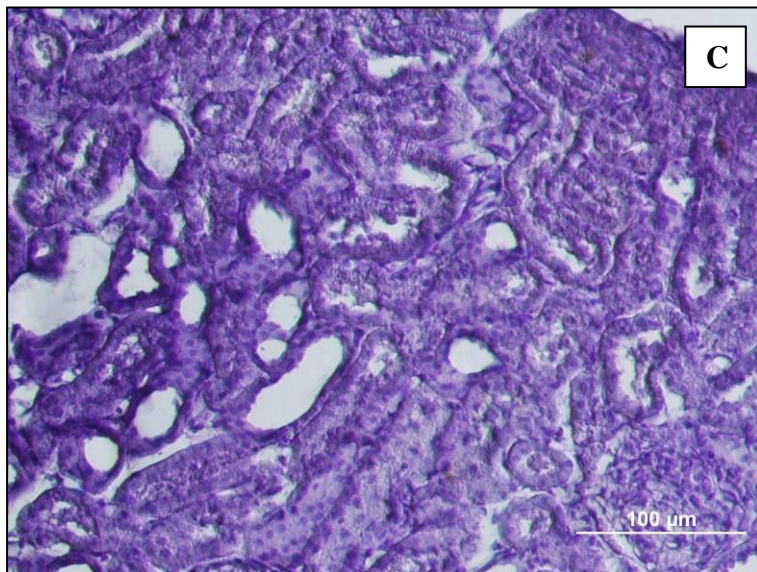
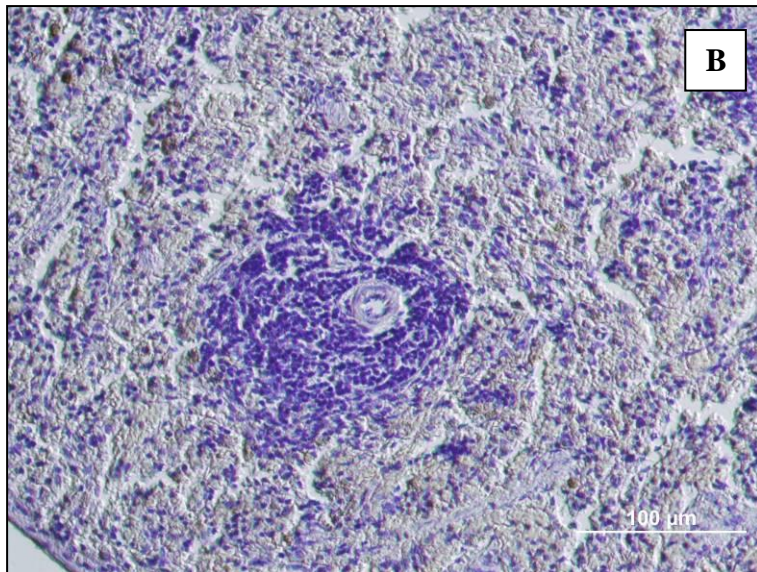
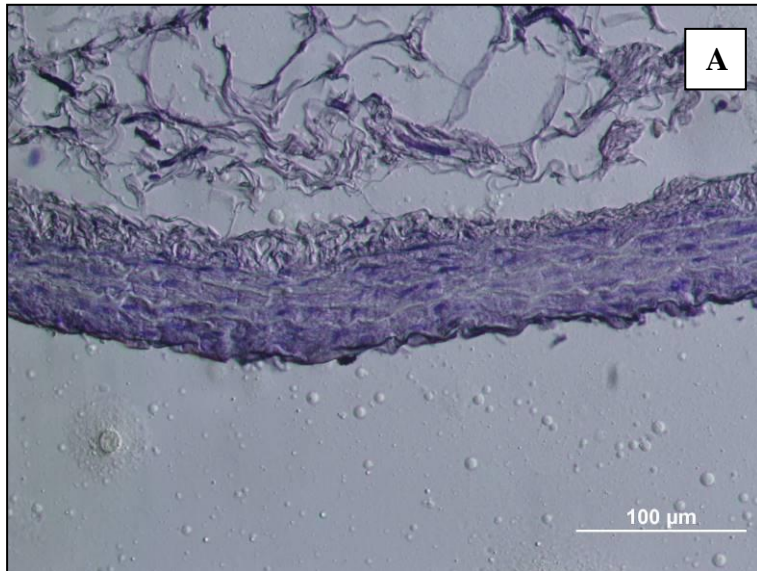


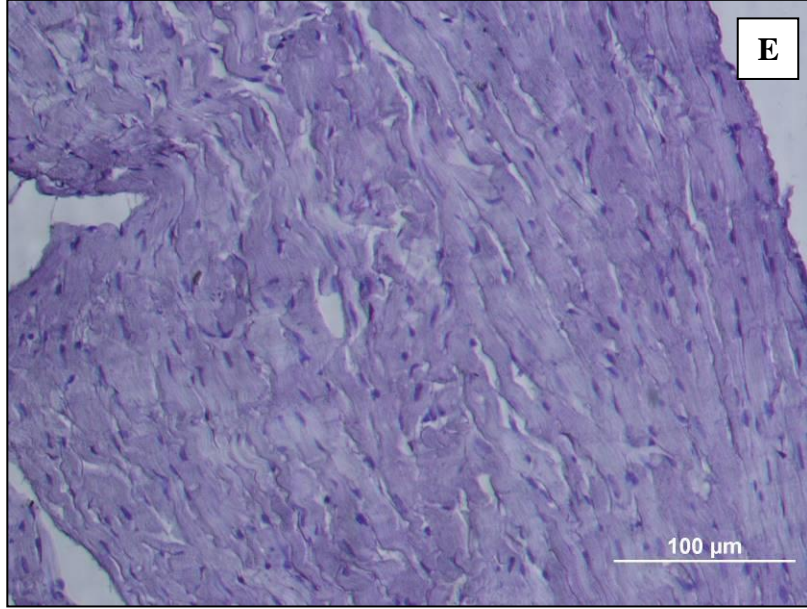
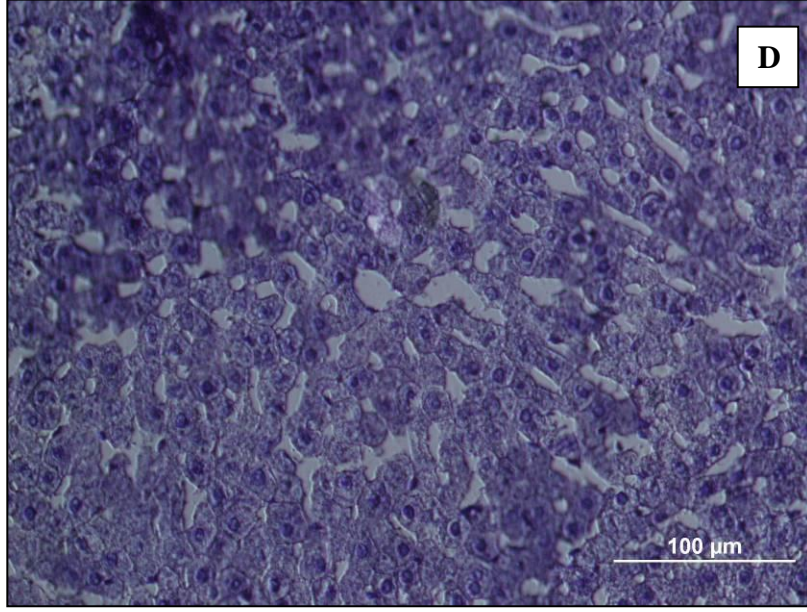
Şekil 3.27 ESM+Hücre 1.hafta deneklerinden alınan dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).





Şekil 3.28 ESM+Hücre 2.hafta deneklerinden alınan dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).





Şekil 3.29 ESM+Hücre 4.hafta deneklerinden alınan dokuların anti-BrdU ile boyanması (A) Abdominal aorta, (B) Dalak, (C) Böbrek, (D) Karaciğer ve (E) Kalp (x200).

3.1.12. RT-PCR

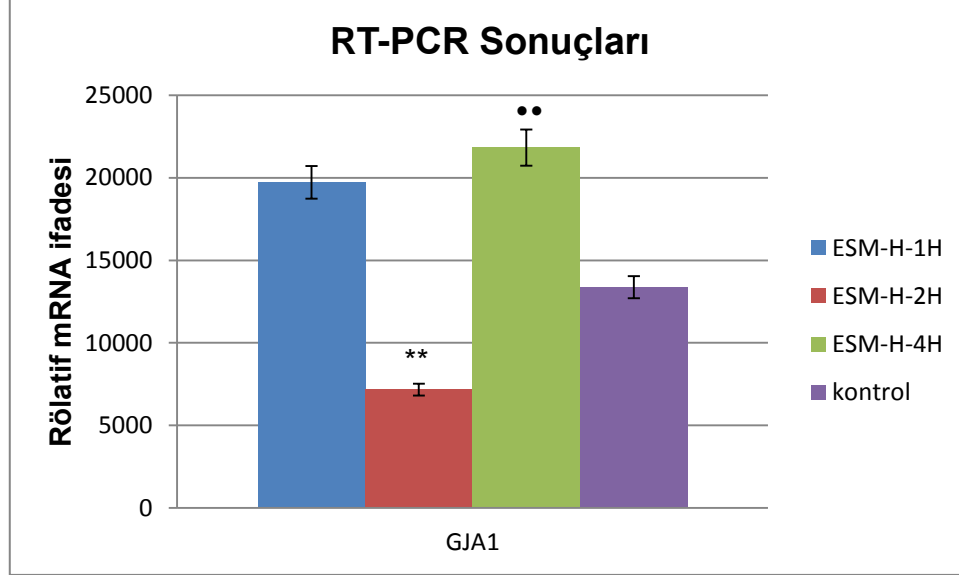
Deney gruplarından ESM+Hücre grubu deneklerinden farklı zaman dilimlerinde sakrifikasyon sonucunda elde edilen implante matriks+hücre kompozitlerinden ve *in vitro* ortamda aynı süre boyunca farklılaştırılmış hücre ile inkübe edilen kontrol matrikslerinden elde edilen total RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları Çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3.5 ESM+Hücre grubu deneklerinden farklı zamanlarda explante edilen hücre uygulamalı aselülerize matriksler ve kontrol matriksinden elde edilen total RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları.

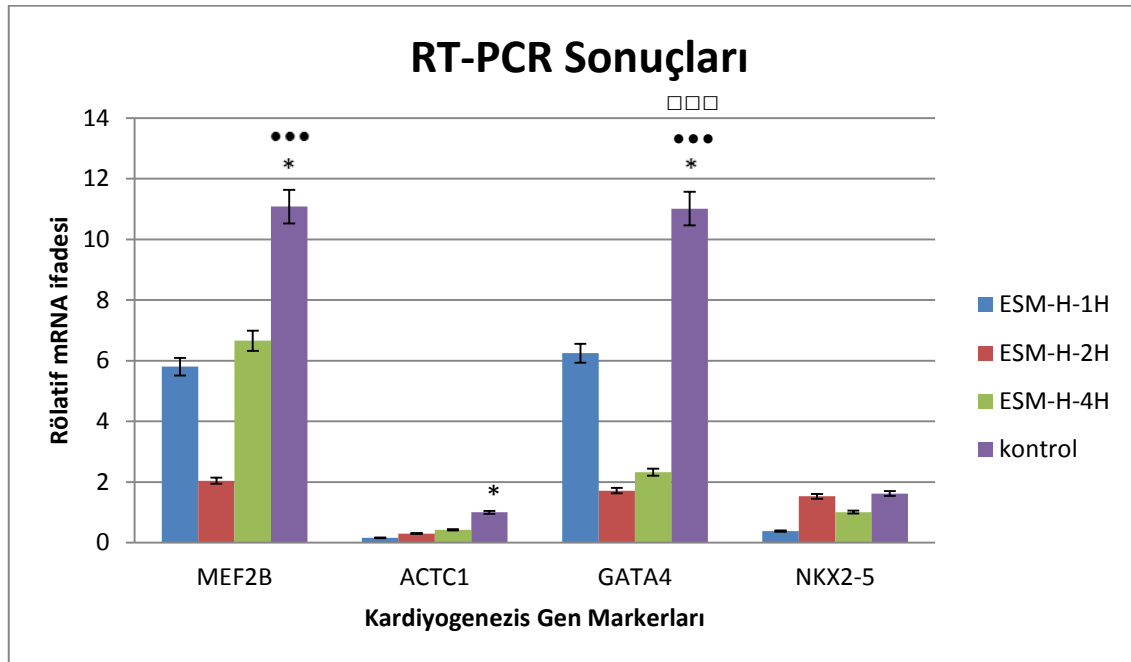
Örnek	Total RNA miktarı (ng/ul)
Kontrol Matriks	117.5
ESM+Hücre-1H	257.7
ESM+Hücre-2H	429.8
ESM+Hücre-4H	321.8

ESM+Hücre matriks örnekleri için yapılan RT-PCR analizi sonucunda elde edilen veriler $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct) methodu kullanılarak değerlendirilmiştir. İç kontrol geni olan HPRT-1, kullanılan metod sonucunda elde edilen verilerin normalizasyonu için kullanılmıştır. Normalizasyon sonucunda elde edilen veriler ile genlerin rölatif ifade profilleri karşılaştırılmıştır. Hesaplama sonuçlarına ait ESM+Hücre örneklerinin kontrol ile karşılaştırma grafikleri Çizelge 3.6 ve 3.7' de verilmiştir.

Çizelge 3.6 Kontrol matris ile ESM+Hücre örneklerinden elde edilen implante matrislerin HPRT-1'e göre normalize edilmiş rölatif GJA-1 ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n:6, ESM-Hücre-1H için **: $p < 0.01$, ESM-Hücre-2H için **: $p < 0.01$).



Çizelge 3.7 Kontrol matris ile ESM+Hücre örneklerinden elde edilen implante matrislerin HPRT-1'e göre normalize edilmiş rölatif MEF2B, ACTC-1, GATA-4 ve NKx2,5 ifadeleri. (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n:6, ESM-Hücre-1H için *: $p < 0.05$, ESM-Hücre-2H için **: $p < 0.001$, ESM-Hücre-4H için □□□: $p < 0.001$).



Çizelge 3.6' da GJA1 geninin ifadesinin ESM-Hücre-1H için ESM-Hücre-2H ile aralarında anlamlı bir farklılık gözlenirken, diğer gruplar ile fark bulunmamıştır. ESM-Hücre-2H için ESM-Hücre-4H ile aralarında anlamlı bir farklılık gözlenirken, diğer gruplar ile fark bulunmamıştır.

Çizelge 3.7'de genlerin ifade grafikleri incelendiğinde; Nkx2,5 geninin hücre farklılaştırılmasının analizinde ifadesi yok iken (bkz Çizelge 3.3), implante ve kontrol matriksleri üzerinde tutunan farklılaşmış hücrelerde ifade edildiği gözlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak Nkx2,5 gen ifadesinin gruplar içerisinde anlamlı bir farklılığı bulunmamıştır. Çizelge 3.7'deki incelenen diğer genlerden MEF2B için ESM-Hücre-1H ($p<0.05$) ve ESM-Hücre-2H ($p<0.001$) için kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. Aynı şekilde GATA-4 gen ifadesi için tüm deney gruplarının kontrole göre yüksek değerde anlamlı farklılığının olduğu gösterilmiştir. ACTC-1 geni için sadece ESM-Hücre-1H grubunun kontrole göre anlamlı bir farklılığı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre aselülerize kalp doku iskeleleri üzerine uygulanan farklılaştırılmış hücrelerin, uygulama sonrasında implantasyonu takip eden sürede kardiyomiyosite farklılaşma potansiyellerinin zaman içerisinde gen düzeyinde arttığı gösterilmiştir. Doku iskelesi üzerinde tutunan hücrelerin birbiri ile olan etkileşimlerinin önemli derecede arttığı ve daha uzun implantasyon sürelerinde bu gen ifadelerinin artma ihtimalinin olduğu anlaşılmıştır.

3.2. Tartışma

Kardiyovasküler hastalıklar güncel tedavi yöntemlerinin sınırlı olması nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite oranları ile tüm dünyada ölümlerin önde gelen nedenidir. Tüm ölümlerin %30'unun kalp ve damar hastalıkları sebebiyle olduğu ve buna bağlı olarak da tüm ülkeleri sosyal ve ekonomik yönden ciddi anlamda etkilediği söylenmektedir. Bu ölümlerin büyük çoğunluğuna kalp krizi, diğer kısmının ise geri kalan kalp ve damar hastalıklarının sebep olduğu bilinmektedir [101],[102].

Günümüzde tedavisi hala tam olarak çözüme ulaşamamış hastalıkların ölümcül olmalarının en büyük nedeni bazı hücre, doku ve organların geri dönüşümsüz hasarlanmasıdır. Genel olarak en yaygın tedavi yöntemi donör organ transplantasyonu iken bu yöntem ne yazık ki donör sayısındaki sorun yüzünden geçerli bir çözüm yolu olamamaktadır. Bu tür geri dönüşümsüz hasarlı hastalıklarda bir diğer yaklaşım ise hasar gören hücre, doku veya organın biyolojik işlevini yeniden kazandırmak amacıyla hedef doku ya da organa yetecek sayıda ve kalitede hücrelerin bir yolla nakledilmesidir. Bu yöntemde hasarlı ya da işlevsiz doku bölgesinin yenilenmesini ve tekrardan işlevselliğini kazanmasını sağlamak üzere yaklaşık 20 yıldır kardiyak hücre tedavi yaklaşımı ya da kardiyak hücre implantasyonu adı verilen rejeneratif tedaviler üzerine çalışılmaktadır [103],[104].

Rejeneratif tedavide hedeflenen, hasarlı alanda işlevini kaybeden hücrelerin yerini alacak kardiyak hücrelerin hedef dokunun yapısını koruyarak, fonksiyonunu düzeltmesini sağlamasıdır.

Kök hücreler bu amaca en uygun olan kaynaklar arasındadır. Son 10 yılda rejeneratif tıpta kök hücre üzerine yapılan çalışmalar giderek artmıştır. Kök hücreler, işlevsel olarak farklılaşmamış, potansiyel olarak heterojen bir topluluktur. Proliferasyon güçleri kuvvetli olup farklı hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir. Bu nedenle organ rejenerasyonu için potansiyel tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalara bakıldığında, hangi kök hücre kaynağının seçilmesi gerektiği, seçilen hücrenin hangi yolla farklılaştırılacağı, hangi yöntem ile vücuda verilmesi gerektiği, hasarın hangi aşamasında (patolojisinde) uygulanması gerektiği, hedef organa ulaşım ulaşamadığının takibi ve hedef organdaki diğer hücreler ile olan iletişimi, hedef

organda istenilen şekilde yerleşmesi durumunda hasarlı bölgede fonksiyonel katkısının nasıl ve ne kadar olacağı hala tartışma konuları arasındadır [105],[106]. Yapılan deneylerde farklı kök hücre grupları hayvan ve klinik çalışmalarında test edilmiştir. Deneyler sonucunda neo-vaskülarizasyon, kardiyak onarım veya kardiyak rejenerasyon için embriyonik ve erişkin kök hücrelerin kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Embriyonik kök hücrelerin etik tartışmasının olması, tümör gelişimine neden olabilme ve ektopik farklılaşma potansiyelleri ile immünojenik etkilerinin olması günümüzde klinik çalışmalarda neden tercih edilemediklerini kısaca izah etmektedir [12], [34], [107]. Erişkin kök hücrelerden mezenşimal kök hücrelerin (MKH) kardiyomiyosit fenotipi göstererek kontraktıl disfonksiyonu azalttığı ve farklı hayvan grupları ile yapılan çalışmalarda miyokardiyal enfarktüsünde ters yeniden yapılanmayı (remodeling) önlediği gösterilmiştir [108]. MKH'ler vücutta farklı dokulardan (kemik iliği, göz, adipoz doku) elde edilebilen, *in vitro* ortamda kolayca proliferen olan ve sağlıklı bir şekilde hayatlarını sürdürebilen hücrelerdir. Günümüzde adipoz dokudan izole edilen MKH'ler üzerine birçok çalışma bulunmaktadır [109]. Adipoz dokusundan elde edilen kök hücre ve progenitor hücre gruplarının kardiyak hasar onarımında ve yeniden damarlanmada çok güçlü hücre kaynağı olduğu birçok çalışma tarafından bildirilmiştir. Bu hücrelerin pre-anjiojenik büyüme faktörleri ile birlikte bazı sitokinleri salgılayarak miyokardiyal iyileşmeye destek oldukları çalışmalarda bildirilmiştir [110], [111]. Aynı zamanda immünojenitesinin olmaması nedeniyle allojenik kullanıma olanak sağladığı çalışmalarda gösterilmiştir. Adipoz dokusunun az invaziv bir yolla elde edilmesi ve çok miktarda bulunması otolog olarak da kullanımını son derece avantajlı hale getirmektedir. Bu şekilde otolog hücre tedavisinde pratik, verimli ve kolay elde edilebilirliği avantaj olarak görülmektedir [112], [113]. Klinik kullanım açısından adipoz hücrelerinin kullanımı üzerine çalışmalar devam etmekte ve izolasyonu için yeni teknikler geliştirilmektedir [114].

Çalışmamızda da geliştirilen yeni, pratik bir teknik ile enzimatik herhangi bir uygulama olmadan adipoz dokudan mezenşimal kök hücreler izole edilmiştir. İzole edilen mezenşimal kök hücreler akış sitometrisi ile karakterize edilmiştir. CD54, CD90, CD29, MHC sınıf I için pozitif, CD45, CD34, CD106, ve MHC sınıf II antikoları için negatif olarak fenotipik karakterizasyon sonuçları alınmıştır.

Kardiyak rejenerasyonunda tedavi için seçilen hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştırılarak kullanımı günümüzde tercih edilmektedir. Son çalışmalardan

birinde hasarlı kalp kasına transplante edilen farklılaşmamış mezenşimal kök hücrelerin bir kısmının fibrotik skar oluşumuna neden oldukları ve böylece miyokardiyal rejenerasyonda istenmeyen bir durumla karşı karşıya kalılabileceğine işaret edilmiştir [35]. Bu nedenle literatürde mezenşimal kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştırılmasında çok çeşitli faktörlerin kullanımından söz edilmektedir. Bu amaçla sitokinler, büyüme faktörleri, sentetik kimyasallar, serbest radikaller, reaktif oksijen türleri, serumsuz kültür ortamları, ekstraselüler matriksler, elektriksel ve mekaniksel stimülasyon kullanılan teknikler arasındadır. Bunlardan sentetik kimyasallardan 5-Aza üzerine birçok çalışma bulunmaktadır [32].

5-Aza; *in vitro* ve *in vivo* ortamda yeni gen ekspresyonunu aktive ederek hücre fenotipinin değişebilmesini sağlayan sitozin analogudur [115]. Yapılan bir çalışmada kültür ortamında 5-aza uygulamasının kardiyomiyosit farklılaşmasını %30 indüklediği gösterilmiştir [116]. Aynı zamanda başka bir çalışmada 5-Aza'nın 24 saatlik uygulamasının hücrelerde sarkomerik alfa aktinin ifade edildiği miyosit benzeri hücrelere farklılaştığı belirtilmiştir [117]. Uygulanacak 5-Aza konsantrasyonu da farklılaşma potansiyelini ve bu kimyasalın sitotoksikite etkisini önemli bir şekilde belirlemektedir. Tomita ve ark. [116] yaptıkları çalışmada 10µM 5-Aza 24 saat uygulamasının optimal konsantrasyon olduğu gösterilmiştir. Belirtilen konsantrasyon ve uygulama süresinde MKH'lerin kardiyomiyosit benzeri karakteristik özellik gösteren miyojenik hücrelere farklılaştığı belirtilmiştir. Aynı araştırmacıların yaptığı çalışmada 5-Aza ile farklılaştırılan MKH'lerin farklılaştırılmamış hücrelere göre uygulama alanında kontraktıl fonksiyonlarının daha fazla olduğu ve alıcı dokusunda kardiyomiyositler ile kontakt kurarak senkronize atıma eşlik ettikleri gösterilmiştir [118], [119]. Çalışma kapsamında da yukarıda açıklanan nedenlerin elde edilen konsantrasyon denemelerini desteklemesi sonucunda 5-Aza konsantrasyonu 10µM olarak seçilmiştir. Farklılaştırma sonucunda elde edilen hücreler kardiyomiyosite özgü antikorlar ile karakterize edilmiştir. Fenotipik karakterizasyon sonucunda farklılaşan hücrelerin Troponin I, MHC, pan-kaderin, konneksin 43 ve sarkomerik alfa aktin için pozitif olduğu gösterilmiştir.

Hücresel tedavi yaklaşımında bir diğer önemli basamak ise hücre uygulamasından sonra hücrelerin vücutta zaman içerisinde normal yaşamsal faaliyetlerini nasıl devam ettirdiklerini takip edebilmek için hücre işaretleme yöntemlerinin

geliştirilmesidir. İdeal hücre işaretleyicisinin hücre üzerine herhangi bir sitotoksik etkisi olmaması, hücresel veya genomik ekspresyon yolağını engellememesi veya etkilememesi gerekmektedir. Günümüzde birçok hücre işaretleme metodu üzerine çalışma bulunmaktadır. Floresan işaretleyicilerden DAPI, PKH26, Dil, GFP ve BrdU çalışmalarda tanımlanan en yaygın boyalardır [120]. Yan ve ark. [121] çalışmasında çekirdek işaretleyicisi olan DAPI ile hücre takibi yapılmış ancak bu işaretleyicinin hücre döngüsü sırasında kaç döngü boyunca başarılı olacağını bilmediği vurgulanmıştır. Aynı çalışma kapsamında sitoplazmik işaretleyicisi olan PKH26'nın transplantasyon sonrasında 60 gün boyunca takip edilebildiği ancak floresan şiddetinin her hücre döngüsünden sonra azalan sitoplazma miktarı nedeniyle gitgide azaldığı bildirilmiştir. GFP'nin ise MKH'lerin takibinde %40-60 arasında etkin olduğu ancak BrdU ile kıyaslandığı zaman etkinliğinin az olduğu gösterilmiştir [122]. Yapılan çalışmalarda timidin analogu olan BrdU ile işaretli hücrelerin transplantasyonu sonrasında hem takiplerinde hem de yer tayinlerinde histolojik olarak analiz edilebildiği gösterilmiştir [38]. Lequeux ve ark. [120] BrdU ile işaretli hücrelerin transplantasyonlarından 90 gün sonra dahi tanımlanabildikleri bildirilmiştir. Wennersten ve ark. [39] çalışmalarında ise BrdU ile işaretlenmiş nöral progenitor hücrelerinin migrasyon hareketlerinin takibinin implantasyondan altı hafta sonra dahi gerçekleştiği belirtilmiştir. Michishite ve ark.'nın [123] yaptığı çalışma ile timidin analoglarının olumsuzluğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda BrdU'nun farklı hücre tiplerinde hücre proliferasyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir. Ancak bu olumsuzluğun hücre proliferasyon ölçüm deneylerinde sorun yaratırken, hücre takibinde herhangi bir sorun yaratmadığı bildirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında hücre takibi için BrdU işaretleyicisi kullanılmıştır. BrdU'nun etkin olan konsantrasyonu daha önceki çalışmalar dikkate alınarak belirlenmiştir. Aynı şekilde uygulama süresine de literatür taraması sonucunda karar verilmiştir. 1µM konsantrasyonda ve 24 saat uygulama süresi ile farklılaştırılan mezenşimal kök hücreler işaretlenmiştir. İşaretlenen hücreler anti-BrdU immünohistokimyasal boyama ile tespit edilmiştir.

Hücresel tedavi yaklaşımında birçok kaynaktan elde edilen hücre çeşidinden bağımsız olarak, implante edilen hücrelerin %90'nın dolaşım ile hedeften uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Bu nedenle fonksiyonel özellikleri yüksek olan çok sayıdaki hücrenin birarada uygulanması gerekmektedir. Bu amaç ile transplante edilen hücrelerin hedef dokuya verilmesi ve hedef dokuda yerleşip sağlıklı bir

şekilde yaşamını sürdürebilmesi için doku mühendisliği yaklaşımları gündeme gelmiştir. Doku mühendisliği yaklaşımında sentetik ve doğal matriksler üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Sentetik yamalar esnek olmayan yapıları ve inflamatuvar cevap oluşturma potansiyelleri yüzünden hücre tutunumunu ve revaskülarizasyonu kısıtladığı için çok tercih edilmemektedir. Fibrin biyopolimer yamalar, enjekte edilebilen kollajen bazlı matriksler doğal yapıdaki doku iskeleleri olduğu için sıçan miyokardiyal iskemi modeli gibi çalışmalarda hücre canlılığını ve revaskülarizasyonu destekleyerek kan akımını arttırdığı, aynı zamanda enfarktli bölgedeki hasarlı alanı küçülttüğü belirtilmiştir. Kanada [51] ve Almanya' da [54],[55] yapılan çalışmalarda kollajen tabanlı yamalar üzerinde kasılabilen kardiyomiyosit ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları destekler başka bir çalışma da Zimmermann ve ekibinin yaptığı araştırma sonucunda yapılmıştır. Çalışma ile kasılabilen kardiyomiyosit ekimi yapılmış yamalarda kasılabilirliğin sekiz hafta sürebildiği açıklanmıştır [10].

Doku mühendisliğinin yakın zamanda odaklandığı bir diğer yöntem ise hücrelerinden arındırılmış (aselülerize) organlardan elde edilen doku iskelelerinin seçilen hücreler ile reselülerize edilmesi (üç boyutlu doku iskelesi eldesi) ya da parçalar halinde hücre uygulaması sonrasında yama şeklinde kullanılmasıdır. Üç boyutlu doku iskelesi uygulama yönteminde optimal başarıyı sağlamak için biyoreaktörler içerisinde kültürasyon yöntemi önerilmiştir. Biyoreaktör kullanımının doku mikroçevresindeki normal stres ve akım gücünü taklit ederek üç boyutlu doku iskelesinin eldesi sağlanarak elde edilecek bu doku iskelesinin transplantasyonundan önce iskemik ortama uyumu sağlanmış olacaktır [4].

Ancak üç boyutlu yöntemde karşılaşılan önemli bir sorun doku iskelesinin transplantasyon yöntemidir. Torakotomi yöntemi ile transplantasyonu mümkün olan bu büyük iskelelerin daha az invazif bir yöntem olan kateter yolu ile transplantasyonu mümkün olmadığı için üç boyutlu iskelelerden parça doku iskelesi dizaynına yönelinmiştir. Leor ve ark. [57] 2004 yılında yaptıkları çalışmada önerdikleri 1 cm'lik boyutlardaki aselülerize yamalar ile bu yöntem üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır. Böylece kardiyak doku rejenerasyon alanında *in vitro* proliferasyon gücüne sahip otolog hücrelerin kullanımı ile biyolojik olan ve biyomimetik özelliğe sahip materyallerin kombin kullanımları gündeme gelmiştir [4], [124].

Günümüzde aselülerize doku iskelesi eldesi için çok çeşitli metodlar uygulanmaktadır. Bu metodlar fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlevleri olan ajanların tek tek ya da birkaçının kombine edilmesi ile uygulanmaktadır [97]. Aselülerizasyon işleminde hangi metodların ne kadar süreyle uygulanacağını belirleyen en önemli kriter ESM'nin yapısının bozulmadan, en az zarar görece şekilde kalmasının sağlanmasıdır. Ott ve ark. [125] çalışmada domuzda immersiyon aselülerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem tüm dokunun parçalara ayrılmadan hücrelerinden arındırılması esasına dayanmaktadır. Bu şekilde elde edilen üç boyutlu doku iskelesini reselülerize ederek transplantasyona uygun hale getirilmektedir. Ancak bu yöntemin daha öncede bahsedildiği üzere sıkıntısı invazif bir yöntem ile yapılamamasıdır. Bir diğer çalışmada kullanılan metodların zamansal değişkeni üzerine yoğunlaşmış ve uzun süreli kimyasal uygulamalarının ESM üzerinde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir . Bunlar göz önünde tutularak bu çalışma kapsamında elde edilmesi istenen aselülerize kalp doku iskeleleri için kimyasal metoda dayalı bir sistem kullanılmıştır. Seçilen kimyasallar hem iyonik hem de iyonik olmayan solüsyonların birlikte kullanımına dayanmaktadır. ESM'nin en az zarar görece şekilde hücrelerden arındırılmasını esas alarak farklı dokular için literatürden elde edilen uygulama zamanlarını kalp dokusu için optimize edebilmek üzere sekiz farklı yöntem uygulanmıştır. Elde edilen sekiz farklı ESM daha önceki çalışmalardaki gibi immünohistolojik, immünohistolojik boyamalar ile, aynı zamanda taramalı elektron mikroskop görüntüleme ve RT-PCR analizleri ile incelenmiştir. Hücre uygulaması sonrasında gruplar arasında proliferasyon potansiyel farkı MTT analizi ile incelenmiş ve en iyi hücre tutunumunun olduğu grup ile çalışmalara devam edilmiştir.

Yapılan bir çalışma sonucunda kardiyomiyositlerin direk olarak ektopik transplantasyonunun kalpte aritmiye ve miyokardiyal enfarktüse neden olabileceği açıklanmıştır [126]. Bir başka çalışmada kardiyomiyositlerin alternatif bir şekilde ektopik transplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Johkura ve ark. [127] çalışmalarında retroperitoneumda abdominal aortanın etrafına herhangi bir doku iskelesi kullanılmadan transplante edilen hücreleri elektrofizyolojik ve immünohistolojik olarak incelemişlerdir. Sonuçta, miyositlerin 30 gün boyunca uygulandıkları alanda kontraktıl fonksiyonlarını devam ettirdikleri, proliferasyon ve farklılaşma özelliklerini kaybetmedikleri gösterilmiştir.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında adipoz doku kökenli mezenşimal kök hücrelerin 5-Aza ile farklılaşma potansiyellerinin konsantrasyon bağımlı olduğu ve seçilen konsantrasyon ile farklılaşma süresinin önemli olduğu gösterilmiştir. Kardiyomiyosite farklılaşan hücrelerin kardiyogenezis öncülü olan genleri (MEF2B, GATA-4, ACTC-1) ifade ettiği gösterilmiştir.

Farklılaşmış hücrelerin, ektopik göçünün takibi için, işaretlenmesi amaçlanmış, bu amaç doğrultusunda AdMSC'ler için BrdU işaretleme yöntemi optimize edilmiştir. 1µM BrdU ile 24 saat inkübasyonun işaretleme için ideal olduğu gösterilmiştir.

Tez kapsamında farklılaşmış işaretli hücrelerin *in vivo* kullanımı için uygun bir doku iskelesi dizayn edilmesi hedeflenmiştir. Hücrelerinden arındırılmış doku iskelesi elde etmek için "kalp" aday doku olarak seçilmiştir. Daha önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak farklı dokularda kullanılan çeşitli yöntemler denenmiş ve hücre uygulaması için düşük konsantrasyonlardaki iyonik ve iyonik olmayan deterjan solüsyonlarını içeren yöntemin en verimli yöntem olduğu gösterilmiştir.

BrdU ile işaretlendikten sonra bu hücrelerin aselülerize doku iskelelerine uygulanması, daha sonra elde edilen ESM+Hücre kompozitinin ektopik implantasyonları için uygun yöntemin geliştirilmesi ve implante edilen kompozitler arasındaki farklılıklar ve farklı dokulardaki (karaciğer, dalak, kalp, abdominal aorta ve böbrek) işaretli hücrelerin göç etme potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla implantasyon için en uygun bölgenin retroperitoneumda abdominal aortanın sol lateral bölgesindeki adipoz doku olduğuna karar verilerek aselülerize doku iskelelerinin (Boş ESM, ESM+Hücre) bu bölgeye implantasyonu gerçekleştirilmiştir. Ektopik olarak implante edilen doku iskelesine, uygulama alanında vücut tarafından oluşacak tepkiler farklı zaman periyodlarında incelenmiştir. Ancak implante edilen doku iskelelerinin herhangi bir immünolojik reaksiyona neden olmadığı, implantasyon bölgesinde enfeksiyona yol açmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda doku iskelesi üzerine uygulanan hücrelerin zaman içerisinde kardiyomiyosite özgü genleri ifade etme potansiyellerinin arttığı gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen bu bulguların, aselülerize kalp matrikslerinin farklılaşmış kök hücreler ile birarada kullanılarak ektopik olarak implante edilebilirliğinin mümkün olduğu ve yama malzemesi olarak alternatif olabileceği, aynı zamanda doku mühendisliği çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılabilceği düşünülmüştür. İmplantasyon sonrasında farklı zamanlarda

yapılan doku incelemeleri sonucunda ESM+Hücre grubu 1. ve 2. hafta deneklerinden elde edilen böbrek doku kesitlerinde işaretli hücreler tespit edilmiştir. Kontrol ve Boş ESM gruplarının doku kesitleri incelenmesi sonucunda hedef dokularda işaretli hücreye rastlanmamıştır. Aynı şekilde ESM+Hücre grubunda 4. hafta dokularında ve 1. ve 2. hafta böbrek dışındaki hedef doku kesitlerinin immünohistopatolojik incelemelerinde işaretli hücreler gözlenmemiştir. Bu bulgular ışığında daha sonraki çalışmalarda ektopik olarak implante edilen hücrelerin daha uzun zaman periyodlarında incelenmesi gerektiği ve zaman içerisinde farklı dokulara göç eden hücrelerin bu dokularda teratomaya neden olup olmadığı incelenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Hayvan gruplarına, sadece işaretli farklılaşmış hücrelerin enjekte edildiği negatif kontrol grubunun eklenmesi ve enjekte edilen hücrelerin aynı zaman aralıklarında takip edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Aynı zamanda ESM+Hücre kompozitlerinin zamana bağlı kardiyomiyosit hücreleri bakımından zenginliği ve üzerine uygulanan hücrelerin birbiri ile olan iletişimlerini incelemek amacı ile TEM analizinin yapılması düşünülmüştür.

Tüm deney gruplarının doku kesitlerinde anti-BrdU boyamasına ek olarak kardiyomiyositlerin varlığını ve proliferasyon güçlerini gösterebilmek için uygun kardiyomiyosit ve proliferasyon markerları ile immün boyamalarının (troponin I, MHC, PCNA, pan-kaderin, konneksin-43 vs) yapılması düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] V. C. Babaliaros, J. T. Green, S. Lerakis, M. Lloyd, and P. C. Block, "Emerging Applications for Transseptal Left Heart Catheterization. Old Techniques for New Procedures," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 51, no. 22, pp. 2116–2122, **2008**.
- [2] T. E. David, J. Ivanov, S. Armstrong, H. Rakowski, M. a. Acker, David, K. D. Accola, and Carpentier, "Late outcomes of mitral valve repair for floppy valves: Implications for asymptomatic patients," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 125, no. 5, pp. 1143–1152, **2003**.
- [3] B. H. Trichon, G. M. Felker, L. K. Shaw, C. H. Cabell, and C. M. O'Connor, "Relation of frequency and severity of mitral regurgitation to survival among patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure," *Am. J. Cardiol.*, vol. 91, no. 5, pp. 538–543, Jun. **2015**.
- [4] P. Zammaretti and M. Jaconi, "Cardiac tissue engineering: regeneration of the wounded heart.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 15, no. 5, pp. 430–4, Oct. **2004**.
- [5] G. Zund, C. K. Breuer, T. Shinoka, P. X. Ma, R. Langer, J. E. Mayer, and J. P. Vacanti, "The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 11, no. 3, pp. 493–497, **1997**.
- [6] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa, "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium," *Nature*, vol. 410, no. 6829, pp. 701–705, Apr. **2001**.
- [7] R. Passier and C. Mummery, "Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair," *Cardiovasc Res*, vol. 58, no. 2, pp. 324–335, **2003**.
- [8] C. E. Murry, M. H. Soonpaa, H. Reinecke, H. Nakajima, H. O. Nakajima, M. Rubart, K. B. S. Pasumarthi, J. Ismail Virag, S. H. Bartelmez, V. Poppa, G. Bradford, J. D. Dowell, D. A. Williams, and L. J. Field, "Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts," *Nature*, vol. 428, no. 6983, pp. 664–668, Apr. **2004**.
- [9] J. S. Forrester, M. J. Price, and R. R. Makkar, "Stem cell repair of infarcted myocardium: An overview for clinicians," *Circulation*, vol. 108, no. 9, pp. 1139–1145, **2003**.
- [10] W.-H. Zimmermann, I. Melnychenko, and T. Eschenhagen, "Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1639–1647, Apr. **2004**.

- [11] A. P. Pêgo, A. A. Poot, D. W. Grijpma, and J. Feijen, "Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering," *J. Control. Release*, vol. 87, no. 1–3, pp. 69–79, Feb. **2003**.
- [12] L. Gepstein, "Derivation and potential applications of human embryonic stem cells," *Circ. Res.*, vol. 91, no. 10, pp. 866–876, **2002**.
- [13] P. Menasché, A. A. Hagège, J.-T. Vilquin, M. Desnos, E. Abergel, B. Pouzet, A. Bel, S. Sarateanu, M. Scorsin, K. Schwartz, P. Bruneval, M. Benbunan, J.-P. Marolleau, and D. Duboc, "Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 41, no. 7, pp. 1078–1083, Apr. **2003**.
- [14] P. Menasché, "Skeletal muscle satellite cell transplantation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 58, no. 2, pp. 351–357, **2003**.
- [15] G. Matsumura, N. Hibino, Y. Ikada, H. Kurosawa, and T. Shin'oka, "Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2303–2308, Jun. **2003**.
- [16] H. Kawada, J. Fujita, K. Kinjo, Y. Matsuzaki, M. Tsuma, H. Miyatake, K. Tsuboi, Y. Itabashi, Y. Ikeda, S. Ogawa, H. Okano, W. Dc, and Y. Muguruma, "Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction," vol. 104, no. 12, pp. 3581–3587, **2013**.
- [17] T. Yoshioka, N. Ageyama, H. Shibata, T. Yasu, Y. Misawa, K. Takeuchi, K. Matsui, K. Yamamoto, K. Terao, K. Shimada, U. Ikeda, K. Ozawa, and Y. Hanazono, "Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model.," *Stem Cells*, vol. 23, no. 3, pp. 355–364, **2005**.
- [18] A. Kadner, G. Zund, C. Maurus, C. Breyman, S. Yakarisik, G. Kadner, M. Turina, and S. P. Hoerstrup, "Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: A comparative study," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 25, no. 4, pp. 635–641, **2004**.
- [19] K. Matsubayashi, P. W. M. Fedak, D. a G. Mickle, R. D. Weisel, T. Ozawa, and R.-K. Li, "Improved left ventricular aneurysm repair with bioengineered vascular smooth muscle grafts.," *Circulation*, vol. 108 Suppl , no. Lv, pp. II219–II225, **2003**.
- [20] R. Madonna, Y.-J. Geng, and R. De Caterina, "Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 11, pp. 1723–9, Nov. **2009**.

- [21] J. D. Dowell, M. Rubart, K. B. S. Pasumarthi, M. H. Soonpaa, and L. J. Field, "Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart," vol. 58, pp. 336–350, **2003**.
- [22] B. Murtuza, K. Suzuki, G. Bou-Gharios, J. R. Beauchamp, R. T. Smolenski, T. a Partridge, and M. H. Yacoub, "Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 12, pp. 4216–4221, **2004**.
- [23] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. a Bunnell, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 9, pp. 1249–60, May **2007**.
- [24] S.-J. Huang, R.-H. Fu, W.-C. Shyu, S.-P. Liu, G.-P. Jong, Y.-W. Chiu, H.-S. Wu, Y.-A. Tsou, C.-W. Cheng, and S.-Z. Lin, "Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential," *Cell Transplant.*, vol. 22, no. 4, pp. 701–709, **2013**.
- [25] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. a Bunnell, "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 9, pp. 1249–1260, **2007**.
- [26] R. Madonna and R. De Caterina, "In vitro neovasculogenic potential of resident adipose tissue precursors.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 295, no. 5, pp. C1271–C1280, **2008**.
- [27] B. Puissant, C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, and A. Blancher, "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells," *Br. J. Haematol.*, vol. 129, no. 1, pp. 118–129, **2005**.
- [28] K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, J. B. Mitchell, Z. E. Floyd, L. Hammill, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, J. P. Ting, R. W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J. M. Gimble, "The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro.," *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1246–1253, **2006**.
- [29] A. Ö. Gündeşlioğlu, Z. Altuntaş, B. İnce, M. Dadacı, M. Aktan, and S. Duman, "ALANLARI," pp. 1–10, **2013**.
- [30] S. Lendeckel, A. Jödicke, P. Christophis, K. Heidinger, J. Wolff, J. K. Fraser, M. H. Hedrick, L. Berthold, and H.-P. Howaldt, "Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report," *J. Craniomaxillofacial Surg.*, vol. 32, no. 6, pp. 370–373, Jun. **2015**.
- [31] D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, a Leri, and P. Anversa, "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 18, pp. 10344–10349, **2001**.

- [32] B. C. Heng, H. K. Haider, E. K.-W. Sim, T. Cao, and S. C. Ng, "Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 62, no. 1, pp. 34–42, Apr. **2004**.
- [33] J. S. Odorico, D. S. Kaufman, and J. a Thomson, "Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines.," *Stem Cells*, vol. 19, no. 3, pp. 193–204, **2001**.
- [34] A. O. Trounson, "The derivation and potential use of human embryonic stem cells," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 13, no. 8, pp. 523–532, Jan. **2001**.
- [35] J. S. Wang, D. Shum-Tim, E. Chedrawy, and R. C. J. Chiu, "The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 122, no. 4, pp. 699–705, **2001**.
- [36] S. C. Choi, J. Yoon, W. J. Shim, Y. M. Ro, and D.-S. Lim, "5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells.," *Exp. Mol. Med.*, vol. 36, no. 6, pp. 515–23, Dec. **2004**.
- [37] V. Santini, H. M. Kantarjian, and J.-P. Issa, "Changes in DNA Methylation in Neoplasia: Pathophysiology and Therapeutic Implications," *Ann. Intern. Med.*, vol. 134, no. 7, pp. 573–586, Apr. **2001**.
- [38] A. Darkazalli and C. W. Levenson, "Tracking stem cell migration and survival in brain injury: Current approaches and future prospects," *Histol. Histopathol.*, vol. 27, no. 10, pp. 1255–1261, **2012**.
- [39] A. Wennersten, X. Meijer, S. Holmin, L. Wahlberg, and T. Mathiesen, "Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury," *J. Neurosurg.*, vol. 100, no. 1, pp. 88–96, Jan. **2004**.
- [40] J. L. Russell, S. C. Goetsch, H. R. Aguilar, D. E. Frantz, and J. W. Schneider, "Targeting Native Adult Heart Progenitors with Cardiogenic Small Molecules.," *ACS Chem. Biol.*, Apr. **2012**.
- [41] L. Li, Q. Jiang, C. S. Qu, G. L. Ding, Q. J. Li, S. Y. Wang, J. H. Lee, M. Lu, A. Mahmood, and M. Chopp, "Transplantation of marrow stromal cells restores cerebral blood flow and reduces cerebral atrophy in rats with traumatic brain injury: in vivo MRI study.," *J. Neurotrauma*, vol. 28, no. 4, pp. 535–545, **2011**.
- [42] C. Bonilla, M. Zurita, L. Otero, C. Aguayo, and J. Vaquero, "Delayed intralesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury," *Brain Inj.*, vol. 23, no. 9, pp. 760–769, Jan. **2009**.
- [43] S.-W. Jeong, K. Chu, K.-H. Jung, S. U. Kim, M. Kim, and J.-K. Roh, "Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with

- experimental intracerebral hemorrhage.,” *Stroke.*, vol. 34, no. 9, pp. 2258–2263, **2003**.
- [44] K. Hemmrich, M. Meersch, D. von Heimburg, and N. Pallua, “Applicability of the Dyes CFSE, CM-Dil and PKH26 for Tracking of Human Preadipocytes to Evaluate Adipose Tissue Engineering,” *Cells Tissues Organs*, vol. 184, no. 3–4, pp. 117–127, **2006**.
- [45] A. Ferrari, D. Hannouche, K. Oudina, M. Bourguignon, A. Meunier, L. Sedel, and H. Petite, “In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 56, no. 3, pp. 361–367, **2001**.
- [46] S. Zhang, Z. Zou, X. Jiang, R. Xu, W. Zhang, Y. Zhou, and Y. Ke, “The Therapeutic Effects of Tyrosine Hydroxylase Gene Transfected Hematopoietic Stem Cells in a Rat Model of Parkinson’s Disease,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 28, no. 4, pp. 529–543, **2008**.
- [47] W. Liu, X. Jiang, X. Fu, S. Cui, M. Du, Y. Cai, and R. Xu, “Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 434, no. 2, pp. 160–4, Mar. **2008**.
- [48] J. Baumgartner, P. K. Dash, D. Ph, and C. S. C. Jr, “NIH Public Access,” vol. 110, no. 6, pp. 1189–1197, **2010**.
- [49] A. Manuscript, “NIH Public Access,” *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, **2012**.
- [50] S. F. Badylak, “Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction.,” *Transpl. Immunol.*, vol. 12, no. 3–4, pp. 367–77, Apr. **2004**.
- [51] P. Akhyari, P. W. M. Fedak, R. D. Weisel, T.-Y. J. Lee, S. Verma, D. a G. Mickle, and R.-K. Li, “Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts.,” *Circulation*, vol. 106, no. 12 Suppl 1, pp. I137–I142, **2002**.
- [52] J. R. Paniagua Gutierrez, H. Berry, S. Korossis, S. Mirsadraee, S. V. Lopes, F. da Costa, J. Kearney, K. Watterson, J. Fisher, and E. Ingham, “Regenerative Potential of Low-Concentration SDS-Decellularized Porcine Aortic Valved Conduits In Vivo,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 21, no. 1–2, pp. 332–342, **2015**.
- [53] T. Chandy, G. H. R. Rao, R. F. Wilson, and G. S. Das, “The Development of Porous Alginate/Elastin/PEG Composite Matrix for Cardiovascular Engineering,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 17, no. 4, pp. 287–301, Apr. **2003**.
- [54] T. Eschenhagen, M. Didié, J. Heubach, U. Ravens, and W.-H. Zimmermann, “Cardiac tissue engineering,” *Transpl. Immunol.*, vol. 9, no. 2–4, pp. 315–321, May **2002**.

- [55] T. Kofidis, P. Akhyari, J. Boublik, P. Theodorou, U. Martin, A. Ruhparwar, S. Fischer, T. Eschenhagen, H. P. Kubis, T. Kraft, R. Leyh, and A. Haverich, "In vitro engineering of heart muscle: Artificial myocardial tissue," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 124, no. 1, pp. 63–69, Jun. **2015**.
- [56] J. Nakahira, H. Ishii, T. Sawai, and T. Minami, "Fibrin glue on an aortic cusp detected by transesophageal echocardiography after valve-sparing aortic valve replacement: a case report," *J. Med. Case Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 10–12, **2015**.
- [57] J. Leor and S. Cohen, "Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1015, pp. 312–9, May **2004**.
- [58] T. Ozawa, "Optimal Biomaterial for Creation of Autologous Cardiac Grafts," *J. Med. Soc. Toho Univ.*, vol. 51, no. 1, pp. 38–40, **2004**.
- [59] D. Press, "Greater cardiomyocyte density on aligned compared with random carbon nanofibers in polymer composites," pp. 5533–5539, **2014**.
- [60] T. C. McDevitt, K. A. Woodhouse, S. D. Hauschka, C. E. Murry, and P. S. Stayton, "Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 66, no. 3, pp. 586–95, Sep. **2003**.
- [61] S. Abdalla, G. Makhoul, M. Duong, R. C. J. Chiu, and R. Cecere, "Hyaluronic acid-based hydrogel induces neovascularization and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction.," *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 17, no. 5, pp. 767–72, **2013**.
- [62] A. V Vashi, J. F. White, K. M. McLean, W. M. L. Neethling, D. I. Rhodes, J. A. M. Ramshaw, and J. A. Werkmeister, "Evaluation of an established pericardium patch for delivery of mesenchymal stem cells to cardiac tissue.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, no. 6, pp. 1999–2005, Jun. **2015**.
- [63] T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, and T. Okano, "Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2309–2316, Jun. **2003**.
- [64] A. R. Kolker, D. J. Brown, J. S. Redstone, V. M. Scarpinato, and M. K. Wallack, "Multilayer Reconstruction of Abdominal Wall Defects With Acellular Dermal Allograft (AlloDerm) and Component Separation," *Ann. Plast. Surg.*, vol. 55, no. 1, **2005**.
- [65] J. Y. Exposito, M. D'Alessio, M. Solursh, and F. Ramirez, "Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro- $\alpha 2(I)$ collagen," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 22, pp. 15559–15562, **1992**.
- [66] R. W. Grauss, M. G. Hazekamp, F. Oppenhuizen, C. J. Van Munsteren, A. C. Gittenberger-De Groot, and M. C. DeRuiter, "Histological evaluation of

- decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods,” *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 27, no. 4, pp. 566–571, **2005**.
- [67] E. Rieder, M. T. Kasimir, G. Silberhumer, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon, and G. Weigel, “Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 127, no. 2, pp. 399–405, **2004**.
- [68] B. S. Conklin, E. R. Richter, K. L. Kreutziger, D.-S. Zhong, and C. Chen, “Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 24, no. 3, pp. 173–183, Jun. **2015**.
- [69] E. Uchimura, Y. Sawa, S. Taketani, Y. Yamanaka, M. Hara, H. Matsuda, and J. Miyake, “Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol).,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, no. 3, pp. 834–7, Dec. **2003**.
- [70] R.-N. Chen, H.-O. Ho, Y.-T. Tsai, and M.-T. Sheu, “Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 13, pp. 2679–2686, Jun. **2004**.
- [71] B.-S. Kim, J. J. Yoo, and A. Atala, “Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 68, no. 2, pp. 201–9, Feb. **2004**.
- [72] G. H. Borschel, R. G. Dennis, and W. M. J. Kuzon, “Contractile Skeletal Muscle Tissue-Engineered on an Acellular Scaffold,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 113, no. 2, **2004**.
- [73] J. S. Cartmell and M. G. Dunn, “Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 134–140, Jan. **2000**.
- [74] T. Woods and P. F. Gratzner, “Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft.,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 35, pp. 7339–49, Dec. **2005**.
- [75] B. P. Kropp, B. L. Eppley, C. D. Prevel, M. K. Rippy, R. C. Harruff, S. F. Badylak, M. C. Adams, R. C. Rink, and M. A. Keating, “Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute,” *Urology*, vol. 46, no. 3, pp. 396–400, Jun. **2015**.
- [76] D. O. Freytes, S. F. Badylak, T. J. Webster, L. A. Geddes, and A. E. Rundell, “Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 12, pp. 2353–2361, May **2004**.
- [77] K. Sun, S. Tian, J. Zhang, C. Xia, C. Zhang, and T. Yu, “Anterior cruciate ligament reconstruction with BPTB autograft, irradiated versus non-irradiated

- allograft: a prospective randomized clinical study,” *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, vol. 17, no. 5, pp. 464–474, **2009**.
- [78] J. A. Fox, M. Pierce, J. Bojchuk, J. Hayden, C. A. Bush-Joseph, and B. R. Bach Jr., “Revision anterior cruciate ligament reconstruction with nonirradiated fresh-frozen patellar tendon allograft,” *Arthroscopy*, vol. 20, no. 8, pp. 787–794, Jun. **2015**.
- [79] A. K. Gulati, “Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve,” *J. Neurosurg.*, vol. 68, no. 1, pp. 117–123, Jan. **1988**.
- [80] J. J. Yoo, J. Meng, F. Oberpenning, and A. Atala, “Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells,” *Urology*, vol. 51, no. 2, pp. 221–225, Jun. **2015**.
- [81] J. Hodde and M. Hiles, “Virus safety of a porcine-derived medical device: Evaluation of a viral inactivation method,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 79, no. 2, pp. 211–216, Jul. **2002**.
- [82] A. Pruss, M. Kao, H. Kiesewetter, R. Von Versen, and G. Pauli, “Virus Safety of Avital Bone Tissue Transplants: Evaluation of Sterilization Steps of Spongiosa Cuboids Using a Peracetic Acid–Methanol Mixture,” *Biologicals*, vol. 27, no. 3, pp. 195–201, Sep. **1999**.
- [83] K. Lindberg and S. F. Badylak, “Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins,” *Burns*, vol. 27, no. 3, pp. 254–266, Jun. **2015**.
- [84] C. Le Visage, S.-H. Yang, L. Kadakia, A. N. Sieber, J. P. Kostuik, and K. W. Leong, “Small Intestinal Submucosa as a Potential Bioscaffold for Intervertebral Disc Regeneration,” *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 31, no. 21, **2006**.
- [85] J. Hodde, R. Record, R. Tullius, and S. Badylak, “Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 8, pp. 1841–1848, Apr. **2002**.
- [86] S. L. Voytik-Harbin, A. O. Brightman, M. R. Kraine, B. Waisner, and S. F. Badylak, “Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 67, no. 4, pp. 478–491, **1997**.
- [87] X.-G. Lv, C. Feng, Q. Fu, H. Xie, Y. Wang, J.-W. Huang, M.-K. Xie, A. Atala, Y.-M. Xu, and W.-X. Zhao, “Comparative study of different seeding methods based on a multilayer SIS scaffold: Which is the optimal procedure for urethral tissue engineering?,” *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, p. n/a–n/a, May **2015**.
- [88] A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, “Membrane proteins , lipids and detergents : not just a soap opera,” vol. 1666, pp. 105–117, **2004**.

- [89] J. M. Wallis, Z. D. Borg, A. B. Daly, B. Deng, B. a. Ballif, G. B. Allen, D. M. Jaworski, and D. J. Weiss, "Comparative Assessment of Detergent-Based Protocols for Mouse Lung De-Cellularization and Re-Cellularization," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 18, no. 6, pp. 420–432, **2012**.
- [90] L. Carboni, C. Piubelli, P. G. Righetti, B. Jansson, and E. Domenici, "Proteomic analysis of rat brain tissue: Comparison of protocols for two-dimensional gel electrophoresis analysis based on different solubilizing agents," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 24, pp. 4132–4141, Dec. **2002**.
- [91] G. Goissis, S. Suzigan, D. R. Parreira, J. V. Maniglia, D. M. Braile, and S. Raymundo, "Preparation and Characterization of Collagen-Elastin Matrices From Blood Vessels Intended as Small Diameter Vascular Grafts," *Artif. Organs*, vol. 24, no. 3, pp. 217–223, Mar. **2000**.
- [92] R. Moore, J. L. Madara, and R. J. MacLeod, "Enterocytes adhere preferentially to collagen IV in a differentially regulated divalent cation-dependent manner," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 266, no. 6, pp. G1099–G1107, Jun. **1994**.
- [93] J. Gailit and E. Ruoslahti, "Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 26, pp. 12927–12932, **1988**.
- [94] P. Gamba, M. Conconi, R. Lo Piccolo, G. Zara, R. Spinazzi, and P. Parnigotto, "Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix," *Pediatr. Surg. Int.*, vol. 18, no. 5–6, pp. 327–331, **2002**.
- [95] P. S. McFetridge, J. W. Daniel, T. Bodamyali, M. Horrocks, and J. B. Chaudhuri, "Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 70A, no. 2, pp. 224–234, Aug. **2004**.
- [96] O. E. Teebken, A. Bader, G. Steinhoff, and A. Haverich, "Tissue Engineering of Vascular Grafts: Human Cell Seeding of Decellularised Porcine Matrix," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 19, no. 4, pp. 381–386, Jun. **2015**.
- [97] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, "Decellularization of tissues and organs.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–83, Jul. **2006**.
- [98] K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. König, I. Riemann, K. J. Halbhuber, T. Wahlers, and U. A. Stock, "Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves," *J. Struct. Biol.*, vol. 143, no. 3, pp. 201–208, Sep. **2003**.
- [99] S. L. Hilbert, R. Yanagida, J. Souza, L. Wolfinbarger, A. L. Jones, P. Krueger, G. Stearns, A. Bert, and R. a Hopkins, "Prototype anionic detergent technique used to decellularize allograft valve conduits evaluated in the right ventricular outflow tract in sheep.," *J. Heart Valve Dis.*, vol. 13, no. 5, pp. 831–840, **2004**.

- [100] F. D. A. da Costa, P. M. Dohmen, S. V. Lopes, G. Lacerda, F. Pohl, R. Vilani, M. Brenner Affonso da Costa, E. D. Vieira, S. Yoschi, W. Konertz, and I. A. da Costa, "Comparison of Cryopreserved Homografts and Decellularized Porcine Heterografts Implanted in Sheep," *Artif. Organs*, vol. 28, no. 4, pp. 366–370, Apr. **2004**.
- [101] M. Mirabel, B. Lung, G. Baron, D. Messika-Zeitoun, D. D taint, J.-L. Vanoverschelde, E. G. Butchart, P. Ravaud, and A. Vahanian, "What are the characteristics of patients with severe, symptomatic, mitral regurgitation who are denied surgery?," *Eur. Heart J.*, Mar. **2007**.
- [102] B. H. Trichon, G. M. Felker, L. K. Shaw, C. H. Cabell, and C. M. O'Connor, "Relation of frequency and severity of mitral regurgitation to survival among patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure," *Am. J. Cardiol.*, vol. 91, no. 5, pp. 538–543, Mar. **2003**.
- [103] B. Carabello, "Mitral valve repair in the treatment of mitral regurgitation," *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 419–425, **2009**.
- [104] O. Alfieri, F. Maisano, M. De Bonis, P. L. Stefano, L. Torracca, M. Oppizzi, and G. La Canna, "The double-orifice technique in mitral valve repair: a simple solution for complex problems.," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 122, no. 4, pp. 674–81, Oct. **2001**.
- [105] F. Maisano, J. J. Schreuder, M. Oppizzi, B. Fiorani, C. Fino, and O. Alfieri, "The double-orifice technique as a standardized approach to treat mitral regurgitation due to severe myxomatous disease: Surgical technique," *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.*, vol. 17, no. 3, pp. 201–205, **2000**.
- [106] T. Feldman, E. Foster, D. D. Glower, S. Kar, M. J. Rinaldi, P. S. Fail, R. W. Smalling, R. Siegel, G. A. Rose, E. Engeron, C. Loghin, A. Trento, E. R. Skipper, T. Fudge, G. V Letsou, J. M. Massaro, and L. Mauri, "Percutaneous Repair or Surgery for Mitral Regurgitation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 15, pp. 1395–1406, Apr. **2011**.
- [107] J. L. Mignone, K. L. Kreutziger, S. L. Paige, and C. E. Murry, "Cardiogenesis From Human Embryonic Stem Cells," *Circ. J.*, vol. 74, no. December, pp. 2517–2526, **2010**.
- [108] K. E. Hatzistergos, H. Quevedo, B. N. Oskouei, Q. Hu, G. S. Feigenbaum, I. S. Margitich, R. Mazhari, A. J. Boyle, J. P. Zambrano, J. E. Rodriguez, R. Dulce, P. M. Pattany, D. Valdes, C. Revilla, A. W. Heldman, I. McNiece, and J. M. Hare, "Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation.," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 7, pp. 913–22, Oct. **2010**.
- [109] M. Gneccchi, P. Danieli, and E. Cervio, "Mesenchymal stem cell therapy for heart disease.," *Vascul. Pharmacol.*, Apr. **2012**.

- [110] R. Madonna, J. T. Willerson, and Y.-J. Geng, "Myocardin a enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation.," *Stem Cells*, vol. 26, no. 1, pp. 202–11, Jan. **2008**.
- [111] J. K. Fraser, R. E. Schreiber, P. a Zuk, and M. H. Hedrick, "Adult stem cell therapy for the heart.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 4, pp. 658–66, Apr. **2004**.
- [112] R. Vishnubalaji, M. Al-Nbaheen, B. Kadalmani, A. Aldahmash, and T. Ramesh, "Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis.," *Cell Tissue Res.*, pp. 419–427, Jan. **2012**.
- [113] Y. Zhu, T. Liu, K. Song, and X. Fan, "Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC," *Cell Biochem.*, no. August 2007, pp. 664–675, **2008**.
- [114] M. Niyaz, Ö. A. Gürpınar, S. Günaydın, and M. A. Onur, "Isolation, culturing and characterization of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a simple technique," *Turkish Journal of Biology*, vol. 36, no. 6. pp. 658–664, **2012**.
- [115] C. Chiu, "5-azacytidine permits gene activation in a previously noninducible cell type," *Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 417–424, Feb. **1985**.
- [116] Y. Tomita, S. Makino, D. Hakuno, N. Hattan, K. Kimura, S. Miyoshi, M. Murata, M. Ieda, and K. Fukuda, "Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 45, no. 2, pp. 209–220, **2007**.
- [117] B. Wang, A. Borazjani, M. Tahai, A. L. D. J. Curry, D. T. Simionescu, J. Guan, F. To, S. H. Elder, and J. Liao, "Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 94, no. 4, pp. 1100–10, Sep. **2010**.
- [118] R.-K. Li, Z.-Q. Jia, R. D. Weisel, D. A. G. Mickle, J. Zhang, M. K. Mohabeer, V. Rao, and J. Ivanov, "Cardiomyocyte Transplantation Improves Heart Function," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 62, no. 3, pp. 654–661, Jun. **2015**.
- [119] S. Tomita, R. Li, R. D. Weisel, D. A. G. Mickle, and E. Kim, "Autologous Transplantation of Bone Marrow Cells Improves," **1999**.
- [120] C. Lequeux, G. Oni, A. Mojallal, O. Damour, and S. Brown, "Adipose derived stem cells: efficiency, toxicity, stability of BrdU labeling and effects on self-renewal and adipose differentiation," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 351, no. 1–2, pp. 65–75, **2011**.
- [121] L. Yan, Y. Han, Y. He, H. Xie, J. Liu, L. Zhao, J. Wang, L. Gao, and D. Fan, "Cell Tracing Techniques in Stem Cell Transplantation," *Stem Cell Rev.*, vol. 3, no. 4, pp. 265–269, **2007**.

- [122] S. Wolbank, A. Peterbauer, E. Wassermann, S. Hennerbichler, R. Voglauer, M. van Griensven, H.-C. Duba, C. Gabriel, and H. Redl, "Labelling of human adipose-derived stem cells for non-invasive in vivo cell tracking," *Cell Tissue Bank.*, vol. 8, no. 3, pp. 163–177, **2007**.
- [123] M. Eriko, K. Nakabayashi, T. Suzuki, S. C. Kaul, H. Ogino, M. Fujii, Y. Mitsui, and D. AyABDwa, "5-Bromodeoxyuridine Induces Senescence-Like Phenomena in Mammalian Cells Regardless of Cell Type or Species," *J. Biochem.*, vol. 126, no. 6, pp. 1052–1059, Dec. **1999**.
- [124] T. J. Keane and S. F. Badylak, "Biomaterials for tissue engineering applications," *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, no. 3, pp. 112–118, **2014**.
- [125] H. C. Ott, T. S. Matthiesen, S.-K. Goh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Netoff, and D. a Taylor, "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart.," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 213–21, Feb. **2008**.
- [126] R.-K. Li, D. A. G. Mickle, R. D. Weisel, J. Zhang, and M. K. Mohabeer, "In Vivo Survival and Function of Transplanted Rat Cardiomyocytes," *Circ. Res.*, vol. 78, no. 2, pp. 283–288, Feb. **1996**.
- [127] K. Johkura, L. Cui, A. Suzuki, R. Teng, A. Kamiyoshi, S. Okamura, S. Kubota, X. Zhao, K. Asanuma, Y. Okouchi, N. Ogiwara, Y. I. Tagawa, and K. Sasaki, "Survival and function of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in ectopic transplants," *Cardiovasc. Res.*, vol. 58, no. 2, pp. 435–443, **2003**.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı-Soyadı** : Esin Akbay
- Doğum tarihi ve yeri** : 23.06.1983, Kuveyt
- İş adresi** : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 06800 Beytepe, Ankara (tel: 297 64 40)
- E-mail** : akbayesin@gmail.com
- Yabancı dili** : İngilizce
- Eğitim durumu** :2001-2006 Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü.
2006-2009 Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
2009-2015 Doktora, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Görev durumu** 2006-devam ediyor: Araştırma görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı.
- Bilimsel araştırma tecrübesi** Biyopolimerlerin biyolojik uygunluk ve sitotoksosite testlerinin yapılması, *in vivo* uygulamaları. Yetişkin kök hücrelerinin izolasyonu, kültürü ve bu hücrelerin biyomedikal uygulamaları, apoptosiz. Düz kas ve sinir izolasyonu, bu dokular üzerinde bazı kimyasalların analiz edilmesi ve elektrofizyolojik değişikliklerin incelenmesi.

Diplomalar:

1. Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Lisans Diploması, 2006, Ankara
2. Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Yüksek Lisans Diploması, 2009, Ankara

A. ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN SÖZLÜ BİLDİRİ:

A.1. Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Günaydın, S., Transplantation of mesenchymal stem cells into the ischemic rat myocardium for myocardial regeneration, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium, BIOMED, Turkish republic of Northern Cyprus, 2009

B. ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN POSTERLER :

B.1. Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Eroğlu, M., Gümüşderelioğlu, M., Using chitosan for bone defect repairing at aging rat model, 14th International Biomedical Science and Technology Symposium, BIOMED, Marmaris, Türkiye, 2008

B.2. Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Kaplan-Can, H., Onur, M.A., Rzaev, M.O., Güner, A., Investigation of cytotoxic effects of anhydride containing water-soluble copolymers on L929 mouse fibroblasts, International Symposium on Drug Research and Development From Chemistry to Medicine, Antalya, Türkiye, 2007

B.3. Sevim, H., Akbay, E., Gürpınar, Ö.A., Çehrelî, Z.C., Onur, M.A., Tümer, A., Investigation of cell proliferation of Dexamethasone on human pulp and gingival fibroblasts, International Symposium on Drug Research and Development From Chemistry to Medicine, Antalya, Türkiye, 2007

B.4. Sevim, H., Akbay, E., Gürpınar, Ö.A., Çehrelî, Z.C., Onur, M.A., Tümer, A., Investigation of cytotoxicity of Self-priming Dental Adhesive System on human pulp and gingival fibroblasts, 13th Biomedical Science and Technology Symposium, BIOMED, İstanbul, Türkiye, 2007

B.5. Akçay, A., Cehrelî, Z.C., Onur, M.A., Akbay, E., Sevim, H., Tasman Dalgı, F., Effect of an antibacterial root canal cleanser (MTAD) on vascular responses in carotid artery tissue, 13th Biennial Congress of the European Society of Endodontology (ESE), International Endodontic Journal 40 (12), 979-1007, İstanbul, Turkey, 2007

B.6. Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Günaydın, S., Differentiation and characterization of cardiomyocytes from rat bone marrow mesenchymal stem cells for myocardial regeneration, 15th International Biomedical Science and Technology Symposium, BIOMED, Turkish republic of Northern Cyprus, 2009

B.7. Sevim, H., Akbay, E., Gürpınar, Ö.A., Günaydın, S., Onur, M.A., Differentiation and characterization of cardiomyocytes from rat BM-MSCs for myocardial regeneration, 18th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Milan, Italy, 2010

B.8. Akbay, E., Ayaz, G., Sevim, H., Albayrak, M.E., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Calcium Impression on Proliferation and Phenotype Changes of Differentiated

Cardiomyocytes *in vitro*, 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidatives Stres: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Türkiye, 2010

B.9. Ayaz, G., Akbay, E., Sevim, H., Albayrak, M.E., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., The Effect Of Calcium on The Proliferation and Viability of Rat Mesenchymal Stem Cells, 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidatives Stres: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Türkiye, 2010

B.10 Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Günaydın, S., Potential treatment modality for ischemic myocardial rat heart with mesenchymal stem cell transplantation, Frontiers in Cardiac and Vascular Regeneration, Trieste, İtalya, 2012

C. ULABDL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİ:

C.1. Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Sıçanlarda miyokard infarktüsü sonrası mezenşimal kök hücre transplantasyonu ve miyokardiyal rejenerasyonun elektrofizyolojik analizi, 36. UIABDI Fizyoloji Kongresi, Edirne, Türkiye, 2010

D. ULABDL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN POSTERLER :

D.1. Sevim, H., Akbay, E., Gürpınar, Ö.A., Atasoy, P., Günaydın, S., Onur, M.A., İnsan aorta yayından endotel hücrelerinin izolasyonu,kültürü ve karakterizasyonu, 19. UIABDI Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2008

D.2. Akbay, E., Sevim, H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Eroğlu, M., Güzel, M., Gümüşderelioğlu, M., Yaşlı ve genç sıçanlarda oluşturulan kemik hasarlarının kemik iliği kök hücreleri kullanılarak iyileşme süreçlerinin incelenmesi, 19. UIABDI Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2008

D.3. Albayrak, M.E., Sevim, H., Akbay, E., Ayaz, G., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Farklı hasar seviyelerindeki sıçan siyatik sinirlerine ait birleşik aksiyon potansiyellerinin (BAP) in vitro ortamda analizi ve karşılaştırılması, 36. UIABDI Fizyoloji Kongresi, Edirne, Türkiye, 2010

E. BİLİMSEL TOPLANTILARA KATILIM (KATILIMCI OLARAK)

E.1. Tissue Engineering and Regenerative Medicine Conference, Samsun, Türkiye, 2007

E.2. Nanoscience, Nanotechnology, Nanobiotechnology, Nanomedicine Conference, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2007

E.3. EBAT National Neurobiology Summer School: High Function of Nerveous System, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 2007

E.4. EMBO Young Scientists Forum, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2008

E.5. Nanobiomaterials, Tissue Engineering and Nanobiotechnology Workshop, METU, Ankara, Türkiye, 2008

E.6. TUBA IV. Kök Hücre Sempozyumu, Ankara, Türkiye, 2009

E.7. The Teorical Course “Mouse genetics; models for human diseases”, Trieste, İtalya, 2010

E.8. Training Course on “Cranio-Maxillofacial animal models”, Ankara, Türkiye, 2010

E.9. VI. EGE-BINGSS “Psycho-Neuro-endocrino-Immunology” Importance in Brain Function and Behavior”, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye, 2011

F. PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

F.1. Miyokardiyal regenerasyonda kullanılmak üzere kemik iliği kök hücrelerinden kardiyomiyositlerin farklılaştırılması ve karakterizasyonu, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, 07.01.601.007 nolu proje, 2010 yılında Tamamlandı, Yardımcı araştırmacı, UIABDI.

F.2. Miyokardiyal Rejenerasyonda Kullanılmak Üzere Kültüre Edilmiş Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücrelerinin Sıçan Kalbine Tranplantasyonu, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, 07.01.601.002 nolu proje, 2012 yılında Tamamlandı, Yardımcı araştırmacı, UIABDI.

F.3. Kemik iliği hücrelerinden farklılaştırılan osteoblast hücrelerinin liyofilizasyonu sonucunda elde edilen hücre homojenatının kemik defektlerinde kullanılması, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, 07.01.601.001 nolu proje, 2012 yılında Tamamlandı, Yardımcı araştırmacı, UIABDI.

F.4. Kardiyomiyositlere farklılaştırılan işaretlenmiş mezenşimal kök hücrelerin ektopik göçü, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, 013.01.601.002 nolu proje, 2013 yılında, devam etmekte, Yardımcı araştırmacı, UIABDI.

G. BURSLAR

G.1. International Center of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) bursu, “The Teorical Course “Mouse genetics; models for human diseases”, Trieste, İtalya, 2010

G.2. Erasmus programı ile yurtdışı bursu: RUG University - Faculty of Mathematics and Natural Science-Department of Biology-Centre for Behaviour and Neurosciences (CBN - Neuroendocrinology Groningen/Netherlands (Çalışma danışmanı: Prof. Dr. Gertjan van Dijk), Eylül - Mart 2011

G.3. International Center of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) bursu, Frontiers in Cardiac and Vascular Regeneration, Trieste, İtalya, 2012

F. SERTİFİKALAR

F.1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2007

F.2. Certificate Laboratory Animal Science Course, Rijkuniversiteit, Groningen, 2011