

**HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMIŞ MİYOKARDİYAL
DOKU İLE HÜCRE TABAKASI DESTEKLİ KALP
YAMASI GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF CELL SHEET SUPPORTED
CARDIAC PATCH WITH DECELLULARIZED
MYOCARDIAL TISSUE**

GÖKÇE KAYNAK BAYRAK

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

GÖKÇE KAYNAK BAYRAK'ın hazırladığı “Hücrelerinden Arındırılmış Miyokardiyal Doku ile Hücre Tabakası Destekli Kalp Yaması Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ
Başkan



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



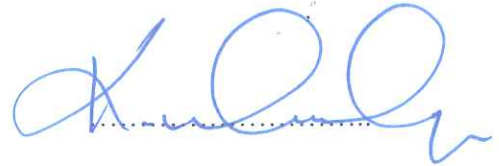
Prof. Dr. Mehlika PULAT
Üye



Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR
Üye



Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

- 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 tahrifat yapmadığımı,
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13 / 02 / 2019



Gökçe KAYNAK BAYRAK

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarda kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yüksek Öğretim Kurulu tarafından yayınlanan *“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”* kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

13 / 02 / 2019



GÖKÇE KAYNAK BAYRAK

ÖZET

HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMIŞ MİYOKARDİYAL DOKU İLE HÜCRE TABAKASI DESTEKLİ KALP YAMASI GELİŞTİRİLMESİ

Gökçe KAYNAK BAYRAK

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Şubat 2019, 174 sayfa

Sunulan tez çalışmasında kardiyovasküler hücre tabakası ve hücrelerinden arındırılmış miyokardiyal hücre dışı matrisin (ECM) birleştirilmesi ile kalp yaması üretilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada doku mühendisliğinin yenilikçi yaklaşımları arasında yer alan “hücre tabaka teknolojisi” ve “hücresizleştirme yaklaşımı” birleştirilmiştir. Böylece, kalp hastalıklarının tedavisi için kullanılabilecek *in vitro* kalp doku modeli geliştirilmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, kardiyovasküler hücre tabakalarının üretiminde kullanılan, H9C2 sıçan kardiyomiyoblast hücre hattı ve primer sıçan kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri (KMEH)’nin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından, yalnızca H9C2 hücre hattı kullanılarak hücre tabakası üretmek için 3 farklı yöntem, sıcaklık duyarlı kültür kapları, yüksek hücre ekim yoğunluğu ve serum konsantrasyonu ve askorbik asit (AA) uygulaması, kullanılmıştır. Genel olarak tüm hücre tabakalarında canlılığın yüksek oranda korunduğu ve hücre tabakalarının sırası ile kültürün 7., 9. ve 5. günlerinde başarılı şekilde yüzeyden kaldırıldığı belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin hücre kültür kabı yüzeyinden, hücre ekim yoğunluğundan ve kültür ortamındaki AA ve serum konsantrasyonundan

etkilendiği gözlenmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analiz sonuçları, poli(izopropil akrilamid) (PIPAAm) kaplı kültür yüzeyinin iskelet kası spesifik L-tipi voltaj bağımlı Ca^{+} kanalı (Alfa 1s, *Cacna1s*) gen ifadesini arttırdığını, düşük hücre ekim yoğunluğunun ise *Cacna1s* ve kardiyak troponin T (*Tnnt2*) ekspresyonunu azalttığını ve kollajen I (*Col1a1*) gen ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Kültür ortamında yüksek serum konsantrasyonu ve AA kullanılması ile hücrelerin *Col1a1* gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Askorbik asitin etkisi değerlendirildiğinde, normal serum içeren ortamda H9C2 hücrelerinin miyojenik karakterinde artış meydana geldiği, ancak, yüksek serum ile birlikte 100 µg/mL AA kullanıldığında kardiyomiyojenik karakteri yüksek hücre tabakalarının üretildiği belirlenmiştir.

Kardiyovasküler hücre tabakalarının üretilmesi için, öncelikle H9C2 hücreleri retinoik asit (RA; 10 nM, 50 nM ve 100 nM) içeren ortamda farklı sürelerde (5 ve 7 gün) kültüre edilmişler ve kardiyomiyosit hücrelerine farklılaştırılmışlardır. İmmüno Floresan boyama ve RT-PCR analizleri sonucunda 5 gün süresince 100 nM konsantrasyonda RA uygulamasının farklılaşma için en uygun koşul olduğu belirlenmiştir. Ardından farklılaştırılmış H9C2 hücreleri ve KMEH'leri ko-kültür şeklinde (6:1) farklı konsantrasyonlarda AA (20, 50, 100 µg/mL) ve serum (%10.5 ve %15.0 v/v) içeren ortamlarda kültüre edilmişlerdir. Tüm gruplarda yüksek oranda canlılık gösteren hücre tabakası elde edilmesine rağmen, %10.5 (v/v) FBS ve 100 µg/mL AA konsantrasyonda kardiyomiyojenik özelliklerin en yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kalp yaması üretimi için bu koşullarda elde edilen hücre tabakaları kullanılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, kalp yamasının ikinci bileşeni olarak, hücreleştirilmiş miyokardiyal ECM iskele üretimi için 2 farklı yöntem (SDS ve OGP) kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), immüno Floresan boyama, histolojik boyama ve DNA analizi sonuçları hücreleştirilmenin SDS yönteminde başarılı şekilde gerçekleştirildiğini ve doğal doku ile karşılaştırıldığında DNA içeriğinde ~%89 oranında azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca gerçekleştirilen hidroksiprolin, GAG analizi ve sitotoksikite testi ile yöntemin ECM yapısına zarar vermediği ve hücrelere toksik kimyasal kalıntı bulundurmadığı belirlenmiştir.

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AKMKH) ve KMEH'ler kullanılarak, hücreleştirilmiş ECM iskele üzerinde 2 haftalık *in vitro* ko-kültür çalışması gerçekleştirilmiştir. Kardiyomiyojenik farklılaşmayı uyarmak için 24 sa süresince 5-Azasitidin (5-Aza) uygulaması yapılmıştır. Hücrelerin, kültür süresince, canlılıklarını yüksek oranda korudukları ve iskele içerisinde damar benzeri lümen yapıları oluşturdukları belirlenmiştir. Ancak, yapılan analizler (immünofloresan boyama ve RT-PCR) 5-Aza'nın, kalp ECM nişi üzerindeki AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında tek başına yeterli olmadığını göstermiştir.

Kardiyovasküler hücre tabakası destekli miyokardiyal yamanın üretilmesi için AKMKH ve KMEH ekimi gerçekleştirilmiş ECM iskele yapısı, elde edilen kardiyovasküler hücre tabakası ile birleştirilmiştir. Kardiyomiyojenik farklılaşmanın desteklenmesi için 24 sa 5-Aza uygulaması yapılmıştır. 5-Aza'nın, kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür etkisi yardımıyla, ECM nişi üzerindeki AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını desteklediği gözlenmiştir. RT-PCR sonuçları hücrelerin *Tnnt2* ve *Gata4* gen ekspresyonlarında artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca, kimyasal uyarıcı ajan bulunmadığı durumda, kalp ECM nişi ve kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültürün de AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir.

Çalışma kapsamındaki tüm sonuçlar değerlendirildiğinde sıcaklık duyarlı kültür kaplarının kullanımına gerek duyulmadan hücre tabakalarının başarılı şekilde elde edilebildiği belirlenmiştir. Ayrıca, AKMKH'lerin kalp ECM nişi, kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür ve 5-Aza'nın üçlü sinerjik etkisi ile kardiyomiyojenik farklılaştırılabildiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, damarlanma potansiyeli yüksek bir *in vitro* kalp doku modeli ortaya konmuştur. Üretilen kalp yamasının, sıçanlar üzerinde gerçekleştirilecek *in vivo* deneylerde kullanıma uygun olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda başarılı sonuçlar alındığı takdirde, yamanın klinik çalışmalara uyarlanarak, kalp hasarlarında alternatif bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kalp doku mühendisliği, Hücre tabaka teknolojisi, Hücreleştirilmiş ECM iskele, Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre, Askorbik asit, Retinoik asit, 5-Azasitidin.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CELL SHEET SUPPORTED CARDIAC PATCH WITH DECELLULARIZED MYOCARDIAL TISSUE

Gökçe KAYNAK BAYRAK

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Şubat 2019, 174 sayfa

The aim of this thesis is to produce a heart patch by combining cardiovascular cell sheet and decellularized myocardial extracellular matrix (ECM). In the study, two innovative approaches of tissue engineering, “cell sheet technology” and “decellularization approach” were combined. Thus, *in vitro* heart tissue model, which can be used for the treatment of heart diseases, has been developed.

In the first step of the thesis study, characterization studies of H9C2 rat cardiomyoblast cell line and primary rat cardiac microvascular endothelial cells (CMEC), used in the production of cardiovascular cell sheets, were performed. Then, 3 different methods, temperature responsive culture plates, high cell seeding density and serum concentration and ascorbic acid (AA) treatment, were used to produce cell sheet using only H9C2 cell line. In general, it has been determined that the viability of all cell sheets is highly conserved and the cell sheets were successfully removed from the culture surface on days 7, 9 and 5 of the culture, respectively. In addition, it was observed that the gene expression levels of the cells were influenced by the nature of the cell culture dish surface, cell seeding density and AA and serum concentration in the culture medium. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis results demonstrated the poly(isopropylacrylamide) (PIPAAm)-coated culture surface

enhanced gene expression of skeletal muscle specific L-type voltage-dependent Ca^{+} channel (Alpha 1s, *Cacna1s*), while low cell seeding density decreased the expression of *Cacna1s* and cardiac troponin T (*Tnnt2*), but increased collagen I (*Col1a1*) gene expression. It has been shown that *Col1a1* gene expression of the cells increased with the use of high serum concentration and AA in culture medium. When the overall effect of ascorbic acid was evaluated, it was determined that myogenic character of H9C2 cells increased in normal serum containing medium, but, cell sheets having high cardiomyogenic character were produced in case of high serum with 100 $\mu\text{g/mL}$ AA.

In order to produce cardiovascular cell sheets, at first H9C2 cells were cultured in retinoic acid (RA; 10 nM, 50 nM and 100 nM) containing medium at different time periods (5 and 7 days) and differentiated into cardiomyocyte cells. As a result of the analyzes (immunofluorescence staining and RT-PCR), it was determined that 100 nM RA treatment for 5 days was the most appropriate condition for differentiation. Subsequently, differentiated H9C2 cells and CMECs (6:1) were co-cultured in media containing different AA (20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) and serum (10.5% and 15.0% v/v) contents. Although high levels of viable cell sheets were obtained in all groups, it was determined that cardiomyogenic properties were highest in 10.5% (v/v) FBS and 100 $\mu\text{g/mL}$ AA concentration. Therefore, cell sheets obtained in these conditions were used for the production of heart patches.

Two different methods (SDS and OGP) were used for the production of decellularized myocardial ECM scaffolds, which is the second component of the heart patch. Scanning electron microscope (SEM), immunofluorescence staining, histological staining and DNA analysis showed that decellularization was performed successfully with SDS method and compared to native tissue there was ~89% reduction in DNA content. Otherwise, hydroxyproline assay, GAG analysis and cytotoxicity test showed that the SDS method did not damage the ECM structure and did not contain toxic chemical residues to the cells.

A 2-week *in vitro* co-culture study was performed on the decellularized ECM scaffold using adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) and CMECs. 5-Azacytidine (5-Aza) was applied for 24 h to stimulate cardiomyogenic differentiation. It has been

determined that the cells maintain high viability during culture and form vascular-like lumen structures in the scaffold. However, the analyzes (immunofluorescence staining and RT-PCR) showed that 5-Aza alone was not sufficient for the cardiomyogenic differentiation of ADMSCs on the heart ECM niche.

ECM scaffold seeded with ADMSCs and CMECs was combined with cardiovascular cell sheet to produce the cardiovascular cell sheet supported myocardial patch. To support cardiomyogenic differentiation, 5-Aza treatment for 24 h was applied. It has been observed that, 5-Aza supports the cardiomyogenic differentiation of ADMSCs on the ECM niche with the help of direct co-culture with cardiomyocytes. RT-PCR results showed an increase in *Tnnt2* and *Gata4* gene expression of the cells. Furthermore, in the absence of a chemical stimulant agent, heart ECM niche and direct co-culture with cardiomyocytes were also found to support the cardiomyogenic differentiation of ADMSCs.

It was determined that cell sheets could be produced successfully without the use of temperature responsive culture plates. Besides, it has been observed that ADMSCs could be differentiated cardiomyogenic with the triple synergistic effect of cardiac ECM niche, direct co-culture with cardiomyocytes and 5-Aza. In conclusion, an *in vitro* heart tissue model with high vascularization potential has been demonstrated. It has been shown that the produced heart patch is suitable for use in *in vivo* experiments on rats. If successful results were obtained in these studies, it was determined that the patch could be considered as an alternative approach in heart damage by adapting the clinical studies.

Keywords: Heart tissue engineering, Cell sheet technology, Decellularized ECM scaffold, Adipose-derived mesenchymal stem cell, Ascorbic acid, Retinoic acid, 5-Azacytidine.

TEŞEKKÜR

Lisans öğrencisi olduğum dönemde gerçekleştirilen bir seminerde, anlattığı çalışmaları ile beni çok heyecanlandırarak Hacettepe Üniversitesi'ne gelmeme vesile olan, yalnızca akademik başarısı ile değil, insani değerleri ile de her zaman örnek alacağım, hayatımın dönüm noktalarında ve çalışmalarımda karşılaştığım zorlayıcı anlarda desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bana cesaret veren değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimde bana **2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı** kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK**'a ve tez çalışmamda **FBA-2017-16248** numaralı Kapsamlı Araştırma Projesi ile maddi destek sağlayan **HÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitiminde kendisinden aldığım dersler ile doğru yerde olduğumu hissettiğim ve gelecekteki yolumu çizdiğim değerli hocam **Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan**'a, laboratuvarında staj yaparak tanıma fırsatı bulduğum, tez izleme komitemde de yer alan değerli hocam **Prof. Dr. Kezban Ulubayram**'a, laboratuvar olanakları ile tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım **Prof. Dr. Mehmet Ali Onur**'a, **Prof. Dr. Nurhayat Barlas**'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitiminde başlayan tanışıklığımızın, aynı zamanda Hacettepe'ye gelmemizle birlikte değerli bir arkadaşlığa dönüştüğü, tez çalışmamın ve hayatımın kafa karıştıran zamanlarında beni sakinleştiren ve destek olan arkadaşım **Dr. Öğr. Üyesi Merve Çapkın Yurtsever**'e, hayatımda ayrı bir yeri olan arkadaşım **Özge Ekin Akdere**'ye, yol göstericiliği ile sanırım yalnız benim değil tüm tanıdığı insanların zor zamanlarda fikir danışabileceği arkadaşım **Dr. Öğr. Görevlisi Anıl Sera Çakmak**'a, iç güzelliğinin yüzüne yansıdığını düşündüğüm arkadaşım **Dr. Öğr. Üyesi Işıl Gerçek Beşkardeş**'e, hem neşeli hem depresif olabilmeyi aynı anda başarabilen arkadaşım **Dr. Arş. Gör. Damla Çetin Altındal**'a ve ihtiyaç duyduğum zamanlarda çekinmeden yardımlarını isteyebildiğim **Dr. Arş. Gör. Soner Çakmak**'a ve **Dr. Öğr. Üyesi Murat Şimşek**'e, beraber deney yaparken eğlendiğim **Burcu Sarıkaya**'ya ve **Aşlı Sena Karanfil**'e, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım **Şeyma Bektaş Tercan**'a, **Elvan Konuk**'a, **Tuğçe Gültan**'a, **Gülnehal Tok İlhan**'a, **Dr. Arş. Gör. Ülkü Bozoğlu**'na **Gülseren Irmak**'a, **Demet Çakır**'a, **Tülay Selin Ertekin**'e, **Sena Koç**'a, **Ayfer Koyuncu**'ya, **Hala Jarrar**'a ve tüm **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu**'ndaki değerli arkadaşlarıma ve tez çalışmamda sorularımı yanıtsız bırakmayan Hacettepe Biyoloji Bölümü'nden **Dr. Esin Akbay Çetin**'e ve **Dr. Elif Karacaoğlu**'na teşekkür ederim.

Hayattaki en vazgeçilmezlerim güzel aileme, öncelikle benim ben olmamı sağlayan, emeklerinin karşılığını ne yapsam ödeyemeyeceğim, hala hayatımın en büyük yardımcısı olan, mükemmel bir insan ve anne olmayı onun gibi başarabilmeyi dilediğim **Canım Annem Lütfiye Kaynak**'a her koşulda arkamda duran, kararlılığı, okuma ve öğrenme azmini hayranlıkla örnek aldığım, başarılarımın en büyük destekçisi **Canım Babam Güngör Kaynak**'a, artık bir öğretmen olup minik öğrencilerini yetiştirse de benim için hep küçük kalan, belki de sahiplenmeyi ve sorumluluk almayı onunla öğrendiğim **Canım Kardeşim Gökay Kaynak**'a, bana sevgisini her fırsatta hissettiren, birlikte bir aile kurmanın zorluklarını yaşayarak öğrendiğimiz ve büyüdüğümüz **Canım Eşim Emre Bayrak**'a ve varlığını ilk öğrendiğim andan itibaren bana hayatımda tatmadığım duyguları yaşatan, doğduğu andan itibaren hep iyikim dediğim ve varlığı için şükrettiğim tatlı cadım, **Canım Kızım Belis Yaz Bayrak**'a **Sonsuz Teşekkürler, iyi ki varsınız, SİZİ ÇOK SEVİYORUM.**

Gökçe KAYNAK BAYRAK

Şubat 2019, Ankara.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER.....	xiii
ŞEKİLLER	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kalp Doku Mühendisliği	5
2.1.1. Kalbin Yapısı ve Özellikleri.....	5
2.1.1.1. Kalbin Embriyolojik Gelişimi	6
2.1.1.2. Kalbin Anatomisi	7
2.1.1.3. Kalbin Histolojisi	9
Kalp Kasının Özellikleri.....	11
2.1.1.4. Kalbin Fizyolojisi.....	13
Kasılma Mekanizması	13
İletim Sistemi, Uyarı ve Kontrol Mekanizması	14
2.1.2. Kalp Doku Mühendisliği Yaklaşımı	15
2.1.2.1. Kalp Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri	19
2.1.2.2. Kalp Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Türleri	22
2.2. Doku Mühendisliğinde HücreSizleştirme Yaklaşımı	25
2.2.1. HücreSizleştirme İşleminde Kullanılan Ajanlar ve Uygulama Yöntemleri ..	27
2.2.2. HücreSizleştirilmiş ECM Karakterizasyonu	31
2.2.3. Bozunma Mekanizması	32
2.2.4. Yeniden Hücrelendirme	33
2.2.5. Kalp Doku Mühendisliğinde HücreSizleştirilmiş İskeleler	34
2.3. Hücre Tabaka Teknolojisi	37
2.3.1. Hücre Tabakalarının Oluşturulmasında Alternatif Yaklaşımlar	39
Askorbik Asit Uygulaması	39
2.3.2. Hücre Tabaka Teknolojisinin Avantajları ve Dezavantajları	40

2.3.3. Kalp Doku Mühendisliğinde Hücre Tabakası Çalışmaları	41
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	43
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	43
3.2. Deneysel Çalışmalar	45
3.2.1. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretiminde Kullanılacak Hücrelerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	45
3.2.1.1. H9C2 Kardiyomiyoblast Hücre Hattı	45
Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi.....	45
Morfolojik İnceleme	46
3.2.1.2. Primer Sıçan Kardiyak Mikrovasküler Endotel Hücreleri.....	47
Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi.....	47
Morfolojik İnceleme	47
<i>In Vitro</i> Tübül Oluşumu.....	48
3.2.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları	48
3.2.2.1. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi	49
Sıcaklık-Duyarlı Hücre Kültürü Kapları.....	49
Yüksek Hücre Ekim Yoğunluğu ve FBS Konsantrasyonu.....	49
Askorbik Asit Uygulaması.....	49
3.2.2.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları ..	50
Canlı/Ölü Hücre Boyama.....	50
İmmünofloresan Boyama.....	50
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi	50
3.2.3. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretimi	52
3.2.3.1. H9C2 Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Çalışmaları.....	52
PrestoBlue Analizi	53
İmmünofloresan Boyama.....	53
RT-PCR	54
3.2.3.2. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretilmesi ve Karakterizasyon Çalışmaları	54
PrestoBlue Analizi	55
Canlı/Ölü Hücre Boyama.....	55

RT-PCR Analizi	56
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	56
Histolojik Boyama.....	56
3.2.4. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Üretimi	58
3.2.4.1. SDS Yöntemi.....	59
3.2.4.2. OGP Yöntemi	59
3.2.5. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Karakterizasyonu	60
3.2.5.1. SEM Analizi.....	60
3.2.5.2. İmmünofloresan Boyama	60
3.2.5.3. DNA Analizi	61
3.2.5.4. Histolojik Boyama.....	61
3.2.5.5. Kollajen Analizi	61
3.2.5.6. Glikozaminoglikan Analizi	62
3.2.5.7. Sitotoksite Testi	62
3.2.6. AKMKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu	63
3.2.7. Hücresizleştirilmiş ECM İskele Üzerinde Ko-Kültür ve Kardiyomiyojenik Farklılaşma Çalışmaları ile Miyokardiyal Yama Üretimi.....	64
3.2.7.1. SEM Analizi.....	66
3.2.7.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama	66
3.2.7.3. Histolojik Boyama.....	66
3.2.7.4. İmmünofloresan Boyama	66
3.2.7.5. RT-PCR.....	67
3.2.8. Kardiyovasküler Hücre Tabakaları ile Desteklenmiş Miyokardiyal Yama Üretimi	68
3.2.8.1. SEM Analizi.....	69
3.2.8.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama	69
3.2.8.3. Histolojik Boyama.....	70
3.2.8.4. İmmünofloresan Boyama	70
3.2.8.5. RT-PCR.....	70
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	71
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	72

4.1. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretiminde Kullanılacak Hücrelerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	72
4.1.1. H9C2 Kardiyomiyoblast Hücre Hattı	72
4.1.1.1. Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi	73
4.1.1.2. Morfolojik İnceleme	74
4.1.2. Sıçan Kalp Mikrovasküler Endotel Hücreleri.....	77
4.1.2.1. Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi	77
4.1.2.2. Morfolojik İnceleme	78
4.1.2.3. <i>İn Vitro</i> Tübül Oluşumu.....	81
4.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları	83
4.2.1. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi	83
4.2.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları	89
4.2.2.1. Canlı/Ölü Hücre Boyama.....	89
4.2.2.2. İmmünofloresan Boyama.....	92
4.2.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi	95
4.3. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretimi	99
4.3.1. H9C2 Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Çalışmaları.....	99
4.3.1.1. PrestoBlue Analizi	99
4.3.1.2. İmmünofloresan Boyama.....	100
4.3.1.3. RT-PCR	105
4.3.2. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretilmesi ve Karakterizasyon Çalışmaları	106
4.3.2.1. PrestoBlue Analizi	110
4.3.2.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama.....	111
4.3.2.3. RT-PCR Analizi.....	113
4.3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	115
4.3.2.5. Histolojik Boyama	116
4.4. Hücreleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Üretimi	116
4.4.1. SDS Yöntemi	116
4.4.2. OGP Yöntemi	117
4.5. Hücreleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Karakterizasyonu.....	117

4.5.1. SEM Analizi	118
4.5.2. İmmüno Floresan Boyama	120
4.5.3. DNA Analizi	120
4.5.4. Histolojik Boyama.....	121
4.5.5. Kollajen Analizi	122
4.5.6. Glikozaminoglikan Analizi	123
4.5.7. Sitotoksikite Testi	124
4.6. AKMKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu	125
4.7. Hücreleştirilmiş ECM İskele Üzerinde Ko-Kültür ve Kardiyomiyojenik Farklılaşma Çalışmaları ile Miyokardiyal Yama Üretimi.....	127
4.7.1. SEM Analizi	129
4.7.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama	131
4.7.3. Histolojik Boyama.....	133
4.7.4. İmmüno Floresan Boyama	133
4.7.5. RT-PCR.....	135
4.8. Kardiyovasküler Hücre Tabakaları ile Desteklenmiş Miyokardiyal Yama Üretimi	136
4.8.1. SEM Analizi.....	137
4.8.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama	139
4.8.3. Histolojik Boyama.....	141
4.8.4. İmmüno Floresan Boyama	141
4.8.5. RT-PCR.....	142
5. GENEL SONUÇLAR	145
KAYNAKLAR.....	149
EK 1 Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	165
ÖZGEÇMİŞ	170

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kalp doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan hücrelerin avantaj ve dezavantajları.	24
Çizelge 2.2. Hücresizleştirme işleminde kullanılan ajanlar ve uygulama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları.	29
Çizelge 2.3. Miyokardiyal kesitlerinde uygulanan hücresizleştirme yöntemleri.....	36
Çizelge 2.4. Kalp rejenerasyonu amacıyla yapılan hücre tabaka çalışmaları.	42
Çizelge 3.1. RT-PCR analizlerinde kullanılan genlerin primer dizileri.	52
Çizelge 4.1. Kardiyomiyoblast hücre tabakaları elde etmek için uygulanan yöntemler.	83

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Kalbin iç yapısı .	7
Şekil 2.2.	Perikardiyum altında kalbin dış görünümü ve damarları.	8
Şekil 2.3.	Kalp duvarını oluşturan tabakalar	10
Şekil 2.4.	Kalp kasının şematik gösterimi	13
Şekil 2.5.	Kalp doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan farklı yaklaşımlar.	18
Şekil 2.6.	Kalp doku mühendisliği uygulamalarında biyomateryaller	22
Şekil 2.7.	Hücreleştirilmiş iskelelerin rejeneratif tıp alanında uygulaması	25
Şekil 2.8.	Hücre tabaka temelli doku mühendisliği pek çok farklı doku/organda uygulanmaktadır .	38
Şekil 3.1.	Kardiyovasküler hücre tabakası elde etmek için uygulanan çalışma planı.	55
Şekil 3.2.	Miyokardiyal yama üretimi için uygulanan çalışma planı.	65
Şekil 3.3.	Miyokardiyal yama üretiminin şematik gösterimi.	66
Şekil 3.4.	Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama elde etmek için uygulanan çalışma planı.	69
Şekil 3.5.	Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama üretim aşamalarının şematik gösterimi.	69
Şekil 4.1.	H9C2 hücrelerine ait a) MTT analizi sonucu elde edilen, b) Hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre üreme grafikleri.	73
Şekil 4.2.	H9C2 hücrelerinin kristal viyole boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları: a, b, e, f, i, j)10 X; c, g, k)20 X; d, h, j) 32 X.	75
Şekil 4.3.	H9C2 hücrelerinin immüno Floresan boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları: a, b, e, f, i, j)10 X; c, g, k)20 X; d, h, j) 32 X. Hücre çekirdekleri mavi, F-aktin filamentleri ise yeşil renkte boyanmıştır.	76
Şekil 4.4.	Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerine ait a) MTT analizi sonucu elde edilen, b) Hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre üreme grafikleri.	78

Şekil 4.5.	Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin kristal viyole boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları: a, b, e, f)10 X; c, g)20 X; d, h) 32 X.	79
Şekil 4.6.	Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin immünofloresan boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları: a, b, e, f)10 X; c, g)20 X; d, h)32 X.	80
Şekil 4.7.	Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin anti-VWF immünofloresan boyama fotoğrafları: a) 20 X, b) 32 X.	81
Şekil 4.8.	<i>In vitro</i> tübül oluşum analizi sonucu elde edilen yapının optik mikroskop fotoğrafları (10 X, bar 200 µm).	82
Şekil 4.9.	<i>In vitro</i> tübül oluşum analizi (yüksek hücre ekim yoğunluğu) sonucu elde edilen yapının VEGF (–) (a, b) ve VEGF (+) (c, d) ortamdaki canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: a ve c) 4 X, bar 500 µm; b ve d) 10 X, bar 200 µm.	83
Şekil 4.10.	Sıcaklık-duyarlı kültür kabı (a, b, c, d) ve yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu (e, f, g, h) yöntemi ile elde edilen hücre tabakalarının optik mikroskop fotoğrafları: a ve e) yüzeyden kaldırılmadan önce (20 X), b ve f) yüzeyden kaldırıldıktan sonra (20 X), c ve g) tutunmadan 3 ve 1 gün sonra (20 X), d ve h) tutunmadan 3 ve 1 gün sonra (4 X). Barlar 20 X’de 100 µm, 4 X’de 500 µm’yi işaret etmektedir.	86
Şekil 4.11.	AA uygulaması (Y-FBS, %20) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c), yüzeyden kaldırıldıktan sonra (d, e, f) ve yeni yüzeye tutunmadan 1 gün sonra (g, h, i) optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 µm.	87
Şekil 4.12.	AA uygulaması (N-FBS, %10) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c, d), yüzeyden kaldırmak için DPBS uygulaması sonrasında (e) ve yeni yüzeye tutunmadan 1 gün sonra (f, g, h) optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 µm.	88
Şekil 4.13.	Yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu ile AA uygulanan (Y-FBS, 20 µg/ml) grupta gözlenen miyotüp benzeri yapıların optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 µm.	89

- Şekil 4.14. Sıcaklık-duyarlı kültür kapları (a, b), yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu (c) ve AA uygulaması (Y-FBS; d ve g 20 µg/ml AA; e ve h 50 µg/ml AA; f ve i 100 µg/ml AA) ile elde edilen H9C2 hücre tabakalarına ait yüzeyden kaldırma öncesi (a, c, d, e, f) ve kaldırma sonrası tutunmadan 1 gün sonra (b, g, h, i) canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 10 X, bar 200 µm.90
- Şekil 4.15. AA uygulaması (N-FBS) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c) ve yeni yüzeye tutunmadan 1 gün sonra (e, f, g) canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 10 X, bar 200 µm.....91
- Şekil 4.16. Sıcaklık-duyarlı kaplar (a, b), yüksek hücre/serum konsantrasyonu (c) ve AA uygulaması (Y-FBS, d ve g 20 µg/ml AA; e ve h 50 µg/ml AA; f ve i 100 µg/ml AA) ile elde edilen H9C2 hücre tabakalarına ait yüzeyden kaldırma öncesi (a, d, e, f) ve kaldırma sonrası tutunmadan 1 gün sonra (b, c, g, h, i) immünofloresan boyama fotoğrafları: 20 X. Bar 100 µm....93
- Şekil 4.17. AA uygulaması (N-FBS) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c, d) ve kaldırma sonrası tutunmadan 1 gün sonra (e, f, g) immünofloresan boyama fotoğrafları: 20 X.....94
- Şekil 4.18. Farklı kültür kabı yüzey materyali (a) ve hücre ekim yoğunluğunun (b) bağlı gen ifadeleri üzerindeki etkisini gösteren RT-PCR analiz grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4; * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001.97
- Şekil 4.19. AA uygulaması ve FBS konsantrasyonunun bağlı gen ifadeleri üzerindeki etkisini gösteren RT-PCR analiz grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=5; N-FBS ve Y-FBS grupları kendi arasında kontrole göre * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001, 20 µg/ml AA grubuna göre # p<0.05; Y-FBS grubu, N-FBS grubuna göre + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001.....98
- Şekil 4.20. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait PrestoBlue grafiği. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3, aynı gün kontrole göre * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; 20 nM RA grubuna göre ++ p<0.01, +++ p<0.001; 50 nM RA grubuna göre # p<0.05, ### p<0.001.100

Şekil 4.21. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait optik ve floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılmış fotoğrafları a)kontrol, b)10 nM, c)50 nM, d) 100 nM RA (20 X).	101
Şekil 4.22. Sıçan kalp dokusuna ait immüno floresan Anti-MLC2 (a, b) ve Anti-TNT (c, d) boyamalar, a ve c) 10 X, b ve d) 32 X.	102
Şekil 4.23. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait 5. (a, b, c, d) ve 7. (e, f, g, h) gün Anti-MLC2 immüno floresan boyama fotoğrafları: kontrol (a ve e), RA uygulaması b ve f) 10 nM, c ve g) 50 nM, d ve h) 100 nM RA: 20 X.	103
Şekil 4.24. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait 5. (a, b, c, d) ve 7. (e, f, g, h) gün Anti-TNT immüno floresan boyama fotoğrafları: kontrol (a ve e), RA uygulaması b ve f) 10 nM, c ve g) 50 nM, d ve h) 100 nM RA: 20 X. ...	104
Şekil 4.25. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait bağıl gen ifadesini gösteren RT-PCR grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, her gün kendi arasında kontrol grubuna göre *p<0,05, ** p<0.01; 10 nM RA grubuna göre ## p<0.01; 50 nM RA grubuna göre +p<0.05.	106
Şekil 4.26. Kaldırma öncesi kardiyovasküler hücre tabakalarına ait optik mikroskop fotoğrafları: 10 X.	109
Şekil 4.27. Kardiyovasküler hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılıp yeni yüzeye tutunmasından 1 gün sonra optik mikroskop fotoğrafları: 10 X.	110
Şekil 4.28. Ko-kültür hücre tabakalarına ait prestoblue grafiği. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, günler kendi arasında %10.5 (v/v) FBS gruplarına göre * p<0.05, **** p<0.0001.	111
Şekil 4.29. Yüzeyden kaldırma öncesi kardiyovasküler hücre tabakalarına ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 10 X.	112
Şekil 4.30. Yüzeyden kaldırma sonrası kardiyovasküler hücre tabakalarına ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 10 X.	113
Şekil 4.31. AA uygulaması ve FBS konsantrasyonunun kardiyovasküler hücre tabakasında bağıl gen ifadeleri üzerindeki etkisini gösteren rt-pcr analiz grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3; %10.5 (v/v) ve %15 (v/v) FBS grupları kendi arasında kontrole göre + p<0.05; 50 µg/ml AA	

grubuna göre $p < 0.05$; %15 (v/v) FBS grubu, %10.5 (v/v) FBS grubuna göre * $p < 0.05$	114
Şekil 4.32. Kardiyovasküler hücre tabakalarına ait SEM fotoğrafları: a ve b) farklılaştırılmamış H9C2/endotel hücre tabakası, c ve d) kardiyomiyosite farklılaştırılmış H9C2/endotel hücre tabakası: a ve c) 200 X, bar 500 μm ; b ve d) 5,000 X, bar 20 μm	115
Şekil 4.33. Kardiyovasküler hücre tabakasına ait dikey (a) ve yatay (b) kesit H&E boyama fotoğrafları: 20 X, bar 200 μm	116
Şekil 4.34. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (a), OGP yöntemi (b) ve SDS yöntemi (c) uygulanmış kalp kesitlerine ait makroskopik fotoğraflar.	118
Şekil 4.35. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (a, b), OGP yöntemi (c, d) ve SDS yöntemi (e, f) uygulanmış kalp kesitlerine ait SEM fotoğrafları: a, c ve e) 500 X, bar 100 μm ; b, d ve f) 2,500 X, bar 20 μm	119
Şekil 4.36. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (a), OGP yöntemi (b) ve SDS yöntemi (c) uygulanmış kalp kesitlerine ait immüno Floresan fotoğraflar: 20 X, bar 100 μm	120
Şekil 4.37. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve OGP yöntemi ya da SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait dna analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=3$; kontrol grubu doğal doku ise ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; kontrol grubu OGP ise +++ $p < 0.001$	121
Şekil 4.38. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış doğal doku (a, b, c) ve SDS yöntemi uygulanmış (d, e, f) kalp kesitlerine ait H&E boyama görüntüleri: a, b, d, e) 20 X, bar 200 μm ; c, f) 40 X, bar 100 μm	122
Şekil 4.39. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve OGP yöntemi ya da SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait hidroksipirolin analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=3$; kontrol grubu doğal doku ise * $p < 0.05$	123
Şekil 4.40. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait GAG analizi sonuçları.	124
Şekil 4.41. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait sitotoksite çalışmasında gerçekleştirilen MTT analizi sonuçları.	124

Şekil 4.42. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait sitotoksosite çalışmasında L929 hücrelerini gösteren optik mikroskop fotoğrafları: 10 X.	125
Şekil 4.43. İzole edilen farklı pasaj numarasına (P1-P6) sahip AKMKH'lere ait optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 µm.	126
Şekil 4.44. a)1:1, b)3:1 ve c)6:1 oranda karıştırılan ortamda kültüre edilen AKMKH ve endotel hücre ko-kültür çalışmasına ait 9. gün optik mikroskop fotoğrafları: 10 X, bar 200 µm.....	129
Şekil 4.45. 1:1, 3:1 ve 6:1 oranda karıştırılan ortamda kültüre edilen AKMKH ve endotel hücre ko-kültür çalışmasına ait MTT analizi sonuçları.	129
Şekil 4.46. Miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e)1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.	130
Şekil 4.47. Miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e)1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.	131
Şekil 4.48. Miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.....	132
Şekil 4.49. Miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.....	132
Şekil 4.50. Miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait dikey (a, b, d, e) ve yatay (c, f) kesit H&E boyama fotoğrafları: a, d) 20 X, bar 200 µm; b ve e) 40 X, bar 100 µm; c ve f) 20 X, bar 200 µm.....	133
Şekil 4.51. Miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b) ve farklılaşma grubuna (c, d) ait immünofloresan boyama fotoğrafları: 20 X, bar 200 µm.....	135
Şekil 4.52. Miyokardiyal yama kültüründe kontrol ve farklılaşma grubuna ait bağıl gen ifadelerini gösteren RT-PCR analiz grafiği, n=3.....	136

- Şekil 4.53. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e) 1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.....138
- Şekil 4.54. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e) 1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.....138
- Şekil 4.55. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.....140
- Şekil 4.56. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.....140
- Şekil 4.57. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait dikey (a, b, d, e) ve yatay (c, f) kesit H&E boyama fotoğrafları: a, d, f) 20 X, bar 200 µm; b ve e) 40 X, bar 100 µm; c ve f) 20 X, bar 200 µm.141
- Şekil 4.58. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b) ve farklılaşma grubuna (c, d) ait immünofloresan boyama fotoğrafları: 20 X, bar 200 µm.142
- Şekil 4.59. Hüresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde kültüre edilen kardiyovasküler hücre tabakasının ve kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yamanın kontrol ve farklılaşma gruplarına ait bağıl gen ifadelerini gösteren RT-PCR analiz grafikleri: a) tabaka ve ko-kültür gruplarına ait kontrol gruplarının ve farklılaşma gruplarının karşılaştırılması, b) tabaka ve ko-kültür gruplarının kendi içinde kontrol ve farklılaşma gruplarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3; a) kontrol grubu tabaka, b) kontrol grubu kontrol ise * p<0.05, ** p<0.01.144

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ca^{+2}	Kalsiyum
CO_2	Karbon Dioksit
H^+	Hidrojen
Hcl	Hidroklorik Asit
K^+	Potasyum
Mg^{+2}	Magnezyum
MgCl	Magnezyum Klorür
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	Magnezyum Klorür Hekzahidrat
Na^+	Sodyum
Na_2EDTA	Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
O_2	Oksijen
t	Zaman
v/v	Hacim/Hacim Oranı
w/v	Kütle/Hacim Oranı
x	Hücre Sayısı
α	Alfa
β	Beta
μ	Özgöl Üreme Hızı

Kısaltmalar

5-Aza	5-Azasitidin
AA	Askorbik Asit
ADAMTS	Trombospondin Motifli Metalloproteinazlar
AKMKH	Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre

Alfa 1C, <i>Cacna1c</i>	Kardiyak Spesifik L-Tipi Voltaj Bağımlı Ca ⁺ Kanalı
Alfa 1S, <i>Cacna1s</i>	İskelet Kası Spesifik L-Tipi Voltaj Bağımlı Ca ⁺ Kanalı
ATP	Adenozin Trifosfat
ATPaz	Adenozin Trifosfataz
bFGF	Bazik Fibroblastik Büyüme Faktörü
BMP	Kemik Morfojenik Proteini
BrdU	5-Bromo-2'-Deoksiüridin
BSA	Sığır Serum Albümini
cDNA	Komplementer DNA
CX43, <i>Cx43</i>	Konneksin 43
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECM	Hücre Dışı Matris
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EdU	5-Etinil-2'-Deoksiüridin
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EKG	Elektrokardiyografi
ENT-1, <i>Slc29a1</i>	Dengeleyici Nükleozid Taşıyıcı-1
ERK	Ekstraselüler Sinyal İlişkili Kinaz
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerika Gıda ve İlaç İdaresi Başkanlığı
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
g	Gram
GAG	Glikozaminoglikan
<i>Gata4</i>	Kardiyak Transkripsiyonel Düzenleyici
H&E	Hematoksilen & Eozin
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HMDS	Hekzametildisilazan
İPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

KMEH	Kardiyak Mikrovasküler Endotel Hücre
Kol-I, <i>Col1a1</i>	Kollajen Tip 1 A1
MAPK	Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MLC2	Miyozin Hafif Zincir 2
MMP	Matris Metalloproteinazlar
N-FBS	Normal-FBS konsantrasyonu
OGP	Oktil-B-D-Glukopiranosid
PBS-A	%1 (w/v) BSA Çözeltisi (PBS İçinde)
PEG	Polietilen Glikol
PFA	Paraformaldehit
PGA	Poliglikolik Asit
PGS	Poligliserol Sebakat
PIPAAm	Poliizopropil Akrilamid
PLA	Polilaktik Asit
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florür
PVDF	Poliviniliden Florür
RA	Retinoik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sa	Saat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SIS	İnce Bağırsak Submukozası
TCPS	Polisitiren Hücre Kültür Kabı
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TNT	Kardiyak Troponin T
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VWF	Von Willebrand Faktör
Y-FBS	Yüksek-FBS konsantrasyonu
α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification

1. GİRİŞ

Kalp hastalıkları dünya çapındaki ölümlerin yaklaşık %40'ına neden olan sosyo-ekonomik boyutu önemli hastalıklar gurubunda yer almaktadır (Chaudhuri ve ark., 2017). Akut ya da kronik kalp hasarında esas problem, yetişkin kardiyomiyositlerin bölünme yeteneklerini kaybetmiş olmaları ve hasar sonrası bölgede bulunan kardiyak kök hücrelerinin, onarım için yeterli sayıda olmamasıdır. Dolayısı ile, hasarlı bölgede bir yara (skar) dokusu oluşur ve kalp, kasılma fonksiyonunu doğru şekilde gerçekleştiremez. Bu durumda uygulanması gereken, yara dokusu oluşumunun engellenmesi ya da bu dokunun fonksiyonel sağlıklı doku ile değiştirilmesidir (Curtis ve Russel, 2009). Mevcut tedavilerde sağ kalımı arttırmak için farmakolojik terapiler, kardiyak resenkronizasyon terapisi ya da mekanik destek cihazları kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler, kısıtlı sayıdaki hastanın tedavisine uygulanabilmektedir. Terapötik alanlardaki tüm gelişmelere rağmen ileri evre kalp hastalıklarında son çare kalp transplantasyonudur. Kalp transplantasyonu iyileştirici bir tedavi olanağı sunmakla birlikte, verici yetmezliği nedeniyle uygulanması kısıtlanmış durumdadır. Bu nedenle, organ bağımsız tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir (Sanchez ve ark., 2015; Fujita ve Zimmermann, 2018).

Klinik uygulamaların ilk yaklaşımı hasarlı bölgeye sağlıklı hücrelerin enjeksiyonu şeklindedir. Ancak, hücre ölümü, hücrelerin bölgede stabil kalmaması ve hücresel entegrasyonun sağlanamaması tedavinin başarısızlığına neden olmaktadır. İkinci yaklaşımda ise “**kalp doku mühendisliği**” uygulamaları ile hasarlı kalp kasının etkin şekilde onarılması ya da yeni doku ile değiştirilmesi amaçlanmaktadır. Bunun için kullanılan destekleyici biyomateryaller kalp kası hücreleri için gerekli nişi sağlamaktadırlar. Biyomateryallerin, şekil, boyut ve kimyası, hücrelerin tutunma, sinyalizasyon ve farklılaşma süreçlerini etkilemektedir (Curtis ve Russel, 2009; Pecha, Eschenhagen ve Reichenspurner, 2016). Bu nedenle kullanılacak doku iskelesinin doğal miyokardiyal matris yapısını taklit etmesi, uygun gözeneklilik ile damarlanmayı desteklemesi ve mekanik özellikleri ile kasılmaya uygun olması gerekmektedir (Chaudhuri ve ark., 2017).

Doku mühendisliğinin güncel uygulamalarından biri olan “**hücresizleştirme yaklaşımı**” ile üretilen hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (ECM) iskeleler, doğal dokuya en yakın özellikleri sağlayacağı için iskele materyali olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Hücre dışı matris içerisindeki yapısal ve fonksiyonel proteinler, glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar, kollajen ve fibronektin gibi diğer moleküllerin arasında dokuya özgü olarak yerleşmektedir. Bu yapı, aynı zamanda büyüme faktörleri ve biyoaktif peptidler için de bir kaynak oluşturmaktadır. Bu faktörler hücre fonksiyon ve farklılaşma için belirleyici nişi oluştururlar (Brown and Badylak, 2014). Hücresizleştirme yaklaşımında, doku ya da organın doğal ECM yapısı korunur, hücre bileşenler çeşitli fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemler uygulanarak uzaklaştırılır (Üçgül ve Aras, 2017). Ayrıca korunmuş damar ağı ve azaltılan immün yanıt hücresizleştirilmiş iskelelerin getirdiği önemli avantajlardır (Chaudhuri ve ark., 2017). Ancak, geliştirilen pek çok hücresizleştirme yöntemine rağmen ideal hücresizleştirme ve yeniden hücrelendirme yöntemi belirlenememiştir (Feng ve ark., 2017).

Hücre enjeksiyonunun dezavantajlarını ortadan kaldırmak için iskele temelli doku mühendisliğinin yanında yeni bir yaklaşım sayılan “**hücre tabaka teknolojisi**”de kalp doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre tabaka teknolojisi, sıcaklık-duyarlı kültür kaplarının üretilmesi ile gündeme gelmiştir. İlerleyen yıllarda ise başta askorbik asit kullanımı olmak üzere pek çok farklı yöntem uygulanarak ve farklı hücre türleri kullanılarak hücre tabakaları elde edilmiştir (Matsuura ve ark., 2013; Kirby ve ark., 2018). Hücre tabaka yaklaşımı, doku iskelesi kullanılmadığı için, buna bağlı meydana gelecek enflamatuvar yanıtın ya da fibröz doku oluşumunun engellenmesini sağlamaktadır. Ayrıca kolaylıkla 3B yapı oluşturulabilmesi, kolay manipüle edilebilmesi ve alıcı dokuya kolaylıkla transplante edilebilmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Tabakaların kırılkan olması ve elde edilen tek tabakanın kalınlık kısıtının bulunması ise hücre tabaka teknolojisinin dezavantajlarını oluşturur (Masuda ve ark., 2008; Chaudhuri ve ark., 2017).

Fonksiyonel kalp doku yamasının geliştirilmesinde kullanılacak hücre için kesin bir kaynak belirlenememiştir. Ancak yetişkin kök hücreler en olası kaynak olarak görülmektedir (Curtis ve Russel, 2009). Kök hücre tedavisi, hasarlı kalpteki kardiyak hücrelerini ve kardiyak fonksiyonunu desteklemek için umut verici terapötik seçenek

haline gelmiştir. **Mezenkimal kök hücreler** (MKH'ler), bu amaçla en sık kullanılan hücrelerdir ve yüksek miktarda üretilibilmeleri, otolog ya da allojenik kullanıma uygun olmaları sağladıkları avantajlar arasındadır. Yapılan çalışmalarda miyogenez ve anjiyogenezi destekledikleri, kendileri doğrudan kardiyomiyositlere farklılaşmasa da parakrin etki ile salgıladıkları anjiyogenik ajanlar ve büyüme faktörlerinin kardiyoprotektif özellik gösterdiği belirtilmiştir. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AKMKH'ler) kolay elde edilebilmeleri ve kemik iliğinden daha fazla MKH popülasyonuna sahip olmaları açısından avantaj sağlamaktadır (Chiu ve Rasidic, 2013; Galvez-Monton ve ark. 2013; Ishida ve ark., 2015; Tachida ve ark., 2016).

Sunulan tez çalışmasında kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş hücrelerinden arındırılmış miyokardiyal doku kullanılarak bir kalp yamasının elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk önce H9C2 kardiyomiyoblast hücre hattı ve 3 farklı yöntem (sıcaklık duyarlı hücre kültürü kapları, yüksek hücre ekim yoğunluğu ve serum konsantrasyonu ve askorbik asit uygulaması) kullanılarak kardiyomiyoblast hücre tabakaları elde edilmiş ve tabakaların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından, en uygun yöntem olarak belirlenen, askorbik asit uygulaması yöntemi ile kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri (KMEH) ve kardiyomiyosit hücrelerine farklılaştırılmış H9C2 hücreleri kullanılarak kardiyovasküler hücre tabakaları üretilmiştir. Elde edilen hücre tabakalarının özellikleri çeşitli analizler ile belirlenmiştir. Kalp yamasının ikinci bileşeni olan, miyokardiyal doku iskelesinin üretimi için sıçan kalbinden alınan kesitler 2 farklı yöntem (sodyum dodesil sülfat ,SDS, ve oktil- β -D-glukopiranosid ,OGP, yöntemi) kullanılarak hücresizleştirilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda SDS yönteminin hücresizleştirme işleminde başarılı olduğuna karar verilmiştir. AKMKH'leri, KMEH'ler ile ko-kültür şeklinde hücresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde kültüre edilmiş ve kimyasal uyarıcı ajan (5-Azasitidin, 5-Aza) varlığında kardiyomiyojenik farklılaşma potansiyeli incelenmiştir. Tez çalışmasının son aşamasında ise AKMKH ve KMEH ekimi gerçekleştirilen hücresizleştirilmiş ECM iskele, kardiyovasküler hücre tabakası ile birleştirilmiş ve 5-Aza varlığında kültüre edilmiştir. Böylece hedeflenen kalp yamasının üretimi gerçekleştirilmiştir. Kültür süresince yapılan çeşitli analizler ile uygun niş, doğrudan ko-kültür ve kimyasal farklılaşma ajanının sinerjik etkileri ile AKMKH'lerin

kardiyomiyojenik farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kardiyomiyojenik özellikleri ve damarlanma potansiyeli yüksek bir kalp yaması modelinin geliştirilmesi açısından değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Genel bilgiler bölümünde ilk önce kısaca kalbin yapısı, embriyolojik gelişimi, anatomisi, histolojisi ve fizyolojisinden bahsedilmiştir. Daha sonra kalp hasarlarının tedavisinde kalp doku mühendisliği yaklaşımında kullanılan doku iskeleleri ve hücre türleri açıklanmıştır. Tez kapsamında uygulanan, doku mühendisliğinde hücreleştirme yaklaşımı ve bu amaçla kullanılan ajanlar, hücreleştirilen ECM iskelelerin karakterizasyonu, bozunma mekanizması, yeniden hücrelendirme ve kalp doku mühendisliği alanındaki kullanımları hakkında bilgi verilmiştir. Ardından hücre tabaka teknolojisi, hücre tabakalarının oluşturulmasında kullanılan alternatif yaklaşımlar ve hücre tabaka teknolojisinin avantaj ve dezavantajları kısaca açıklanmıştır.

2.1. Kalp Doku Mühendisliği

2.1.1. Kalbin Yapısı ve Özellikleri

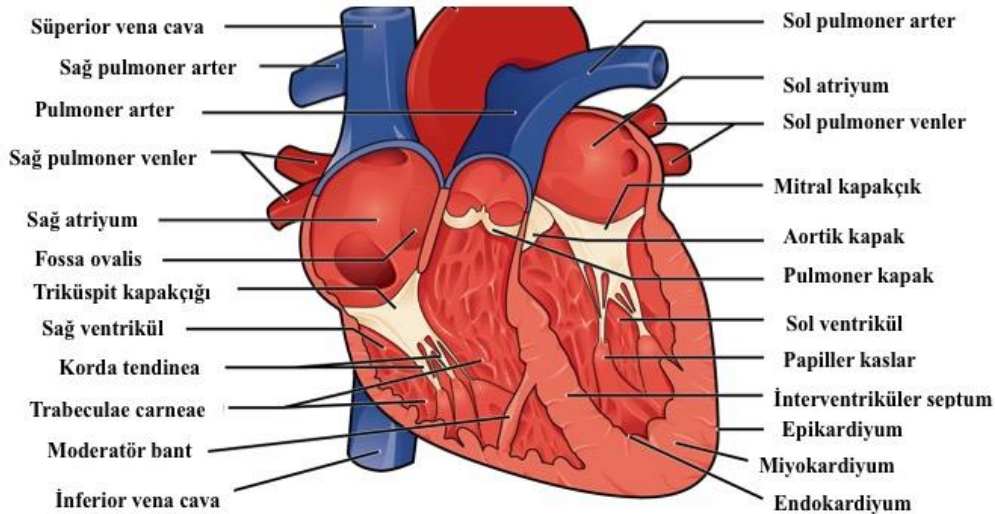
Kalp, göğüs kafesinin *mediastinum* adı verilen boşluğunda, akciğerler arasında sola yakın bir bölgede bulunan, kardiyovasküler sistemi meydana getiren arterler ve venler aracılığıyla vücuda kanı pompalamak ile görevli musküler bir organdır. Kalbin önünde göğüs kemiği *sternum*, arkasında omurga kemikleri bulunur, bu haliyle tabanı yukarıda, tepe noktası aşağıda olan bir çam kozalağına benzemektedir. Kalp diğer organlardan *perikardiyum* adı verilen bir zar ile ayrılmakta olup, perikardiyal boşluk adı verilen bir alana yerleşmiş durumdadır. Ortalama bir kalp yaklaşık olarak yumruğumuzun büyüklüğündedir (12 cm uzunluğunda, 8 cm genişliğinde ve 6 cm kalınlığında). Cinsiyetler arasında karşılaştırıldığında ise bir kadının kalp ağırlığı yaklaşık 250-300 g iken bir erkeğin kalp ağırlığı yaklaşık olarak 300-350 g olarak ölçülmektedir. Spor yapan kişilerde, bu ağırlıklar miyosit hacminin egzersiz ile artmasına bağlı olarak biraz daha fazla olabilir (Anatomy and Physiology, 2013; Iaizzo, 2005; Bouten ve ark., 2011). Sağlıklı bir yetişkin kalbi günde ortalama 10^5 , yaşam boyu 3×10^9 kez vücuda kan pompalar. Kalp mekanik fonksiyonunu yerine getirmek üzere gerekli oksijen ve besin ihtiyacını vücuttaki kanın yaklaşık %5'ini kullanarak karşılamaktadır (Bouten ve ark., 2011).

2.1.1.1. Kalbin Embriyolojik Gelişimi

İnsan kalbi gelişim sırasında oluşan ilk fonksiyonel organdır. Fertilizasyondan yaklaşık 3 hafta sonra atmaya ve kan pompalamaya başlar. Kalp embriyonik dokuda mezoderm kökenli olarak, embriyonun baş bölgesine yakın bir kardiyojenik alanda gelişmeye başlar (Moorman ve ark., 2003). Bu gelişimde kemik morfojenik proteini (BMP) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyalizasyonu önemli rol oynar (Chien, Domian and Parker., 2008). Primer ve sekonder kalp alanı, kardiyak nöral krest ve proepikardiyum, kalp gelişimindeki 4 temel embriyonik bölgedir. İnsan gelişiminin 15. gününde primitif çizgi oluşur ve çizgi boyunca göç eden ilk mezodermal hücreler kalbe farklılaşan hücrelerdir. Öne ve yana yerleşen hücreler primer kalp alanını oluşturur. Bunlar miyokardiyal ve endokardiyal öncül hücrelerdir. Endoderm kaynaklı kimyasal sinyallerin de etkisi ile 2 şerit halinde kardiyojenik kord oluşur ve bunların gelişmesi ile endokardiyal tüpler meydana gelir. Üçüncü haftada endokardiyal tüplerin füzyonu ile miyokardiyum hücreleri bir matris salgılar ve kardiyak jel adı verilen bu tabaka miyokardiyum ve endokardiyumu birbirinden ayırır. Yirmi ikinci günde lineer kalp tüpü atmaya başlar, 22-28. günler arasında kalbin katlanma ve halka yapısını almaya başlamasıyla epikardiyal hücreler kalbin etrafını sarar ve kalp endokardiyum, kardiyak jel, miyokardiyum ve epikardiyumdan oluşan 4 tabaka haline gelir. Sekonder kalp alanı kalbin çıkış yollarını meydana getirir. Kardiyak nöral krest ise primer ve sekonder kalp alanı dışında kalan nöral tüpten kaynaklanan hücrelerdir. Gelişimin 3-4. haftalarında nöral tüpten ayrılıp, 5-6. haftalarda kalbin gelişen çıkış yollarına doğru hareket eder ve ventriküller ile çıkış yollarının doğru şekilde ayrılmasında görev alırlar. Kalbin bir çember yapısı meydana getirmesi epikardiyumun miyokardiyumu çevrelemesi ile başlar. Mezoderm kaynaklı olan proepikardiyal hücreler, koroner damar ağı ve miyokardiyum gelişiminde önemli rol oynar. Embriyonik kalp 11. haftada anatomik ve fonksiyonel olarak tamamen oluşmuştur. Doğuma kadar olan süreçte kalp hücre bölünmesi ile büyümeye devam eder, doğumdan sonraki 1-2 hafta içerisinde ise büyüme hücre hipertrofisi, yani hücrenin sayıca değil hacimce artmasına bağlı olarak gerçekleşir. Sonuçta olgun kardiyak hücrelerinin çoğu bölünme yeteneklerini kaybeder. Kalbin gelişim evrelerinin bilinmesi doğuştan kalp hastalıklarının etiyolojisi için ipuçları oluşturmaktadır (Anatomy and Physiology, 2013; Martinsen and Lohr, 2005).

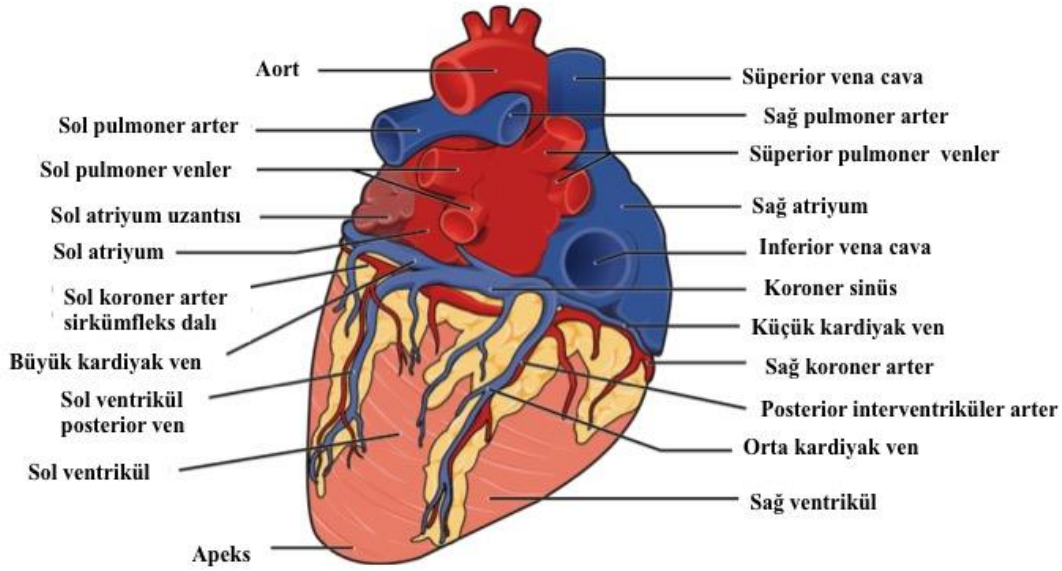
2.1.1.2. Kalbin Anatomisi

Kalp, *septum* adı verilen miyokardiyum ve endokardiyumun uzantısından meydana gelen yapılar ile 4 bölmeye ayrılmış durumdadır. Üst kısımda sağ ve sol atriyumlar, alt kısımda ise sağ ve sol ventriküller bulunur (Haschek, Rousseaux and Wallig, 2010). İki atriyumu ayıran bölme interatriyal septum, ventrikülleri ayıran bölme interventriküler septum, atriyum ve ventrikülleri birbirinden ayıran bölme ise atriyoventriküler septum olarak adlandırılır. Atriyoventriküler septumda kanın atriyumdan ventriküle, ventriküllerden ise pulmoner dolaşıma ya da aorta geçmesini sağlayan 4 adet kapakçık bulunmaktadır. Kanın tek yönlü olarak atriyumdan ventriküle geçişini sağlayan kapakçıklar “atriyoventriküler” (solda biküspit, mitral, sağda triküspit), aorta ve pulmoner dolaşıma geçişini sağlayanlar ise “aortik ve pulmoner semilunar kapakçıklar” olarak adlandırılmaktadır. Kalbin iç yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Sağ atriyum, süperior vena kava ve inferior vena kava ile koroner sinüsün, sistemik dolaşımdan kalbe getirdiği karbondioksitçe zengin kanın toplandığı bölme olarak görev alır. Sağ ventrikül, sağ atriyumdan gelen kanı akciğerlere pompalamaktadır. Bu sırada oluşan basınç nedeniyle kanın atriyumlara geri dönmesini önlemek için kapakçıkların ventriküler yüzey ile bağlantılarını sağlayan özel kas ve bağ doku yapıları bulunmaktadır. Pulmoner damarlarda meydana gelen gaz değişiminden sonra oksijence zengin kan kalbe sol atriyumdan giriş yapar ve mitral kapakçıktan sol ventriküle geçer. Sol ventrikülün kasılması ile kan aortik semilunar kapakçıktan geçerek aort ile sistemik dolaşıma gönderilir.



Şekil 2.1. Kalbin iç yapısı (Anatomy and Physiology, 2013’den değiştirilerek).

Kalbin yaşam boyu kritik ve sürekli aktivitesi, kardiyomiyositlerin diğer hücrelere göre enerji ihtiyacının daha fazla olmasına, dolayısı ile kan dolaşımına daha çok ihtiyaç duymasına neden olmaktadır. Kalbin kendi içerisindeki kan dolaşımı koroner sirkülasyon olarak adlandırılır, koroner arter ve venler yardımı ile gerçekleşir. Kalbe ait damarlar Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Sol koroner arter, kalbin sol atriyumu, ventrikülü ve interventriküler septumuna kan dolaşımını sağlar. Buradan ayrılan sirkümfleks arterin kolları sağ koroner arterin kolları ile birleşmektedir. Sol koronerden ayrılan ikinci büyük arter, kalbin sol ön inen arteri (left anterior descending artery; LAD) olarak adlandırılır ve oluşturduğu küçük kollar posterior interventriküler arterin kolları ile birleşip anastomoz yapabilir. Kalpteki anastomoz bölgelerinin çok az olması ve koroner arterin herhangi bir nedenle tıkanması bu damar tarafından beslenen hücrelerin ölmesine, yani miyokardiyal enfarktüs ile sonuçlanmasına neden olmaktadır. Sağ koroner arter, posterior interventriküler arter ve marjinal arter ile kalbin sağ bölümüne dolaşımı sağlamaktadır. Koroner venler ise kalp tarafından kullanılan kanın tekrar kalbe geri dönmesini sağlar ve genellikle arterlere paralel olarak yerleşmişlerdir. Büyük kardiyak ven başta anterior interventriküler arter ile birlikte ilerlerken posterior, orta ve küçük kardiyak veni yapısına alır ve kardiyak sinüs ile sağ atriya bağlanır (Weinhaus and Roberts, 2005; Akhter, 2011).



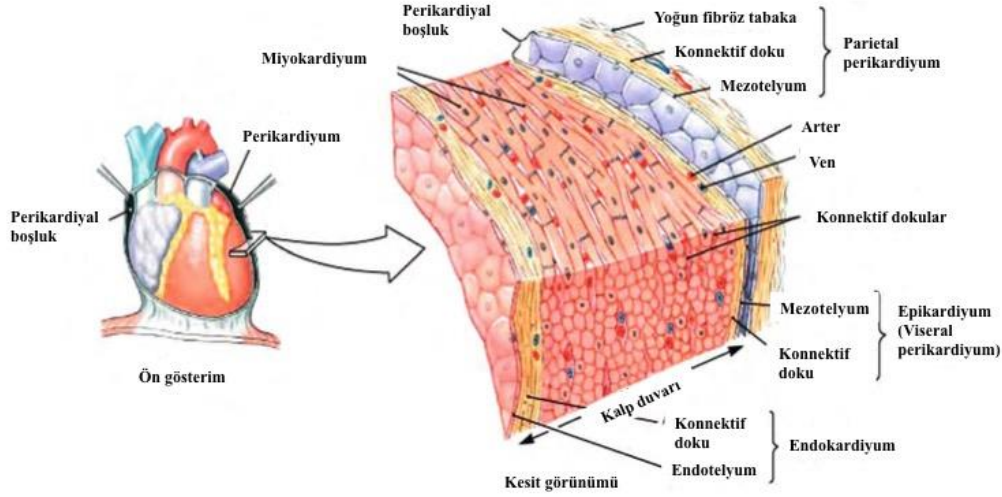
Şekil 2.2. Perikardiyum altında kalbin dış görünümü ve damarları (Anatomy and Physiology, 2013’den değiştirilerek).

2.1.1.3. Kalbin Histolojisi

Kalp kendisine ait büyük damarların duvarlarına ve diyaframa yapışık olarak bulunan perikardiyum kesesi içerisinde yerleşmiştir. Perikardiyum, yoğun olarak tip I ve III kollajen fiberlerinin arasına yerleşmiş elastik fiberlerden meydana gelmiştir ve iki ayrı katmandan oluşur: dışta bulunan fibröz perikardiyum ve içteki seröz perikardiyum. Fibröz perikardiyum, kalbin göğüs kafesi içindeki pozisyonunu sağlayan ve onu dış etmenlere karşı koruyan sert, yoğun bağ dokusundan meydana gelmektedir, kollajen ve elastin fiberler içerir. Daha hassas olan seröz perikardiyum iki tabakadan oluşur: fibröz perikardiyum ile birleşmiş olan parietal perikardiyum ve kalp ile birleşerek kalp duvarının bir parçası olan iç viseral perikardiyum (epikardiyum). Epikardiyum ve parietal perikardiyum arasında yer alan perikardiyal boşluk seröz bir sıvı ile doludur. Epikardiyumun serbest yüzeyinde yassı epitel hücrelerinden oluşan mezotelyum tabakası bulunur. Bu hücreler perikardiyal boşluk içerisinde bulunan ve kasılma sırasında sürtünme etkisini azaltan seröz sıvıyı salgılamaktadırlar. Epikardiyum, mezotelyumu destekleyen fibroelastik bağ dokusu ve aradaki ince bir yağ dokusu ile miyokardiyuma bağlanır (Hoit, 2017).

Kalbin esas yapısını oluşturan kalp duvarının enine kesiti incelendiğinde farklı kalınlıklara sahip 3 katmandan oluştuğu görülmektedir (Şekil 2.3). Dıştan içe doğru epikardiyum, miyokardiyum ve endokardiyum olarak sayılabilir. En dıştaki epikardiyum (viseral perikardiyum) tabakası perikardiyumun en iç katmanıdır. Ortadaki en kalın tabaka çoğunlukla kardiyomiyositlerin oluşturduğu miyokardiyumdur. Yapı içinde ayrıca kollajen fiberler, kalbi besleyen kan damarları ve düzenleyen sinir fiberleri bulunur. Kalp kası, hücrelerin oluşturduğu girdap şekli ile kalp odacıklarının etrafını sararak mükemmel bir yapı oluşturur. Bu “8” benzeri motif ile kalp, kanı lineer bir dizilime göre çok daha kolay ve etkin şekilde pompalayabilmektedir (Van Vleet, Ferrans and Herman, 2002; Anatomy and Physiology, 2013). Sağ ve sol ventrikül kasılmada eşit miktarda kan pompalamalarına rağmen sol ventrikülün kanı sistemik dolaşıma pompalaması nedeniyle çok daha yüksek basınç oluşturması gerekmektedir, bu nedenle sol ventrikül daha kalın (8-15 mm) bir kas duvarına sahipken sağ ventrikül daha ince (4-5 mm) bir duvara sahiptir (Bouten ve ark., 2011). En içteki yassı epitel hücrelerinden oluşan endokardiyum tabakası ise ince bir bağ dokusu ile miyokardiyuma

bağlanır ve kanın dolaştığı tüm odacıklar ile kalp kapakçıklarını kaplayarak kan damarlarının endotel katmanını olarak devam eder (Anatomy and Physiology, 2013; Haschek, Rousseaux and Wallig, 2010).



Şekil 2.3. Kalp duvarını oluşturan tabakalar (Weinhaus ve Roberts, 2005'ten değiştirilerek).

Kalp temel olarak kardiyomiyositler, fibroblastlar, endotel hücreler, perisitler ve düz kas hücrelerini içeren hücresel bileşenler ve hücreler arasında yer alan hücre dışı matristen (ECM) oluşmaktadır. Kardiyomiyositler kalbin temel fonksiyonel kasılabilen hücreleridir. Kalp fibroblastları ise kollajen, fibronektin ve laminin gibi hücre dışı matris komponentlerinin üretilmesinden sorumludur. Kardiyomiyosit ve endotel hücrelerin aksine stromal boşlukta bulunurlar. Bu özellikleri sayesinde enfarktüs gibi durumlarda hasarlı bölgeye göç edip hızlıca doku hacmi ve matris bileşenlerinin yeniden düzenlenmesini sağlamaktadırlar. Uygun uyarı altında, nispeten durgun fibroblastlar aktif bir kasılma fenotipi edinebilir ve fibroblastların tipik olmayan birkaç düz kas hücre markırını ve kontraktıl proteinleri eksprese edebilirler. Kardiyak iskeletini oluşturan kollajen ağ, fibroblastların miyositler üzerinde kuvvet uygulamasına ve ayrıca ECM'nin bozunması ve sentezi yoluyla dış uyaranlara yanıt vermesine izin verir. Ayrıca fibroblastlar komşu kardiyomiyosit ve endotel hücreleri ile heterotipik bağlantıları oluştururlar. Fibroblast ve miyositler arasındaki hücre-hücre etkileşimi miyokardiyum kasılmasının uzun menzilli senkronizasyonunu sağlamaya yardımcı olur (Alessandra, 2014; Valiente-Alandi, Schafer ve Blaxall., 2016).

Kalp ECM yapısında pek çok kollajen izoformu (~%85 kollajen tip I), elastin, laminin, fibronektin, hiyalüronik asit, glikozaminoglikan (GAG), kondroitin sülfat proteoglikanları, heparin sülfat ile çeşitli büyüme faktörleri yüksek organizasyonda üç boyutlu yapı içerisinde dizilmiştir (Godier-Furnemont ve Vunjak-Novakovic, 2012; Shahabipour ve ark., 2017). Bu elemanların her biri farklı yollarda görev almaktadır. Proteoglikanlar ve GAG'lar gelişim ve hastalıkların oluşumu sırasında önemli rol oynamaktadırlar. Hiyalüronik asit gelişen kalpte hücrel çoğalma ve göçü desteklerken, kondroitin sülfatlar epitel mezenkimal geçiş ile endokardiyal oluşum, kalbin özelleşmesi ve kapakçık oluşumunda görevlidir. Kollajen ise birincil yük taşıyan proteindir, elastisite ile birlikte, sistol sırasında dayanılan yükü aktarırken, diyastol sırasında pasif sağlamlık sağlar (Godier-Furnemont ve Vunjak-Novakovic, 2012). Fibronektin ise integrin, proteoglikan ve kollajen ile etkileşerek hücrel tutunmayı sağlar. Hücre dışı matrisin yeniden düzenlenmesi büyüme faktörleri, sitokinler ve küçük peptidler gibi faktörlerin salımı için önemlidir ve matris metalloproteazlar (MMP) tarafından gerçekleştirilir (Moroni ve Mirebella, 2014). Gelişim süresince ECM'deki kollajen sentezi, fibronektin ekspresyonu ve biyoaktif moleküllerin oranları değişim göstermektedir. (Williams ve ark., 2014). Miyokardiyal ECM, doku desteği oluşturma yanında hücre sağ kalımı, hareketleri ve çoğalmasını düzenleyen hücre-hücre etkileşimleri için sinyal taşıyıcı görevi görmektedir. Matris homeostazının bozulması kardiyak fonksiyonel bozukluklarına, hasar sonrası fibröz doku oluşumuna ve patolojik yeniden düzenlenmeye neden olur. Kardiyak hasarında fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşürler ve iyileşmeyi düzenleyici pek çok ECM proteini salgırlar, yapılan yanlış ECM sentezi ise kalp sertleşmesi ve kasılma bozukluklarına neden olmaktadır (Moroni ve Mirebella, 2014; Valiente-Alandi, Schafer ve Blaxall., 2016).

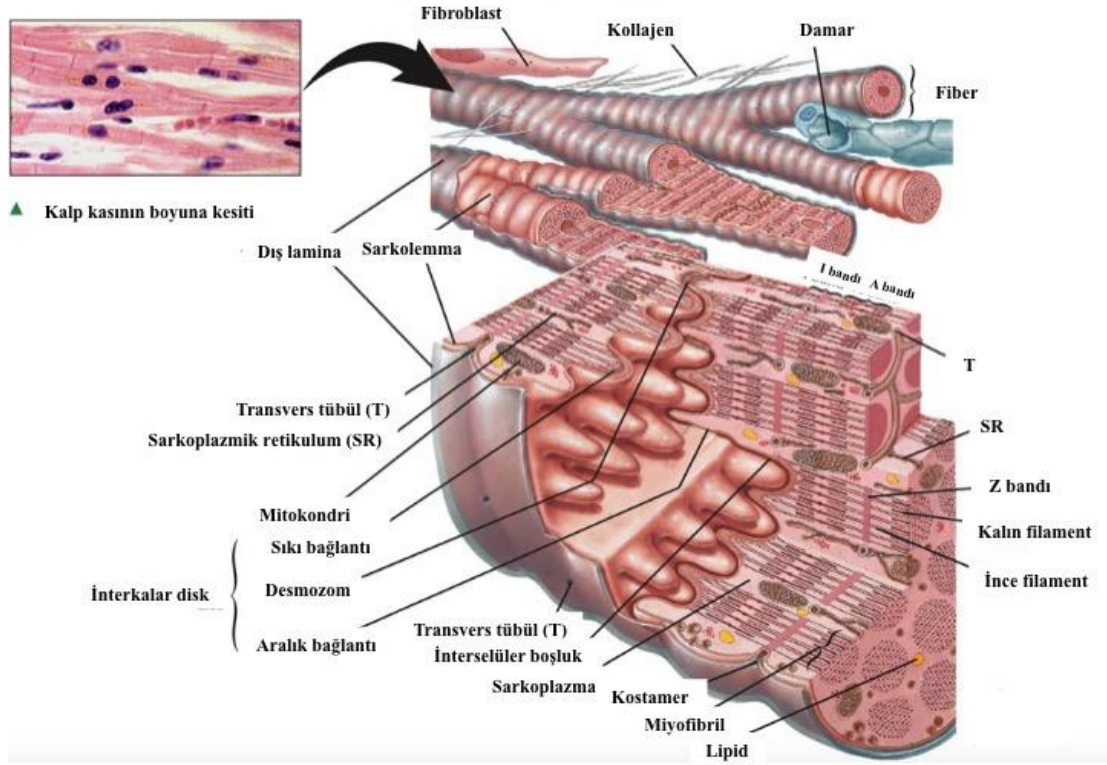
Kalp Kasının Özellikleri

Kalpte kasılabilen ve iletken olmak üzere 2 farklı miyosit hücresi bulunmaktadır. Kasılabilen hücreler atriyum ve ventriküllerin ~%99'unu oluştururken, iletken hücreler kalpteki aksiyon potansiyelinin iletiminden sorumludur. Purkinje hücreleri dışındaki diğer iletken hücreler kasılabilen hücrelere göre daha küçüktürler ve fonksiyonel olarak nöronlara benzeyen özelleşmiş kas hücreleridir (Anatomy and Physiology, 2013). Kalp

kası hücreleri, merkezi çekirdek bulundurması, istem dışı ve sürekli kasılması açısından düz kasa benzerken, iskelet kasına benzer şekilde miyofilament ve fibrillerin en küçük fonksiyonel ünite olan sarkomerler halinde düzenlenmesine bağlı olarak enine çizgilenme gösterir. Ancak kalp kasında daha fazla mitokondri bulunur, sarkoplazmik retikulum ise iskelet kası kadar yaygın değildir. Kalp kası hücrelerinin en önemli özellikleri kollateraller (yan kollarla) ile birbirlerine bağlanmasıdır. Bu bağlantı bölgeleri “interkalar diskler” olarak adlandırılır ve kas içerisinde senkronize kasılmayı sağlamaktadır. İnterkalar disklerin yapısında, hücreleri birbiri ile ve hücre iskeletini hücre dışı matris ile bağlayan sıkı bağlantılar, kalp hücrelerinin kasılma sırasında ayrılmasını önleyen desmozomlar ve hücreler arasında iyon geçişine izin vererek uyarının iletilmesini sağlayan aralık bağlantı bölgeleri bulunmaktadır (Ackermann, Hu, ve Kontogianni-Konstantopoulos, 2012; Anatomy and Physiology, 2013).

Kontraktıl proteinlerinin dizilimi kalp kası ve iskelet kası hücrelerinde benzerlik gösterir. Sarkomer yapısı ince ve kalın filamentlerden meydana gelmiştir. Kalın filamentler miyozin proteinlerinden oluşur ve sarkomerde miyozinlerin bulunduğu bölgeler A bandını oluşturur. A bandı miyozinlerin uç bölgelerinde aktin filamentlerinin de bir kısmını içerir. Yalnızca miyozinlerin bulunduğu bölge H bandı olarak adlandırılır. Miyozin aktine bağlanarak motor protein görevi görür ve kasılma fonksiyonunu gerçekleştirir. A bantlarının arasında kalan ince filamentlerin oluşturduğu bölgeler ise I bandı olarak adlandırılır ve Z çizgisi ile ortadan ikiye ayrılmıştır. İnce filamentlerin omurgasını aktin proteinleri oluşturmalarına rağmen düzenleyici tropomiyozin ve troponin proteinlerini de içerir. Troponin; kalsiyum bağlayan troponin C, kasılmayı inhibe eden troponin I ve troponin kompleksini tropomiyozin ve aktine bağlayan troponin T alt ünitlerinden oluşmuştur (Barnett, 2005). Hücre membranının (sarkolemma) iç kısımlara kıvrılmasıyla meydana gelen ve elektriksel uyarının hücre içine iletilmesini sağlayan transvers tübüller (T-tübül) iskelet kasında A ve I bandının birleşme bölgesinde bulunurken kalp kasında sarkomer birleşme bölgelerinde bulunurlar. Kalpte sarkoplazmik retikulumda az miktarda kalsiyum iyonu depolanır, bu nedenle kasılmada görevli iyonların çoğu hücre dışından geldiği için kasılma yavaş başlatılmaktadır. Ayrıca kalp kası hücreleri, otoritmik kasılma özelliği ile aksiyon potansiyelini başlatabilir ve kasılmanın sabit bir hızda hücreden hücreye yayılmasını

sağlayabilir (Anatomy and Physiology, 2013). Kalp kasının şematik gösterimi Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Kalp kasının şematik gösterimi (Ovalle ve Nahirney, 2013'ten değiştirilerek).

2.1.1.4. Kalbin Fizyolojisi

Kasılma Mekanizması

Kalbin temel fonksiyonu, kasılma ile kanın pompalanmasını sağlamaktır. Kasılma mekanizması temelde, ince filamentlerin kalın filamentler üzerinde kayması ile sarkomer boyunun kısalmasına dayanır ve kayan iplikçikler hipotezi ile açıklanır. Dinlenme durumunda bir kasta tropomiyozin aktine, miyozin başının aktin bağlanma bölgesine bağlanmasını engelleyecek şekilde bağlanmıştır. Fakat uyarının başlaması, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması ve kalsiyumun troponin C'ye bağlanması ile konformasyonel bir değişiklik meydana gelir, böylece aktin üzerinde kapanan bölgeler açılır. Miyozin başı aktine bağlanır, bu sırada miyozin başındaki adenozin trifosfaz (ATPaz) enzimi adenozin trifosfatı (ATP) parçalar, açığa çıkan enerji ile aktin filamentler sarkomerin ortasına doğru çekilir (Barnett, 2005; Haschek, Rousseaux and Wallig, 2009).

İletim Sistemi, Uyarı ve Kontrol Mekanizması

Kalbin iletim sistemi sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler düğüm, His demeti (atriyoventriküler lifler ve dalları) ile Purkinje hücrelerinden oluşmaktadır. Kardiyak ritim, sağ atriyum duvarında bulunan sinoatriyal düğümdeki iletken miyokardiyal hücreler tarafından başlatılır. Bu bölge kalp pili (pacemaker) olarak adlandırılır. Oluşturulan uyarı atriyoventriküler düğüme ön, orta ve arka yolaktaki kasılan hücreler ile iletilir. Depolarizasyon ile uyarılan hücreler iletim yoluna bağlı olarak yukarıdan aşağıya doğru kasılmaya başlar, böylece kanı atriyumdan ventriküllere pompalar. Uyarı sağ atriyumdan sol atriyuma Bachmann demeti olarak adlandırılan özel bir yolak ile iletilir. Uyarı atriyoventriküler septuma iletildiğinde konnektif doku, uyarının atriyoventriküler düğüm dışındaki hücrelere iletilmesini engeller ve uyarı His demetlerine buradan da Purkinje liflerine iletilir. Purkinje lifleri uyarının kardiyomiyositlere iletilmesini ve depolarizasyon ile kasılmasını, böylece kanın ventriküllerden akciğere ya da aort ile vücuda pompalanmasını sağlamaktadır.

Aksiyon potansiyeli kardiyakın iletken ve kasılan hücrelerinde farklı şekilde gerçekleşmektedir. Her iki hücrede de Na^+ , K^+ , ve Ca^{+2} etkin rol oynasa da kardiyak iletken hücrelerde, iskelet kası ya da nöronlardakine benzer bir kararlı dinlenme potansiyeli yoktur. Sodyum iyonunun yavaşça kanallardan içeriye girmesi ile membran potansiyeli -60 mV iken -40 mV'a yükselir, böylece spontan depolarizasyon (prepotansiyel depolarizasyon) başlamış olur. Bu sırada kalsiyum kanallarının açılması ile hücre içine hızlı Ca^{+2} girişi başlar ve depolarizasyon hızlanır. Membran potansiyelinin +5 mV olması ile Ca^{+2} kanalları kapanır, K^+ kanalları açılır, hücre içinden dışarıya K^+ akışı başlar ve repolarizasyon gerçekleşir. Membran potansiyelinin -60 mV olması ile K^+ kanalları kapanır ve Na^+ kanallarının açılmasıyla prepotansiyel faz tekrar başlar. Bu şekilde kalpte otoritmik kasılma gerçekleştirilmiş olur. Kasılan kardiyomiyosit hücrelerinde ise hızlı depolarizasyon, plato fazı ve sonrasında repolarizasyon gerçekleşmektedir. Bu olgu kardiyomiyositlerin kanı etkin şekilde boşaltabilmeleri için gerekli süreyi sağlayacak refraktör aşamasını gerektirmektedir. Hücreler elektriksel potansiyeli başlatmak için bir uyarı beklerler. Kasılan kardiyomiyositler, iletken kardiyomiyositlere göre daha kararlı dinlenme fazı geçirirler ve atriyumlarda -80 mV, ventriküllerde ise -90 mV potansiyele sahiptirler. Uyarı

sonrasında meydana gelen olaylar dizisi aynı şekilde devam etmektedir. Voltaj kapılı iyon kanallarının açılması ile pozitif yüklü iyonlar hızla hücre içerisine girer ve membran potansiyeli +30 mV olduğunda sodyum kanalları kapanır. Depolarizasyon sonrası kalsiyumun içeri girmesi ve bir miktar potasyumun dışarı çıkması ile membran potansiyeli düşmeye başlar, sıfır değerine yaklaştığında Ca^{+2} kanalları kapanır, K^{+} kanalları tamamen açılır ve repolarizasyon gerçekleşir (Anatomy and Physiology, 2013).

Atriyumların kasılması ile başlayıp, ventriküllerin gevşemesi ile biten olaylar dizisi “kardiyak döngüsü” olarak adlandırılır. Kalbin kasılması ile kanı vücuda pompalaması “sistol”, gevşemesi ile vücuttaki kanın kalbe dolması ise “diastol” terimleri ile ifade edilir. Kalp tarafından pompalanan kan miktarı temelde 2 mekanizma ile kontrol edilir; içsel (intrinsik) düzenleme ve dış (ekstrinsik) kontrol mekanizması. Frank-Starling Kanunu olarak bilinen içsel mekanizma kalbe gelen kan miktarına verilen cevaba bağlı olarak gerçekleşir. Yüksek hacimde kan girişi olduğunda ventriküldeki kalp kaslarının uzaması ve gerilmesindeki artışa bağlı olarak kasılma gücü artar, böylece daha fazla kan pompalanır. Dış (ekstrinsik) kontrol mekanizması ise otonom sinir sistemi ile gerçekleşir. Kalbin hızı sempatik kardiyak siniri yolu ile arttırılabilir ya da parasempatik olarak vagus siniri ile azaltılabilir. Bu sinirler sinoatriyal ya da atriyoventriküler düğümlere uyarı götürürler. Bunların dışında damarlardaki basınç değişimini algılayan baroreseptörler, kanın kimyasal bileşen içeriğini (CO_2 , O_2 , H^{+}) algılayan kemoreseptörler ya da çeşitli hormonlar (renin-anjiyotensin-aldesteron, epinefrin-norepinefrin vb) aracılığıyla refleks mekanizması da kardiyovasküler düzenlemede önemli rol almaktadır (Iaizzo, 2005). Kalbin elektriksel sinyali elektrokardiyografi (EKG) yöntemi ile takip edilebilir. Elektrokardiyograf cihazının kullanıldığı yöntem ile elde edilen sinüs grafiği sağlıklı ve anormal kalp fonksiyonunun incelenmesini sağlamaktadır.

2.1.2. Kalp Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında yüksek morbidite ve mortalite oranı ile sosyo-ekonomik boyutu önemli hastalıklar grubu içerisinde yer almaktadır. Bu hastalıklar, yılda 17.5 milyondan fazla insanın ölümüne neden olmakta ve bu sayının 2030 yılına kadar ≈23.6 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Cui ve ark., 2018). Kalpte, dokulara yeterli

oksijenin taşınmasında sorun oluşturacak, metabolik ve fonksiyonel anormallik meydana gelmesi "kalp yetmezliği" olarak tanımlanır ve vulvular kalp hastalığı, iskemik kalp hastalığı, hipertansiyon ya da kardiyomiyopati gibi pek çok etmen kalp yetmezliğine neden olabilir (Eng ve ark., 2014). Kardiyomiyositler yaşamın ilk 25 yılında kendilerini yılda %1 oranında yenilerken, 75 yaşına kadar bu oran %0.45 olarak azalmaktadır (Godier-Furnemont ve Vunjak-Novakovic., 2012). Kardiyomiyositlerin düşük çoğalma kapasitesi, yenilenme için yeterli miktarda kalp kök hücresi bulunmaması ve hasar sonrası skar dokusu oluşumuna eğimli olması, kalbin rejeneratif potansiyelinin düşük olmasına neden olmaktadır. Ayrıca kardiyomiyositlerin yüksek metabolik ihtiyaçları nedeniyle, kalp dolaşımında miyokardiyal enfarktüs benzeri bir sorun olması, hızlı bir şekilde hücre ölümü ve doku nekrozuna neden olmaktadır (Boyle, 2009; Emmert, Hitchcock ve Hoerstrup., 2014).

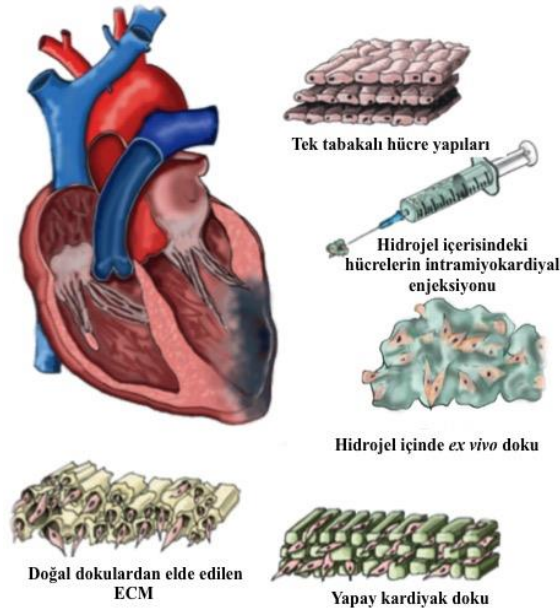
Miyokardiyal enfarktüs halk arasında bilinen adı ile “kalp krizi” kan akışının bir şekilde engellenmesi nedeniyle kalbin bir bölümünün oksijensiz kalması sonucunda hücrelerde ölüm meydana gelmesidir. Bu durum, genellikle koroner arterin, lipid, kolesterol, yağ asidi ve çoğunlukla makrofajlardan meydana gelen beyaz kan hücrelerinin oluşturduğu aterosklerotik plak tarafından tıkanması ya da serbest kalan plak parçasının dolaşım sırasında bir damarı tıkaması sonucunda meydana gelmektedir. Aşırı egzersiz sonucu kalbe yeterli kanın ve oksijenin sağlanamaması ya da strese bağlı olarak damar duvarındaki düz kasların kasılması da enfarktüsü tetikleyebilir. Miyokardiyal enfarktüs sonrası art arda bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Enfarktüs sonrası kalp, enflamasyon, proliferasyon ve matürasyon olmak üzere 3 aşamalı iyileşme sürecine girer. Enfarktüs bölgesinde saniyeler içinde ATP biter ve 20-40 dk arasında geri dönüşümsüz hücre hasarı meydana gelir. Koroner tıkanmadan yaklaşık 30 dk sonra koagülasyon nekrozunun başlaması ile enflamasyon meydana gelir, 24 sa içerisinde reaktif oksijen türlerinin salınmasıyla nötrofil göçü başlar, nekroz ile birlikte 2-3 gün devam eder. Nötrofiller hücre kalıntılarını temizler. Monositler apoptoza uğrayan nötrofilleri fagosite eder. Çeşitli sitokinlerin salınmasıyla proliferatif faza girilir. Enfarktüstən 5-7 gün sonra makrofajlar bölgede yoğunlaşır, granülasyon dokusu oluşmaya başlar. Haftalar ve aylar içerisinde kollajen birikimi ile fibröz yara dokusu meydana gelir. Oluşan yara dokusu miyokardiyumdaki ECM miktarını artırır,

kasılma fonksiyonunu azaltır, duvarın incelmesine ve dilatasyona neden olur. Sonuçta kalp yetmezliği meydana gelir (Eng ve ark., 2014). Miyokardiyal enfarktüs tedavisinde acil müdahale çok önemlidir, oksijen takviyesi, pıhtıyı açmaya yardımcı aspirin kullanımı ya da vazodilatör olarak bilenen nitrik oksit salımı ile koroner damarlardaki düz kasların gevşemesine yardımcı olan dil altına yerleştirilen nitrogliserin kullanımı sıklıkla uygulanmaktadır. Uzun süreli tedavilerde ise pıhtıyı çözecek trombolitik ajanlar, heparin gibi antikoagülanlar, tıkanmış damarı açacak balon anjiyoplasti, stent uygulaması ya da tıkanık bölgenin etrafından kan dolaşımını sağlayacak by-pass uygulaması yapılmaktadır (Anatomy and Physiology, 2013).

Klinikte, kalp yetmezliği durumunda artan toksik faktörlerden kalbin korunması için farmakolojik tedavi, kardiyomiyoplasti, sol ventrikül mekanik destek cihazları, implante edilebilir kardiyoverter defibrilatörler, kardiyak resenkronizasyon terapisi ya da ACORN CorCap cihazları gibi medikal tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Chen ve ark., 2008a; Eng ve ark., 2014). Bunun dışında otolog perikardiyum, zenojenik-hücreleştirilmiş perikardiyum ya da sentetik polimerler (Dacron, PTFE) de klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Otolog perikardiyum kullanımında dokunun cerrahi operasyon sırasında alınması ile ek bir travmaya neden olmaması, anında ve kolay ulaşılabilir olması, otolog kaynaktan dolayı immünolojik yanıt oluşturmaması, pasif mekanik dayanımının uygun olması, dikiş sırasında bazı sentetik eşleniklerine göre daha az kanamaya neden olması ve yeniden yapılandırma potansiyeline sahip olması çeşitli avantajlar sağlarken, operasyon sonrası kardiyak doku ve etraftaki dokuya istenmeyen adezyonların gerçekleşmesi önemli bir dezavantaj sayılmaktadır. Kullanıma hazır yamalara ihtiyaç duyulması sonucu üretilen zenojenik yamalarda ise çapraz bağlanma ile donör hücre antijenlerinin baskılanması immün yanıt oluşumunu azaltarak önemli bir avantaj sağlamaktadır, fakat kullanım sonrası dejeneratif etkiler ve kalsifikasyon olasılığı göz önüne alınmalıdır. Son zamanlarda hücreleştirilmiş dokuların da kullanımı gündeme gelmiştir. Fakat antijenlerin ECM'ye zarar vermeden uzaklaştırılmasında başarılı bir metodun henüz geliştirilememiş olması uygulamada başarısızlığa neden olmaktadır. Sentetik materyallerde ise spesifik olmayan immün yanıt, implant-alıcı arasında fazla adezyona neden olabilmekte, aşırı rijit yapıda olması kardiyak doku ile arasında uyum sorununa neden olmaktadır. Ayrıca pediatrik kardiyak

cerrahide kullanıldığında büyümemesi, kasılma fonksiyonuna yardımcı olmaması, uzun sürede enfeksiyon oluşturma riski ve kan ile doğrudan etkileşime girdiğinde tromboz ve emboli oluşturma riski bulundurması nedeniyle biyolojik eşleniklerine göre önemli dezavantajlara sahiptir (Akyhari, Barth ve Lichtenberg., 2011).

Pek çok farmakolojik terapi ve cerrahi işlem yaşam süresini uzatmakla birlikte bir tedavi sağlamamaktadır. Şuana kadar kalp yetmezliği hastaları için en etkili yöntem kalp transplantasyonudur. Fakat tıbbi açıdan zor bir işlem olması ve donör organ yetmezliği, meydana gelebilecek çeşitli komplikasyonlar, düşük kararlılık, yaşam boyunca immün baskılayıcı kullanma zorunluğu ya da organ reddi gibi dezavantajları nedeniyle alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Emmert, Hitchcock ve Hoerstrup., 2014; Boyle, 2009; Cui ve ark., 2018). Bu nedenle rejenerasyonu ve iyileşmeyi destekleyecek "kalp doku mühendisliği" çalışmaları gündeme gelmiştir. Kalp doku mühendisliği alanında pek çok farklı strateji uygulanmaktadır. Enjekte edilebilir hidrojeller, konvansiyonel hücre-iskele yapısı ile yapay kardiyak doku eldesi, hücre agregatlarını içeren mikro doku yaklaşımı, hücresizleştirilmiş ECM uygulamaları ve iskele içermeyen hücre tabakası uygulamaları bu stratejilerin temellerini oluşturmaktadır (Şekil 2.5) (Chiu ve Rasidic, 2013; Alessandra, 2014).



Şekil 2.5. Kalp doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan farklı yaklaşımlar (Galvez-Monton ve ark., 2013'ten değiştirilerek).

Doku mühendisliği çalışmaları, kalbin fonksiyonel olarak iyileştirilmesini, nekrotik ya da anormal dokuların sağlıklı doku ile yer değiştirilmesini amaçlamaktadır. Çalışmalarda dikkat edilmesi gereken temel noktalar şu şekilde sıralanabilir; (i) kardiyak doku bileşeni (uygun hücre kaynakları ve biyomateryal seçimi), (ii) yapısal özellikler (miyofiber ve perfüze edilebilir damarlanma), (iii) mekanik özellikler ve (iv) fonksiyonallite (elektro-mekanik özellikler ve senkronize kasılabilirlik) (Zimmermann, Melnychenko, ve Eschenhagen, 2004; Cui ve ark., 2018). Geliştirilen pek çok yaklaşıma rağmen özellikle fizyolojik olarak uygun bir şekilde doku yapısının oluşturulması henüz gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle güncel yaklaşımlar ile çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.1.2.1. Kalp Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri

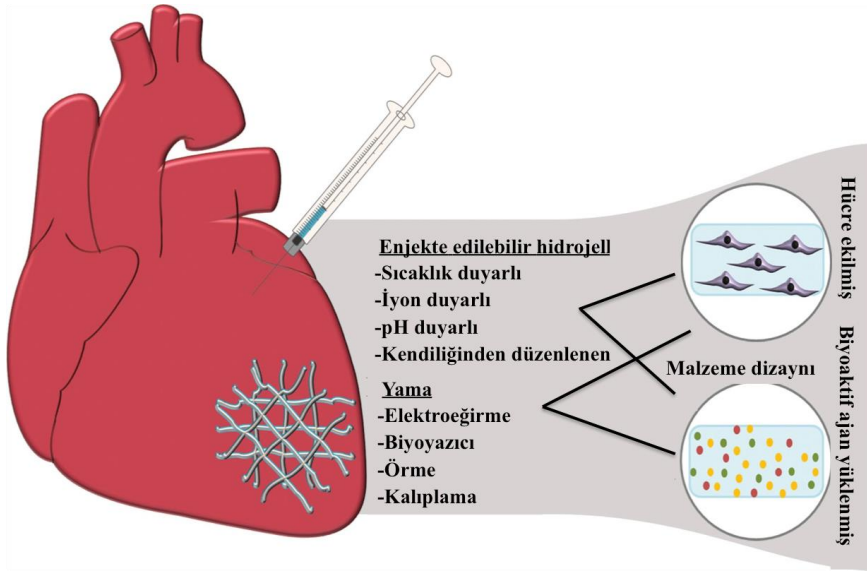
Hücre dışı matris, doku homeostazı, hücre çoğalma döngüsü, farklılaşması ve göçünde önemli rol oynar. Bu nedenle kalp doku mühendisliği için kullanılacak iskelenin hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemesi, doğal kalbin fiziksel ve mekanik özelliklerine benzer özelliklerde olması gerekmektedir. Aynı zamanda içsel hücre göçünü ve damarlanmayı desteklemeli, ventriküler doku ile elektro-mekanik entegrasyon sağlamalı, anti-trombojenik ve kalsifikasyon dirençli olmalıdır. Mekanik özellikler, kullanılan materyal ve üretim tekniğine bağlı olarak değişmektedir ve kök hücrelerin farklılaşma yol izi ile kardiyomiyositlerin kasılma özelliklerinde etkili olduğu için önemli bir özelliktir. Mekanik fonksiyonunun yanında ECM önemli biyolojik fonksiyona da sahiptir. Matris yapısında bulunan proteinler, büyüme faktörü ve hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime geçerler. Böylece spesifik intraselüler sinyal yolları yalnızca biyokimyasal etkileşimler ile değil hücre-ECM arasındaki etkileşim yoluyla, mekanotransdüksiyon ile de açılıp kapanabilirler. ECM'nin bu regülatör özelliklere sahip olması nedeniyle yapılan çalışmalarda *in vivo* dokuyu en iyi taklit edecek malzemenin geliştirilmesi üzerine çalışılmaktadır. Doğal hücresizleştirilmiş doku matrisinin kullanılması, mikroçevreyi en doğru şekilde sağlayacağı için yapılan araştırmalarda hücresizleştirilmiş ECM yapısı önemli bir seçenek haline gelmektedir. Bunun dışında fibrin, kollajen, hiyalüronik asit, aljinat, Matrijel ve ipek fibroin gibi doğal polimerler ve poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poligliserol sebakat (PGS), poliakrilamid, poliüretan, trimetilen karbonat ve polikaprolakton gibi sentetik

polimerler de iskele materyali olarak kullanılmaktadır. Sentetik materyallerin özellikle biyolojik fonsiyonalitelerinin olmaması, büyümeyi desteklememeleri, elastik özelliklerinin uygun olmaması (doğal kalp matrisi ile eş zamanlı olarak kasılamaması), asidik ya da toksik bozunma ürünlerinin bulunması ve immün yanıt oluşturmaları gibi dezavantajları bulunmaktadır. Çoğu sentetik polimer, büyüme faktörleri ile desteklenerek kullanılmaktadır. Jelatin, aljinat, kollajen tip I ya da Matrijel gibi malzemeler doğal matris yapısına daha çok benzedikleri için hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşmasını daha çok desteklerler. Fakat bölgesel proteazlar ile hızla bozunmaları, potansiyel immünojeniteleri ve enfeksiyon taşıma olasılıkları nedeniyle doğal malzemeler de genellikle modifiye edilerek kullanılmaktadır. Doku mühendisliği çalışmalarında iskelelerin üretimi için fiziksel yöntemler (faz ayrımı, gaz köpükleştirme, dondurarak kurutma, çözücü döküm, parçacık uzaklaştırma vb.), hızlı prototipleme (3 boyutlu yazıcı, stereolitografi, seçici lazer sinterleme vb.) ve tekstil yöntemleri (ıslak/kuru elektroegirme, örgü vb.) gibi pek çok farklı yöntem bulunmasına rağmen, kalp dokusu gibi yönlendirilmiş yumuşak dokular için genellikle mikrodeseleme ve mikrofabrikasyon yaklaşımı olan elektroegirme ya da biyoyazıcılar gibi teknikler tercih edilmektedir (Chen ve ark., 2008a; Gaetani ve ark., 2011; Godier-Furnemont ve Vunjak-Novakovic., 2012; Chiu ve Rasidic, 2013; Eng ve ark., 2014; Alessandra, 2014; Lee ve ark., 2014; Shahabipour ve ark., 2017).

Yüzey topografisi *in vivo* da kardiyak fonksiyonunu etkileyen kardiyomiyositlerin organizasyonunu belirler. Nano boyuttaki desenler doğal ECM'deki fibril yapısını taklit eder ve hücrelerin yönlendirilmesi substrat üzerindeki hücre adezyon moleküllerince gerçekleştirilir. Mikro desenler, çoğunlukla oluk ve çıkıntılar şeklinde ise, kardiyomiyositleri kontak yönlendirme ve tutuklama etkisi ile organize eder, ancak, bu boyut ECM'yi tam olarak taklit edemez (Chiu ve Rasidic, 2013). Yapıdaki gözenek boyutu, materyalin hidrofilitatesini, kütle aktarımını ve hücre penetrasyonunu etkilemektedir. Literatürde hücre ve damar infiltrasyonu için 30 µm gözenek boyutunun yeterli olduğu belirtilmiştir. Kardiyak yamalarda biyomekanik özellik ve elektrofizyolojik performans, kullanılan biyomateryalin özelliklerinden etkilenmektedir. Özellikle kültürün ilerleyen zamanlarında biyomekanik özellikler, başlangıç ECM materyalinin bozunması, hücreler tarafından sentezlenen ECM ve hücre çoğalmasına

bağlı olarak değişen hücre-hücre, hücre-ECM adezyonu ile değişim göstermektedir (Akyhari, Barth ve Lichtenberg., 2011; Seif-Naraghi ve Christman, 2013). Doğal kalbin moleküler ve fiziksel faktörlerini bir araya getiren hücrenin mikroskobik ve moleküler çevresini kontrol eden akıllı biyomateryaller üzerinde de çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu malzemeler proteaz aktivitesi ya da mekanik kuvvet gibi uyaranlara karşı kontrollü salım mekanizmasını kullanarak *in vivo* çevreye yanıt verebilirler (Bouten ve ark., 2011).

Doku mühendisliği çalışmalarında, malzemelerin bir iskele ya da yama formunda kullanılması tam kalınlıkta hasarların tamirinde ya da doğuştan kalp yetmezliği durumunda doğal dokunun değişimi için uygulanırken, akut miyokardiyal enfarktüs gibi daha az invazif durumlar için enjekte edilebilir hidrojel kullanılabilmektedir (Şekil 2.6) (Chiu and Rasidic, 2013; Hinderer, Brauchle, ve Schenke-Layland, 2015). Hidrojeller çapraz bağlı, hidrofilik polimerlerdir ve doku hacmini artırıp mekanik destek vererek ya da biyoaktif molekül ve hücre salımı ile kardiyak doku tamirini hızlandırabilirler. Aljinat, polietilen glikol (PEG), hiyalüronik asit, fibrin, kitosan, Matrijel, kollajen, N-izopropil akrilamid gibi materyaller enjekte edilebilir hidrojel şeklinde hücre/büyüme faktörü desteği ile ya da tek başlarına kullanılmışlardır. Hücreleştirilmiş matrisler de enjekte edilebilir jel formatında kullanılmaktadır. Hazırlanan jeller doğrudan epikardiyal enjeksiyon, transkoronal enjeksiyon ya da transendokardiyal enjeksiyon yoluyla kalbe uygulanabilirler. Minimal invazif yöntem ile kalp içerisine uygulanabilmesi ve enjekte edilen bölge geometrisine uyum sağlaması bu yönteme avantaj sağlasa da enjekte edilen hücrelerin hücre-hücre etkileşimini kurma zorluğu ve jelin mekanik özellikleri kullanım alanını kısıtlamaktadır (Fujimoto ve ark., 2009; Gaetani ve ark., 2011; Chiu ve Rasidic, 2013; Emmert, Hitchcock ve Hoerstrup., 2014).



Şekil 2.6. Kalp doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomalzemeler (Hinderer, Brauchle ve Schenke-Layland, 2015'ten değiştirilerek).

2.1.2.2. Kalp Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Türleri

Kalp yüksek organizasyona sahip bir organdır. Fonksiyonel kalp yamasının oluşturulması kalbin kompleks yapısının ve fonksiyonunun başarılı şekilde taklit edilebilmesi ile sağlanabilir. Uygulanacak tüm yaklaşımlarda kullanılacak hücrenin seçimi çalışmanın merkezinde yer almaktadır. İskele, kültür ortamı ve çevre gibi doku mühendisliğinin diğer bileşenleri hücrenin yapılanmasını hızlandırmak için kullanılır (Vunjak-Novakovic ve ark., 2010).

Doku mühendisliği yöntemi ile oluşturulan kalp yamasının doğal kalpte olduğu gibi yüksek yoğunlukta ($\sim 10^8$ hücre/cm³) ve düzenli kardiyomiyosit hücrelerini içermesi gerekmektedir. Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılacak hücrelerin yüksek miktarda, kolaylıkla bulunabilir, alıcı ile uyumlu, minimal immün reaksiyon oluşturacak, *in vivo* ve *in vitro* da canlılığını sürdürerek fonksiyonel olabilecek özelliklere sahip olması gerekmektedir. Kardiyovasküler araştırmalarda somatik hücreler (yetişkin, fetal ve neonatal kardiyomiyosit, iskelet miyoblast, düz kas, fibroblast, endotel), kök hücreler (kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kalp kökenli ve indüklenmiş pluripotent gibi somatik ya da embriyonik hücreler) ve progenitör (kalp/endotel) hücreler olmak üzere pek çok farklı hücre türü ile çalışmalar yapılmaktadır (Chen ve ark. 2008a; Akyhari, Barth ve Lichtenberg, 2011;

Godier-Furnemont, ve Vunjak-Novakovic, 2012; Chiu ve Rasidic, 2013; Emmert ve ark. 2014; Lanza ve ark. 2014). Bunların kalp doku mühendisliğinde kullanım avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.1’de sunulmuştur (Iaizzo, 2005; Chen ve ark., 2008a; Akyhari, Barth ve Lichtenberg, 2011; Chiu ve Rasidic, 2013; Galvez-Monton ve ark., 2013; Emmert, Hitchcock ve Hoerstrup, 2014).

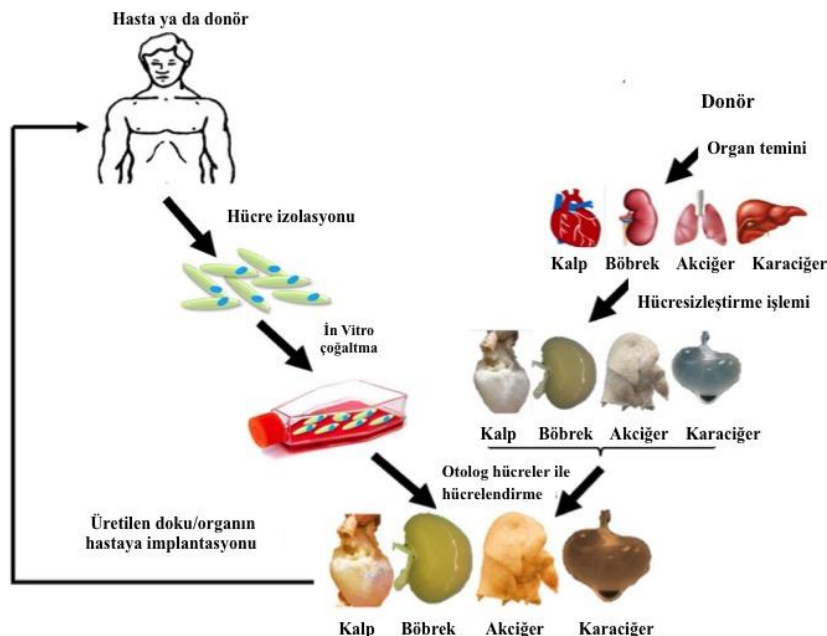


Çizelge 2.1. Kalp doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan hücrelerin avantaj ve dezavantajları.

Hücre	Avantaj	Dezavantaj
Kardiyomyosit	Kasılmaya doğrudan etki Elastik özelliklerinin uygunluğu, fetal hücrelerden salgılanan büyüme faktörlerinin anjiyogenezi desteklemesi ve mevcut kardiyak progenitor hücreleri uyarması	Otolog değil ve kolay elde edilemez Düşük çoğalma kapasitesi Kısıtlı miktarda elde edilir Etik açıdan tartışmalı olmaları İmmünbaskılayıcı kullanımı gerektirmesi
Miyoblast	Otolog ve kolay elde edilir Hipoksiye dirençli ve kasılma yeteneğine sahip Düşük onkogenik potansiyel Salgıladıkları biyosinyaller kardiyoprotektif ve kök hücreleri uyandırıcı özelliktedir	Çoğalma kapasitesi yaşa bağlı Kardiyak miyogenez tartışmalı Aritmi olasılığı
Fibroblast	Otolog, kolay elde edilir ve yüksek çoğalma kapasitesi	Kardiyak miyogenez yok
Embriyonik kök hücre	Pluripotent Yüksek çoğalma kapasitesi Kardiyak miyogenez	Otolog değil ve kolay elde edilemez Kısıtlı miktarda elde edilir Teratom ve alıcı immün yanıt riski Etik problemler
Kemik iliği kökenli kök hücre	Otolog, multipotent ve kolay elde edilir Düşük immün yanıt EGF (epidermal büyüme faktörü), FGF, TGF- β , HGF gibi anjiyogenik ve anti-apoptotik faktörler salgılaması	Kısıtlı miktarda elde edilir Çoğalma kapasitesi yaşa bağlı Fibröz Kalsifikasyon
Göbek kordonu kaynaklı kök hücre	Multipotent ve kolay elde edilir Düşük immün yanıt	Genelde allojenik
Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre	Otolog ve multipotent Yüksek miktarda ve kolay elde edilir Düşük immün yanıt Anjiyogenezi artıran, apoptozu azaltan ve başarılı miyokardiyumda zarar gören nöronları destekleyen parakrin faktörlerin salgılanması	Düşük hayatta kalım
Kardiyak kök hücre	Otolog ve multipotent	Kısıtlı miktarda elde edilir
İndüklelenmiş pluripotent kök hücre	Pluripotent ve otolog Yüksek çoğalma kapasitesi	Teratojenik potansiyel Onkogenik potansiyel

2.2. Doku Mühendisliğinde Hücresizleştirme Yaklaşımı

Doğal dokulardan spesifik ECM üretiminin ilk olarak 1970-1980 yıllarında yapılan çalışmalarda gerçekleştirildiği bilinmektedir. Üretilen ECM'nin rejeneratif özelliği ise Badylak ve ark.'nın ince bağırsak submukozasını hücresizleştirilmesi ve bu yapıyı köpek Aşil tendon hasarında kullandıkları çalışma ile gösterilmiştir. İlerleyen yıllarda deri, damar, kalp kapakçığı, mesane gibi basit dokulardan hücresizleştirilmiş ECM biyolojik iskele olarak kullanılmış ve bu matris kesitleri ile kompleks organların oluşturulması için araştırmalar başlatılmıştır. Ott ve ark., ilk kez 2008 yılında bütün bir fare kalbinin organ halinde hücresizleştirilmesini gerçekleştirmişlerdir. Günümüze kadar fare, sıçan, domuz, maymun ve insan gibi farklı türlere ait karaciğer, kalp, akciğer ve böbrek gibi çeşitli organların tamamıyla hücresizleştirilmesi gerçekleştirilmiştir (Garreta ve ark., 2017). Kollajen, fibronektin, laminin gibi ECM bileşenleri hücre kültürü ve doku mühendisliği çalışmalarında uzun süredir kullanılmaktadır. Fakat ECM yapısının bir bütün halinde kullanılması ile yapısal ve fonksiyonel molekülleri dokunun doğal 3 boyutlu yapısı içerisinde korunmakta ve böylelikle ECM'nin hücre için gerekli pek çok elementi bir arada bulundurması önemli avantaj sağlamaktadır (Badylak, Brown ve Gilbert, 2012). Bu nedenle hücresizleştirilmiş doku ve organlar rejeneratif tıp çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Hücresizleştirilmiş iskelelerin rejeneratif tıp alanında uygulaması (Rana ve ark., 2017’ten değiştirilerek).

Hücre dışı matris, biyofizyolojik uyarı ve sinyal molekülleri için büyük bir kaynak oluşturmaktadır. Hücrelerin doku onarımı sırasında ECM tarafından yönlendirilmesi önemlidir. Oluşturulan matrisin miktar, içerik ve organizasyonu doku rejenerasyonu ile yara dokusu oluşumu arasındaki sınırı belirlemektedir (Moroni ve Mirebella, 2014). Örneğin, hasarlı kalp dokusunun sağlıklı dokuya göre daha sert bir yapıya sahip olduğu belirtilmiştir. Hücrenin davranışı, üzerinde bulunduğu nişin mikromekanik özelliklerine göre değişeceği için bu özelliklerin bilinmesi büyük avantaj sağlayacaktır (Andreu ve ark., 2014).

Farklı dokuların ECM yapıları farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Higuchi ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada embriyonik kök hücrelerin 5-azasitidin varlığında kardiyomiyojenik farklılaşması üzerinde karaciğer ve kalp ECM etkisini incelemişlerdir. Farklı iki doku matrisinin proteomiks yaklaşımı ile incelenmesi sonucu bileşimlerinin birbirlerinden farklı olduğu belirlenmiştir. Temel ECM bileşenleri her iki yapıda da bulunmaktadır, fakat miktarlarındaki farklılık kök hücrelerin farklılaşma eğilimlerinde etkili olabilmektedir. Biyolojik içeriğinin yanında farklı doku matrislerinin elastisite ve gözenek özellikleri de farklıdır ve kalp matrisinin doğal mikroçevreye daha uygun olması ile farklılaşmayı daha çok desteklediği belirtilmiştir. Ayrıca farklılaşmanın yalnızca kimyasal ya da mekanik etki ile gerçekleştirilemediği, iki farklı uyarının birlikte etkin olduğu belirtilmiştir (Higuchi ve ark., 2013).

Hücreleştirilmiş ECM yapısı organ hasarlarında bütün halinde uygulanabildiği gibi küçük doku kesitleri, hidrojel ya da yüzey kaplamaları şeklinde de uygulanabilirler. Tüm organ matrisleri organ transplantasyonunda, hidrojeller enjeksiyon yapılan tedavilerde, yüzey kaplamaları ve kesitler ise genellikle matrisin hücre farklılaşması üzerindeki etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır (Agmon ve Christman, 2016; Saldin ve ark., 2017). Pek çok farklı hayvana ait organdan (kalp, karaciğer, iskelet kası, yağ, kıkırdak, damar ve deri) elde edilmiş hücreleştirilmiş ECM yapıları biyoyazıcılar için biyomürekkep olarak kullanılmıştır (Choudhury ve ark., 2018). Hücreleştirilmiş ECM elde etmek amacı ile kullanılan dokular genellikle tabaka şeklindedir ve bu morfoloji 3 boyutlu yapı ve mekanik özellik açısından bazı çalışmalarda yeterli olmayabilir. Bu nedenle ECM iskeleler uygulama alanına göre tüp,

koni, çoklu tabakalar gibi farklı formlara da getirilmişlerdir (Badylak, Brown ve Gilbert, 2012).

Hücreleştirilmiş ECM iskenin doku rejenerasyonunu ve anjiyogenezi hangi mekanizmalar ile desteklediği tam olarak bilinmemektedir. Fakat implantasyon sonrası iskenin parçalanması ile ECM'den biyoaktif moleküllerin salımı, iskele içerisine göç eden hücrelerin salgıladıkları matris ile birlikte anjiyogenezin başlaması ve mekanik kuvvetlere bağlı olarak doku organizasyonunda geçici bir düzenlenme meydana gelmesinin olumlu etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Hücresiz ECM'nin diğer bir önemli rolü kök hücrelerin fenotiplerini sürdürebilmesi ve farklılaşması için uygun mikroçevre oluşturmastır. Ayrıca ECM bileşenlerinin türler arasında benzer olması, implantasyon sonrası düşük immün yanıt oluşturur. *In vivo* 'da kısa sürede bozunması da önemli bir avantaj sağlamaktadır. Hücreleştirilmiş ECM yapısı prelinik/klinik çalışmalarda ve pek çok ticari üründe başarı ile kullanılmaktadır. Piyasada insan, domuz, sığır ve at gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen mesane, kalp, karaciğer, akciğer, kas, sinir, deri, tendon ve ince bağırsak dokularının ECM yapıları, tabaka, toz ya da jel gibi farklı formlarda pek çok ticari ürün (Alloderm®, CollaMend®, Dura-Guard®, FasLata®) halinde bulunmaktadır ve bu ürünler yumuşak doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi, ortopedik uygulamalar, kardiyovasküler ve gastrointestinal hastalıkların tedavileri ve merkezi sinir sistemi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Badylak, Brown ve Gilbert, 2012; Brown ve Badylak, 2014; Steffens ve ark., 2018).

2.2.1. Hücreleştirme İşleminde Kullanılan Ajanlar ve Uygulama Yöntemleri

Doku ya da organların hücreleştirilmesi için pek çok farklı yöntem geliştirilmiştir. Yapılacak çalışma için hücreleştirme yöntemi seçilirken tek bir metodun tüm doku tipleri için uygun olmayacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Etkin hücreleştirme yöntemi doku yoğunluğu, organizasyonu, istenen ürün ve klinik uygulama, uygun geometri ve biyolojik özelliklere uygun olarak belirlenmektedir. Kullanılan hücreleştirme ajanları kimyasal, biyolojik, fiziksel ve diğer ajanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Her bir ajanın kendine özgü avantajlarının yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle her doku için ECM'nin yapısal ve fonksiyonel özelliklerine zarar vermeden hücresel içeriğini uzaklaştıracak hücreleştirme

yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Badylak, Brown ve Gilbert, 2012; Agmon ve Christman, 2016). Hücresizleştirme sırasında matris proteinlerinin modifiye olması *in vivo* fibrozise, kalsifikasyon düşük endotelizasyona ya da implante edilen yamanın başarısız olmasına neden olabilir (Moroni ve Mirebella, 2014). Hücresizleştirme işleminde kullanılan ajanlar ve yöntemlerin avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.2’de özetlenmiştir (Gilbert, Sellaro ve Badylak., 2006; Crapo, Gilbert ve Badylak., 2011; Patnaik ve ark., 2014; Çeviker ve ark., 2017; Yesmin ve ark., 2017; Steffens ve ark., 2018).



Çizelge 2.2. Hücresizleştirme işleminde kullanılan ajanlar ve uygulama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları.

Kullanılan Ajanlar	Avantajları	Dezavantajları
Kimyasal Ajanlar		
Asitler/Bazlar	Sitoplazmik bileşenlerin ve nükleik asitlerin uzaklaştırılmasında etkilidir. Dezenfeksiyonu sağlar.	Kollajen, GAG ve büyüme faktörlerine zarar verebilir. Mekanik özellikleri etkileyebilir.
Hipotonik/Hipertonik Çözeltiler	Ozmotik çok etkisi ile hücrelerin parçalanmasını sağlar. DNA'yı proteinden uzaklaştırmada etkilidir.	Hücrel kalıntıları tamamen uzaklaştıramazlar.
Deterjanlar	Hücre ve çekirdek membranını parçalar, proteinleri denatüre eder.	
İyonik (SDS vb)		Dokunun türüne ve kalınlığına göre etkinliği değişkendir. Doku ultrayapısına, GAG, kollajen ve büyüme faktörü içeriğine zarar verebilir.
İyonik olmayan (Triton X-100 vb)	DNA-protein, lipid-lipid ve lipid-protein bağlarını parçalar. Yoğun dokularda daha etkilidir.	Dokunun türüne ve kalınlığına göre etkinliği değişkendir. GAG yapısına zarar verebilir.
Zwitteriyonik (çift kutuplu, CHAPS vb)	Proteinleri denatüre ederek iyonik olmayan deterjanlara göre daha etkin hücresizleştirme sağlarlar.	Dokunun türüne ve kalınlığına göre etkinliği değişkendir. GAG yapısına zarar verebilir.
Alkoller	Dehidrasyon ile hücre parçalanmasına yardımcı olurlar. Özellikle fosfolipidlerin uzaklaştırılmasında lipaz gibi enzimatik ajanlardan daha etkili oldukları belirtilmiştir.	Dokudaki proteinleri çöktürerek ECM ultra yapısına zarar verebilir.
Diğer çözeltiler	Lipidleri uzaklaştırmak için kullanılır.	
Aseton		Çapraz bağlar ile mekanik özellikleri değiştirebilir.
Antibiyotikler	Mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için kullanılır.	
Biyolojik Ajanlar		
Enzimler	Spesifik olarak istenmeyen materyalin uzaklaştırılmasını sağlayabilirler. Protein-protein etkileşimini bozarak hücre-matris bağlantısını koparır ve hücrel/nükleer materyali parçalar.	Yalnızca enzimatik yol ile hücresizleştirme çok zordur. Uzun süreli uygulamalar laminin, fibronektin, elastin ve GAG'ı yapıdan uzaklaştırarak ECM'ye zarar verebilir.
Enzimatik Olmayan Ajanlar	Metal iyonlarını uzaklaştırarak hücrelerin ECM proteinlerinden ayrılmasını kolaylaştırır.	Tek başlarına yeterli olmadıkları için enzimler ya da deterjanlar ile birlikte kullanılırlar.
Şelatlayıcı ajanlar (EDTA vb)		
Fiziksel ve Diğer Ajanlar		
Sıcaklık	Doku dondurulup (-80°C) daha sonra çözülürerek (37°C) hücrelerin parçalanması sağlanır.	Tek başına yeterli olmayan bir yöntemdir ve hücrel bileşenler ek işlemler ile uzaklaştırılırlar. Dondurma sırasında ECM zarar görebilir.

Çizelge 2.2'nin devamı.

Basınç ve Mekanik Güç	Hidrostatik basınç, sonikasyon ya da karıştırma çeşitli ajanlar ile birlikte kullanılmaktadır.	Yüksek hidrostatik basınç uygulamasının GAG'ı uzaklaştırdığı belirtilmiştir.
Termal Olmayan Geri Dönüşümsüz Elektroporasyon	Elektiriksel uyarı ile hücrede meydana getirilen porlar hücre homeostazını bozar böylece hücre ölümü gerçekleştirilir. Daha sonra perfüzyon ile hücresel bileşenler uzaklaştırılır.	Çok etkin bir yöntem değildir.
Uygulama Yöntemleri		
Perfüzyon	Konvektif güç kullanılması gerekli süreyi kısaltmaktadır. Hücresizleştirme ajanının dağılımı ve hücresizleştirme homojen gerçekleşir. Fizyolojik perfüzyon basıncının sağlanması ile ECM yapısının korunması sağlanabilir. Kontrollü perfüzyon koşulları, biyoreaktörlerin kullanımı ile prosesin dayanıklılığını ve verimliliğini artırır.	Uygun olmayan basınç ECM yapısına zarar verebilir. Organ arterine kanülasyon yapma zorunluluğu ve spesifik perfüzyon reaktörü ihtiyacı bulunur.
Basınç gradienti	Basınç gradienti ile hücreler patlatılır ve uzaklaştırılır.	ECM ultrayapısına zarar verebilir ve yoğun dokularda çok etkin olmaz.
Süperkritik akışkan	Basit ve kısa süreli bir yöntemdir. ECM mekanik özelliklerine zarar vermediği belirtilmektedir. Doku işlem sonunda kuru olarak elde edildiği için uzun süreli saklama için uygulanan liofilizasyon gibi ekstra basamaklara ihtiyaç olmamaktadır.	Özel ekipman gerektirmektedir.
Daldırma ve çalkalama yöntemi	Basit ve hızlı bir yöntemdir, biyoreaktör ekipmanına ihtiyaç duyulmaz.	Dokuya ve dokunun kalınlığına göre kullanılan ajan, çalkalama hızı ve süresinin optimize edilmesi gerekir, uzun süre uygulama ECM yapısına zarar verebilir. Doku kesimleri ya da küçük hayvan organları için uygundur, büyük organlarda başarılı sonuçlar elde edilemez.

2.2.2. Hücresizleştirilmiş ECM Karakterizasyonu

Hücresizleştirme işlemi uygulanan dokularda i) hücresel bileşenlerin tamamının ve DNA içeriğinin uzaklaştırılması, ii) ECM bileşenlerinin korunması, iii) dokudaki 3B yapının, damar ağının ve biyomekanik özelliklerin devamlılığının sağlanması ve iv) kullanılan kimyasal ajanların uzaklaştırılması gibi belirli kriterlerin sağlanması gerekmektedir (Garreta ve ark., 2017). Hücresel bileşenlerin tamamen uzaklaştırılıp uzaklaştırılamadığı ya da kullanılan yöntemin dokunun matris yapısına zarar verip vermediği kalitatif ya da kantitatif analizler ile belirlenmektedir. Başarılı hücresizleştirme ile implantasyon sonrası olumsuz immün yanıtın yanı sıra dokunun yeniden şekillenmesinde meydana gelebilecek sorunlar da önlenmektedir.

Dokudaki hücresel içerik ve DNA'nın uzaklaştırılmasında başarılı olunduğunu söyleyebilmek için kullanılan bazı temel kriterler şu şekilde belirtilmiştir:

- 1 mg kuru ECM'de bulunan dsDNA miktarı 50 ng'dan az olmalıdır.
- DNA parçalarının uzunluğu 200 bp'dan daha kısa olmalıdır.
- Doku kesitleri 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve Hematoksilin & Eozin (H&E) ile boyandığında görülen hücresel materyal az olmalıdır.

İlk iki kriterin değerlendirilmesi için sırası ile PicoGreen ya da bisbenzimid gibi kolay ulaşılabilir ürünler ve jel elektroforez kullanılabilir. Son kriter ise histolojik ve immunofloresan boyama yöntemleri kullanılarak kalitatif bir değerlendirme ile belirlenebilir (Crapo, Gilbert ve Badylak., 2011; Garreta ve ark., 2017).

ECM bileşenlerinin varlığı ise kollajen, laminin, fibronektin ve elastinin immünohistokimyasal incelenmesi (kollajen için Masson trikrom ve Herovici, GAG için Alcian mavisi/PAS, kollajen ve elastin fiberler içinse Movat boyama) ile kalitatif olarak ya da kollajen, elastin ve GAG için sırası ile ticari olarak bulunan Sircol, Fastin ve Blyscan kitleri ile kantitatif olarak belirlenebilir. Hücresizleştirme gerçekleştirildikten sonra hücresiz ECM'nin doğal doku ECM'sine ultra yapısal ve mekanik olarak benzerliğini de belirlemek gerekmektedir. Matrisin mikro-nano yapısı geçirimli ya da taramalı elektron mikroskopisi ile, damar yapısı ise mikro-bilgisayarlı tomografi (Micro-CT), boya ya da mikro-boncuk perfüzyon analizi ve anjiyografi gibi yöntemler ile incelenebilmektedir Mekanik özelliklerin belirlenmesi için tek/çok yönlü

mekanik analiz yöntemi ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yöntemi kullanılabilmektedir (Arenas-Herrera ve ark., 2013; Garreta ve ark., 2017).

Hücreleştirilmiş dokunun toksisitesinin ve immünojenitesinin incelenmesi de karakterizasyon aşamalarından biridir. Hücresiz ECM'lerin sitotoksitesinin belirlenmesi için hücre canlılığının incelendiği MTT benzeri analizler ile *in vitro* hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Amerika Gıda ve İlaç İdaresi Başkanlığı (FDA) onayının alınması için ekstrakt sitotoksite ve endotoksin analizinin de yapılması gerekmektedir (Keane ve ark., 2015). Özellikle zenojenik dokularda immün reddine neden olan α -Gal epitopu immünohistokimyasal yöntem ya da ELISA analizi ile incelenebilmektedir. Başarılı bir işlem sonrasında tüm hücresel bileşenler ve antijenler uzaklaştırılacağı için bir immün yanıt meydana gelmesi beklenmemektedir, fakat transplantasyon öncesi implantın immünitesi ve biyouyumluluğu kontrol edilmelidir. *In vivo* modeller doku iskelesinin bozunma süresi hakkında da bilgi vermektedir (Wilson ve ark., 2013).

Hücresel bileşenlerin dışında yıkamalar sonunda hücresiz ECM yapısında deterjanların ya da diğer kimyasal ajanların da kalıntılarının olmaması gerekmektedir. Bu amaçla yapıda kalan SDS, Stains-All boyası kullanılarak, Tx-100 ise spektrofotometrik yöntem ile belirlenebilir (Garreta ve ark., 2017).

2.2.3. Bozunma Mekanizması

ECM yapısının bozunma mekanizmasından proteinaz ailesindeki matris metalloproteinazlar (MMP) ve trombospondin motifli metalloproteinazlar (ADAMTS) adı verilen 2 büyük grup sorumludur (Lu ve ark., 2011).

Hücreleştirilmiş ECM'nin bozunması immün yanıtın düzenlenmesi ve öncül hücrelerin yönlendirilmesi ile dokunun yeniden düzenlenmesinde önemli yere sahiptir. ECM iskeleler *in vivo* da kısa sürede bozunmaktadır ve bozunma prosesi hem hücresel, hem de enzimatik mekanizmaları içermektedir. Makrofaj gibi enflamatör hücrelerin ürettiği proteolitik enzimler bozunmaya yardımcı olmaktadır (Gilbert ve ark., 2007).

Hücreleştirilmiş ECM iskeleler yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin yanında bozunma ile ortaya çıkan biyolojik sinyal aktivitesi ile de yeniden yapılanmayı desteklemektedir. Parçalanma ile ortama vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), FGF ve TGF- β gibi çeşitli büyüme faktörleri salınır. Bu faktörler kök hücre ve progenitör hücreler için kemoatraktan özellik göstermektedir ve bölgedeki rejenerasyonu olumlu etkilemektedir. Ayrıca hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve anjiyogenez gibi çeşitli prosesler bu hücre sinyalizasyon mekanizması ile gerçekleşmektedir (Badylak, Taylor ve Uygun., 2011; Taylor ve ark., 2018). Çapraz bağlanma uygulanan ECM iskelelerde ise kullanılan ajanlar ECM'nin bozunma süresini uzattığı ya da engellediği için bozunma sonucunda biyoaktif moleküllerin salımı azalır, dolayısı ile rejenerasyon daha az desteklenir (Badylak, Brown, ve Gilbert, 2012; Brown ve Badylak, 2014).

ECM'nin bozunmasını önlemek için penta-galloil glikoz gibi ajanlar ile stabilizasyon işlemi de uygulanabilir. Yöntemin yeniden hücrelendirmeyi olumsuz etkilemediği belirtilmiştir. Hücresiz ECM yapısının uzun süre saklanabilmesi için ise kriyoprezervasyon (-196°C' de sıvı azot içerisinde saklanması) veya liyofilizasyon (-80°C' de dondurarak kurutma) teknikleri uygulanır (Patnaik ve ark., 2014).

2.2.4. Yeniden Hücrelendirme

Yeniden hücrelendirme (reselülerizasyon) terimi, hücreleştirilen doku ya da organın hücre ekimi yapılarak tekrar hücre içeren bir yapı oluşturması için kullanılır. Yeniden hücrelendirme öncesinde *in vitro* ya da *in vivo* tüm çalışmalarda olduğu gibi sterilizasyon aşaması çok önemlidir. İskelede bulunabilecek viral ve bakteriyel DNA'lar, pirojenler ve endotoksinler uzaklaştırılmalıdır. Sterilizasyon sırasında yapı herhangi bir zarar görmemelidir. Hücresiz ECM iskelelerin sterilizasyonunda genellikle etanol ya da perasetik asit uygulaması, etilen oksit, kısmen asidik elektrolize su, süperkritik CO₂, ultraviyole, gama radyasyonu ve elektron demeti ışıması gibi yöntemler kullanılmaktadır. Etanol gibi çözücüler ya da asit içerisinde inkübasyon gibi basit yöntemlerin sterilizasyon için yeterli olduğu düşünülmektedir. Fakat bu yöntemlerde kullanılan sterilizasyon ajanlarının büyük dokularda iç bölgelere tamamen ulaştırılamaması ve ECM özelliklerinde istenmeyen değişikliklere neden olabilmesi gibi dezavantajları vardır. Etilen oksit, ECM mekanik özelliklerini büyük ölçüde değiştirebilir ve ayrıca hastada immün yanıt oluşmasına neden olabilir. Gama

radasyonu ise bazı proteinlerin (kollajen vb.) denatüre olmasına neden olabilir ya da lipid kalıntıları sitotoksik etkiye yol açabilir. Süperkritik akışkanların kullanımı ise henüz araştırma aşamasında olan umut verici yaklaşımlar arasındadır (Crapo, Gilbert ve Badylak., 2011; Patnaik ve ark., 2014; Badylak, Freytes ve Gilbert, 2015; Taylor ve ark., 2018). Gliserol uygulaması virus, bakteri ve fungal inaktivasyonu sağladığı gösterilmesine rağmen sterilizasyon yöntemleri arasında kabul edilmemektedir ve klinik uygulamaları hakkında çelişkili düşünceler bulunmaktadır (Akyhari, Barth ve Lichtenberg, 2011).

Hücreleştirilmiş ECM iskelelerin yeniden hücrelendirilmesi çalışmalarında ilk önce uygun hücre türünün ve hücre ekim yoğunluğunun, daha sonra ise uygun ekim yönteminin belirlenmesi gerekmektedir (Taylor ve ark., 2018). Ayrıca bazı çalışmalarda hücre ekimi öncesi fonksiyonlileti arttırmak için hücreleştirilmiş iskelenin çeşitli büyüme faktörleri ya da biyoaktif moleküller ile modifikasyonu da gerçekleştirilmiştir (Rana ve ark., 2017).

2.2.5. Kalp Doku Mühendisliğinde Hücreleştirilmiş İskeleler

Hücreleştirilmiş ECM'nin özellikleri dikkate alındığında, kalp doku mühendisliği çalışmaları için çok uygun bir iskele olduğu düşünülmektedir. Kalp rejenerasyonu için yapılan çalışmalarda ince bağırsak submukozası (Tan ve ark., 2009; Hata ve ark., 2010), mesane (Robinson ve ark., 2005), kalp kapakçığı (Wan ve ark., 2017), perikardiyum (Seif-Naraghi ve ark., 2010; Mendoza-Novelo ve ark., 2011; Rajabi-Zeleti ve ark., 2014; Dong, Li, ve Mo, 2013; Mathapati ve ark., 2013) ve omentum (Shevac ve ark., 2014) gibi pek çok farklı dokudan elde edilmiş hücreleştirilmiş ECM iskeleler kullanılmıştır. Kullanılacak doku kaynağının sağlıklı organlardan alınması da önemlidir. Hücrenin davranışı, üzerinde bulunduğu nişin mikromekanik özelliklerinden etkilenmektedir, sağlıklı ve hasarlı kalbin mekanik özellikleri farklılık göstermektedir (Andreu ve ark., 2014).

Kalbin hücreleştirme çalışmalarında hem tüm kalp hem de kalpten alınan kesitler ile yapılan araştırmalar bulunmaktadır. Tüm kalp için fare, sıçan, domuz ve insandan alınan kalpler ile yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır (Ng ve ark., 2011; Carvalho ve ark., 2012; Akbay ve Onur, 2018; Taylor ve ark., 2018). Domuz kalbi kolay elde edilebilmesi, transplant boyutunun uyumlu olması ve anatomik olarak insan kalbine benzerlik açısından diğer seçeneklere göre önemli avantajlar sağlamaktadır

(Shahabipour ve ark., 2017). Farklı kaynaklardan alınan miyokardiyum kesitlerinde etkin hücreleştirme yönteminin bulunması için de pek çok farklı yöntem uygulanmıştır (Çizelge 2.3) ve hücreleştirilmiş miyokardiyal matrisler hücresiz ya da yeniden hücrelendirilmiş şekilde kalp doku mühendisliği alanında çeşitli araştırmalarda kullanılmıştır.



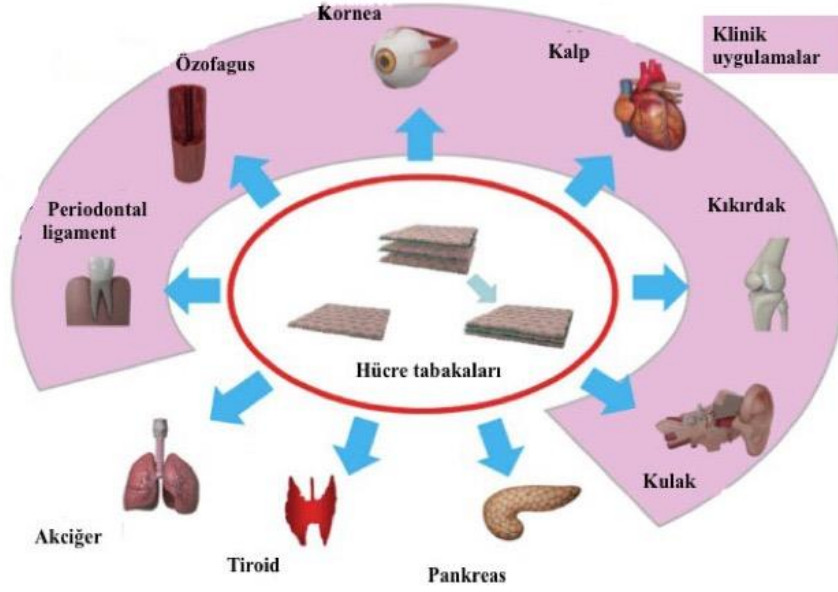
Çizelge 2.3. Miyokardiyal kesitlerinde kullanılan hücresizleştirme yöntemleri.

Yazar	Yıl	Tür	Hücresizleştirme yöntemi
Eitan ve ark.	2010	Domuz	Hipertonik çözelti (%1.1 NaCl, %0.02 EDTA) 2 sa + hipotonik çözelti (%0.7 NaCl, %0.02 EDTA) 2 sa + enzimatik çözelti (%0.05 tripsin, %0.02 EDTA pH 7.4) 24 sa + deterjan (%1 Triton X-100, %0.1 NaOH) 4x48 sa
Wang ve ark.	2010	Domuz	Hücresizleştirme çözeltisi (%0.1 SDS, %0.01 tripsin, 1 mM fenil metil sülfonil florür (PMSF), 20 µg/mL RNaz A ve 0.2 mg/mL DNaz) 2.5 hafta
Duan ve ark.	2011	Domuz	%0.02 tripsin 2 sa + %3 Triton X 2 sa + %4 deoksikolat 4 sa
GodierFurnémont ve ark.	2011	İnsan	Lizis çözeltisi (10 mM Tris, %0.1 EDTA, pH 7.4) 2 sa + SDS (%0.5) 6 sa + 50 U/mL DNaz ve 1 U/mL RNaz
French ve ark.	2012	Domuz	%1 SDS 4-5 gün + Triton X-100 30 dk
Sarig ve ark.	2012	Domuz	Hiper/hipotonik çözelti (%1.1 ve %0.7 NaCl) 2x2 sa + enzimatik çözelti (%0.05 tripsin, %0.02 EDTA pH 8.2) 2x48 sa + deterjan (%1 Triton-X-100, %1 NaOH) 2x24 sa
Higuchi ve ark.	2013	Fare	%1 SDS 1 sa + %1 Triton X-100 10 dk + DNaz 1 sa
Shevach ve ark.	2014	Domuz	Lizis çözeltisi (10 mM Tris, %0.1 EDTA, pH 8) 24 sa + SDS (%0.5) 4 gün + 40 U/mL Benzozonaz (50 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ , %0.01 BSA içerisinde, pH 8.0) 20 sa
Oberwallner ve ark.	2014	İnsan	Lizis çözeltisi (10 mM Tris, %0.1 EDTA, pH 7.4) 2 sa + SDS (0.5%) 6 sa + FBS 3 sa
Perea-Gil ve ark.	2015	Domuz	%1 SDS 72 sa + %1 Triton X-100 48 sa + 0.1 mg/mL DNaz I 72 sa - Sarig ve ark., 2012
Lee ve ark.	2015	Sıçan	Hücresizleştirme çözeltisi (%0.25 Triton X-100 ve 10 mmol/L NH ₄ OH) 1.5 sa + enzim çözeltisi (50 U/mL DNaz I ve 2.5 µL/mL RNaz A) 3 sa
Williams ve ark.	2015	Sıçan	%0.5 ya da %1 SDS 1-2 gün + %0.5 ya da %1 TritonX-100 4-8 sa
Ye ve ark.	2016	Domuz	%1 Triton X-100 3 gün + enzim uygulaması 2 sa %1 SDS 3 gün + enzim uygulaması 2 sa %0.5 tripsin 3 gün + enzim uygulaması 2 sa Uygulanan 3 ayrı yöntem sonrasında enzim uygulaması: RNaz A (20 mg/ml) ve DNaz (0.2 mg/ml) 2 sa
KC ve ark.	2017	Domuz	%1 SDS ve %0.5 P/S 2.5 hafta + %0.01 Triton-X 100 1 sa
Di Meglio ve ark.	2017	İnsan	- Oberwallner ve ark., 2014 - Godier-Furnémont ve ark., 2011 Protease inhibitör çözeltisi (aprotinin, 10 KIU/mL; %0.1 EDTA) 90 dk + proteaz inhibitör bulunan hipotonik çözelti (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 16 sa + %0.1 SDS 24 sa + reaksiyon tampon (50 U/mL DNaz I ve 1 U/mL RNaz A içeren 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 3 sa %1 SDS 12 sa + %1 Triton X-100 30 dk + antibiyotik çözeltisi (100 U/mL penisilin, 50 U/ml streptomisin ve amfoterisin B) 124 sa %1 SDS ve %1 Triton X-100 24 sa + antibiyotik çözeltisi (100 U/mL penisilin, 50 U/ml streptomisin ve 0.25 µg/mL amfoterisin B) 30 dk

2.3. Hücre Tabaka Teknolojisi

Hücre tabaka mühendisliği 1990'lı yıllarda Okano ve grubu tarafından geliştirilen sıcaklık duyarlı kültür kapları ile ortaya çıkan bir yaklaşımdır. Kullanılan modifiye kültür kapları ile hücreler 32°C'nin altındaki sıcaklıklarda 30 dakikadan daha kısa sürede enzim ya da şelatlayıcı ajan kullanılmasına gerek olmadan tabaka halinde elde edilebilmektedir (Tang ve Okano, 2014). Enzimatik yöntemde hücreler arasındaki hücre-hücre ve hücre-ECM bağlantıları parçalandığı için hücreler tek tek ve süspansiyon halinde yüzeyden kaldırılırlar. Hücre tabakası teknolojisinde ise hücrelerin birbirleri ile bağlantıları ve ECM yapısı parçalanmadan yüzeyden kaldırılabilirler, böylece enzimlere karşı duyarlı hücreler (hepatosit, glial hücreler vb.) farklılaşmış fenotiplerini koruyabilirler (Anilkumar ve ark., 2015). Ayrıca yanyana olan hücreler arasındaki çeşitli iyonların ve 1,200 Da'dan küçük moleküllerin geçişini sağlayan aralık bağlantı elemanı olan konneksin yapılarının korunması, fonksiyonel kardiyomiyosit hücrelerinin yüzeyden kaldırıldıktan sonra da senkronize biçimde kasılmaya devam etmesini sağlamaktadır (Chang ve Okano., 2011).

Hücre tabaka teknolojisi yaklaşımı ile deri, kalp, kornea, üriner sistem, karaciğer, periodontal doku, böbrek, akciğer, özofagus, pankreas, tendon, kemik ve kırık gibi dokuların rejenerasyonu için yapılan pek çok *in vitro* ya da *in vivo* çalışma bulunmaktadır (Şekil 2.8) ve bu çalışmalar çeşitli derleme makalelerinde literatür bilgisi olarak sunulmuştur (Haraguchi ve ark., 2012a; Anilkumar ve ark., 2015; Owaki ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015, Kirby ve ark., 2018). Çalışmalarda keratinositler, kardiyomiyositler, miyoblastlar, retinal pigment epitel hücreleri, korneal epitel hücreleri, ürotelyal hücreler, hepatositler, periodontal ligament hücreleri, böbrek epitel hücreleri, dermal fibroblast hücreleri, oral mukozal epitel hücreleri, pankreas adacık hücreleri, sinoviyal hücreler, kondrositler, endotel hücreler, çeşitli kök hücreler ya da indüklenabilir pluripotent kök hücreleri gibi farklı hücre tiplerinin tek başına ya da ko-kültür şeklinde birlikte hücre tabakası oluşturduğu yaklaşımlar bulunmaktadır.



Şekil 2.8. Hücre tabaka temelli doku mühendisliği pek çok farklı doku/organda uygulanmaktadır (Shimizu, 2014'ten değiştirilerek).

Okano ve grubu hücre tabakası çalışmalarının kliniğe aktarılarak rutin bir uygulama haline gelebilmesi için Hücre Tabaka Doku Mühendisliği Merkezi'ni (Cell Sheet Tissue Engineering Center, CSTE) kurmuşlar ve Hücre Tabaka Temelli Doku ve Organ Fabrikası (Cell Sheet-Based Tissue and Organ Factory, CSTOF) projesine başlamışlardır. İlk aşama olan doku fabrikasında (T-factory) hücrelerin biyopsiden izolasyonu, kültürü ve hücre tabakası elde etme işlemi standart prosedürler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada ise karmaşık vaskülerize organların üretilmesi için gelişmiş sistemlerin kurulması için çalışmalar devam etmektedir (Owaki ve ark., 2014).

Hayvan çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar göz önüne alınarak kornea (Nishida ve ark., 2004; Fields ve ark., 2016) kalp (Sawa ve ark., 2012; Imamura ve ark., 2016), özofagus (Ohki ve ark., 2012; Yamaguchi ve ark., 2017), periodontal doku (Chen ve ark., 2016; Iwata ve ark., 2018), kıkırdak (Maehara ve ark., 2017) ve kulak (Yamamoto ve ark., 2017) dokularında hücre tabakası teknolojisi kullanılarak klinik çalışmalar yapılmıştır. Deri (epidermis tabakası (J-TEC, Japan); epidermis tabakası Epicel® (Vericel, USA)) ve kalp (miyoblast tabakası TCD-51073 (Terumo Corporation, Japan)) dokularının rejenerasyonunda kullanılmak üzere hazır bulunan ticari ürünler de mevcuttur (Imamura ve ark., 2016; Kirby ve ark., 2018). Kıkırdak dokuda ise allojenik kondrosit hücreleri ile üretilen RevaFlex (ISTO Technologies, USA) faz 3 klinik çalışmalarına devam edilmektedir (DuRaine ve ark., 2015).

2.3.1. Hücre Tabakalarının Oluşturulmasında Alternatif Yaklaşımlar

Hücre tabakalarının sıcaklık duyarlı kültür kapları kullanılarak elde edilmesi özel ekipman gerektirmesi, pahalı olması ve zaman alan bir yöntem olması gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle farklı yöntemler ile hücre tabakası oluşturulması için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlar; enzim uygulaması, amniyotik membran, manyetik kuvvet, elektrokimyasal polarizasyon, elektrokimyasal-uyarılı pH değişimi, iyonik çözünme, ışık etkisi, fibrin kaplı yüzeyler, yüksek hücre yoğunluğu ve serum etkisi (Owaki ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015; Kirby ve ark., 2018) olup, tez kapsamında kullanılan yaklaşım olması nedeniyle aşağıda askorbik asit uygulamasına yer verilmiştir.

Askorbik Asit Uygulaması

Askorbik asit uygulaması hücre tabakası elde etmek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Diğer prosedürlere göre ekstra bir ekipman gerektirmemesi, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olması en önemli avantajları arasındadır. Askorbik asitin hücre tabakası elde etmek amacıyla kullanıldığı ilk çalışmada kan damarı dokusu oluşturmak için insan düz kas hücreleri ve fibroblastları askorbik asit içeren ortam içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür sonunda askorbik asitin ECM sentezini artırdığı ve hücrelerin bütün bir hücre tabakası oluşturarak yüzeyden kaldırılabildiği belirtilmiştir (L'Heureux ve ark., 1998). Başka bir çalışmada ise askorbik asit 3B fibroblast kültürü oluştururken kullanılmış, lizin ve prolinin posttranslasyonel hidroksilasyonunu sağladığı, prokollajen mRNA ve kollajen sentezini artırdığı belirtilmiştir (Naughton, Jacob ve Naughton, 1998). Michel ve ark. ise askorbik asit yardımı ile keratinosit ve fibroblast hücre tabakaları oluşturarak insan deri eşleniğini üretmişlerdir (Michel ve ark., 1999).

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile kemik iliği kökenli MKH (Jin ve ark. 2014; Yan ve ark. 2014; Guo ve ark. 2015), AKMKH (Vermette ve ark. 2007; Trottier ve ark. 2008; Yu ve ark. 2014), periodontal ligament ve göbek kordonu (Wei ve ark. 2012) kökenli mezenkimal kök hücreler de askorbik asit kullanılarak hücre tabakası şeklinde elde edilmiştir. Bazı çalışmalarda ise askorbik asit ve deksametazon birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kullanılan ajanların ECM yapısındaki proteinlerin sentezini artırdığı ve böylelikle sağlıklı hücre tabakası yapısının oluşmasını sağladığı düşünülmektedir (Akahane ve ark. 2008; Nakamura ve ark. 2010). Askorbik asitin ECM sentezini artırmanın yanında, apoptozu azaltarak antioksidan etki gösterme ve

farklılaşmayı baskılayıp Oct4 ve Sox2 gibi pluripotensi markırlarının sentezini artırıcı özellikleri de bulunmaktadır (Guo ve ark., 2015).

2.3.2.Hücre Tabaka Teknolojisinin Avantajları ve Dezavantajları

Hücre tabaka teknolojisinin doku mühendisliği ve rejeneratif çalışmalarda sağladığı pek çok avantaj bulunmaktadır (Matsuda ve ark., 2007; Haraguchi ve ark., 2012a; Anilkumar ve ark., 2015; Kanai, Yamato ve Okano., 2014; Chen ve ark., 2015):

- Trypsin, dispaz gibi enzimler kullanılmadığı için hücreler hasar görmez ve farklılaşmış fenotipleri etkilenmez.
- Hücreler ECM, iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri ve diğer önemli fonksiyonel yüzey proteinlerini kaybetmezler.
- Hücre tabakası alıcı dokuya iskele gibi bir taşıyıcı olmadan ya da dikiş kullanılmadan transplante edilebilir.
- Çok katlı tabakalar ve farklı hücre tipleri kullanılarak *in vitro* da kalın dokular elde edilebilir.
- Hücre süspansiyonu enjeksiyonuna göre minimum hücre sel kayıp olması doğrudan hücre enjeksiyonuna karşı avantaj sağlar.
- Doku iskelesi kullanılmadığı için biyobozunmaya bağlı immün yanıt oluşturmaması klasik hücre-iskele yapısına karşı avantaj sağlar.
- Hücre sel açıdan daha yoğun dokular üretilebilir.
- Hücre tabakalarının transplantasyonu hücre süspansiyonu enjeksiyonuna göre daha güçlü doku fonksiyonu, daha bütün doku rejenerasyonu ve daha güçlü terapötik etki sağlar.

Hücre tabakalarının kullanılmasının dezavantajları arasında ise şu maddeler sayılabilir:

- Sıcaklık duyarlı kültür kapları kullanılacaksa özel ekipman gerektirir ve maliyeti arttırır.
- Özel yüzey kaplamalarının hazırlanması zaman almaktadır.
- Elde edilen tabaka yapıları incedir, bu nedenle kalın dokular elde etmek için tabakaların çok katmanlı olarak birleştirilmesi gerekmektedir. Kalın dokular üretildiğinde ise oksijen ve besin yetmezliği nedeniyle nekrotik bölgeler meydana gelebilir. Bunun önlenmesi için büyüme faktörleri/gen transferi ile modifikasyon veya endotel hücreleri ile ko-kültür yapılarak damarlanma çalışmaları yapılmaktadır.

2.3.3. Kalp Doku Mühendisliğinde Hücre Tabakası Çalışmaları

Geliştirilen hücre tabaka teknolojisi ile kalp hasarlarında uygulanan hücre temelli tedavilere pek çok avantaj sağlanmıştır. Kalp rejenerasyonu için pek çok farklı hücre türü ve yöntem kullanılarak tek ya da çok katmanlı hücre tabakaları elde edilmiş ve bu tabakalar *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda (Çizelge 2.4) kullanılmıştır.

Oluşturulan kalp yamalarının klinikte etkin şekilde kullanılabilmesi ve olumlu sonuçlar alınabilmesi için kalın dokuların üretilmesi gerekmektedir. Bazı çalışmalarda elde edilen doku kalınlıklarının arttırılması için hücreleştirilmiş ECM yapısı ile hücre tabaka mühendisliği yaklaşımı birleştirilmiştir. Hata ve ark. (2010) kasılma fonksiyonu olan kalp yamasının kalınlığını arttırmak için sıcaklık duyarlı kültür kaplarının yardımı ile elde ettikleri 3 katlı kardiyomiyosit hücre tabakasını, kardiyomiyosit ekimi yapılan hücreleştirilmiş domuz ince bağırsak submukozası (SIS) ile birleştirmişlerdir. Böylece ~600-800 µm kalınlıkta bir yama elde etmişlerdir. Elde edilen başarıya rağmen araştırmacılar kullanılan SIS iskelenin ventrikül kasılmasını destekleyecek şekilde doğal ECM'ye benzerlik derecesinin ve kullanılan hücre türünün klinik uygulamalardaki uygulanabilirliğinin sorun oluşturabileceğine vurgu yapmışlardır. Chen ve ark. (2008b) ise sığır perikardiyum dokusunu hücreleştirilmişler ve ince kesitlere ayırmışlardır. Daha sonra metil selüloz bazlı sıcaklık duyarlı kültür kapları yardımı ile ürettikleri kemik iliği MKH tabakasını katlayarak çok katmanlı hale getirmişler ve bu tabakaları hücrelendirilmiş ECM tabakalarının arasına yerleştirerek sandviç modeli oluşturmuşlardır. Elde ettikleri yamayı hasarlı sıçan kalbine transplante etmişler, histolojik ve fonksiyonel analizlerde sandviç grubunda, kontrol ve hücrelendirilmiş iskele implante edilen gruba göre daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir.

Çizelge 2.4. Kalp rejenerasyonu amacıyla yapılan hücre tabaka çalışmaları.

Yazar	Yıl	Hücre türü	Hücre tabakası elde etmek için kullanılan yöntem	İn-vivo transplantasyon
Itabashi ve ark. Fruta ve ark.	2005 2006	Sıçan kardiyomiyosit	Fibrin kaplı TCPS	Sıçan
Memon ve ark.	2005	Sıçan iskelet kası miyoblast	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Hata ve ark.	2006	Köpek iskelet kası miyoblast	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Köpek
Haraguchi ve ark.	2006	Sıçan kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	-
Kondoh ve ark.	2006	Hamster miyoblast	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Hamster
Miyahara ve ark.	2006	Sıçan AKMKH ve dermal fibroblast	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Sekine ve ark.	2006a	Sıçan kardiyomiyosit ve dermal fibroblast	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Sekine ve ark.	2006 b	Sıçan kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Sekiya ve ark.	2006	Sıçan kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Kubo ve ark.	2007	Sıçan kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	-
Sekine ve ark.	2008	Sıçan kardiyomiyosit ve endotel	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Hoashi ve ark.	2009	Sıçan iskelet kası miyoblast	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Bel ve ark.	2010	Primat AKMKH ve embriyonik kök hücresi ko-kültür	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Makak
Asakawa ve ark.	2010	HUVEC ve İnsan dermal fibroblast ko-kültür	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	-
Sekine ve ark.	2011	Sıçan kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Haraguchi ve ark.	2012 b	Sıçan kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	-
Kawamura ve ark.	2012	İnsan İPKH kökenli kardiyomiyosit	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Domuz
Ishida ve ark.	2014	Domuz AKMKH	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Domuz
Yeh ve ark.	2014	Tavşan AKMKH	Yüksek hücre ekim yoğunluğu ve serum	Tavşan
Masumoto ve ark.	2014	İnsan İPKH kökenli kardiyomiyosit ve vasküler hücreler	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan
Sakaguchi ve ark.	2018	Sıçan kardiyomiyosit ve endotel	Sıcaklık duyarlı kültür kabı	Sıçan

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında kullanılan malzemeler ve gerçekleştirilen deneysel çalışmalar açıklanmıştır. Deneysel çalışmalar 3 temel aşamada aşağıda belirtilen sıralama doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında ko-kültür hücre tabakası üretimi ve elde edilen tabakaların çeşitli analizler ile karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla ilk önce hücre tabakası çalışmalarında kullanılacak H9C2 kardiyomiyoblast hücre hattı ve kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerine ait karakterizasyon çalışmaları detaylı şekilde anlatılmıştır. Hücre tabakası elde etmek için, H9C2 hücreleri kullanılarak 3 farklı yöntem denenmiş ve elde edilen tabakaların özellikleri incelenmiştir. Daha sonra H9C2 ve endotel hücreleri ile ko-kültür hücre tabakası elde etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve elde edilen kardiyovasküler hücre tabakalarının karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tezin ikinci aşamasında sıçan kalp kesitlerinin hücreleştirilmesi gerçekleştirilmiş, hücreleştirme işleminin başarısı farklı analizler ile değerlendirilmiştir. Hücreleştirilmiş ECM iskele üzerinde adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AKMKH) endotel hücreler ile birlikte ko-kültür ekimi yapılmış, kök hücrelerin kimyasal uyaran varlığında kardiyomiyojenik farklılaşması incelenmiştir. Böylece miyokardiyal yama üretimi gerçekleştirilmiştir.

Son aşamada ise üretilen miyokardiyal yama, kardiyovasküler hücre tabakası ile birleştirilmiş ve kök hücrelerin kimyasal indükleyici ajan varlığında kardiyomiyojenik farklılaşması incelenmiştir. Böylece kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan olan H9C2 (embriyonik sıçan ventrikül kardiyomiyoblast) hücre hattı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü'nde Prof. Dr. Belma Turan'ın laboratuvarından temin edilmiştir. Sıçan primer kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri Applied Biological Materials (katalog numarası T4816; ABM, Kanada) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan DMEM yüksek glikoz ve düşük glikoz ortamları

Biowest (Fransa), α -MEM ortamı Biochrom (Almanya), Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS) ve fetal sığır serumu (FBS) Hyclone (ABD) firmasından temin edilmiştir. Tripsin/EDTA çözeltisi ve penisilin-streptomisin (P/S) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Gentamisin ve amfoterisin B Life Technologies (ABD) firmasından, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblastik büyüme faktörü (bFGF) Abcam (İngiltere) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin üreme kinetiğinin belirlenmesi amacıyla yapılan analizlerde kullanılan MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) ve izopropanol Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından; hidroklorik asit (%37, v/v) Merck (Almanya), PrestoBlue ise Invitrogen (ABD) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan 96, 24, 12, 6 gözlü ve 25, 75, 175 cm²'lik hücre kültür kapları (TCPS) ve 4 gözlü 35 mm çaplı Petri kapları Greiner (Almanya), 10 mm çaplı lameller Marienfeld (Almanya), sıcaklık-duyarlı kültür kapları ThermoFisher Scientific (ABD) firmalarından satın alınmıştır. Hücrelerin fiksasyonunda kullanılan metanol, glutraldehit ve paraformaldehit, SEM analizi için kullanılan hekzametildisilazan (HMDS) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücrelerin morfolojik incelenmesi amacıyla kullanılan Triton X-100, sığır serum albümini (BSA), kristal viyole; hücre tabakalarının üretiminde kullanılan L-askorbik asit; canlı/ölü hücre boyama analizinde kullanılan Etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM Sigma (Almanya) firmasından; 4'-6- diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru Invitrogen (ABD) firmasından alınmıştır. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre (AKMKH) izolasyon protokolünde dokuyu parçalamak için kullanılan Tip 1 kollajenaz enzimi Biochrom (Almanya), hücreleri ayırmak için kullanılan hücre filtresi (70 μ m çap gözenekli) BD Biosciences (ABD) firmasından alınmıştır. Kardiyomiyojenik farklılaştırma amacıyla kullanılan retinoik asit ve 5-Azasitidin (5-Aza) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. İmmünofloresan boyamalar için kullanılan primer antikolar (tavşan poliklonal anti-miyozin hafif zincir 2, Anti-MLC2, ab79935, fare monoklonal anti-kardiyak troponin T, Anti-TNT, ab10214, tavşan poliklonal anti-von Willebrand Faktör, Anti-VWF, ab6994) ve sekonder antikolar (keçi anti-tavşan IgG Alexa Fluor 488 (ab150081), keçi anti-fare IgG Alexa Fluor 568 (ab175701) ve keçi anti-tavşan IgG Alexa Fluor 405 (ab175653)) Abcam (İngiltere) firmasından satın alınmıştır.

Hücresizleştirme işlemi için kalp kesitlerinin alınmasında kriyostat (Leica CM 3050 ya da Leica CM 1900, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Trishidroksimetil aminometan

(Tris) Merck (Almanya), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), sodyum dodesil sülfat (SDS), fosfat tampon çözeltisi (PBS), nistatin, fenilmetil-sülfonil florür (PMSF), oktil- β -D-glukopiranosid (OGP), deoksiribonükleaz I, ribonükleaz A ve NaCl Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Magnezyum klorür hegzahidrat ($MgCl_2(H_2O)_6$) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. RNA izolasyonunda kullanılan TRIzol Invitrogen (ABD), RNA izolasyon kitleri Qiagen (Almanya) ve EURX® (Polonya), cDNA sentezi ve RT-PCR analizi için kullanılan kitler ise ThermoFisher Scientific (ABD) ve Solis BioDyne (Estonya) firmalarından satın alınmıştır.

3.2. Deneysel Çalışmalar

3.2.1. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretiminde Kullanılacak Hücrelerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1.1. H9C2 Kardiyomiyoblast Hücre Hattı

H9C2 hücreleri embriyonik sıçan kalbinden izole edilen kardiyomiyoblast hücreleridir. Hücreler %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) P/S içeren DMEM (yüksek glikoz) içerisinde 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Hücrelerin dondurularak saklanması işleminde ise dondurma ortamı olarak %5 (v/v) DMSO, %95 (v/v) serumlu ortam kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında 20. pasaj hücreleri kullanılmıştır. Hücreler 1×10^4 hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde üreme kinetiklerinin incelenmesi amacıyla yapılacak analizler için 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL, kristal viyole boyama için 6 gözlü kültür kaplarına 2 mL, immüno floresan boyama için 4 gözlü 35 mm çaplı Petri kaplarına 2 mL ortam ile ekilmiştir ve 14 gün boyunca kültüre devam edilmiştir. İki ya da üç günde bir taze ortam değişimi yapılmıştır. Tez kapsamında steril ortam gerektiren tüm deneyler laminar akışlı kabin (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi

Hücrelerin üreme kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla MTT analizi ve hemositometrik hücre sayımı yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre hücrelerin spesifik üreme hızı ve ikilenme süresi logaritmik üreme fazında, Eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (3.1)$$

Burada x hücre sayısını, μ özgül üreme hızını ve t zamanı göstermektedir.

MTT analizi için kültürün belirlenen zamanlarında hücrelerin üzerindeki ortam

uzaklaştırılmış, her bir göze 600 µL serumsuz kültür ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL, PBS içerisinde) ilave edilmiş ve hücreler 3 sa 37°C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir. Süre sonunda MTT içeren ortam uzaklaştırılmış, gözlere 0.04 M HCl içeren 400 µL izopropanol çözeltisi ilave edilmiştir. MTT, canlı hücre mitokondrisinde mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. İzopropanol ile bu kristaller çözündüğünde hücre canlılığıyla orantılı yoğunlukta mor renkli çözelti elde edilir. Çözeltiden 200 µL alınıp, 96 gözlü kültür kaplarına aktarılmış ve absorbands 570 nm dalga boyunda 690 nm referans değeriyle UV spektrofotometrede (Asys UVM 340, Avusturya) ölçülmüştür.

Hemositometrik hücre sayımı için kültürün belirlenen zamanlarında sayım yapılacak gözlerdeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler %0.25'lik (v/v) tripsin/EDTA kullanılarak yüzeyden kaldırılmıştır. Canlı hücrelerin daha kolay belirlenebilmesi için tripan mavisi ile boyama yapılmış ve Neubauer lamı kullanılarak sayım yapılmıştır.

Morfolojik İnceleme

Hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi için kristal viyole ve immünofloresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyama yapılacak günlerde hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve DPBS ile iki kez yıkama yapılmıştır. Daha sonra hücreler 4°C' de 20 dk 1:1 (v/v) aseton-metanol çözeltisi ile muamele edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra hücrelerin üzerine %0.5'lik (w/v) kristal viyole çözeltisi ilave edilmiş ve 30 dk inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda boya, akan su altında yıkama yapılarak hücrelere zarar vermeden uzaklaştırılmış ve invert mikroskop (Olympus IX71, A.B.D) ile incelenmiştir.

Hücre çekirdeğinin ve hücre iskeletindeki aktin filamentlerinin görüntülenmesi için DAPI ve Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru ile immünofloresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 2 kez yıkama yapılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında %2.5 (v/v) glutaraldehit ile 10 dk muamele edilerek fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyonun ardından 3 kez PBS ile yıkama yapılmış ve membran geçirgenliğinin artırılması için %0.1 (v/v) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 10 dk muamele yapılmıştır. Daha sonra %1 (w/v) BSA çözeltisi (PBS içinde; PBS-A) ile 3 kez yıkama yapılmış, %1 (v/v) Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru ve %0.1 (v/v) DAPI içeren PBS-A çözeltisi ile karanlıkta 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Süre

sonunda antikor çözeltisi uzaklaştırılmış ve hücreler PBS-A ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından hücrelerin üzerine kapatma ortamı eklenmiş ve cam lameller ile kapatılarak floresan mikroskop (Olympus IX71, A.B.D) ile görüntüleme yapılmıştır.

3.2.1.2. Primer Sıçan Kardiyak Mikrovasküler Endotel Hücreleri

Kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri (KMEH) %20 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin, %1 (v/v) P/S ve 10 ng/mL VEGF içeren DMEM (düşük glikoz) hücre kültür ortamında 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Hücrelerin dondurularak saklanması işleminde ise dondurma ortamı olarak %10 DMSO (v/v), %90 (v/v) FBS kullanılmıştır. Hücrelerin karakterizasyon çalışmaları 6. pasajda gerçekleştirilmiştir. Hücreler 5x10³ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde üreme kinetiklerinin incelenmesi amacıyla yapılacak analizler için 24 gözlü kültür kaplarına 1 mL, kristal viyole için 6 gözlü kültür kaplarına 2 mL, immünofloresan boyama için 4 gözlü 35 mm çaplı Petri kaplarına 2 mL ortam ile ekilmiştir ve 14 gün boyunca kültüre devam edilmiştir. İki ya da üç günde bir taze ortam değişimi yapılmıştır.

Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi

Hücrelerin üreme kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla MTT analizi ve hemositometrik sayım yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre hücrelerin spesifik üreme hızı ve ikilenme süresi logaritmik üreme fazında, ‘3.2.1.1.’de Üreme Kinetiklerinin İncelenmesi’ bölümündekine benzer şekilde 3.1 numaralı eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

Morfolojik İnceleme

Hücrelerin morfolojik olarak incelenmesi için kristal viyole boyama ile DAPI ve Alexa Flour 488 Pallocidin konjuge anti-F-aktin antikorları ile immünofloresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyamalar için ‘3.2.1.1.’de Morfolojik İnceleme’ bölümünde uygulanan işlemler uygulanmıştır.

Endotel hücrelere spesifik von Willebrand Faktör (VWF) antikorları kullanılarak immünofloresan boyama yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle hücreler %4 (w/v) paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 20 dk fikse edilmiş, boyama yapılana kadar PBS içerisinde +4°C’de bekletilmiştir. Boyama yapılacağı zaman hücreler 1 kez PBS ile yıkanmış, daha sonra geçirgenlik ve bloklama işlemi aynı anda yapılmıştır. Bu amaçla %0.1 (v/v) Triton X-100, %5 (v/v) normal keçi serumu (NGS) içeren PBS-A çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 sa inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra 1/400 oranında PBS-A ile seyreltilen primer antikor ile 16 sa +4°C’de inkübasyon yapılmıştır. Üç kez PBS-A ile

yıkama yapıldıktan sonra 1/250 oranında PBS-A (%5 (v/v) NGS içeren) ile seyreltilen sekonder antikor (Alexa Fluor 488) ile oda sıcaklığında 2 sa inkübasyon yapılmış ve floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır.

***In Vitro* Tübül Oluşumu**

Endotel hücrelerin ilerleyen pasajlarda (pasaj 11) fonksiyonel özelliklerini koruyup koruyamadıklarının belirlenmesi için *in vitro* tübül oluşumu analizi yapılmıştır. Bunun için literatürde sıklıkla kullanılan Matrijel'in (Corning, katalog numarası 354230) büyüme faktörü azaltılmış olan formu tercih edilmiştir ve literatüre benzer bir protokol uygulanmıştır (Francescone ve ark., 2011). Matrijel normalde -20°C'de donmuş halde muhafaza edilmektedir ve 10-22°C arasında jelleşmeye başlamaktadır. Deneyden 1 gece önce Matrijelin +4°C'de bekletilmesi ve sıvı hale geçmesi sağlanmıştır. Ayrıca deney sırasında Matrijel ile temas edecek mikropipet uçları, 96 gözlü kültür kabı da en az 3-4 sa önceden -20°C'de bekletilmiştir. Deney günü Matrijel, buz üzerinde laminar kabin içerisine alınmış ve tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Doksanaltı gözlü kültür kabındaki hücre ekimi yapılacak gözlere 50 µL Matrijel eklenmiş ve kültür kabı 37°C'de inkübatöre yerleştirilerek Matrijelin jelleşmesi beklenmiştir. Bu süreçte endotel hücreleri yüzeyden kaldırılmış ve 2×10^4 ya da 4×10^4 hücre/göz olacak şekilde sayım yapılmış, hücreler 100 µL besi ortamı içerisinde jelleşen Matrijel üzerine ekilmiştir. Kültür ortamında VEGF'in tübül oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi için VEGF içeren ve içermeyen endotel hücre ortamı kullanılmıştır. Belirli saatlerde optik mikroskop görüntüleri alınmış, ve analiz sonunda canlı/ölü hücre boyama analizi yapılmıştır. Boyama için kültür ortamı çekildikten sonra Matrijel PBS ile yıkanmıştır ve daha sonra 2 µM kalsein-AM ve 2 µM etidyum homodimer-1 içeren boya çözeltisi (Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS içerisinde) ile karanlıkta 30 dk oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Inkübasyon sonrası PBS ile yıkama yapılarak floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır.

3.2.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Ko-kültür hücre tabakası üretimi öncesinde yalnızca H9C2 hücreleri kullanılarak farklı üretim yöntemleri denenmiş ve en uygun yönteme karar verilmiştir.

3.2.2.1. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi

Hücre tabakalarının üretilmesi için H9C2 kardiyomiyoblast hücreleri 25-26. pasajlarda kullanılmış ve literatürde kullanılan 3 farklı yöntem denenmiştir; i) sıcaklık-duyarlı hücre kültürü kaplarının kullanımı, ii) yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu, iii) askorbik asit (AA) uygulaması.

Sıcaklık-Duyarlı Hücre Kültürü Kapları

H9C2 hücreleri ile hücre tabakası oluşturmak için ticari olarak üretilen sıcaklık-duyarlı hücre kültür kapları kullanılmıştır. Hücre ekiminden önce hücreler ile kültür kabının etkileşimini artırmak için yüzey 3 sa 37°C'de 1 mL FBS ile muamele edilmiştir. Hücreler 10^4 hücre/cm² yoğunluğunda olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiş, %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) P/S içeren DMEM yüksek glikoz ortamında kültüre edilmiştir. İki ya da üç günde bir ortam değişimi yapılmış ve kültürün 7. gününde hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaştıkları düşünülerek kültür kabı daha önceden 20°C'ye ayarlanmış olan inkübatöre yerleştirilmiş ve hücre tabakası yüzeyden kaldırılmıştır. Yüzeyden kaldırılan hücre tabakası steril 35 mm çaplı Petri kabına aktarılmış ve az miktarda ortam eklenerek inkübatör içerisine yerleştirilmiş, tutunma gerçekleştikten sonra 2 mL taze ortam eklenmiştir. İlerleyen günlerde tabakanın invert mikroskop görüntüleri alınmıştır.

Yüksek Hücre Ekim Yoğunluğu ve FBS Konsantrasyonu

Sıcaklık-duyarlı hücre kültür kapları kullanılmadan normal TCPS yüzeyler üzerinde hücre tabakası oluşturmak için H9C2 hücreleri 6 gözlü kültür kaplarına daha yüksek yoğunlukta (5×10^4 hücre/cm²) ekilmiştir. Hücrelerin kollajen sentezini artırmak ve tabaka oluşturmalarını desteklemek için, kullanılan hücre kültür ortamında FBS oranı %20 (v/v) seviyesine çıkarılmıştır. İki ya da üç günde bir taze ortam değişimi yapılmıştır. Kültürün 3. ve 7. gününde hücreler kısa süreli (15 sn) tripsinizasyon ve sadece soğuk DPBS ilavesi ile tabaka halinde kaldırılmaya çalışılmış, fakat başarılı olunamamıştır. Dokuzuncu günde kültür kabının kenarından DPBS uygulaması yapılarak tabakalar başarılı şekilde kaldırılmış, yeni yüzeye aktarılıp tutunması sağlanmış ve invert mikroskop görüntüleri incelenmiştir.

Askorbik Asit (AA) Uygulaması

Hücre tabakası üretimi için kullanılan AA uygulaması yönteminde ise 2. yönteme benzer şekilde hücreler 5×10^4 hücre/cm² yoğunlukta 6 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir.

Ekimden bir gün sonra kültür ortamı 20, 50 ve 100 µg/mL AA konsantrasyonu içeren ortam ile değiştirilmiş, kontrol gruplarına AA eklemesi yapılmamıştır. AA eklemesi yapıldıktan sonra kültürün 2. ve 4. gününde ortam değişimi yapılmış, hücre tabakaları DPBS uygulaması ile 5. günde yüzeyden bütün halinde kaldırılmıştır. Daha sonra serum konsantrasyonu %10'a düşürülerek aynı çalışma tekrarlanmış, AA uygulaması ile %10 (normal-FBS; N-FBS) ve %20 (yüksek-FBS; Y-FBS) (v/v) olmak üzere 2 farklı FBS konsantrasyonunda elde edilen tabakalar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3.2.2.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyon Çalışmaları

Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hücre tabakasını oluşturan hücrelerin canlılık analizleri için etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM boyama yapılmıştır. Analizler hücre tabakaları yüzeyden kaldırılmadan önce ve kaldırılıp yeni yüzeye tutundurulduktan sonra gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi için hücreler 2 µM kalsein-AM ve 2 µM etidyum homodimer-1 içeren boya çözeltisi (Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS içerisinde) ile 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiş, PBS ile yıkama yapıldıktan sonra floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır.

İmmüno Floresan Boyama

Hücrelerin kaldırılmadan önce ve kaldırılıp yeni yüzeye tutundurulduktan sonraki morfolojik incelemeleri için hücre çekirdekleri DAPI, hücre iskeletindeki aktin filamentleri ise Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru ile boyanmış ve floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Boyamalar için '3.2.1.1. Morfolojik İnceleme' bölümünde uygulanan yöntem uygulanmıştır.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

Farklı kültür kabı yüzey materyali, TCPS ya da PIPAAm kaplı TCPS, hücre ekim yoğunluğu, FBS ve AA konsantrasyonlarının spesifik genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi gerçekleştirilmiş, hücrelerin kardiyak troponin T (*Tnnt2*), kardiyak spesifik L-tipi voltaj bağımlı Ca^{+} kanalı (Alfa 1C, *Cacna1c*), dengeleyici nükleozid taşıyıcı-1 (ENT-1, *Slc29a1*) ve kollajen I (Kol-I, *Col1a1*) genleri ile iskelet kası spesifik L-tipi voltaj bağımlı Ca^{+} kanalı (Alfa 1s, *Cacna1s*) gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarının, TCPS yüzey ile karşılaştırılması ve TCPS yüzeylerde yüksek ve düşük hücre ekim yoğunluğunun karşılaştırılması amacıyla 40 mm çapındaki

TCPS kültür kaplarına düşük yoğunlukta (10^4 hücre/cm²) hücre ekimi yapılmıştır. RT-PCR analizi için hücre tabakaları yüzeyden tripsinizasyon ile kaldırılarak steril Eppendorf tüplere alınmış ve analiz yapılana kadar -80°C’de saklanmıştır. Analiz yapılacağı zaman ilk önce RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra cDNA sentezi yapılmış ve RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Mini Kit kullanılmış ve kit içerisinde verilen talimatlar uygulanmıştır. İzolasyon yapılacağı zaman her bir örneğin üzerine 500 µL TRIzol çözeltisi eklenmiş, 3 kez (toplamda 15 s) vortekslenmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık 20 dk bekletilerek parçalanmıştır. Daha sonra örneklerin üzerlerine 100 µL kloroform eklenmiş, kapakları kapatıldıktan sonra 20 kere dikkatlice alt üst edilmiş ve oda sıcaklığında 3 dk inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında, örnekler 4°C’de 10 dk 13,000 rpm’de santrifüjlenmiş ve üstteki sulu faz yeni bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine toplanan sıvı faza eşit olacak şekilde %70’lik (v/v) etanol eklenmiş, karıştırıldıktan sonra çözelti kit içerisindeki RNeasy spin kolonlara aktarılmış, 4°C’de 15 s 13,000 rpm’de santrifüjlenmiştir. İzole edilecek RNA’daki DNA kontaminasyonunu azaltmak için DNaz (Qiagen RNase Free DNase Set) uygulaması yapılmıştır. Eppendorf tüpünün altındaki sıvı dökülmüş, kolon üzerine 350 µL RW1 çözeltisi eklenerek 13,000 rpm’de 15 sn santrifüj yapılmıştır. Her örnek için 10 µL DNaz stok çözeltisi+70 µL RDD çözeltisi karıştırılarak elde edilen karışım kolon membranı üzerine bırakılmış ve oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon yapılmıştır. Ardından 350 µL RW1 çözeltisi eklenmiş ve 13,000 rpm’de 15 sn santrifüj yapılmıştır. Eppendorf tüpünün altındaki sıvı dökülmüş ve kolona 500 µL RPE çözeltisi eklenerek 13,000 rpm’de 15 sn santrifüj yapılmıştır. Tüpte toplanan sıvı dökülmüş ve kolona tekrar 500 µL RPE çözeltisi eklenerek 13,000 rpm’de 2 dk santrifügasyon yapılmıştır. Son aşamada kolonda çözelti kalmaması için kolon toplama tüpüne aktarılmış 13,000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası kolon yeni bir Eppendorf tüp içerisine yerleştirilmiş ve membran üzerine 30 µL RNaz içermeyen steril su eklenerek 13,000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Bu sayede spin kolon membranında tutunan RNA, su ile membrandan yıkanarak santrifüj tüpünde toplanmıştır. RNA konsantrasyonları NanoDrop2000c (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. İzole edilen RNA çözeltisi analiz yapılncaya kadar kısa süreli saklanacaksa -20°C’de, uzun süreli saklanacaksa -80°C’de bekletilmiştir.

cDNA sentezi için Applied Biosystem cDNA Kit kullanılmış, reaksiyon Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak 25°C’de 10 dk, 40°C’de 120 dk ve 85°C’de 5 dk inkübasyon sonucu gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR analizi 5xHot Fire Pol® Eva Green® qPCRMix Plus ya da 5xHot Fire Pol® Eva Green® qPCR supermix (SolisBioDyne, Estonya) kiti kullanılarak LightCycler® Nano Instrument (Roche, İsviçre) cihazında yapılmıştır. RT-PCR analiz koşulları ise denatürasyon basamağı 95°C’de 900 sn; uzama basamağı 95°C’de 15 sn, primerin yapışma sıcaklığında 20 sn ve 72°C’de 20 sn olacak şekilde 45 döngü ve son olarak ayrılma basamağı 60°C’de 20 sn ve 95°C’de 20 sn olacak şekilde uygulanmıştır. Referans gen (Housekeeping gene) olarak *Gapdh* kullanılmıştır. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ifadesi olarak verilmiştir. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre hesaplanmış, sonuçlar kontrol grubunun katları şeklinde verilmiştir. Tez kapsamında RT-PCR analizinde kullanılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR analizlerinde kullanılan genlerin primer dizileri.

Genler	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Gapdh</i>	F: GTGCTGAGTATGTCGTGG	R: GGGAGTTGTCATATTTCTCGT
<i>Tnnt2</i>	F: GGAATTTGATGACATCCAC	R: CCTCTTCCTCCTTCTTCC
<i>Cacna1c</i>	F: CCTGAACTCCATCATCAAGG	R: GGAACATCTATTATGCCCTCC
<i>Slc29a1</i>	F: AACCAATCCATCAAAGCCA	R: CACAGGGATGAAGTAGCAG
<i>Cacna1s</i>	F: GTCCCTGAGATTCTGCCGA	R: ATGGTGAGCAAGATGATGGT
<i>Col1a1</i>	F: TCCTGCCGATGTCGC	R: CAAGTTCCGGTGTGACTCGTG
<i>Cx43</i>	F: TCAAAGTGGCCCAGACTGAC	R: CCGTGCTCTTCAATCCCGTA
<i>Gata4</i>	F: CCCAATCTGATATGTTTGATGACT	R: GATGAGGGGCGGTTGATAC

3.2.3. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretimi

3.2.3.1. H9C2 Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Çalışmaları

Tez kapsamında kardiyovasküler hücre tabakaları üretilmiştir. Literatürde farklılaştırılmış H9C2 hücrelerinin farklılaştırılmamış hücrelere göre primer kardiyomiyosit kültürü açısından daha iyi bir model olduğu, aynı zamanda primer izolasyon için canlı hayvan kullanımı gerektirmemesi açısından avantajlı olduğu

belirtilmektedir (Branco ve ark., 2015). Bu amaçla H9C2 hücrelerinin kardiyomiyojenik farklılaştırılmasına karar verilmiştir.

Farklılaşma çalışmaları 21. pasajdaki hücreler ile gerçekleştirilmiştir. H9C2 hücreleri 5×10^3 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde 24 gözlü (PrestoBlue ve PCR analizi için) kültür kaplarına ve 4 gözlü 35 mm çaplı Petri kaplarına (immünofloresan boyamalar için) ekilmiştir. Ekimden 1 gün sonra H9C2 hücrelerinin kardiyomiyositlere farklılaşmasını desteklemek amacıyla kültür ortamı farklı retinoik asit (RA) konsantrasyonları (10 nM, 50 nM ve 100 nM) ve %1 (v/v) FBS içeren farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Kontrol grubunda %10 (v/v) FBS içeren ortam kullanılmaya devam edilmiş, RA eklemesi yapılmamıştır. Hücreler 7 gün boyunca kültüre edilmiş ve ortamlar her gün taze hazırlanan ortam ile değiştirilmiş, belirlenen günlerde analizler gerçekleştirilmiştir.

PrestoBlue Analizi

Farklılaşma ajanının hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla PrestoBlue analizi gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra her bir göze 40 µL PrestoBlue ve 360 µL besi ortamı (kültür sırasında kullanılan farklılaştırma ya da kontrol ortamı) eklenmiştir. Hücreler 2 sa 37°C’de inkübe edildikten sonra renk değiştiren ortamdaki 200 µL alınıp 96-gözlü kültür kaplarına aktarılmış, optik yoğunluk 600 nm referans olmak üzere 570 nm’de mikroparka okuyucu ile belirlenmiştir. Hücreler üzerinde kalan PrestoBlue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra steril DPBS ile yıkama yapılmış, taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir.

İmmünofloresan Boyama

Farklılaştırılmış hücrelerin morfolojik değişimlerinin gözlenmesi amacıyla hücreler invert mikroskop altında ve çekirdekleri DAPI ile boyandıktan sonra floresan mikroskopi yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen görüntüler birleştirilerek morfolojik inceleme yapılmıştır.

Hücrelerin farklılaşma belirteci olarak diğer bir analizde Anti-TNT ve Anti-MLC2 primer antikorları ile immünofloresan boyamaları incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak sıçan kalbinden dondurulduktan sonra kriyostat ile alınan doku kesitleri üzerinde boyamalar yapılmıştır. Kesitler -80°C’den çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında kurumaları için beklenmiştir. Boyama yapılacak kesitlerin kenarları boyanın akmasını

engelleyen bir kalem (liquid blocker pen) ile çizilerek işaretlenmiştir. Kesitler PBS ile oda sıcaklığında 3 kez yıkanarak dondurma ortamı uzaklaştırılmıştır. Yüzde 4 (w/v) PFA ile oda sıcaklığında 20 dk fiksasyon ve sonrasında 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra hem doku kesitlerine hem de farklılaşma çalışmasında kullanılan hücrelere aynı protokol uygulanarak boyama gerçekleştirilmiştir. Örnekler üzerine PBS içerisinde hazırlanan %0.1 (v/v) Triton X-100 eklenmiştir ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bloklama amaçlı %1 (w/v) BSA ve %5 (v/v) NGS içeren PBS ile 1 sa oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra yıkama yapılmadan %1 PBS-A içerisinde seyreltilen primer antikorlar (Anti-TNT 1/800, Anti-MLC2 1/280 oranında) eklenmiştir. Örneklerin nemli ortamda kurumadan kalmaları sağlanarak +4°C’de bir gece ~16 sa inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 3 kez PBS-A ile yıkama yapılarak, %5 (v/v) NGS ve %1 (v/v) PBS-A’da hazırlanan sekonder antikorlar (2/250 oranında sırası ile Alexa Fluor 568 ve Alexa Fluor 488) ve %0.1 (v/v) oranında DAPI eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 sa inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında PBS-A ile 3 kez yıkama yapılmıştır ve örnekler üzerine kapatma ortamı eklenerek lamel ile kapatılmış ve floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır.

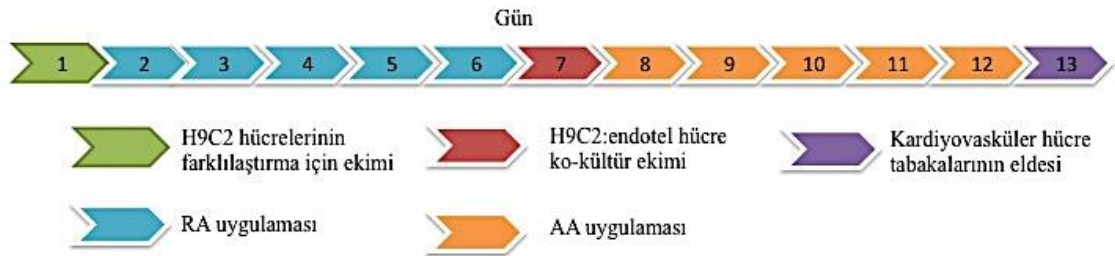
RT-PCR

Kardiyomiyojenik farklılaşmanın belirlenmesi amacıyla hücrelerin spesifik gen (*Tnnt2*, *Cacna1c*, *Slc29a1*, *Cacna1s*) ekspresyonları incelenmiş, deney için ‘3.2.2.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi’ bölümünde anlatılan yöntem uygulanmıştır.

3.2.3.2. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretilmesi ve Karakterizasyon Çalışmaları

H9C2 hücrelerinin farklılaştırma çalışmaları sonucunda en uygun koşulun 5 gün süresince 100 nM RA uygulaması olduğu sonucuna varılmıştır. Bu doğrultuda hücreler farklılaştırma çalışmasındaki koşullar uygulanacak şekilde 75 cm² yüzey alanına sahip flasklara pasajlanmıştır ve hücrelere 5 gün boyunca farklılaştırma ortamı (her gün taze olarak değiştirilerek) uygulanmıştır. Kardiyomiyositlere farklılaştırılmış H9C2 (pasaj 22) ve endotel hücreleri (pasaj 7) ko-kültür şeklinde ekim yoğunluğu 6:1 oranında ve toplam hücre sayısı ~5x10⁴ hücre/cm² olacak şekilde 24 gözlü (PrestoBlue ve RT-PCR analizleri için) ve 6 gözlü (SEM, canlı/ölü hücre ve histolojik boyama için) kültür kaplarına ekilmiştir. Literatürde yapılan bir çalışmada sağlıklı yenidoğan sıçan kalbinde

kardiyomiyosit/endotel hücre oranı 6:1 olarak belirlenmiştir, bu nedenle çalışmada ko-kültürdeki H9C2:endotel hücre oranı 6:1 olarak seçilmiştir (Sekine ve ark., 2008). Ekim ortamı her iki hücrenin değişen koşullardan çok fazla etkilenmemesi için 1:1 oranda DMEM yüksek glikoz (H9C2 besi ortamı) ve DMEM düşük glikoz (KMEH besi ortamı) olacak şekilde seçilmiştir. Fakat H9C2 hücreleri normal koşullarda %10 (v/v), farklılaştırma koşullarında %1 (v/v) FBS ortamında kültüre edilmektedir. Ko-kültür koşullarında hangi serum konsantrasyonunun hücreleri daha olumlu etkileyeceğini belirlemek amacıyla yüksek glikoz ortamında %1 (v/v) ve %10 (v/v) olmak üzere 2 farklı FBS konsantrasyonu kullanılmıştır. Dolayısı ile ko-kültür ortamı toplamda %10.5 (v/v) FBS (farklılaştırma koşullarındaki konsantrasyona eşit, %1 v/v, FBS içeren H9C2 besi ortamı ve KMEH besi ortamı 1:1 oranda karıştırılmıştır) ve %15 (v/v) FBS (normal koşullardaki konsantrasyona eşit, %10 v/v, FBS içeren H9C2 besi ortamı ve KMEH besi ortamı 1:1 oranda karıştırılmıştır) içerecek şekilde 2 farklı bileşimde hazırlanmıştır. Damarlanmanın desteklenmesi amacıyla ko-kültür ortamında 10 ng/mL VEGF ve 10 ng/mL bFGF kullanılmıştır. Ko-kültür ekiminden bir gün sonra hücre tabakası oluşumunu desteklemesi amacı ile kültür ortamı farklı konsantrasyonlarda (20, 50 ve 100 µg/mL) AA içeren ortamlar ile değiştirilmiş, iki günde bir taze ortam değişimi yapılmıştır. Kültürün 5. gününde kültür kabının kenarlarından DPBS uygulaması yapılarak AA uygulanan gruptaki tabakalar yüzeyden kaldırılmıştır. Hücre tabakalarını elde etmek için uygulanan çalışma planı Şekil 3.1’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kardiyovasküler hücre tabakası elde etmek için uygulanan çalışma planı.

PrestoBlue Analizi

Kardiyovasküler hücre tabakası elde etmek için kullanılan ortamların hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla PrestoBlue analizi gerçekleştirilmiş, ‘3.2.3.1 PrestoBlue Analizi’ bölümünde anlatılan protokol uygulanmıştır.

Canlı/Ölü Hücre Boyama

Kültürün 5. günü sonunda hücre tabakalarının kaldırılmadan önceki ve kaldırılıp yeni

yüzeye tutunduktan 1 gün sonraki hücre canlılıklarının belirlenmesi amacıyla kalsein-AM ve etidyum homodimer-1 ile canlı/ölü hücre boyama analizi yapılmış, '3.2.2.2 Canlı/Ölü Hücre Boyama' bölümünde anlatılan protokol uygulanmıştır.

RT-PCR Analizi

Ko-kültür ortamlarında kullanılan FBS ve AA konsantrasyonlarının, farklılaşmış H9C2 hücrelerinin kardiyomiyojenik özellikleri ve hücrelerin kollajen sentezi üzerine etkisinin belirlenmesi için RT-PCR analizi gerçekleştirilmiş, *Tnnt2*, *Cacna1c*, *Slc29a1*, *Cacna1s*, *Col1a1* gen ekspresyonları incelenmiştir. Analiz için '3.2.2.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi' bölümünde anlatılan protokol uygulanmıştır. Sonuçlar %10.5 (v/v) FBS ortamında kültüre edilen kontrol grubunun gen ekspresyon seviyesinin katları şeklinde verilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

RT-PCR analizi sonucunda 100 µg/mL AA konsantrasyonunun kardiyomiyojenik özellikler açısından en uygun koşul olduğuna karar verilmiş, sonraki analizler bu konsantrasyon kullanılarak üretilen tabakalar ile gerçekleştirilmiştir. Hücre tabakasının morfolojik özelliklerinin incelenmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Beşinci günde yüzeyden kaldırılıp yeni kültür kabına aktarılan tabakanın tutunması beklenmiş, tutunmadan 2 gün sonra hücreler DPBS ile 2 kez yıkanmış ve %2.5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 30 dk muamele edilerek fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra örnekler 3 kez PBS ile yıkanmış ve 4°C'de %1 P/S içeren PBS içerisinde saklanmıştır. SEM analizinden 1 gün önce örnekler etanol serisinden (%10, %30, %50, %70, %90 ve %100, v/v) geçirilmiş ve dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiş, son olarak 5 dk heksametildisilazan (HMDS) muamelesi yapılarak 1 gece boyunca çeker ocak içerisinde kurutulmuştur. Görüntüleme öncesinde örnekler altın-palladyum ile kaplanmıştır.

Histolojik Boyama

Hücre tabakalarının histolojik açıdan incelenmesi amacıyla Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama yapılmıştır. Yüzeyden kaldırılan tabakalar poliviniliden florür (PVDF) membran filtre (Durapore®, Merck) üzerine alınmış, %4 (w/v) PFA içerisinde 15 dk bekletilerek fiksasyon gerçekleştirilmiş, 3 kez PBS ile yıkama yapılmış ve 4°C'de %1 (v/v) P/S içeren PBS içerisinde saklanmıştır. Örneklerle susuzlaştırma, kesit alma ve boyama işlemleri için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

Susuzlaştırma

- Örnekler, histolojik kasetler içerisine yerleştirilmiştir.
- Kasetler %70'lik (v/v) etanol içerisinde 30 dk bekletilmiştir.
- Daha sonra %95'lik (v/v) etanol içerisine alınmış ve 30 dk bekletilmiştir.
- %95'lik (v/v) etanol yeni hazırlanan çözelti ile değiştirilmiş ve kasetler tekrar 30 dk bekletilmiştir.
- Kasetler, %100'lük (v/v) etanol içerisine alınmış ve 30 dk bekletilmiştir. Bu basamak %100'lük (v/v) yeni etanol çözeltisiyle iki kere daha tekrarlanmıştır.
- Kasetler, etanol basamaklarından sonra ksilen içerisine transfer edilmiş ve ksilen içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Bu basamak yeni ksilen çözeltisiyle bir kez daha tekrarlanmıştır.

Kesit Alma

- Kasetler, ksilen basamağından sonra parafin banyosu içerisine konulmuş ve bir gece bekletilmiştir.
- Ertesi gün örnekler doku gömme kalıbı içerisinde yatay ya da dikey yerleştirilerek parafine gömülmüş ve -20°C'de 1 gece parafinin sertleşmesi beklenmiştir. Daha sonra mikrotom ile örneklerden 8 µm'lik kesitler alınmıştır.

H&E Boyama

Kesitlerin bulunduğu lamellere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- Ksilende 4 dk bekletilmiştir.
- Ksilende 4 dk bekletilmiştir.
- Mutlak etanolde 2 dk bekletilmiştir.
- Mutlak etanolde 3 dk bekletilmiştir.
- %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- %70'lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- Deiyonize suda 2 dk bekletilmiştir.
- Hematoksilen boya çözeltisinde 10 dk bekletilmiştir.
- Musluk suyunda 1 dk bekletilmiştir.
- Asit alkolde (%70'lik (v/v) etanol içerisinde %5 (v/v) asetik asit) 20 s bekletilmiştir.
- Musluk suyunda asit hızlı bir şekilde uzaklaştırılmıştır.

- Lameller, Scott's tamponuna (2 g sodyum hidrojen karbonat + 20 g magnezyum sülfat + 1 L distile su) 10 kez hızlıca batırılıp çıkarılmıştır (Kesitlerin rengi mor-mavi renge dönüşür).
- Kesitler, musluk suyuna hızlıca batırılıp çıkarılmıştır.
- Kesitler, %70'lik (v/v) etanole hızlıca batırılıp çıkarılmıştır.
- Eozin boya çözeltisinde 1 dk bekletilmiştir.
- %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekletilmiştir.
- Mutlak etanolde 2 dk bekletilmiştir.
- Mutlak etanolde 3 dk bekletilmiştir.
- Ksilende 3 dk bekletilmiştir.
- Ksilende 3 dk bekletilmiştir.

Boyanmış kesitler üzerine kapatma çözeltisi damlatılmış, üzeri lamel ile kapatılarak kurumaya bırakılmış ve mikroskop altında görüntüleme yapılmıştır.

3.2.4. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Üretimi

Tez kapsamındaki çalışmalar için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2015/24-04 karar numarası (26.09.2017 tarihinde 2017/09 sayılı toplantıda alınan karar ile güncellenmiştir) ile alınan izin (Ek 1'de verilmiştir) çerçevesinde 7-12 aylık sıçanlardan kalp ve yağ dokuları alınmıştır.

Ketamin/ksilazin bileşimi ile kilolarına uygun doz (sırasıyla; 90 mg/kg ve 10 mg/kg) kullanılarak bayıltılan sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Dış yüzey sterilizasyonunun sağlanması için sıçanlar %70'lik (v/v) etanol ile silinmiş ve steril cerrahi örtü üzerine sırt üstü yatırılarak el ve ayaklarından sabitlenmiştir. Karın alt bölgesinden steril pens ile tutularak sivri uçlu makas ile sıçan derisi kaldırılmış, daha sonra dikkatli bir şekilde göğüs kafesi açılan sıçanın kalbi, kalbe giren ve çıkan damarların kesilmesi ile alınarak %4 (v/v) P/S içeren DPBS bulunan steril bir kaba aktarılmıştır. Laboratuvara getirilen kalp laminar akışlı kabin içerisinde %4 (v/v) P/S içeren DPBS ile yıkanarak kanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kalpte fonksiyonel olarak sol ventrikülün daha önemli olması nedeniyle genellikle sol ventrikülü destekleyecek tedavi yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında hücresiz ECM iskele üretiminde sıçan sol ventrikül dokusu kullanılmıştır. Ayrıca sol ventrikül dokusu daha kalındır, dolayısı ile daha fazla sayıda doku kesiti elde

edilebilmektedir. Wistar cinsi sıçanlarda sol ventrikül kalınlığı 2-3 mm arasında değişmektedir (De Carvalho ve Thomazini, 2013). Kalp sol ventrikül dokusu laminer kabin içerisinde izole edildikten sonra dondurma ortamı içerisinde gömülerek kriyostat cihazı (Leica CM 3050 ya da Leica CM 1900, Almanya) ile 300 µm kalınlığında kesitlere ayrılmıştır. Kesit alırken yüzeyin tıraşlanması sırasında epikardiyum tabakasının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Alınan miyokardiyal kesitler PBS ile yıkanarak dondurma ortamının uzaklaştırılması sağlanmış daha sonra sodyum dodesil sülfat (SDS), oktil-glukopiranosit (OGP) gibi çeşitli deterjanlar ve deoksiribonükleaz, ribonükleaz gibi çeşitli enzimler kullanılarak kimyasal ve biyolojik yöntemler ile hücresel bileşenlerden arındırılmıştır. Hücresizleştirme amacıyla literatürde kullanılan 2 farklı protokolden (SDS yöntemi ve OGP yöntemi) yararlanılmıştır. Aşağıda bu yöntemler açıklanmıştır.

3.2.4.1. SDS Yöntemi

İlk yöntem literatürde 3 basamaklı protokol olarak belirtilmiş, tez kapsamında SDS yöntemi olarak adlandırılmıştır (Oberwallner ve ark., 2014). Aşağıda yöntem kapsamında uygulanan işlemler belirtilmiştir:

- Kesitler tek tek kapaklı kahverengi cam şişelere aktarılmış, oda sıcaklığında 2 sa liziz tamponu (10 mM Tris, %0.1 (w/v) EDTA, pH 7.4) içerisinde 300 rpm hızında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
- Daha sonra oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 6 sa SDS (%0.5, w/v, PBS içerisinde) ile muamele edilmiştir.
- Karıştırıcı üzerinde 3 kez 10 dk PBS ile yıkandıktan sonra 1 gece %1 (v/v) P/S ve nistatin (100U/mL) içeren PBS ile yıkama yapılmıştır.
- DNA kalıntıları uzaklaştırmak için 3 sa 37°C’de %12 (v/v) FBS, %1 (v/v) P/S içeren DMEM ile 70 rpm’de çalkalayıcı inkübatör içerisinde inkübasyon yapılmıştır.
- İkinci PBS yıkama işleminden sonra örnekler kısa sürede kullanılacaksa %1 (v/v) P/S ve nistatin içeren PBS içerisinde 4°C’de, analizler için bekletilecekse -80°C’de saklanmıştır.

3.2.4.2. OGP Yöntemi

Hücresizleştirme amacıyla kullanılacak ikinci yöntemde ise kimyasal ve enzimatik işlemler bir arada kullanılmıştır (Dong, Li, ve Mo, 2013). Bu yöntem OGP yöntemi

olarak adlandırılmıştır. Aşağıda uygulanan işlemler belirtilmiştir:

- Doku kesitleri tek tek kahverengi cam şişelere alınmış, hücre lizizi için 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), %0.02 (w/v) EDTA, %1 (v/v) P/S ve 1 mM PMSF içeren %1 (w/v) OGP çözeltisi içerisinde 4°C’de 24 sa 3 boyutlu karıştırıcıda 70 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- Daha sonra nükleaz parçalama çözeltisi (NPÇ) içerisinde 37°C’de 24 sa çalkalamalı inkübatör içerisinde 70 rpm’de nükleik asit degradasyonu gerçekleştirilmiştir.
- NPS: 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) içerisinde, 2.5 Kunitz units (KU)/mL deoksiribonükleaz I, 7.5 KU/mL ribonükleaz A, 0.15 M NaCl, 2 mM MgCl₂(H₂O)₆ ve %1 (v/v) P/S.
- Kalıntıları uzaklaştırmak için çalkalamalı inkübatörde %1 (v/v) P/S ve nistatin içeren PBS içerisinde 4°C’de 24 sa yıkama yapılmıştır. Örnekler kısa sürede kullanılacaksa %1 (v/v) P/S ve nistatin içeren PBS içerisinde 4°C’de, analizler için bekletilecekse -80°C’de saklanmıştır.

3.2.5. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Karakterizasyonu

Alınan kesitler üzerinde hücresizleştirme işlemleri uygulandıktan sonra hangi yöntemin daha başarılı olduğunu belirlemek için aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kontrol amaçlı olarak, hücresizleştirme işlemi uygulanmayan doku kesitleri kullanılmıştır.

3.2.5.1. SEM Analizi

Hücresizleştirilmiş ECM yapısının morfolojik açıdan incelenmesi için SEM analizi yapılmıştır. Örneklerin hazırlanması için ‘3.2.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi’ bölümünde anlatılan işlem uygulanmıştır.

3.2.5.2. İmmünofloresan Boyama

Hücresizleştirilen örneklerde nükleer materyal kalıntısı olup olmadığını belirlemek için DAPI ile immünofloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Örneklerden kriyostat cihazı ile 8 µm kalınlığında kesitler alınmış, 15 dk %4 (w/v) PFA ile fiksasyon yapıldıktan sonra %0.1 (v/v) Triton X-100 ile 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek geçirgenlik sağlanmıştır. Boyama için oda sıcaklığında 20 dk %0.1 (v/v) DAPI (PBS içerisinde) ile inkübasyon yapılmış, floresan mikroskop ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.3. DNA Analizi

Hücresizleştirme sonrasında yapıda kalan DNA miktarının belirlenmesi için DNA analizi yapılmıştır. Bu amaçla Hoechst 33258 kullanılarak florimetrik bir ölçüm gerçekleştirilmiştir. Hücresizleştirilmiş ve hücresizleştirilmemiş örnekler dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuş, 1 mL papain çözeltisi (125 µg/mL papain çözeltisi, 5 mM sistein.HCl ve 5 mM Na₂EDTA içeren 0.1 M PBS, pH 6.0) ile 60°C’de 16 sa inkübe edilmiş, böylece parçalanması sağlanmıştır. DNA standartları ve örnekler, 200 µL DNA miktarına uygun Hoechst çalışma çözeltisi (10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA, 0.1 mM NaCl, pH 7.4) + 10 µL DNA standardı ya da örnek lizatı olmak üzere (toplamda 210 µL) 96 gözlü mikropalakaya aktararak floresan şiddeti (eksitasyon: 360 nm, emisyon: 460 nm, slit aralığı:10 nm) floresan spektrofotometre cihazı (Cary Eclipse, Avusturalya) ile ölçülmüştür.

Hoechst 33258 çalışma çözeltisinin konsantrasyonu, örnek içerisinde bulunan tahmini DNA miktarına göre seçilmelidir (500 ng DNA’ya kadar 0.1 µg/mL, 10 µg DNA’ya kadar 1 µg/mL Hoechst 33258). DNA standardı olarak DNAQF (Sigma-Aldrich) DNA kiti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/mL olan DNA çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.5.4. Histolojik Boyama

Hücresizleştirilen miyokardiyal kesitlerin histolojik açıdan incelenmesi için ‘3.2.3.2 Histolojik Boyama’ bölümünde açıklanan H&E boyama işlemi uygulanmıştır. Boyanan kesitler invert mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.2.5.5. Kollajen Analizi

Hücresizleştirme işleminin ECM yapısındaki kollajen içeriğinde bir değişime neden olup olmadığı hidroksipirolin analizi ile belirlenmiştir. Hidroksipirolin kollajen yapısında bulunan bir aminoasittir. Analiz, dokunun alkali hidrolizi ile yapıdaki hidroksipirolinin ölçülmesine dayalıdır. Serbest hidroksipirolin kloramin-T yardımı ile oksidize edilerek pirol elde edilir ve Ehrlich çözeltisinin (1M) eklenmesi ile 550 nm’de ışıma yapabilecek kromoforlar üretilmiş olur. Analiz aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

Örnekler PBS ile yıkanmış, Eppendorf tüplere aktarılmış ve 1 gece vakum etüvünde 60°C’de kurutulmuştur. Kurutulan örneklerle 100 µL 2M NaOH eklenmiş, standart eğri için hazırlanan örnekler de dahil tüplerin kapakları kapatılarak 121°C’de 15 dk

otoklavlanmıştır. Daha sonra örnekler 1-2 sn vortekslenmiş, 50 µL örnek lizatı ayrı bir tüpe aktarılmıştır. Tüm örnekler 450 µL kloramin T (0.059 M) çözeltisi eklenmiş, dikkatlice karıştırılıp oda sıcaklığında 25 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerlerine 500 µL Enrich çözeltisi (1M) eklenmiş ve 65 °C de 20 dk beklenmiştir. Bütün örneklerden 200 µL alınmış 96 gözlü kaplara aktararak UV spektrofotometre (Asys UVM 340, Avusturya) cihazında 550 nm’de okutma yapılmıştır.

3.2.5.6. Glikozaminoglikan (GAG) Analizi

Hücresizleştirme işleminin doku ECM yapısındaki GAG üzerindeki etkisini belirleyebilmek için florimetrik bir yöntem ile GAG analizi gerçekleştirilmiştir (Enobakhare, Bader ve Lee, 1996). Bunun için örneklerin üzerlerine 1.34 mL parçalama çözeltisi (55 mM sodium sitrat, 150 mM NaCl, 5 mM sistein.HCl, 5 mM EDTA ve 0.56 U/mL papain) ilave edilmiş ve 60°C’de 24 sa inkübe edilerek parçalanması sağlanmıştır. Örnek lizatı ve standart eğri için hazırlanan örneklerden 40 µL alınıp üzerine 250 µL dimetilmtilen mavisi boya çözeltisi eklenmiş, homojen olarak karıştırılarak 96 gözlü kaplarda UV spektrofotometre (Asys UVM 340, Avusturya) cihazında 595 nm’de okutma yapılmıştır.

3.2.5.7. Sitotoksikite Testi

Yapılan analizler sonucunda SDS yönteminin hücresizleştirme işleminde başarılı olduğu belirlenmiş, hücresizleştirilen doku kesitlerinin hücreler üzerinde toksik bir etki yaratıp yaratmayacağının belirlenmesi için 3 günlük bir sitotoksikite çalışması yapılmıştır. Bu amaçla L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Ekstraktın hazırlanması için hücresizleştirilmiş ECM iskele ve hücresizleştirilmemiş doku kesiti 5 mm çapında biyopsi punch ile kesilmiş, 2 sa boyunca %70 (v/v) etanol içerisinde bekletilerek sterilizasyon gerçekleştirilmiş ve etanolün uzaklaştırılması için 3 kez 20 dk DPBS ile yıkama yapılmıştır. Steril örnekler 24 sa boyunca 2 mL %10 (v/v) FBS, %2 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) P/S içeren DMEM-yüksek glikoz ortamında (L929 büyüme ortamı) 37°C %5 CO₂’li ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler 96 gözlü hücre kültür kaplarına 10³ hücre/göz olacak şekilde ekilmiş, ekimden 24 sa sonra hücrelerin ortamları çekilerek her bir kuyucuğa 200 µL ekstrakt ilave edilmiştir. Kontrol grubunda büyüme ortamı kullanılmıştır. Daha sonra 1, 2 ve 3. günlerde MTT analizi yapılmış ve optik mikroskop görüntüleri alınmıştır.

3.2.6. AKMKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu

AKMKH izolasyonu için sıçanlar ‘3.2.4. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Üretimi’ bölümünde açıklanan şekilde kurban edilmiş, gonadal ve böbrek arkası yağ dokuları izole edilmiştir. Alınan dokular %4 (v/v) P/S içeren PBS bulunan steril bir kaba alınmış, sonrasında uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir:

- Yağ dokusu izole edildikten sonra %4 (v/v) P/S içeren DPBS ile yıkanmış, steril bir kaba aktarılmış, laminar akışlı kabin içerisinde başka bir Petri kabında küçük parçalara ayrılmış ve damar yapıları olabildiğince uzaklaştırılmıştır.
- Dokunun tamamen parçalanması için yaklaşık 25 mL (1 g doku/5 mL kollajenaz) %0.075 (w/v) tip I kollajenaz (Ca^{+2} Mg^{+2} içermeyen PBS içinde) içerisinde 37°C’de 60 dk (15 dk’da bir vorteks yapılarak) inkübe edilmiştir.
- Süre sonunda üzerine eşit miktarda PBS eklenmiş ve homojenize edildikten sonra 1,800 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant (yağ hücreleri ve yıkama sıvısı) atılmış ve üzerine 10 mL hücre kültür ortamı eklenerek 1800 rpm’de 10 dk tekrar santrifüj yapılmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır.
- Santrifügasyon sonrası süpernatant dökülmüş ve stromal vasküler fraksiyon’dan elde edilen hücreler 70 µm’lik steril süzgeçten geçirilmiştir.
- Süzgeçten geçen hücreler α -MEM, %15 (v/v) FBS, %0.2 (v/v) gentamisin, %0.2 (v/v) amfoterisin B ve %0.4 (v/v) P/S içeren hücre kültür ortamında, 75 cm² yüzeyli kültür kabına aktarılmıştır.
- Hücrelerin tutunma durumuna göre 5 gün sonra taze ortam değişimi yapılmış, çoğalma durumuna göre kültür kabının %75’i kaplandıktan sonra pasaj yapılmıştır. Hücrelerin dondurulup saklanması için %10 (v/v) DMSO, %90 (v/v) FBS kullanılmıştır.

AKMKH izolasyon yöntemi laboratuvarımızda rutin olarak uygulanmaktadır ve izole edilen kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları standart yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin karakterizasyonu için *in vitro* kültür koşullarında uygun farklılaşma ortamı varlığında osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaları gerçekleştirilmiştir. Uygulanan işlemler araştırma grubumuzdan bir öğrenciye ait yüksek lisans tezinde detaylı şekilde belirtilmiştir (Shikhaliyeva, 2015).

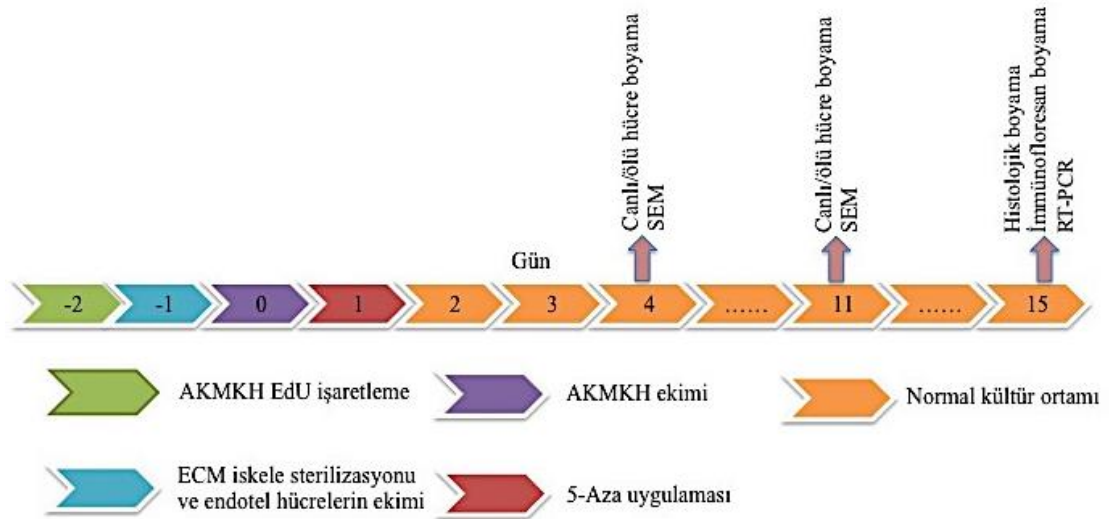
3.2.7. Hücresizleştirilmiş ECM İskele Üzerinde Ko-Kültür ve Kardiyomiyojenik Farklılaşma Çalışmaları ile Miyokardiyal Yama Üretimi

Miyokardiyal yama üretimi için hücresizleştirilen ECM iskele üzerinde AKMKH (pasaj 5-6) ve endotel hücreleri (pasaj 8) kardiyovasküler hücre tabakalarında olduğu gibi 6:1 oranında kültüre edilmiştir. Ko-kültür sırasında kullanılacak besin ortamının her iki hücre türünün de canlılığını desteklemesi gerekmektedir. Uygun ortam bileşiminin belirlenmesi için AKMKH ortamı ve endotel hücre ortamı 1:1, 3:1 ve 6:1 oranlarında karıştırılarak, 2B kültürde hücreler üzerinde canlılıklarına etkisi açısından incelenmiş, MTT analizi ve morfolojik açıdan optik mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Hücreler 48 gözlü hücre kültür kaplarına AKMKH/endotel hücre oranı 6:1 ve toplamda 7×10^4 hücre/göz olacak şekilde ekilmiş, kültür 9 gün boyunca sürdürülmüş ve 2-3 günde bir ortam değişimi yapılmıştır. Damarlanmanın desteklenmesi amacıyla kültür ortamı 10 ng/mL VEGF ve 10 ng/mL bFGF ile desteklenmiştir. Yapılan ön çalışma sonucunda 1:1 oranda karıştırılan ortamın kullanılmasına karar verilmiş ve ECM iskele üzerindeki ko-kültür çalışmasına bu ortam ile devam edilmiştir.

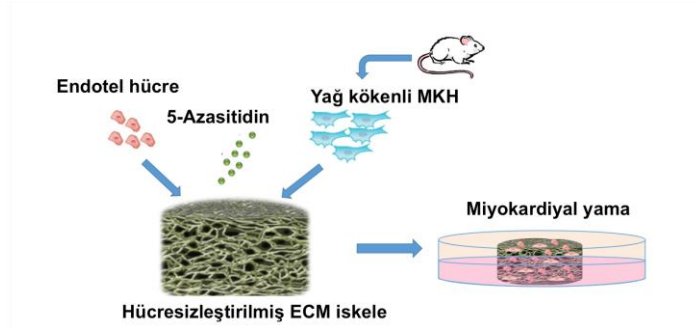
Hücresizleştirilmiş ECM iskelelerin sterilizasyonundan 1 gün önce (AKMKH ekiminden 48 sa önce) immünofloresan boyama analizi için hazırlanacak örneklerde kullanılacak AKMKH'ler 5-etinil-2'-deoksiüridin (EdU) (Click-iT® EdU Imaging Kits, katalog numarası C10339, Invitrogen) ile işaretlenmiştir. Bunun için hücrelerin kültür ortamı %50 (v/v) oranında 20 μ M EdU içeren ortam ile değiştirilmiş, böylece hücreler ekime kadar 48 sa boyunca 10 μ M EdU ile muamele edilmiştir. Ekim günü işaretli AKMKH'lere diğer hücrelere benzer işlemler uygulanarak ekim gerçekleştirilmiş ve kültüre devam edilmiştir.

Ko-kültür ekimine kadar kısa süreli olarak %1 (v/v) P/S ve nistatin içeren PBS içerisinde 4°C de saklanan ECM iskeleler, hücre tutunmasını desteklemeyen 12 gözlü kültür kaplarına aktarılmış, katlanmaların önlenmesi için alt yüzeyi agar ile kaplanmış 316SS paslanmaz çelik pullar (iç çapı 5.3 mm) iskele üzerine yerleştirilmiştir. Agar ve pullar 121°C'de sırası ile 15 dk ve 30 dk otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Daha sonra iskeleler sterilizasyon için 2 sa %70 (v/v) etanol ile muamele edilmiş, etanolün uzaklaştırılması için 3 kez DPBS ile yıkama yapılmış ve örneklerin bulunduğu gözlere DPBS eklendikten sonra kültür kabı 2 kez 30 dk UV altında bekletilmiş bu arada DPBS yenilenmiştir. Hücre ekimi pulların iç boşluğunda kalan iskele üzerine yapılmıştır ve

pullar kültür boyunca iskele üzerinde bırakılmıştır, böylece kültür süresince iskelenin besin ortamı içerisinde yüzmesi ve katlanması engellenmiştir. Hücreler AKMKH ve endotel hücre oranı 6:1 ve toplamda 4.9×10^4 hücre/iskele olacak şekilde ekilmiştir. Endotel hücrelerin ekimi AKMKH'lerden 1 gün önce gerçekleştirilmiş, 30 μ L endotel hücre büyüme ortamı içerisinde ekim yapılmış, hücrelerin kurummasını önlemek amacıyla 5-10 dk aralıklar ile damla damla ortam eklemesi gerçekleştirilmiş ve hücreler tamamen ECM iskeleye tutunduğunda 1 mL ortam ilavesi yapılmıştır. Ertesi gün kültür ortamı tamamen çekilmiş ve AKMKH'lerin ekimi de benzer şekilde 30 μ L AKMKH büyüme ortamı ile gerçekleştirilmiş ve hücreler tamamen tutunduktan sonra 1 mL 1:1 oranda ko-kültür ortamı ilave edilmiştir. AKMKH ekiminden 1 gün sonra kardiyomiyojenik farklılaşmayı desteklemek için ko-kültür ortamı, 10 μ M 5-Azasitidin (5-Aza) içeren ko-kültür farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Hücreler 24 sa boyunca 5-Aza ile muamele edilmiş, süre sonunda ortam normal ko-kültür ortamı ile değiştirilmiş ve kültüre 2 hafta devam edilmiştir. ECM üzerinde kültüre edilen hücreler için belirlenen günlerde analizler gerçekleştirilmiştir. Miyokardiyal yama üretimi için uygulanan çalışma planı Şekil 3.2'de, üretilecek miyokardiyal yama ise Şekil 3.3'te şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Miyokardiyal yama üretimi için uygulanan çalışma planı.



Şekil 3.3. Miyokardiyal yama üretiminin şematik gösterimi.

3.2.7.1. SEM Analizi

ECM iskele üzerinde kültüre edilen hücrelerin 4. ve 11. gündeki morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Örneklerin hazırlanmasında ‘3.2.3.2 SEM Analizi’ bölümünde anlatılan yöntem kullanılmıştır.

3.2.7.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Miyokardiyal yama kültürünün 4. ve 11. gününde ECM iskele üzerindeki hücrelerin canlılıkları canlı/ölü hücre boyamaları yapılarak konfokal mikroskop ile incelenmiştir. Boyama için ‘3.2.2.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama’ bölümünde anlatılan işlemler uygulanmıştır.

3.2.7.3. Histolojik Boyama

Kültür sonunda miyokardiyal yamanın histolojik yapısının ve hücrelerin iskele içerisindeki dağılımlarının incelenmesi için H&E boyama gerçekleştirilmiş, Bölüm ‘3.2.3.2. Histolojik Boyama’ da açıklanan yöntem uygulanmıştır.

3.2.7.4. İmmüno Floresan Boyama

Kültür sonunda ECM iskele üzerindeki endotel hücrelerin yerleşimlerinin, damar yapısı oluşturma potansiyellerinin ve AKMKH’lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarının belirlenmesi için çeşitli immüno floresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla endotel hücre ve AKMKH için sırasıyla anti-VWF ve anti-TNT primer antikoru ile Alexa Fluor 488 ve Alexa Fluor 405 sekonder antikoları kullanılmıştır. Boyama işlemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Örnekler %3 (w/v) BSA içeren PBS ile 3 kez 5 dk yıkanmıştır.

%0.5 (v/v) Triton X-100 içerisinde 20 dk inkübasyon yapılarak geçirgenlik sağlanmıştır.

- %3 (w/v) BSA içeren PBS ile tekrar 3 kez 5 dk yıkama yapılmıştır.
- Primer antikorlar anti-VWF (1/400) ve anti-TNT (1/800) (%3 (w/v) BSA içeren PBS içerisinde) ile 16 sa 4°C’de inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- PBS yıkaması tekrarlanmış ve EdU kit içerisindeki talimatlara uygun şekilde hazırlanan EdU çözeltisi (Alexa Fluor 594 sekonder antikoru içerir) ile 30 dk karanlıkta inkübasyon yapılmıştır.
- PBS yıkaması tekrarlanmış ve sekonder antikorlar (her ikisi de 1/250 oranında %3 (w/v) BSA içeren PBS içerisinde) ile karanlıkta oda sıcaklığında 2 sa inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Son PBS yıkaması yapıldıktan sonra floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

3.2.7.5. RT-PCR

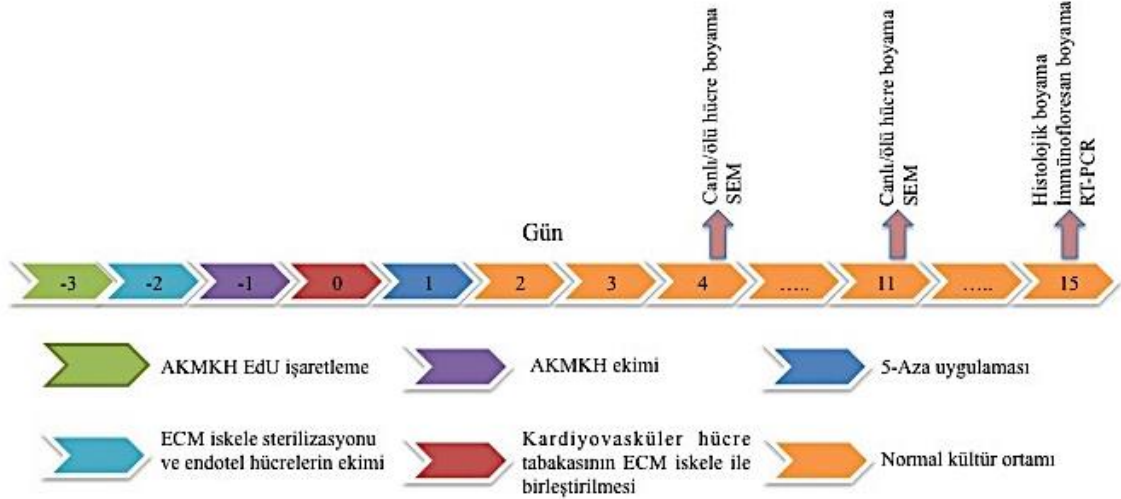
Kültür sonunda hücrelerin *Col1a1* ve spesifik kardiyak belirteçlerinin (*Tnnt2*, *Cacna1c*, *Slc29a1*, *Cx43*, *Gata4*) gen ekspresyonları RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Kültür sonunda örnekler DPBS ile yıkanmış ve analiz yapılana kadar -80°C’de saklanmıştır. Analiz günü örneklerin üzerine 500 µL TRIzol çözeltisi eklenmiş, ara ara 3 kez (toplamda 15 s) vortekslenmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık 45 dk bekletilerek parçalanmıştır. RNA izolasyonu GeneMATRIX UNIVERSAL RNA Purification Kit (EURX®, Polonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda örneklerin üzerlerine 100 µL kloroform eklenmiş, Eppendorf tüplerin kapakları kapatılarak 20 kere alt üst edilmiş ve oda sıcaklığında 3 dk inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında, örnekler 4°C’de 10 dk 13,000 rpm’de santrifüjlenmiş ve üstteki sulu faz kit içerisindeki homojenizasyon spin kolonuna aktarılmış, 4°C’de 13,000 rpm’de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Kolonun altında biriken süpernatana 300 µL %70’lik (v/v) etanol eklenmiş ve karışım kit içerisindeki RNA bağlama kolonuna aktarılmış, 4°C’de 1 dk 12,000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Tüpün altındaki sıvı dökülmüş 400 µL Wash DN1 tamponu eklenmiş, 4°C’de 1 dk 12,000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Altta biriken sıvı dökülmüş 650 µL Wash RBW tampon eklenmiş 4°C’de 1 dk 12,000 rpm’de santrifüj yapılmış, alttaki sıvı tekrar dökülmüş ve 350 µL Wash RBW tampon eklenmiş 4°C’de 2 dk 12,000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. İşlem sonrasında kolon steril başka bir Eppendorf tüp içerisine yerleştirilmiş ve membran üzerine 40 µL RNaz içermeyen steril su eklenerek 12,000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Bu sayede spin kolon membranında tutunan RNA, su ile membrandan yıkanarak santrifüj tüpünde toplanmıştır. RNA konsantrasyonları NanoDrop2000c (Thermo Scientific) ile ölçülmüş,

izole edilen RNA çözültisi analiz yapılncaya kadar kısa süreli saklanacaksa -20°C’de, uzun süreli saklanacaksa -80°C’de bekletilmiştir.

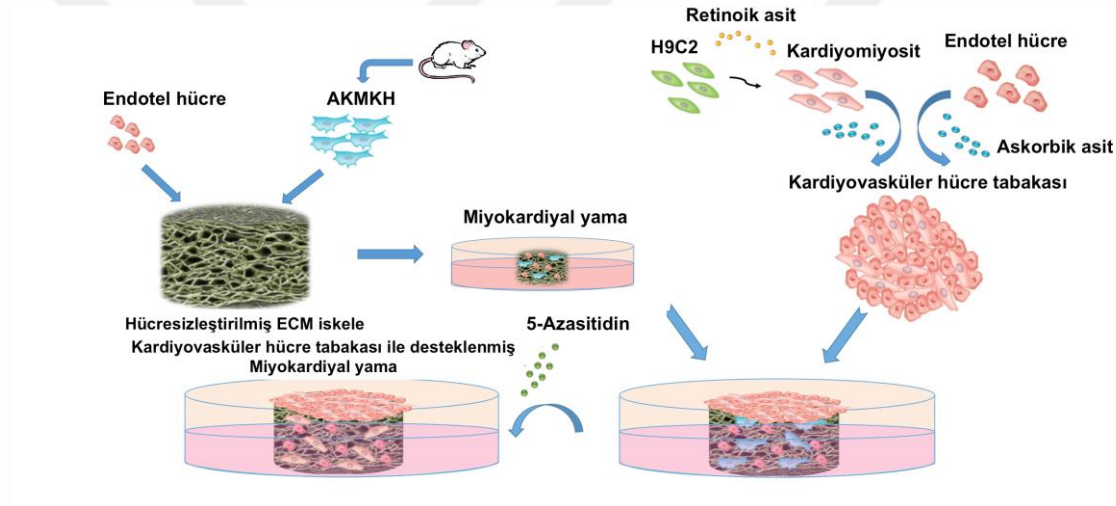
cDNA sentezi ve RT-PCR analizi ‘3.2.2.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi’ bölümünde anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.2.8. Kardiyovasküler Hücre Tabakaları ile Desteklenmiş Miyokardiyal Yama Üretimi

Hücreleştirilmiş ECM üzerinde yapılan ko-kültür ile elde edilen miyokardiyal yamanın hücre tabakası ile desteklenmesi sayesinde daha kalın bir doku eşleniği elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kardiyomiyositler ile doğrudan etkileşim halinde yapılan ko-kültürün kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını desteklediği bilinmektedir. Böylece farklılaşmayı uyarıcı kimyasal ajan, hücreleştirilmiş uygun ECM nişi ve kardiyomiyositlerin varlığında AKMKH’lerin farklılaşma potansiyelleri artırılmıştır. Bölüm ‘3.2.7. Hücreleştirilmiş ECM İskele Üzerinde Ko-Kültür ve Kardiyomiyojenik Farklılaşma Çalışmaları ile Miyokardiyal Yama Üretimi’nde açıklanan şekilde ko-kültür hücre ekimi yapılan ECM iskele 5-Aza uygulaması yapılmadan önce, eş zamanlı olarak hazırlanan ve yüzeyden kaldırılan kardiyovasküler hücre tabakası ile birleştirilmiştir. Hücre tabakası kaldırıldıktan sonra basit pipetleme tekniği ile ECM üzerine aktarılmıştır. Hücre tabakasında hücre bağlantı proteinleri korunduğu için ECM üzerine yapışma için herhangi bir ek işleme gerek kalmamıştır. Yalnızca birleşme sonrası damla damla ortam eklemesi yapılarak tabakayı oluşturan hücrelerin iskeleye tutunması beklenmiştir. Kültür ortamı olarak 10 ng/mL VEGF ve 10 ng/mL bFGF içeren 1:1 oranda karıştırılmış miyokardiyal yama üretiminde kullanılan ko-kültür ortamı:kardiyovasküler hücre tabakası ortamı kullanılmıştır. Tabaka ile ECM iskele birleştirildikten 1 gün sonra kültür ortamı 10 µM 5-Aza içeren farklılaşma ortamı ile değiştirilmiş, 24 sa boyunca 5-Aza uygulaması yapılmıştır. Ardından 5-Aza içermeyen ortamda kültüre 2 hafta devam edilmiş, 2-3 günde bir taze ortam değişimi yapılmış ve belirlenen günlerde analizler gerçekleştirilmiştir. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama üretimi için uygulanan çalışma planı Şekil 3.4’te, üretim aşamalarının şematik gösterimi Şekil 3.5’te verilmiştir.



Şekil 3.4. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama elde etmek için uygulanan çalışma planı.



Şekil 3.5. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama üretim aşamalarının şematik gösterimi.

3.2.8.1. SEM Analizi

Elde edilen hücre tabakası destekli miyokardiyal yama üzerindeki hücrelerin morfolojileri kültürün 4. ve 11. günde SEM analizi ile incelenmiştir. Örneklerin hazırlanmasında '3.2.3.2. SEM Analizi' bölümünde anlatılan yöntem kullanılmıştır.

3.2.8.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Üretilen kalp yaması yapısında bulunan hücrelerin canlılıkları kültürün 4. ve 11. gününde canlı/ölü hücre boyamaları yapılarak konfokal mikroskopi analizi ile incelenmiştir. Boyama için '3.2.2.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama' bölümünde anlatılan işlem uygulanmıştır.

3.2.8.3. Histolojik Boyama

Kardiyovasküler hücre tabakası ve ko-kültür hücre ekimi yapılmış ECM iskelenin birleştirilmesi ile elde edilen çift katmanlı kalp yamasının histolojik yapısının incelenmesi, hücre dağılımının belirlenmesi için Bölüm ‘3.2.3.2. Histolojik Boyama’ da açıklanan yöntem uygulanarak H&E boyama analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.4. İmmüno Floresan Boyama

Miyokardiyal yamayı oluşturan ECM iskele üzerinde ve kardiyovasküler hücre tabakasında bulunan endotel hücrelerin yerleşimlerinin, damar yapısı oluşturma potansiyellerinin ve AKMKH’lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarının belirlenmesi için çeşitli immüno floresan boyamalar gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi için ‘3.2.7.4. İmmüno Floresan Boyama’ bölümünde anlatılan protokol uygulanmıştır.

3.2.8.5. RT-PCR

Üretilen hücre tabakası destekli miyokardiyal yamanın kardiyomiyojenik özelliğinin ve AKMKH’lerin kardiyovasküler hücre tabakası varlığındaki farklılaşmalarının belirlenmesi için spesifik kardiyak belirteçlerinin (*Tnnt2*, *Cacna1c*, *Slc29a1*, *Cx43*, *GATA4*) gen ekspresyonları Bölüm ‘3.2.7.5. RT-PCR’da açıklanan protokol gereğince incelenmiştir.

AKMKH’lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında kardiyovasküler hücre tabakasının etkisinin belirlenebilmesi için karşılaştırma grupları oluşturulmuştur. Bu amaçla hücreleştirilmiş ECM iskeleye hücre ekimi yapılmadan hücre tabakası yerleştirilmiş, tutunması beklenmiş ve aynı koşullarda kontrol ve farklılaşma ortamında 15 gün boyunca kültüre devam edilmiştir. Karşılaştırma yaparken gruplar şu şekilde adlandırılmıştır:

Tabaka kontrol grubu: Kontrol ortamında kültüre edilen hücresiz ECM+kardiyovasküler hücre tabakası.

Ko-kültür kontrol grubu: Kontrol ortamında kültüre edilen hücrelendirilmiş ECM+kardiyovasküler hücre tabakası.

Tabaka farklılaştırma grubu: Farklılaştırma ortamında kültüre edilen hücresiz ECM+kardiyovasküler hücre tabakası.

Ko-kültür farklılaştırma grubu: Farklılaştırma ortamında kültüre edilen hücrelendirilmiş ECM+kardiyovasküler hücre tabakası.

3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan analizlerin sonuçları GraphPad Prism programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler 3-5 paralel örnek için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Kullanılan paralel sayısı her bir analiz sonucu içerisinde belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ikiden fazla grup karşılaştırması için tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmış, ikili karşılaştırmalarda Student's t test kullanılmış ve *p*-değerinin 0.05'den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmaların sonuçları açıklanmış ve literatürde yapılan benzer çalışmalardan örnekler verilerek sonuçlar tartışılmıştır.

İlk aşamada ko-kültür hücre tabakasının üretilmesi için kullanılacak H9C2 kardiyomiyoblast hücre hattı ve kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerine ait karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Daha sonra hücre tabakası elde etmek için yalnızca H9C2 hücreleri kullanılarak 3 farklı yöntem denenmiş ve bu yöntemler ile elde edilen tabakaların özelliklerini belirlemek için yapılan analiz sonuçları açıklanmış ve en uygun yönetime karar verilmiştir. Ardından kardiyovasküler hücre tabakası elde etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve üretilen hücre tabakalarının karakterizasyon sonuçları değerlendirilmiştir.

İkinci aşamada sıçan kalp kesitleri kullanılarak hücresiz ECM iskele üretimi için 2 farklı yöntem kullanılmış ve elde edilen iskele yapılarının incelenmesi için gerçekleştirilen analiz sonuçları açıklanmış, hücresizleştirme işleminin başarısı tartışılmıştır. Ardından AKMKH ve endotel hücrelerin hücresiz ECM iskele üzerine ko-kültür şeklinde ekimi ile miyokardiyal yama üretimi gerçekleştirilmiş, kontrol ve farklılaşma ortamında gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü çalışmasının sonuçlarına yer verilmiş ve AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşması tartışılmıştır.

Son aşamada ise ko-kültür hücre ekimi yapılmış ECM iskele ve kardiyovasküler hücre tabakasının birleştirilmesi ile hedeflenen hücre tabakası destekli kalp yaması elde edilmiş, kontrol ve farklılaşma ortamında gerçekleştirilen *in vitro* kültür çalışmasına ait analiz sonuçları sunulmuş, kök hücrelerin kimyasal indükleyici ajan ve kardiyomiyosit/endotel hücreler ile doğrudan ko-kültür etkisinde kardiyomiyojenik farklılaşması tartışılmıştır.

4.1. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretiminde Kullanılan Hücrelerin Karakterizasyonu

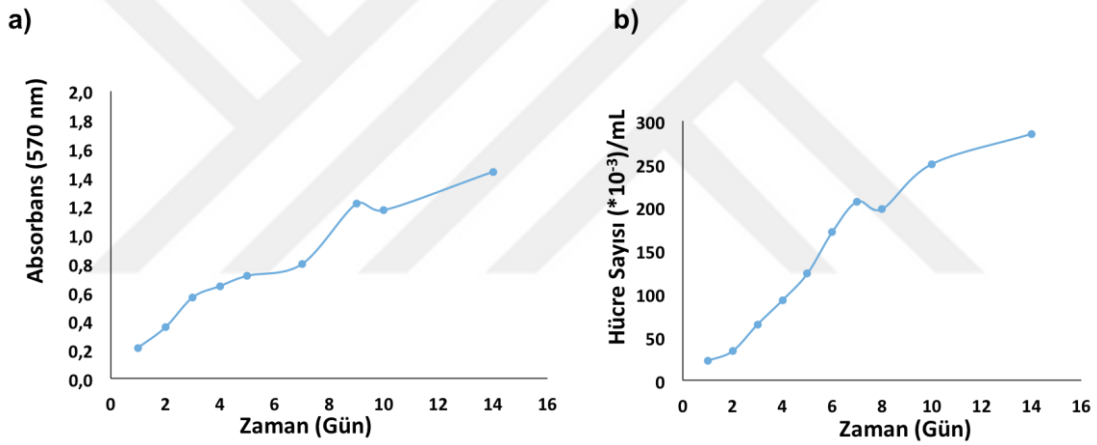
4.1.1. H9C2 Kardiyomiyoblast Hücre Hattı

H9C2 hücre hattı embriyonik sıçan ventrikül dokusundan elde edilmiş kardiyomiyoblast hücreleridir. Primer izole edilen kardiyomiyosit hücreleri gibi atım özelliği olmasa da kasılma ve genleşme özelliklerini sürdürdükleri gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2016).

Ayrıca primer kardiyomiyositlere benzer membran morfolojisine, elektrofizyolojik özelliklere (Watkins, Borthwick ve Arthur, 2011) ve olgun kardiyomiyosit hücrelerine farklılaşabilecek sinyal yollarına sahiptirler (Witek ve ark., 2016). Bu özelliklerinden dolayı pek çok kardiyotoksisite (Feridooni ve ark., 2013; Law ve ark., 2013; Witek ve ark., 2016; Reis-Mendes ve ark., 2018), kalp doku mühendisliği (Martinez ve ark., 2010; Singla ve ark., 2011; Cui ve ark., 2014;) ve *in vitro* kalp hastalığı modellerinde (Jadaun, Yadav ve Bisen, 2018; Tao, Nuo ve Min, 2018) kullanılmaktadırlar. Tez kapsamında ise H9C2 hücreleri ilk kez hücre tabakası oluşturulmasında kullanılmıştır.

4.1.1.1. Üreme Kinetikleri

H9C2 hücrelerinin üreme kinetiklerinin belirlenmesi için MTT analizi ve hemositometrik sayım gerçekleştirilmiş, elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 4.1a ve b’de verilmiştir.



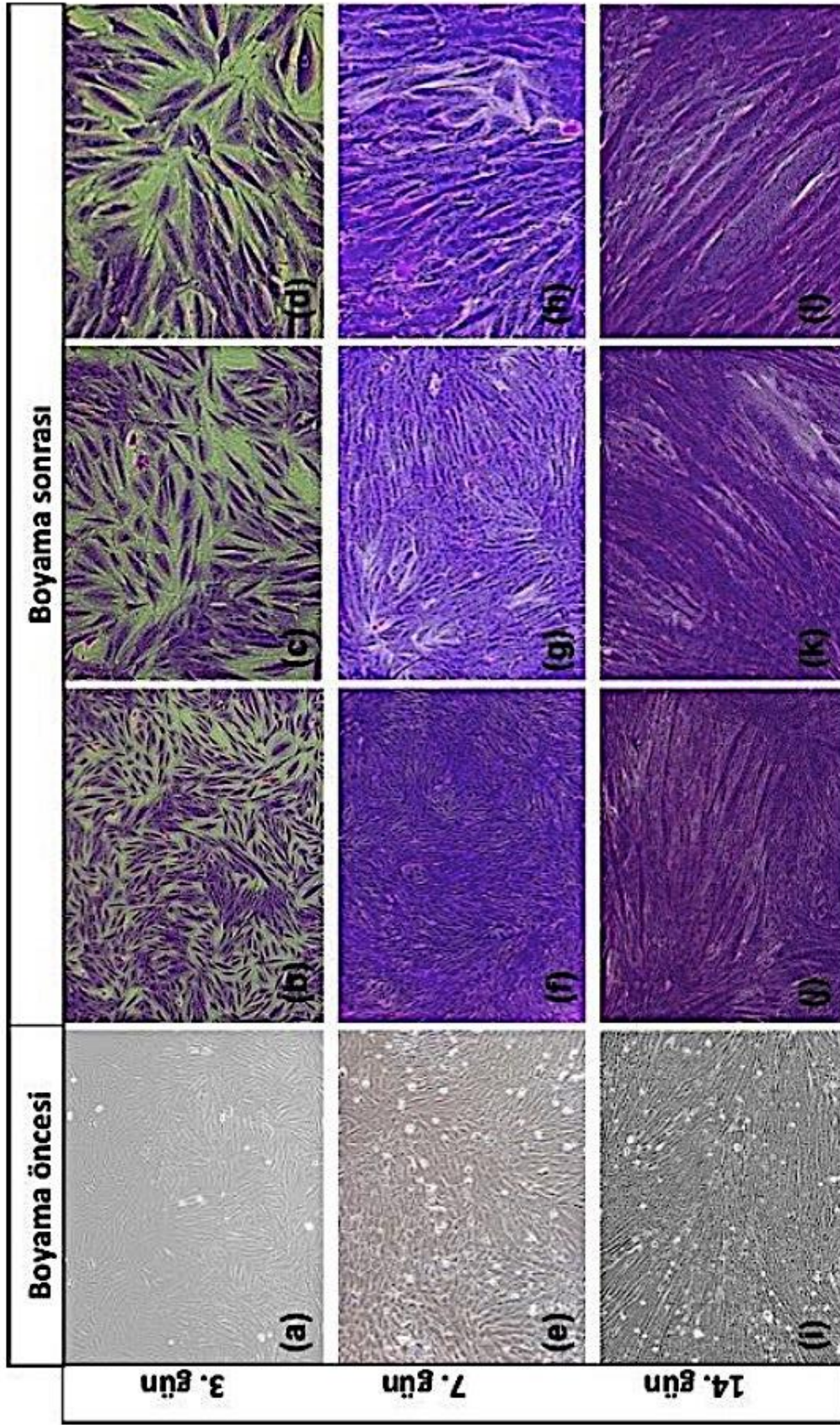
Şekil 4.1. H9C2 hücrelerine (20. pasaj) ait a) MTT analizi sonucu elde edilen, b) Hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre üreme grafikleri.

Hücrelerin üreme grafiklerinde görüldüğü gibi hücreler 14. güne kadar neredeyse sabit bir hızda çoğalmaya devam etmişlerdir. Kültürün ilerleyen zamanlarında hücrelerin sırasıyla duraklama ve ölüm fazına girmeleri beklenmektedir. Hücrelerin özgül üreme hızı (μ), logaritmik fazda Eşitlik 3.1’de verilen denklem kullanılarak $\ln x$ ’e karşı zaman grafiğinin çizilmesi ile hesaplanmıştır. Grafiğin eğimi özgül üreme hızını vermektedir. Yapılan işlemler sonucunda H9C2 hücrelerine ait özgül üreme hızı, 0.013 sa^{-1} , ikilenme süresi ise $\sim 54 \text{ sa}$ olarak hesaplanmış, sonuç literatür ile de uyumlu bulunmuştur (Dott ve ark., 2014).

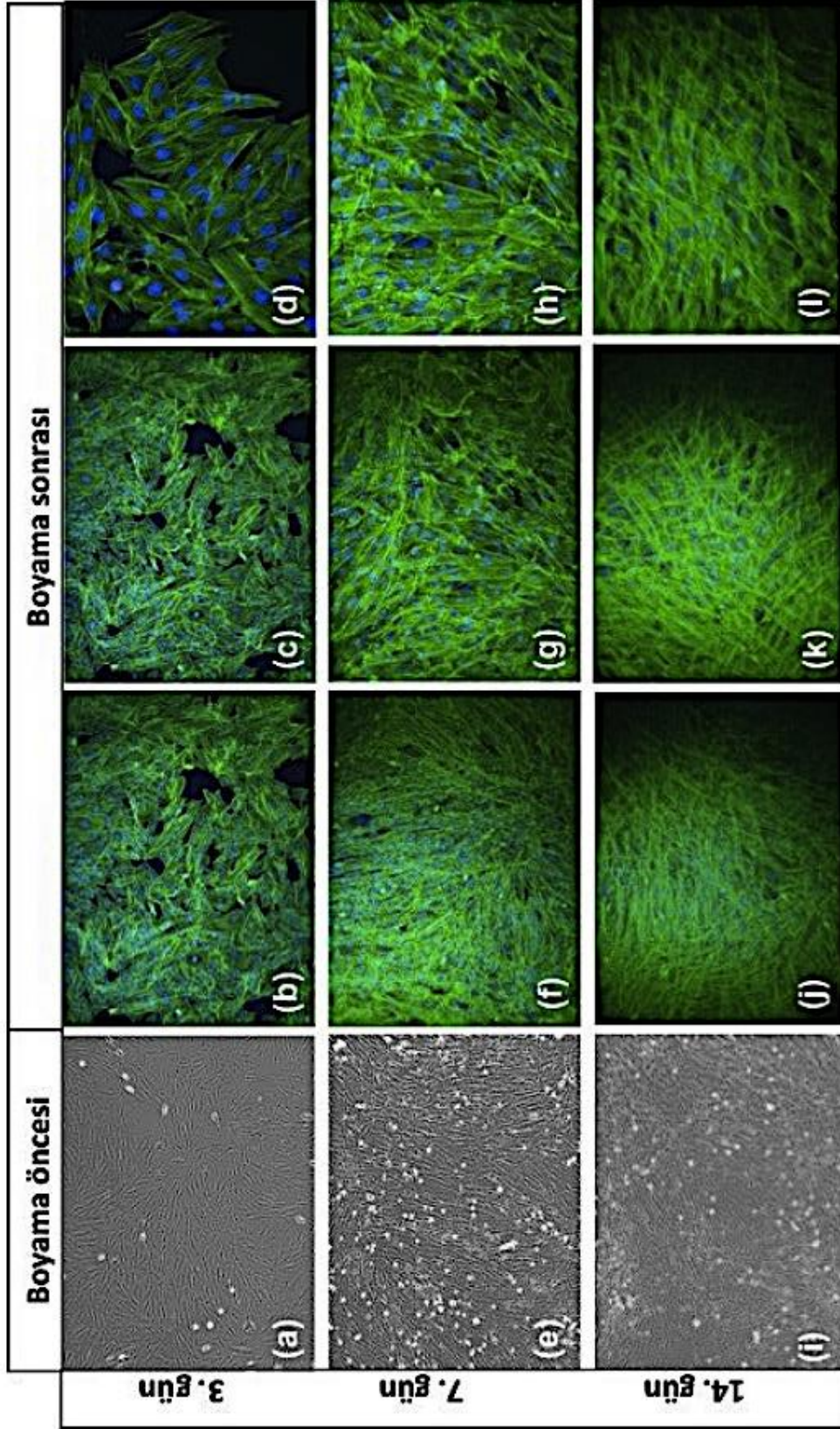
4.1.1.2. Morfolojik İnceleme

H9C2 hücrelerinin morfolojik olarak incelenmesi amacıyla kristal viyole (Şekil 4.2) ve immünofloresan antikorlar (Şekil 4.3) ile boyaması gerçekleştirilmiştir. H9C2 kardiyomiyoblast hücreleri yüzeye bağımlı olarak üreyen, tipik iğsi miyoblast morfolojisine sahip hücrelerdir (Lenco ve ark., 2015). Kristal viyole boyama fotoğrafları incelendiğinde çekirdeklerin hücre sitoplazmasına göre daha koyu renkte boyandığı gözlenmiştir. Ayrıca fotoğraflarda bölünmek üzere olan ya da yeni bölünmüş hücreler de gözlenmiştir. Hücreler, düşük yoğunlukta tamamen düzenli şekilde organize olmamışlardır (3. gün), fakat yüzeyi tamamen kapladıklarında ve sıkıştıklarında paralel şekilde yerleşmişlerdir (7. ve 14. gün). Hücreler normalde tek çekirdekli dirler, fakat yoğunlaşıp, sıkıştıkları zaman füzyona uğrayarak çok çekirdekli tübüler forma geçerler (Şekil 4.2 1). Literatürde hücre kültür ortamı serum konsantrasyonu hacimce %10'dan %1'e düşürüldüğü zaman füzyonun çok daha hızlı gerçekleştiği belirtilmektedir (Kimes ve Brandt, 1976).

Hücrelerin çekirdek ve F-aktin mikrofilamentlerinin incelenmesi için yapılan immünofloresan boyama sonucunda çekirdeklerin mavi, F-aktin filamentlerinin yeşil olarak işaretlendiği gözlenmiştir (Şekil 4.3). Hücrede aktin filamentleri yoğun oranda gözlenmiş, hücreler sitoplazmik uzantıları ile genellikle aynı yönde ve çift kutuplu olarak uzanmışlardır. Hücre yoğunluğunun düşük olduğu durumda hücreler daha yayılmış bir morfoloji sergilerken, hücre sayısının artması ile yüksek yoğunlukta, daha ince uzun iğsi bir morfoloji göstermişlerdir.



Şekil 4.2. H9C2 hücrelerinin (20. pasaj) kristal viyole boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları: a, b, e, f, i, j)10 X; c, g, k)20 X; d, h, j) 32 X



Şekil 4.3. H9C2 hücrelerinin immüno Floresan boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları: a, b, e, f, i, j) 10 X; c, g, k) 20 X;

d, h, j) 32 X. Hücre çekirdekleri mavi, F-aktin filamentleri ise yeşil renkte boyanmıştır.

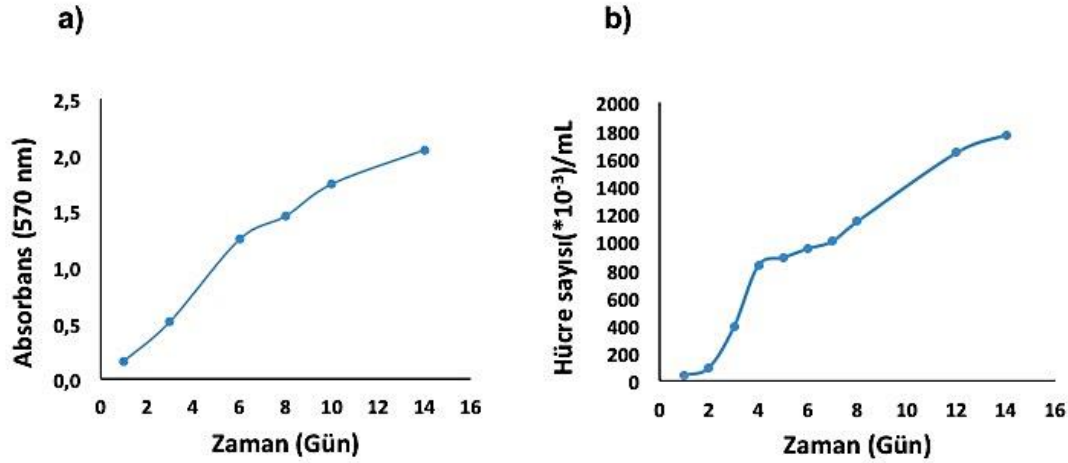
4.1.2. Sıçan Kardiyak Mikrovasküler Endotel Hücreleri

Kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri (KMEH) miyokardiyal anjiyogeneze baş rolü üstlenirken, kardiyak miyositlerinin de endoteller ile birlikte önemli rol aldıkları bilinmektedir (Li ve ark., 2015). Ayrıca KMEH kardiyak gelişiminde, kasılmada ve ritmik atımda kritik rol oynamaktadır. Endotel hücrelerden salınan faktörler kardiyak fonksiyonu ve canlılığını düzenlemekte, aynı zamanda kardiyomiyositlerin hemodinamik ve oksidatif strese karşı dengeleyici yanıtını desteklemektedir (Chiusa ve ark., 2012). Bu nedenle tez kapsamında kardiyovasküler hücre tabakası üretiminde tercih edilmişlerdir.

4.1.2.1. Üreme Kinetikleri

Hücrelerin üreme kinetiklerinin belirlenmesi amacıyla MTT analizi ve hemositometrik sayım yapılmış, elde edilen grafikler Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Grafiklerde görüldüğü gibi KMEH'ler kültürün 2. gününde üstel üreme fazına girmişlerdir. Dördüncü güne kadar devam eden logaritmik faz sonrasında hücreler yavaşlama evresine girmiş ve 7. günden sonra tekrar çoğalmaya başlamışlardır. On dördüncü güne kadar yavaş bir çoğalma eğilimi gösteren hücrelerin kültürün ilerleyen günlerinde sırasıyla duraklama ve ölüm fazına girmeleri beklenmektedir.

Hücrelerin özgül üreme hızı (μ) ve ikilenme süresi logaritmik fazda Eşitlik 3.1'de verilen denklem kullanılarak $\ln x$ 'e karşı zaman grafiğinin çizilmesi ile hesaplanmış ve sırası ile 0.049 sa^{-1} ve $\sim 15 \text{ sa}$ olarak bulunmuştur. Hücrelerin ikilenme süreleri firma tarafından ortalama 38 sa, yapılan başka bir çalışmada sıçan ventrikül dokusundan primer olarak izole edilen hücrelerde ise $\sim 24 \text{ sa}$ olarak belirtilmiştir (Nishida ve ark., 1993). Tez çalışmasında primer hücreleri desteklemesi amacıyla ortama eklenen VEGF'in hücre çoğalmasını olumlu yönde etkileyerek bu süreyi kısalttığı düşünülmüştür.

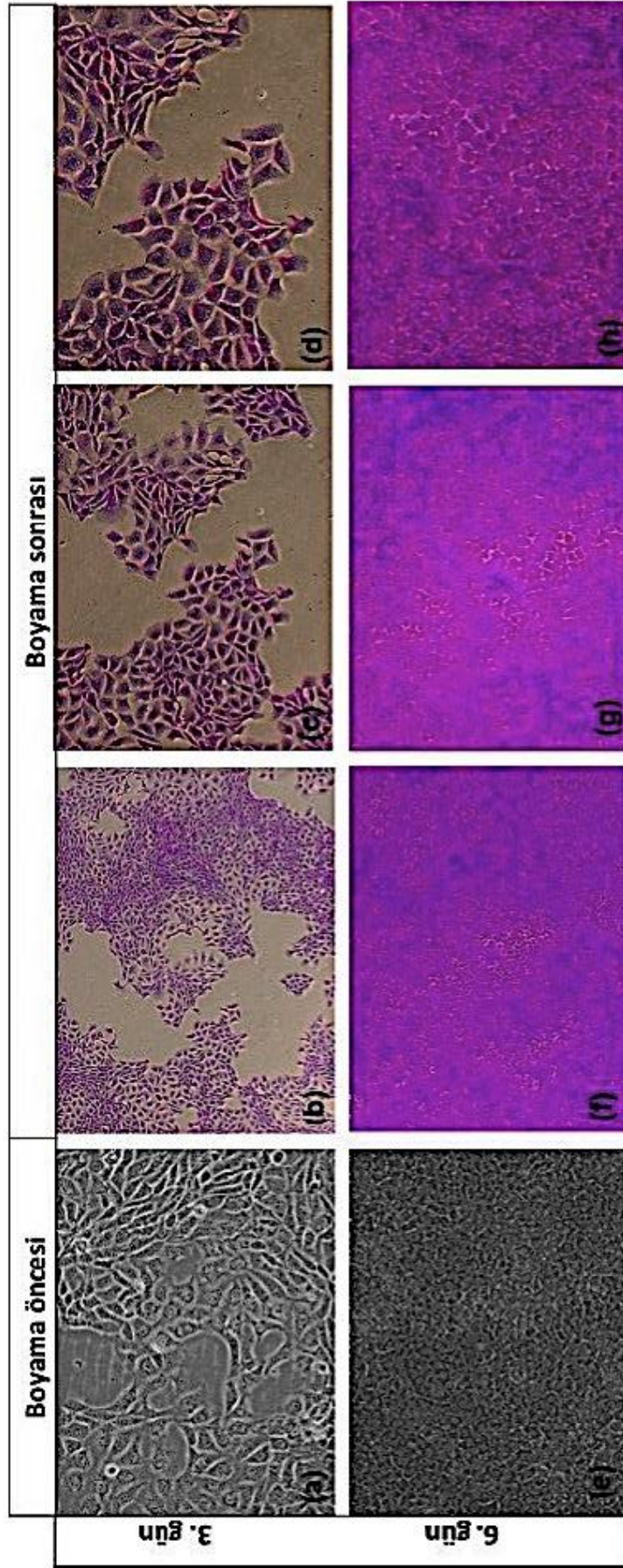


Şekil 4.4. Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerine (6. pasaj) ait a) MTT analizi sonucu elde edilen, b) Hemositometrik sayım sonucu elde edilen hücre üreme grafikleri.

4.1.2.2. Morfolojik İnceleme

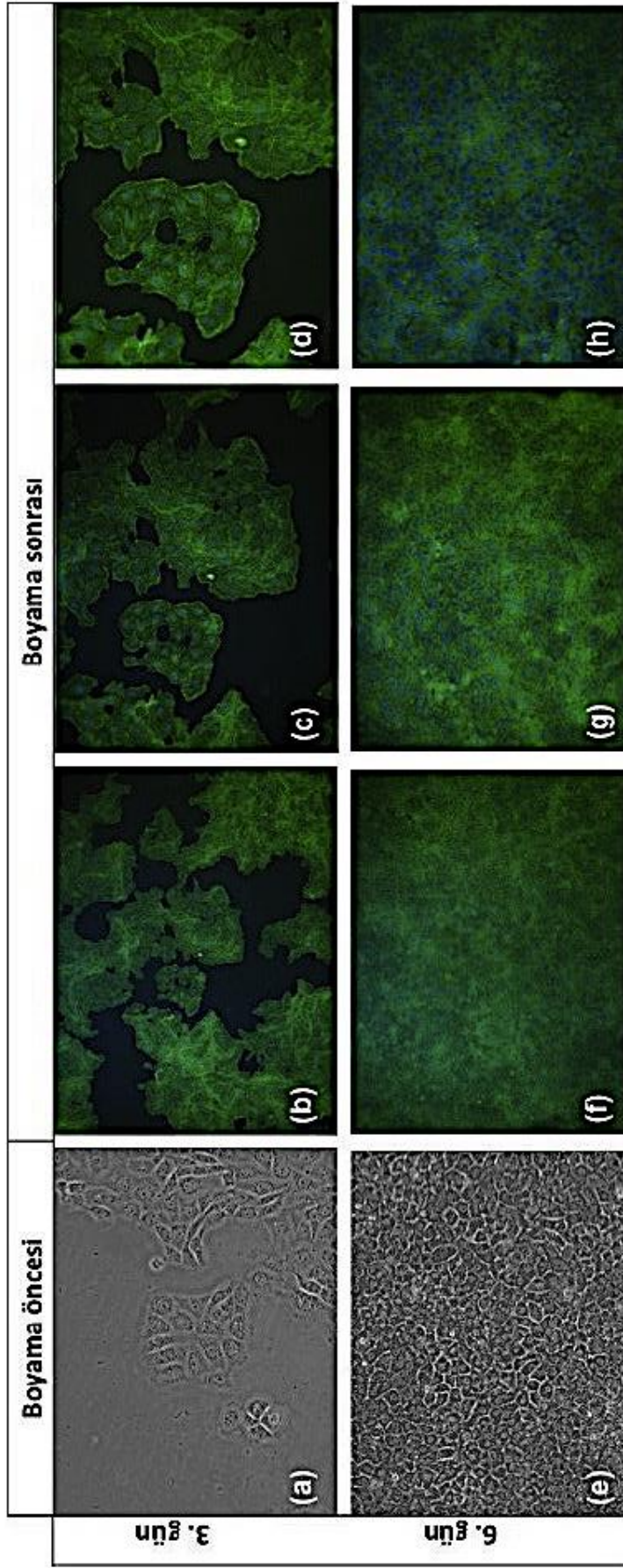
Kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri yüzeye bağımlı olarak üreyen, tek çekirdekli, poligonal morfolojiye sahip hücrelerdir. Düşük yoğunlukta genellikle koloni oluşturarak ürerler. Literatürde belirtildiği gibi kaldırım taşı benzeri bir morfoloji sergilerler, tek oldukları durumda biraz uzamış şekle sahipken hücre kümesi içerisinde gerçek morfolojilerine ulaşırlar (Nishida ve ark., 1993; Wang ve ark., 2012). Kristal viyole boyamalarında hücre çekirdeklerinin daha koyu renkte boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Kültürdeki hücreler hızla çoğaldıkları için 6. günde hücrelerin sınırları yoğunluk nedeniyle çok net biçimde seçilememektedir. Bu nedenle ilerleyen günlerde boyama gerçekleştirilmemiştir.

Hücrelerin çekirdek ve F-aktin mikrofilamentlerinin incelenmesi için yapılan boyama sonucunda hücrede aktin filamentleri yoğun olarak gözlenmiş, hücrelerin sitoplazmik uzantıları morfolojisi ile uyumlu olacak şekilde çok yönlü uzanmışlardır. Düşük yoğunlukta ve yüksek büyütmede hücrelerin yayılması ile hücre iskeleti net bir şekilde gözlenirken, yüksek yoğunlukta hücrelerin sıkışması nedeniyle hücreler arasındaki sınır ve aktin filamentleri ayrıntılı şekilde gözlenememiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin (6. pasaj) kristal viyole boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları:

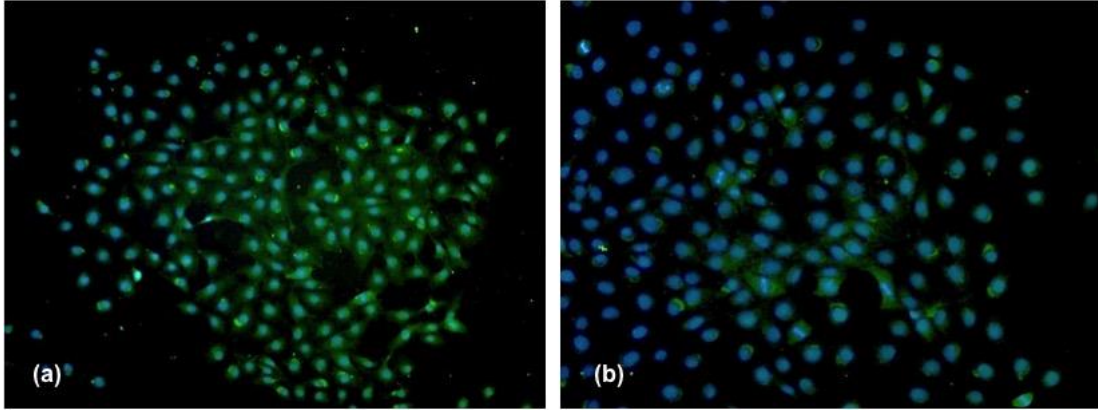
a, b, e, f)10 X; c, g)20 X; d, h) 32 X.



Şekil 4.6. Kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin immünofloresan boyama öncesi ve sonrası optik mikroskop fotoğrafları:

a, b, e, f)10 X; c, g)20 X; d, h) 32 X

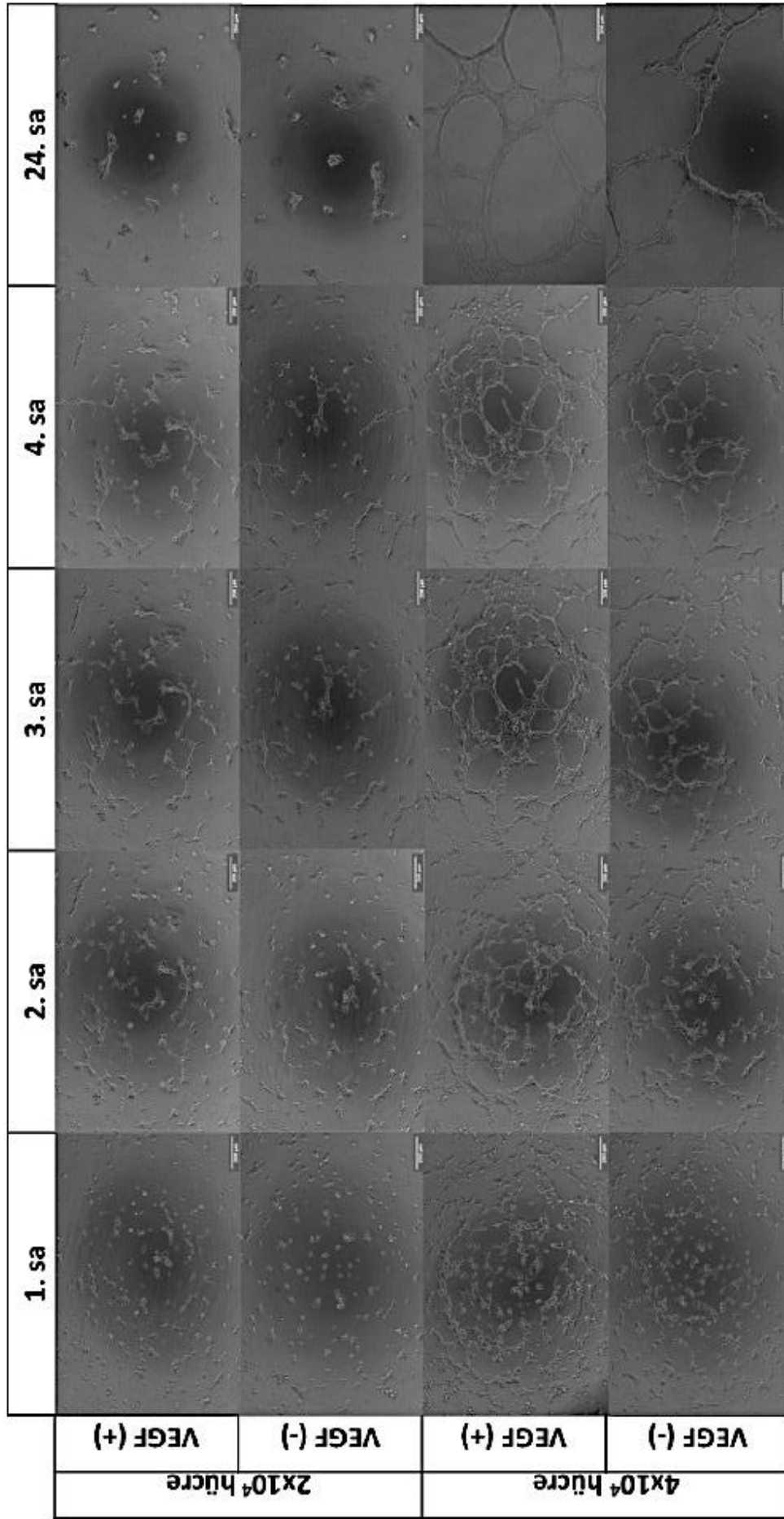
Endotel hücelere spesifik Anti-von Willebrand Faktör (vWF) antikor boyama görüntüleri Şekil 4.7’de verilmiştir. VWF endotel hücelerde Weibel-Palade cisimciklerinde üretilip salgılanan bir glikoproteindir (Ülger, Karabulut ve Pratten, 2002). Fotoğraflar incelendiğinde bazı hücelerde özellikle çekirdek etrafında hilal şeklinde yoğun işaretlenme olduğu belirlenmiştir. Bu durumun hücelerin vWF sentezlendikten sonra, salgılanmadan önce sabitlenmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.7. Kardiyak mikrovasküler endotel hücelerinin Anti-vWF immünofloresan boyama fotoğrafları: a) 20 X, b) 32 X.

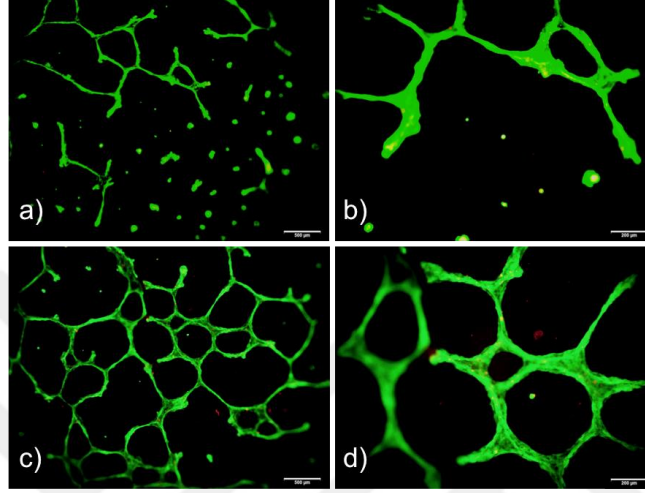
4.1.2.3. *İn Vitro* Tübül Oluşumu

Büyüma faktörü azaltılmış Matrijel üzerinde *in vitro* tübül oluşum analizi vasküler endotelyal hücelerin *in vitro* anjiyogenik aktivitelerini belirlemek için kullanılan standart analizlerden biridir. Tübül oluşumu hücre göçü, hücre-hücre adezyonu, sağ kalım ve apoptoz olaylarını içeren bir prosestir, tübülün gelişimi hücelerin göçü ve birbirlerine tutunmaları ile gerçekleşir ve 24 sa sonra apoptozun artmasına bağlı olarak yapı dağılmaya başlar (Francescone ve ark., 2011). ERK ve Akt fosforilasyonu anjiyogeneizde önemli rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2012). Yapılan analizde 2 farklı hücre ekim yoğunluğu ve VEGF’in tübül formasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir ve optik mikroskop fotoğrafları Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Düşük hücre yoğunluğunun tübül oluşumu için yeterli olmadığı belirlenmiştir. Yüksek hücre yoğunluğunda zaman içerisinde hücelerin göçü ve birbirleri ile etkileşimi sonucunda damar ağı benzeri bir yapının oluştuğu, VEGF varlığının tübül oluşumunu olumlu etkilediği ve tübüllerin daha sıkı bir formda oluştuğu gözlenmiştir. Elde edilen yapının literatürde KMEH’in kullanıldığı *in vitro* tübül oluşum analizi fotoğraflarına benzer olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2012; Xiao ve ark., 2017).



Şekil 4.8. *In vitro* tübül oluşum analizi sonucu elde edilen yapının optik mikroskop fotoğrafları (10 X, bar 200 µm).

Yirmi dördüncü saat sonunda yüksek yoğunlukta ekilen hücrelere canlı/ölü hücre boyama analizi uygulanmış ve floresan mikroskop fotoğrafları Şekil 4.9'da sunulmuştur. Boyama sırasında hücrelerin oda sıcaklığında bekletilmesi kültür ortamı sıcaklığının düşmesine neden olduğundan, bu durum tübül formasyonunu olumsuz etkilemiştir. Özellikle VEGF uygulanmayan grupta yapının dağılmaya başladığı gözlenmiştir.



Şekil 4.9. İn vitro tübül oluşum analizi (yüksek hücre ekim yoğunluğu) sonucu elde edilen yapının VEGF (-) (a, b) ve VEGF (+) (c, d) ortamdaki canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: a ve c) 4 X, bar 500 µm; b ve d) 10 X, bar 200 µm.

4.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi ve Karakterizasyonu

4.2.1. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Üretimi

H9C2 kardiyomiyoblast hücreleri ile hücre tabakası elde etmek için üç farklı yöntem kullanılmış olup yöntemler Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kardiyomiyoblast hücre tabakaları elde etmek için uygulanan yöntemler.

Yöntemler	Hücre ekim yoğunluğu (Hücre/cm ²)	FBS konsantrasyonu (v/v %)	Yüzeyden kaldırma zamanı (Gün)	Askorbik asit konsantrasyonu (µg/mL)
Sıcaklık-duyarlı kültür kapları	1x10 ⁴	10	7	-
Yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu	5x10 ⁴	20	9	-
Askorbik asit uygulaması	5x10 ⁴	10	5	20; 50; 100
		20		20; 50; 100

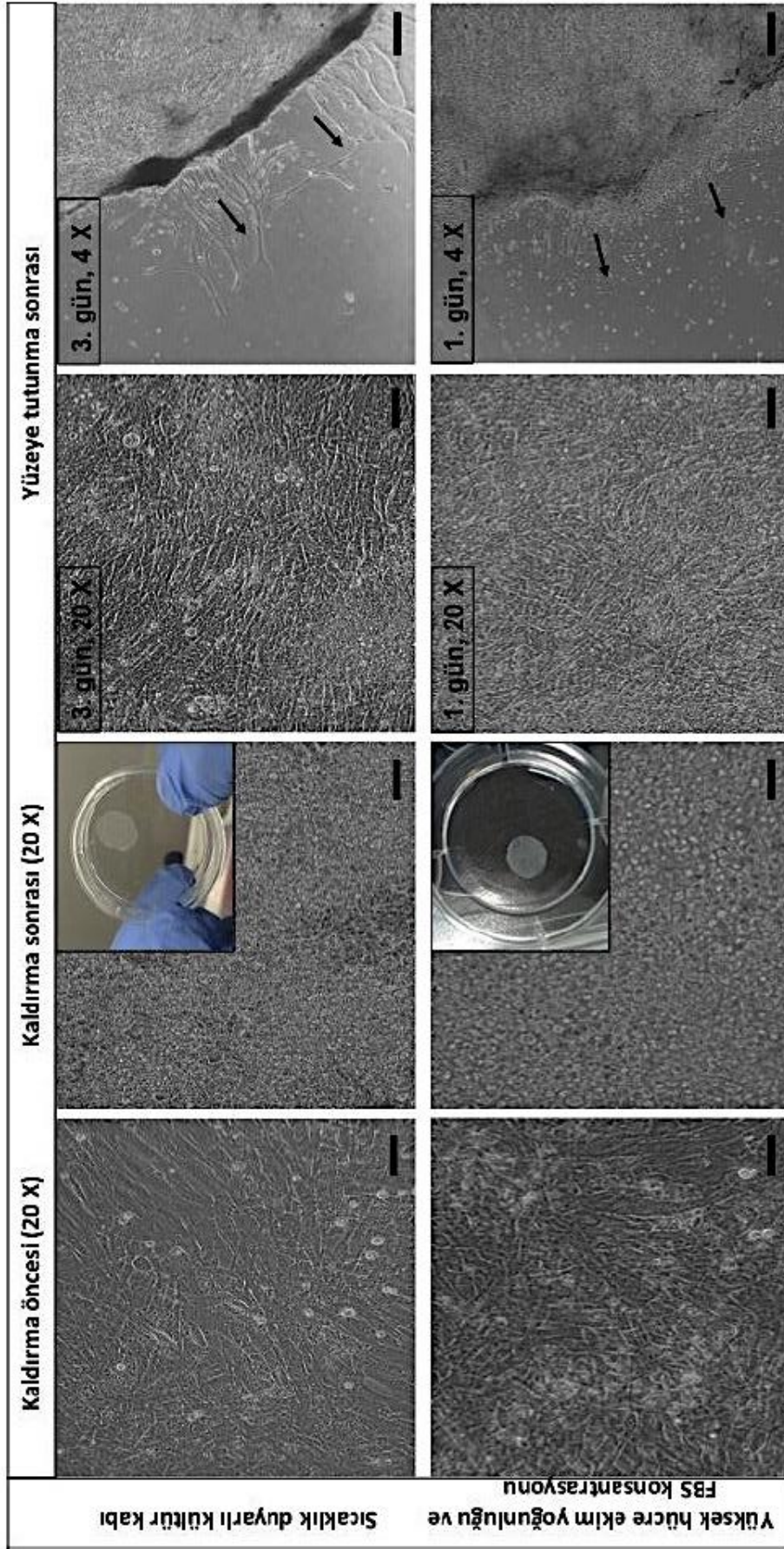
Sıcaklık-duyarlı kültür kabı kullanıldığında kültürün 7. gününde hücreler yüzeyi tamamen kapladıktan sonra ortam sıcaklığının düşürülmesi ile tabakalar 30 dakikanın sonunda kendiliğinden yüzeyden kalkmış ve ortam içerisinde yüzmeye başlamışlardır. İkinci ve 3. yöntemde ise kültürün 9. ve 5. gününde kültür kabının kenarından DPBS uygulaması yapılmış ve tabakalar dikkatlice yüzeyden soyularak ayrılmıştır ve basit pipetleme yöntemi ile başka bir kültür kabına aktarılmıştır.

Literatürde serumun hücre üremesi ve kollajen sentezini arttırdığını (Narayanan, Page ve Swanson, 1989) ve artan konsantrasyon ile üreme (Choi ve ark., 1980) ve kollajen sentezinde (Kato, Shanley ve Fox, 1996) artış olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Uygulanan 2. yöntemde yüksek miktarda FBS kullanılarak hücre tabakası oluşumu desteklenmiştir. Benzer şekilde yalnızca yüksek hücre ekim yoğunluğu ve yüksek FBS konsantrasyonunun kullanılması ile AKMKH tabakasının elde edildiği bir çalışmada tabaka kısa süreli tripsinizasyon uygulaması ile kaldırılmıştır (Yeh ve ark., 2014). Tez kapsamında yapılan çalışmada ise tripsinizasyon uygulaması yapıldığında tabaka parçalanmıştır, bu nedenle DPBS uygulaması yapılmıştır.

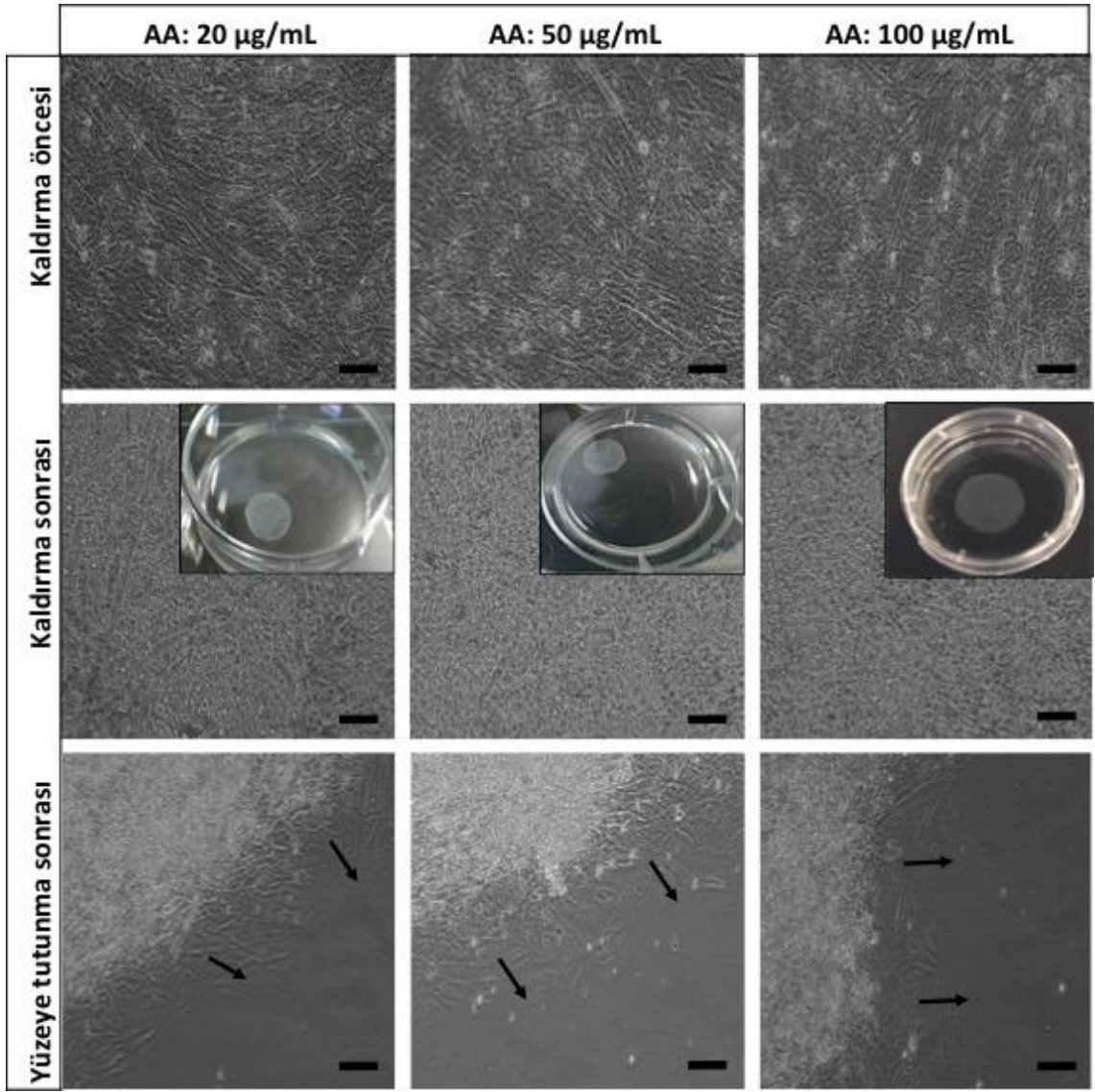
Literatürde askorbik asit (AA) uygulamasının farklı hücre türleri ile tabaka elde etmek için kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Kültür ortamına AA ilave edilmesi ile kısa süre içerisinde hücrelerin ECM sentezi artar ve ECM, hücre tabakasının bütünlüğünü ve mekanik gücünü destekler (Zhang ve ark., 2016). Ayrıca ECM'nin çözünür faktörler ile hücre arasındaki etkileşimi düzenlemesi doku rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır. AA uygulaması ile periodontal ligament, göbek kordonu ve kemik iliği kaynaklı kök hücre tabakalarının elde edildiği başka bir çalışmada ise hücre tabakası ile yalnızca ECM ve hücre-hücre etkileşimlerinin değil, plazma membranı yanındaki mikrofilament ve ekzositoz veziküllerinin de korunduğu, böylece yüksek hücrel aktivite sağlandığı belirtilmiştir (Wei ve ark. 2012). Ayrıca AA'nın embriyonik ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını uyardığını belirten pek çok çalışma bulunmaktadır (Grinnel ve ark., 1989; L'Heureux ve ark., 1998; Wei ve ark., 2012; Yu ve ark., 2014; Lui, Wong ve Lee, 2016; Zhang ve ark., 2016). Hücre kültürü çalışmalarında kollajen üretimini, DNA sentezini artırmak ve hücre içi reaktif oksijen türlerini azaltmak için de AA kullanılan çalışmalar bulunmaktadır. Martinez ve ark. ise yaptıkları çalışmada H9C2 hücrelerinin ortamına AA eklediklerinde, AA'nın hücre apoptozunu engelleyerek sağ kalımını ve üretilen

doku eşleniklerinin *in vivo* da canlılık ve anjiyogenik potansiyellerini artırdığını belirtmişlerdir (Martinez ve ark., 2010). Huang ve ark. ise AA'yı antioksidan olarak kullanmış ve hipotermiye bağlı apoptozu azaltıcı etkisi olduğunu belirtmişlerdir (Huang ve ark., 2009). Kültür ortamında kullanımının olumlu etkilerinin yanında AA ortamın pH değerini düşürebilir, bu durumda hücre canlılığı olumsuz etkilenebilir. Ayrıca AA'nın farklı konsantrasyonlarda farklı hücre tipleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Literatürde 300 µg/mL ve üzerinde AA'nın hiyalosit hücreleri, 1 mM ve üzeri AA'nın tenosit ve insan hücre hatları üzerinde toksik etkisi olduğu gösterilmiştir (Hakimi ve ark., 2014). Çalışma kapsamında maksimum ~0.5 mM AA konsantrasyonu kullanılmış, kültür ortamının pH değişimi ölçülmüş, kontrol ortamı ile AA eklemesi yapılan ortamların pH değerleri arasında istatistiksel açıdan çok büyük bir değişim olmadığı (*p<0.05), farklı konsantrasyonlardaki AA içeren ortamların pH değerleri arasında da istatistiksel açıdan fark olmadığı belirlenmiştir.

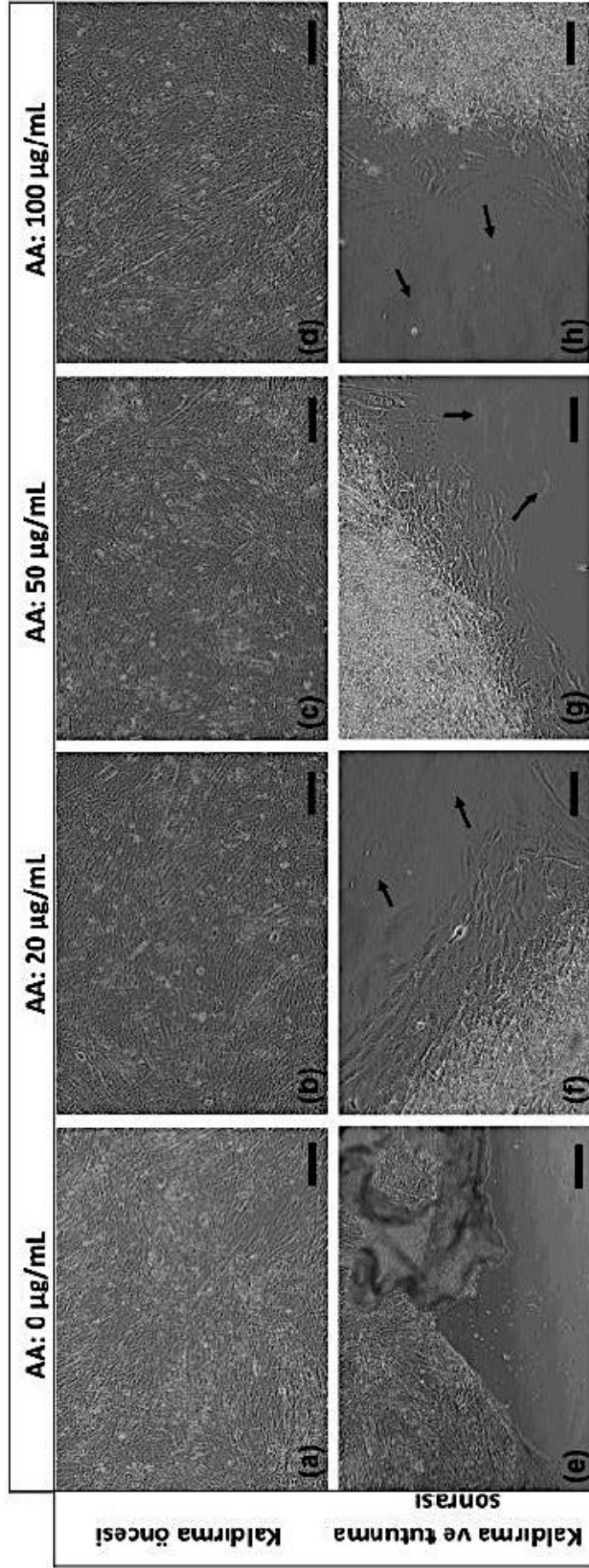
Son iki yöntemin uygulanması ile özel bir kültür kabı kullanılmasına ihtiyaç duyulmadan hücre tabakaları elde edilmiştir. Her 3 yöntem ile elde edilen tabakaların yüzeyden kaldırılmadan önce ve kaldırılıp yeni yüzeye aktarıldıktan sonraki optik mikroskop fotoğrafları Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Kaldırma öncesi fotoğraflar incelendiğinde sıcaklık-duyarlı kültür kaplarının kullanıldığı grupta hücrelerin çok fazla sıkışmadıkları için kendi miyoblastik morfolojilerini korudukları, diğer gruplarda ise hücrelerin sıkışmaya bağlı daha içsi bir morfoloji sergiledikleri gözlenmiştir. Hücre tabakaları yüzeyden ayrıldıklarında hücrelerin küresel morfolojiye geçiş yaptıkları, yeni bir kaba aktarıldıktan sonra yüzeye tutunup yayılmaya başladıkları ve tekrar miyoblastik formlarına ulaştıkları gözlenmiştir. Askorbik asit uygulaması ile hücre tabakası elde etmek için gerekli süre kısaltılmış ve manipülasyon açısından (özellikle Y-FBS grubunda) daha avantajlı olacak şekilde kararlı yapıda tabakalar elde edilmiştir. Yüzeyden kaldırma sonrası her üç gruptaki tabakaların bütünlüğünde herhangi bir bozulma meydana gelmemiştir, kısa süre sonra aktarıldıkları yeni yüzeyde tutunup yayılmaya başlamaları, elde edilen hücre tabakalarının canlılıklarını sürdürdüklerini göstermektedir. Ayrıca yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu ile AA uygulanan gruplarda hücrelerin sıkışmaya bağlı olarak birleşerek literatürde belirtilen (Kimes ve Brandt, 1976) çok çekirdekli miyotüp benzeri yapılar oluşturdukları belirlenmiştir. Örnek fotoğraflar Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



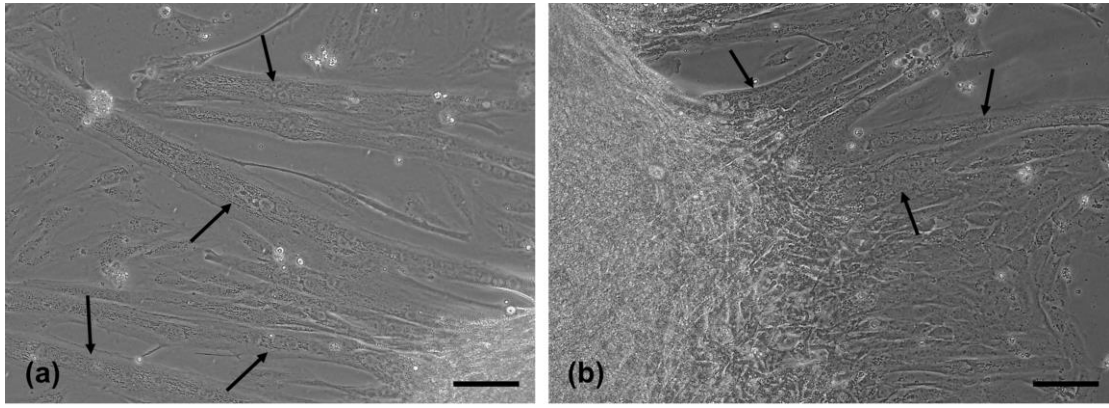
Şekil 4.10. Sıcaklık-duyarlı kültür kabı ve yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu yöntemleri ile elde edilen hücre tabakalarının optik mikroskop fotoğrafları. Barlar 20 X'de 100 μm , 4 X'de 500 μm 'yi işaret etmektedir.



Şekil 4.11. AA uygulaması (Y-FBS, %20) yöntemi ile elde edilen hücre tabakalarının optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 µm. Alt sıradaki fotoğraflar hücre tabakalarının yeni yüzeye tutunduktan 1 gün sonraki görüntülerini içermektedir.



Şekil 4.12. AA uygulaması (N-FBS, %10) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c, d), yüzeyden kaldırmak için DPBS uygulaması sonrasında (e) ve yeni yüzeye tutunmadan 1 gün sonra (f, g, h) optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 μm .

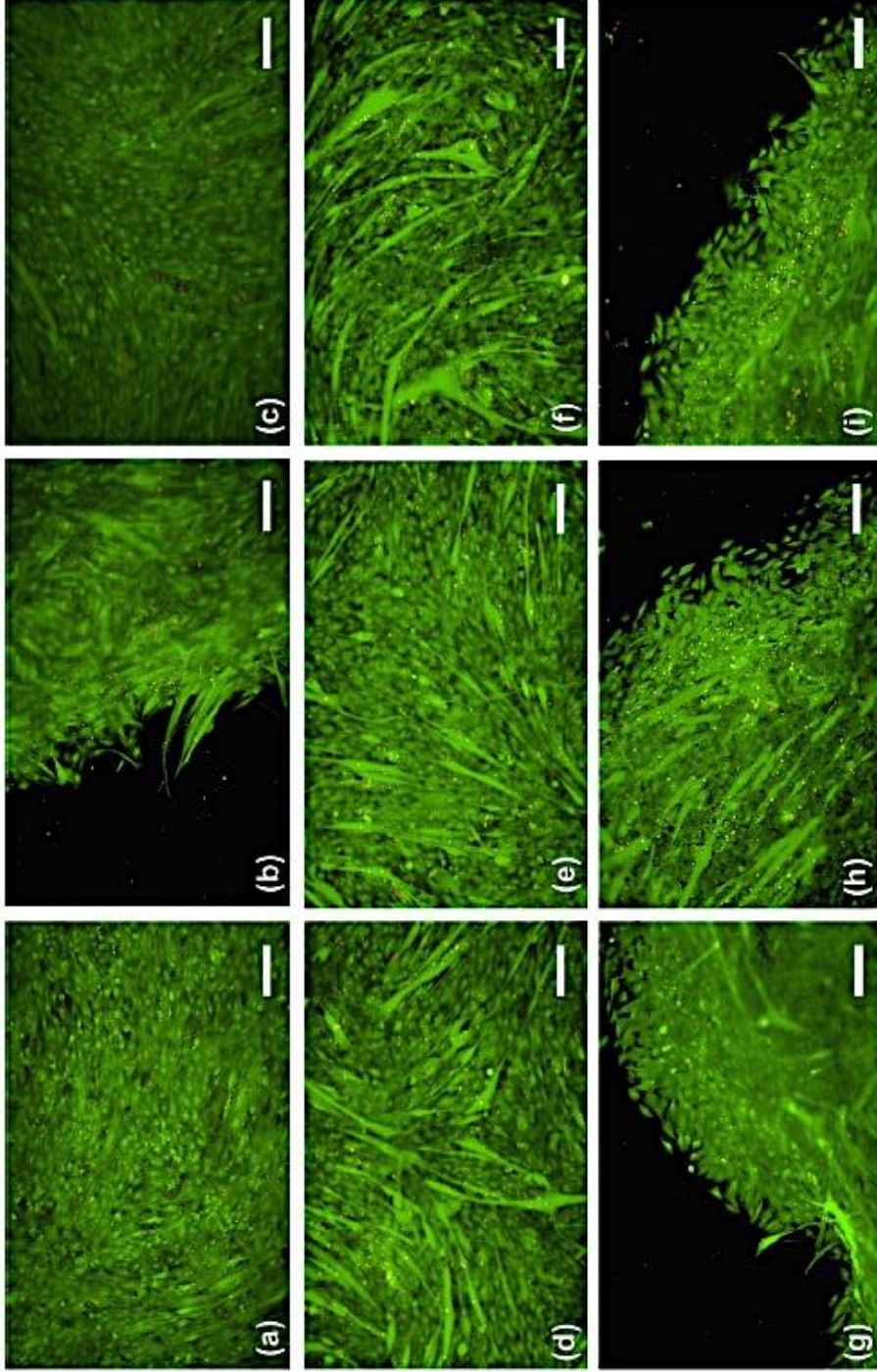


Şekil 4.13. Yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu ile AA uygulanan (Y-FBS, 20 µg/mL) grupta gözlenen miyotüp benzeri yapıların optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 µm.

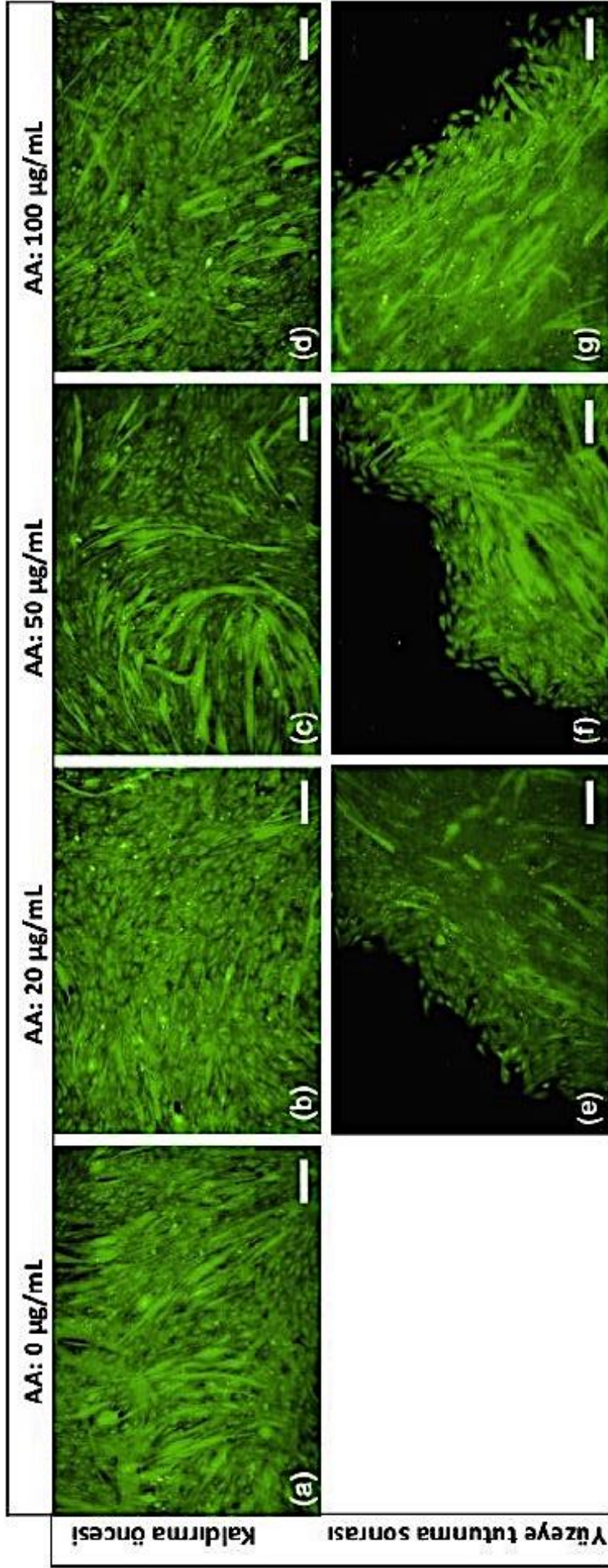
4.2.2. Kardiyomiyoblast Hücre Tabakalarının Karakterizasyonu

4.2.2.1. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hücre tabakası elde etmek için uygulanan yöntemlerin hücre canlılıkları üzerindeki etkisinin belirlenmesi için canlı/ölü hücre boyama analizi gerçekleştirilmiş, floresan mikroskop fotoğrafları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir. Boyama işleminde kullanılan kalsein canlı hücreleri yeşil renge boyarken, etidyum homodimeri ölü hücrelerin çekirdeklerini kırmızı renk ile işaretlemektedir. Floresan olmayan kalsein AM canlı hücrelerdeki intraselüler esteraz aktivitesi ile floresan kalseine çevrilmektedir. Etidyum homodimeri ise membran bütünlüğü bozulan hücrenin içerisine girerek nükleik asitlere bağlanır ve artan kırmızı floresan oluşturur. Fotoğraflar incelendiğinde her üç yöntemin de hücre canlılığını olumsuz etkilemediği, hücre tabakalarının kaldırma öncesi ve sonrasında canlılıklarını yüksek oranda koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca fotoğraflarda özellikle AA gruplarında miyotüp benzeri uzamış hücrelerin varlıkları belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Sıcaklık-duyarlı kültür kapları (a, b), yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu (c) ve AA uygulaması (Y-FBS; d ve g: 20 $\mu\text{g/mL}$ AA; e ve h: 50 $\mu\text{g/mL}$ AA; f ve i: 100 $\mu\text{g/mL}$ AA) ile elde edilen H9C2 hücre tabakalarına ait yüzeyden kaldırma öncesi (a, c, d, e, f) ve kaldırma sonrası tutunmadan 1 gün sonra (b, g, h, i) canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları. 10X, bar 200 μm .



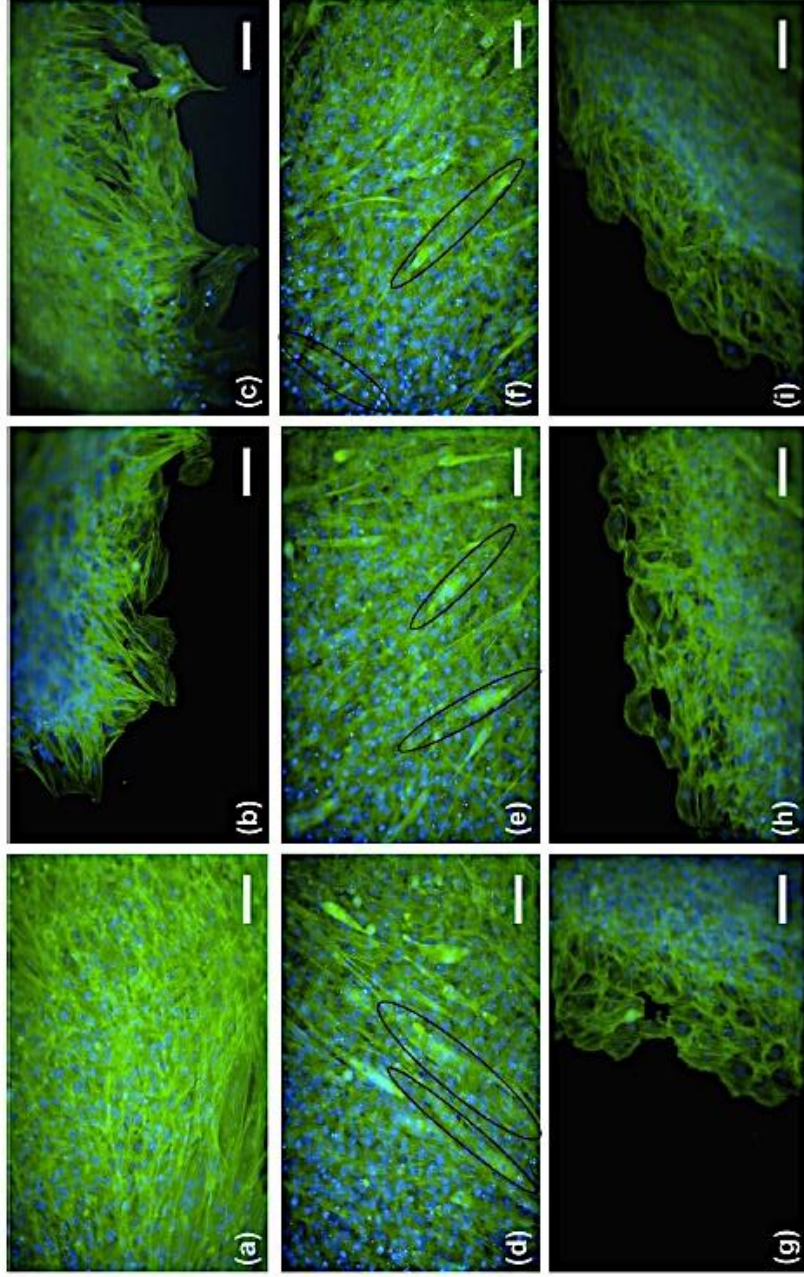
Şekil 4.15. AA uygulaması (N-FBS) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c) ve yeni yüzeye tutunmadan 1 gün sonra (e, f, g) canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 10 X, bar 200 µm.

4.2.2.2. İmmünofloresan Boyama

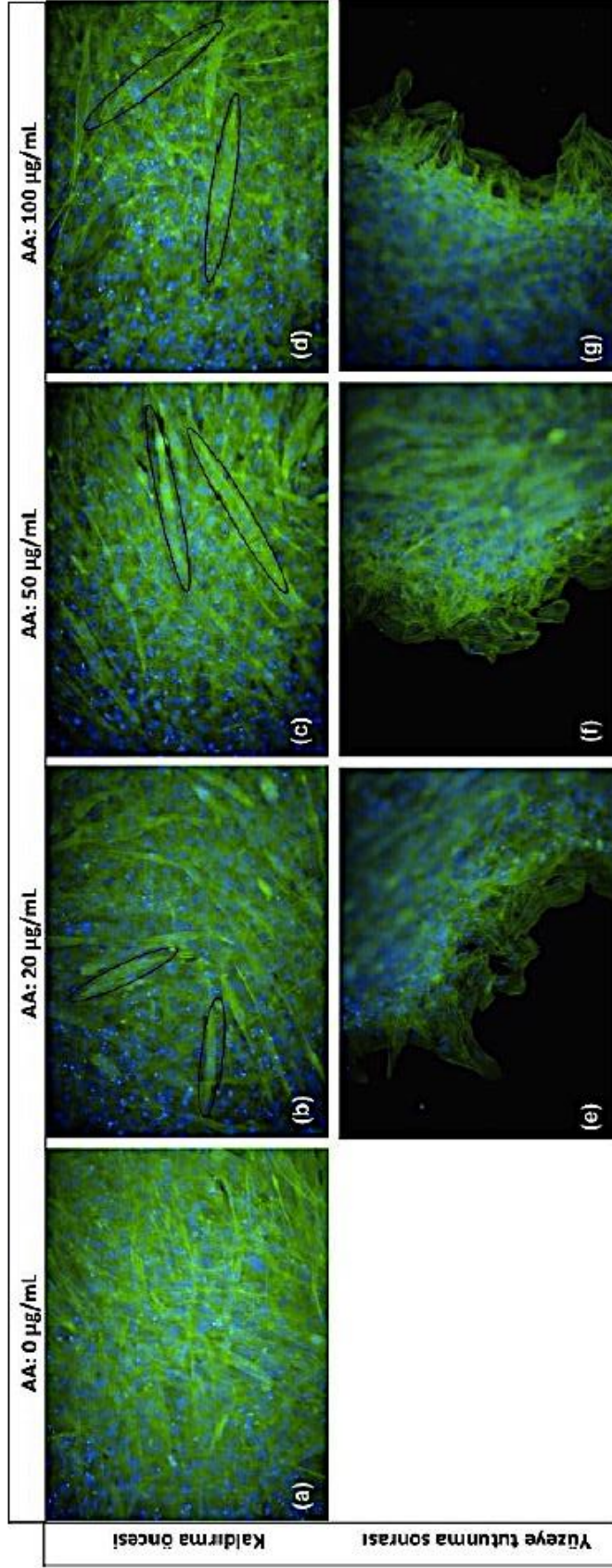
Hücre tabakalarının yüzeyden kaldırmadan önce ve kaldırılıp yeni yüzeye tutundurulmasından 1 gün sonraki morfolojik incelemesi için yapılan immünofloresan boyama fotoğrafları Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir. Hücre iskeletindeki aktin filamentleri yeşil, çekirdekler ise mavi renge boyanmıştır. Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarının kullanıldığı grupta kaldırma öncesi hücre iskeletindeki aktin filamentleri miyoblastik forma daha yakın yönelmiş iken, diğer gruplarda yüksek hücre yoğunluğunun etkisi ile sıkışmaya bağlı içi ince uzun morfolojide oldukları gözlenmiştir. Özellikle AA uygulanan gruplarda, AA’nın hücre çoğalması ve kollajen sentezi üzerindeki arttırıcı etkisinin hücrelerin daha çok sıkışmasına neden olduğu düşünülmüştür.

Ayrıca ilk grupta hücreler çok yoğun olmadıkları için tek çekirdekli ve çekirdekler net olarak seçilebilirken, diğer gruplarda çekirdeklerin üst üste geldiği ve bazı bölgelerde ölen hücrelere ait parçalanmış çekirdeklerden oluşan apoptotik cisimciklerin olduğu gözlenmiştir. Bunun dışında optik mikroskop fotoğraflarına benzer şekilde 2. ve 3. grupta hücrelerin sıkışmasına bağlı olarak birleşerek miyotüp benzeri çok çekirdekli hücreleri oluşturdukları gözlenmiş ve bu hücreler elips içerisinde belirtilmiştir (Şekil 4.16d, e, f ve 4.17b, c, d). Ricotti ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada H9C2 hücrelerinin oluşturdukları miyotüp benzeri yapıları çekirdek ve aktin filamentlerinin boyanması ile göstermiş, tez kapsamında elde edilen boyama fotoğraflarına benzer görüntüler elde etmişlerdir. Ayrıca canlı/ölü boyama fotoğraflarında da benzer formda hücre görüntülerine rastlanmıştır.

Hücrelerin kaldırma ve yüzeye tutunma sonrası boyama fotoğraflarında tabakanın kenar bölgesindeki hücrelerin kültür kabı yüzeyine göç etmeye başladıkları ve hücrelerin aktin filament organizasyonu ve çekirdek morfolojilerinde literatürde belirtilen H9C2 hücrelerinin standart kültür koşullarındaki morfolojilerinden çok farklı özellikte olmadıkları gözlenmiştir (Watkins, Borthwick ve Arthur, 2011). Hücre tabakasının iç bölgelerindeki hücre sınırları kolay seçilememiştir.



Şekil 4.16. Sıcaklık-duyarlı kaplar (a, b), yüksek hücre/serum konsantrasyonu (c) ve AA uygulaması (Y-FBS, d ve g: 20 µg/mL AA; e ve h: 50 µg/mL AA; f ve i: 100 µg/mL AA) ile elde edilen H9C2 hücre tabakalarına ait yüzeyden kaldırma öncesi (a, d, e, f) ve kaldırma sonrası yeni yüzeye tutunmadan 1 gün sonra (b, c, g, h, i) immünofloresan boyama fotoğrafları: 20X. Bar 100 µm.



Şekil 4.17. AA uygulaması (N-FBS) yöntemi ile hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılmadan önce (a, b, c, d) ve kaldırma sonrası tutunmadan 1 gün sonra (e, f, g) immünofloresan boyama fotoğrafları: 20 X

4.2.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

H9C2 hücreleri üzerinde kültür kabının yüzey materyali (TCPS ya da PIPAAm kaplı TCPS), hücre ekim yoğunluğu, AA etkisi ve FBS konsantrasyonu etkisinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR analizi gerçekleştirilmiş ve grafikler Şekil 4.18 ve 4.19'da gösterilmiştir. H9C2 hücreleri hem kardiyak (*Cacna1c*) hem de iskelet kası (*Cacna1s*) spesifik L-tipi voltaj bağımlı Ca^{+} kanalı genlerinin ekspresyonunu gerçekleştirir (Menard ve ark., 1999). İskelet tipi Ca^{+} kanalı primer kardiyak miyositlerinde kasılmada görevlidir (Mejia-Alvarez, Tomaselli ve Marban, 1994). Hücrenin farklılaşma eğilimine göre bu genlerin ekspresyon seviyelerinde artış ya da azalma meydana gelmektedir. *Tnnt2* geni kasılmada görevli troponin T proteininin üretimini düzenler ve önemli bir kardiyak belirteçidir (Pereira ve ark., 2011). *Slc29a1* geni ise dengeleyici nükleozid taşıyıcı-1 (ENT-1) proteinlerinin üretiminden sorumludur. Bu yapılar H9C2 hücrelerinde pek çok fizyolojik proseste önemli görevi olan adenozinin taşınmasında görevlidirler ve *Slc29a1* gen ekspresyonundaki artış, hücrenin kardiyak farklılaşmasının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Leung, Tse ve Man, 2007; Rodgers ve ark., 2009).

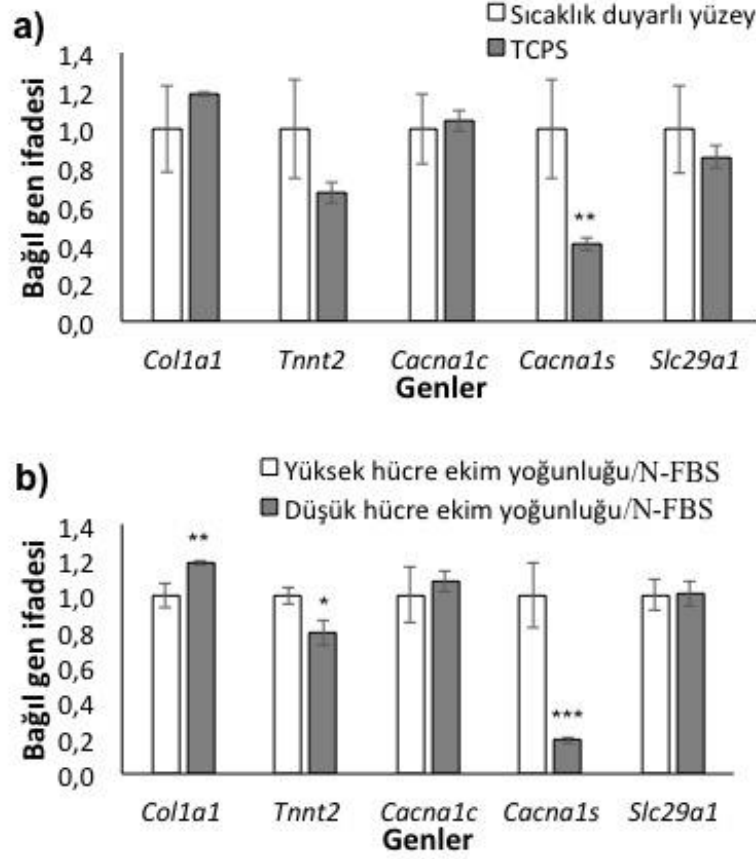
Şekil 4.18a incelendiğinde yüzey materyalinin yalnızca *Cacna1s* gen ifadesini etkilediği, sıcaklık-duyarlı yüzey kullanıldığı durumda ekspresyonda artış olduğu gözlenmiştir. PIPAAm kaplı kültür kaplarında yüzeyde pürüzlülük oluşmaktadır (Yamato ve Okano, 2004) ve nanotopografik detaylar hücre davranışı ile farklılaşma eğilimleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Bu detayların *Cacna1s* gen ekspresyonunu etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. Hücre ekim yoğunluğunun ise hücreler arası iletişim üzerinden gen ekspresyonlarını etkilediği düşünülmektedir (Şekil 4.18b). Düşük hücre yoğunluğunda *Col1a1* gen ifadesinde artış olduğu belirlenmiştir. Literatürde azalan hücre-hücre etkileşiminin kollajen sentezini artırdığına yönelik bilgi bulunmaktadır (Kato, Shanley ve Fox, 1996). Düşük hücre yoğunluğunda *Tnnt2* gen ekspresyonundaki azalmanın da hücre etkileşimlerinin azalmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. *Cacna1s* gen ifadesinin yüksek hücre ekim yoğunluğunda fazla olması ise diğer sonuçlar ile uyumlu olacak şekilde, artan hücre yoğunluğunda sıkışmaya bağlı olarak hücrenin miyoblastik karakterindeki artışın bir göstergesidir.

RT-PCR analizi sonucunda FBS konsantrasyonu ve askorbik asit uygulamasının da

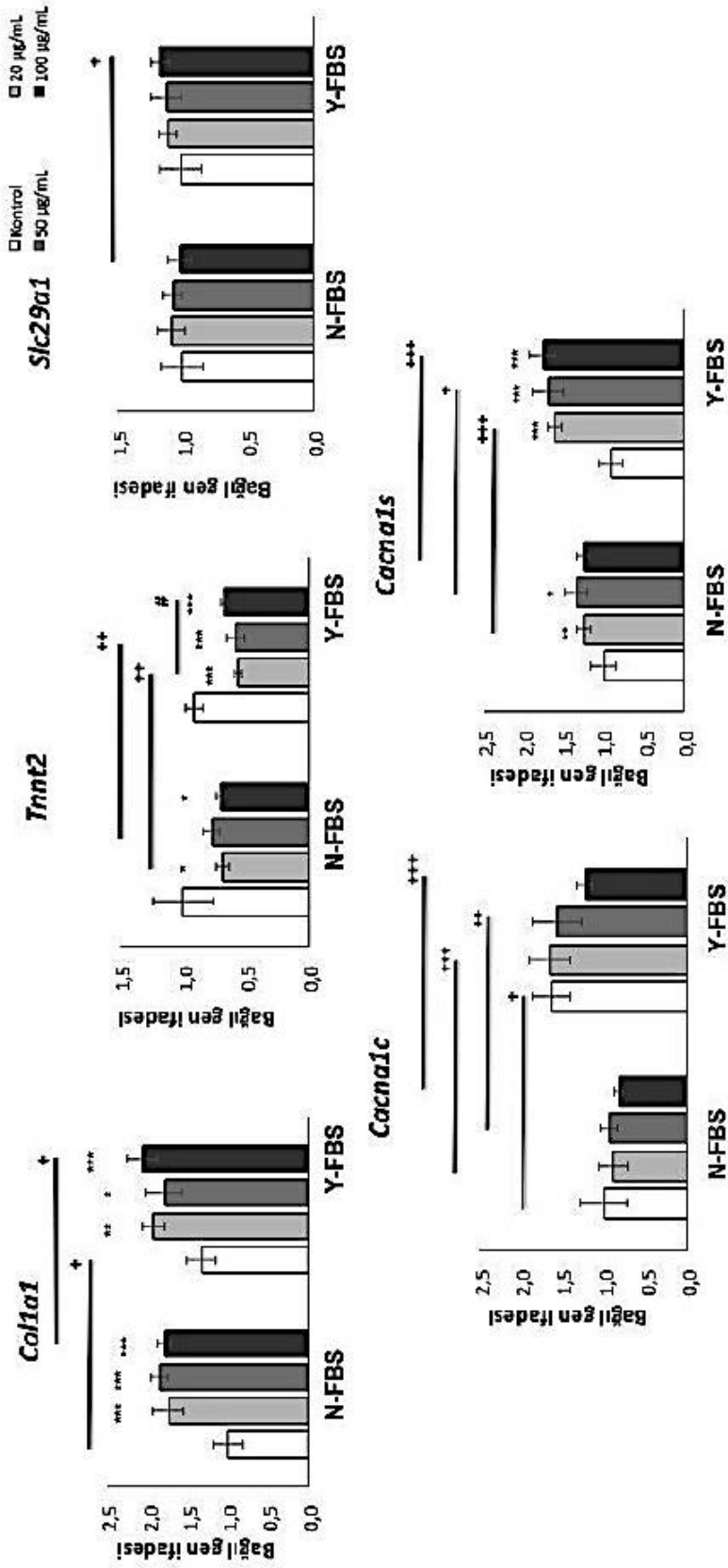
hücrelerin spesifik gen ekspresyonlarını anlamlı derecede etkilediği belirlenmiştir (Şekil 4.19). AA uygulamasının her 2 FBS grubunda da *Col1a1* gen ekspresyonunu önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. Literatürde periodontal ligament, kemik iliği kök hücreleri ve fibroblast hücreler ile yapılan çalışmalarda da AA'nın kollajen tip I sentezini arttırdığı gösterilmiştir (Grinnell ve ark., 1989; Wei ve ark. 2012; Guo ve ark. 2015). FBS konsantrasyonunun artması ile kontrol ve 100 µg/mL AA grubunda *Col1a1* gen ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Yüksek serum konsantrasyonunun hücrelerde kollajen sentezini arttırdığı gösterilmiştir (Kato, Shanley ve Fox, 1996). Yapılan analiz sonucunda AA uygulanan gruplarda genel olarak *Tnnt2* gen ifadesinde azalma olduğu ve bu azalmanın Y-FBS grubunda daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 20 ve 50 µg/mL AA gruplarında FBS konsantrasyonunun artması ekspresyonu olumsuz etkilemiştir. *Slc29a1* gen ekspresyonunda AA uygulamasının önemli bir farklılık oluşturmadığı, sadece 100 µg/mL AA grubunda FBS konsantrasyonunun artması ile gen ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. *Cacna1c* ve *Cacna1s* genlerinin ekspresyonları incelendiğinde ise FBS konsantrasyonunun artması ile tüm AA gruplarında her iki gende de anlamlı artış meydana geldiği belirlenmiştir. AA uygulaması *Cacna1c* gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir farklılık oluşturmamış, *Cacna1s* gen ekspresyonunda ise N-FBS 100 µg/mL AA grubu dışında tüm gruplarda artış meydana getirmiştir. Y-FBS grubunda artışın daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Askorbik asitin embriyonik ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde kardiyogenezi destekleyen bir molekül olduğu belirtilmiştir (Ivanyuk ve ark., 2015). Tez çalışmasında yapılan RT-PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde AA uygulamasının *Tnnt2* ekspresyonunu grupların çoğunda azalttığı, *Slc29a1* ve *Cacna1c* ifadelerini etkilemediği, fakat *Cacna1s* ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonucun, H9C2 hücreleri üzerindeki yüksek hücre yoğunluğu etkisinin, uygulanan AA konsantrasyonlarının etkisinden daha fazla olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Tüm analiz sonuçları değerlendirildiğinde, askorbik asitin H9C2 hücrelerinde *Cacna1s* gen ekspresyonunu arttırarak miyojenik karakteri arttırdığı, AA uygulaması yönteminin özel kültür kabı kullanımına gerek kalmadan, kısa süre içerisinde yüksek canlılığa sahip hücre tabakalarının elde edilmesini sağladığı gösterilmiştir. Yüksek serum ve AA konsantrasyonu birlikte kullanıldığında ise yüksek kardiyak özelliklere sahip hücre tabakası elde edildiği gösterilmiştir. RT-PCR analizi sonuçları dikkate alındığında

Tnnt2 gen ifadesinde azalma olmasına rağmen *Cacna1c* ve *Slc29a1* gen ekspresyonlarında N-FBS grubuna göre daha yüksek değerler elde edilmesi Y-FBS 100 µg/mL AA grubunun kardiyak özellikler açısından en iyi grup olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. Farklı kültür kabı yüzey materyali (a) ve hücre ekim yoğunluğunun (b) H9C2 hücre tabaklarının bağıl gen ifadeleri üzerindeki etkisini gösteren RT-PCR analiz grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4; * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001.



Şekil 4.19. AA uygulaması ve FBS konsantrasyonunun H9C2 hücre tabakalarının bağıl gen ifadeleri üzerindeki etkisini gösteren RT-PCR analiz grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=5; N-FBS ve Y-FBS grupları kendi arasında kontrole göre * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001, 20 µg/mL AA grubuna göre # p<0.05; Y-FBS grubu, N-FBS grubuna göre + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001.

4.3. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretimi

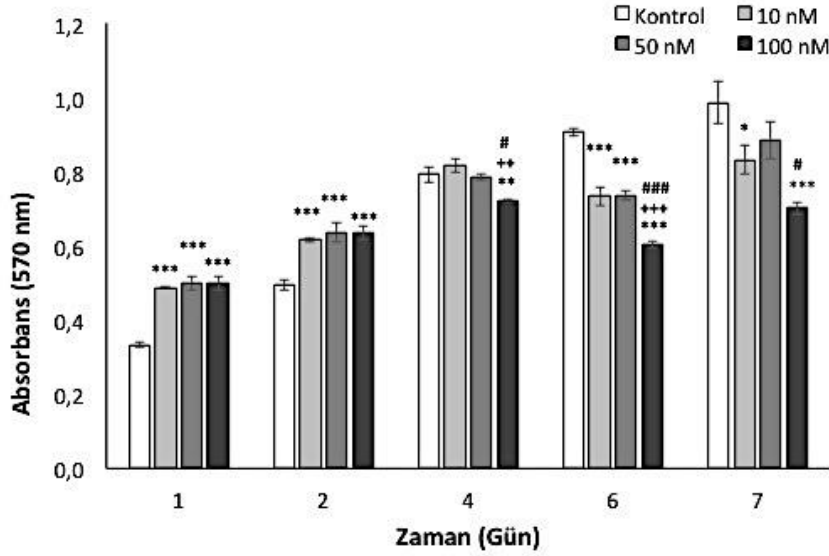
4.3.1. H9C2 Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Çalışmaları

Literatürde H9C2 hücrelerinin kardiyomiyojenik farklılaştırılmasında pek çok çalışmada retinoik asit (RA) uygulaması yapılmıştır (Lund, Peterson ve Wallace, 2007; Karagiannis ve ark., 2010; Pereira ve ark., 2011). H9C2 hücrelerinin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için kültür ortamının FBS oranı %1 (v/v)'e düşürülmüş ve farklı konsantrasyonlarda (10 nM, 50 nM ve 100 nM) RA uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kültüre 7 gün boyunca devam edilmiş, RA hava ve ışığa karşı duyarlı olduğu için ortamlar her gün taze hazırlanan ortam ile değiştirilmiş, 5. ve 7. günde gerçekleştirilen analizler ile konsantrasyon ve uygulama süresi belirlenmiştir. Retinoik asit kardiyak gelişiminde önemli rol alan aktif A vitamini türevidir ve embriyonik gelişim sırasında yokluğunda kalp ve damar anomalilerinin gerçekleştiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda iskemi sonrasında da RA sinyal yolağının aktive olduğu belirlenmiş, kalp hasarının onarılmasında ve yeniden düzenlemede de etkin olabileceği düşünülmüştür (De Luca, 1991; Zaffran, El Robrini ve Bertrand, 2014). Genel olarak çalışmalarda H9C2 hücrelerinde iskelet tipi farklılaşmanın aksine kardiyomiyojenik farklılaşmanın hangi yollar ile gerçekleştiği tam olarak belirtilmemekle birlikte (Sumi, Abe ve Himeno, 2013) Branco ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada kardiyomiyojenik yönde farklılaşan hücrelerin kalsiyum işlenmesi, glikolitik ve mitokondriyal metabolizma ile ilişkili transkript ve protein seviyesinde önemli artış olduğu ve farklılaşmanın retinoik asit tarafından düzenlenen mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolağı üzerinden gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Comelli ve ark. (2011) ise RA etkisi ile farklılaştırılan H9C2 hücrelerinde mitokondriyal kütlede artış ve mitokondri şekil ve yapısında olgunlaşma ile ilişkili değişiklikler olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca RA'nın kardiyomiyoblast hücreleri ve KMEH üzerinde serbest radikal nitrik oksit üretiminden sorumlu nitrik oksit sentaz aktivitesini azaltıcı etki gösterdiği belirtilmiştir (Grosjean ve ark., 2001).

4.3.1.1. PrestoBlue Analizi

Retinoik asit etkisi ile farklılaştırılan hücrelerin canlılıkları PrestoBlue analizi ile incelenmiştir (Şekil 4.20). PrestoBlue resazurin içeren bir çözeltilidir, canlı hücreler mitokondriyal aktivite ile mavi renkli resazurini kırmızı renkli floresan özellikte resorufine indirgerler ve hücre canlılığı ile orantılı olarak absorbans değerleri ölçülür (Sonnaert ve ark., 2015). Analiz sonucunda kültürün 4. gününe kadar farklılaşma

ajanının hücre çoğalması üzerinde olumlu etkisi gözlenirken, daha sonrasında hücrelerin farklılaşmaya yönelmesi ile üremenin yavaşladığı gözlenmiştir. Literatürde de benzer sonuçlar bulunmuştur (Comelli ve ark., 2011; Branco ve ark., 2015).

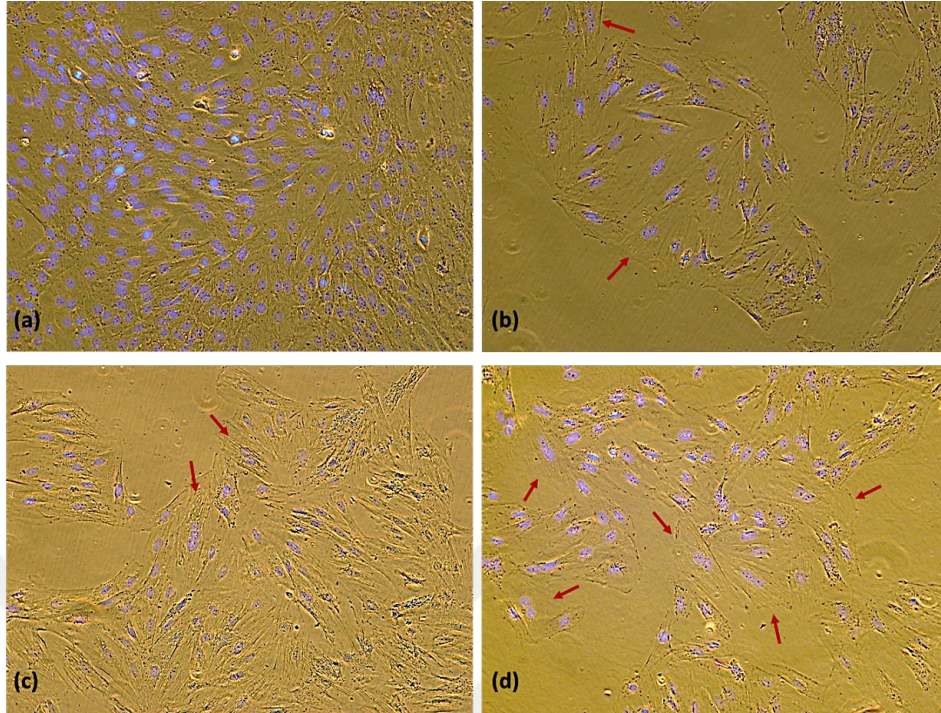


Şekil 4.20. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait PrestoBlue grafiği. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3, aynı gün kontrole göre * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; 20 nM RA grubuna göre ++ p<0.01, +++ p<0.001; 50 nM RA grubuna göre # p<0.05, ### p<0.001.

4.3.1.2. İmmüno Floresan Boyama

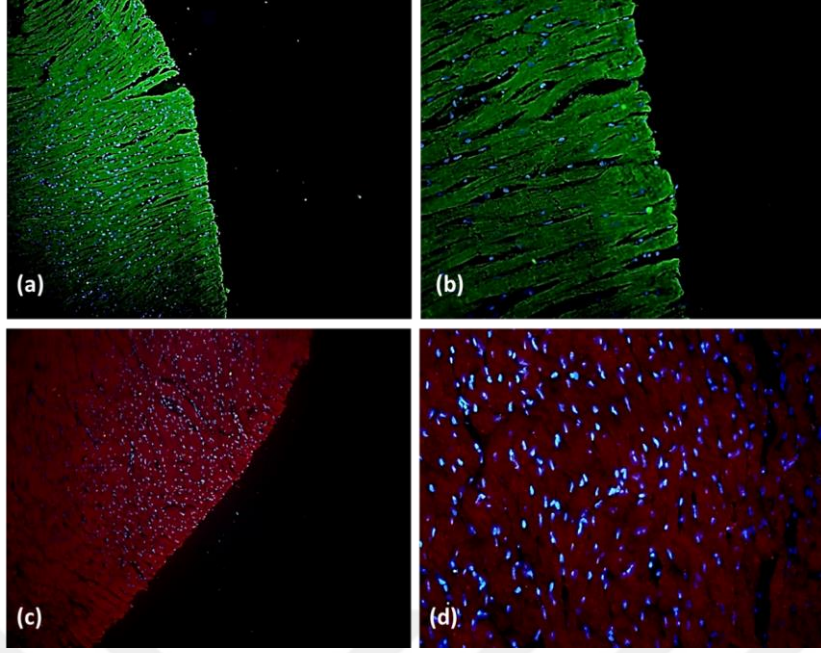
Hücrelerin farklılaşma sürecinde morfolojik açıdan incelenmesi için optik mikroskop ve floresan mikroskop (DAPI boyama) görüntüleri bileştirilmiş, böylece çekirdek yapıları ve hücre morfolojileri daha rahat belirlenebilmiştir. Fotoğraflar (Şekil 4.21) incelendiğinde literatür ile uyumlu olacak şekilde kontrol grubundaki hücrelerin daha yassı, iğsi morfolojiye sahip oldukları, RA uygulanan hücrelerin ise poligonal formda, daha büyük ve çok çekirdekli ve daha küresel bir morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir (Comelli ve ark., 2011, Branco ve ark., 2015). Kardiyomiyosit kültürlerinde hücre bölünmesi gerçekleşmeden DNA replikasyonu ve ardından karyokinezin meydana gelmesi ile çift çekirdekli hücrelerin oluştuğu gösterilmiştir (Menard ve ark., 1999). En yüksek konsantrasyon olan 100 nM RA grubunda farklılaşmış hücre tanımına uygun (kırmızı ok ile işaretlenmiştir) hücreler daha yoğun gözlenmiştir. İki ya da üç çekirdeğe sahip hücrelerin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca hücre üremesinin yavaşlaması nedeniyle RA uygulanan gruplarda hücre yoğunluğunun

kontrol grubuna göre daha düşük olması dikkat çekmiştir.



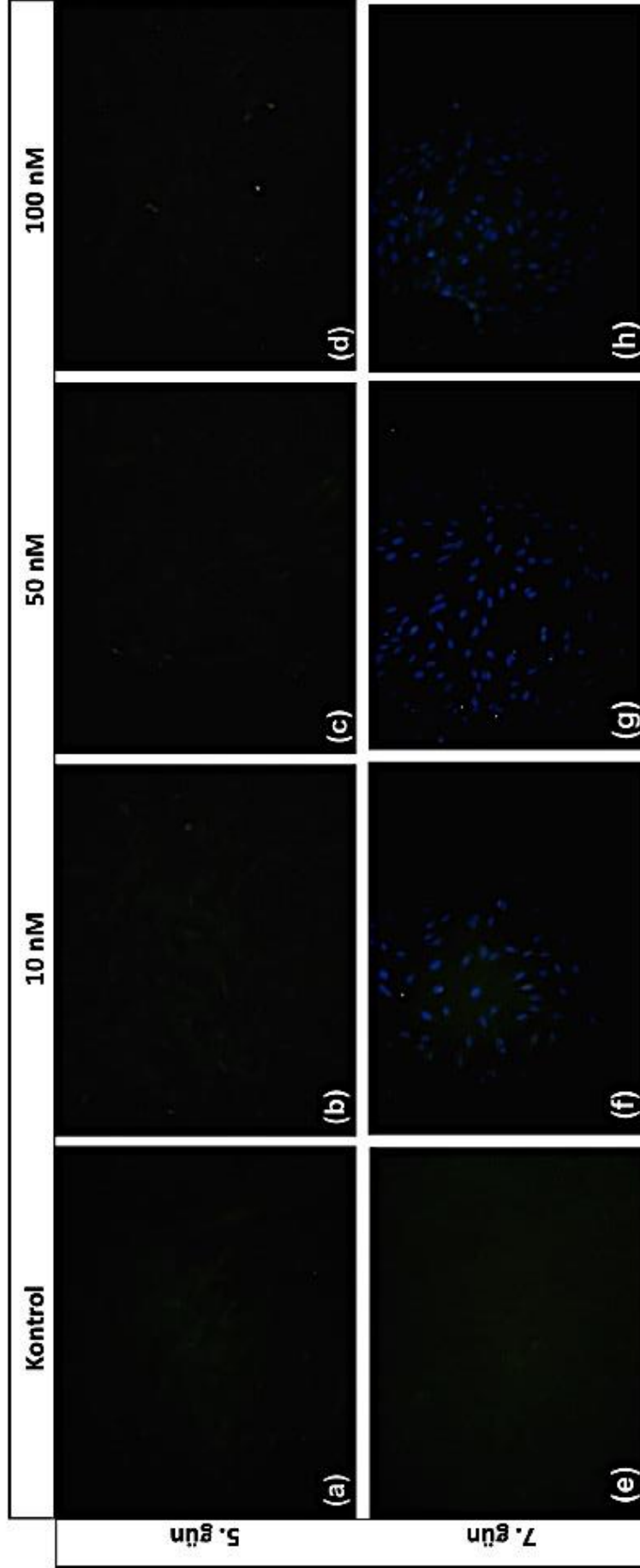
Şekil 4.21. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait optik ve floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılmış fotoğrafları a) Kontrol (RA: 0 nM), b) 10 nM, c) 50 nM, d) 100 nM RA (20 X).

Hücrelerin farklılaşmasını belirlemek için yapılan diğer bir analiz immünofloresan boyamadır. Antikorların pozitif kontrolü olarak sıçan kalp dokusu boyanmış (Şekil 4.22), Anti-TNT kırmızı, Anti-MLC2 ise yeşil ışına veren sekonder antikor ile işaretlenmiştir. Pozitif kontrolün başarılı şekilde boyanması ile kullanılan primer ve sekonder antikorların etkin olduğu doğrulanmıştır.



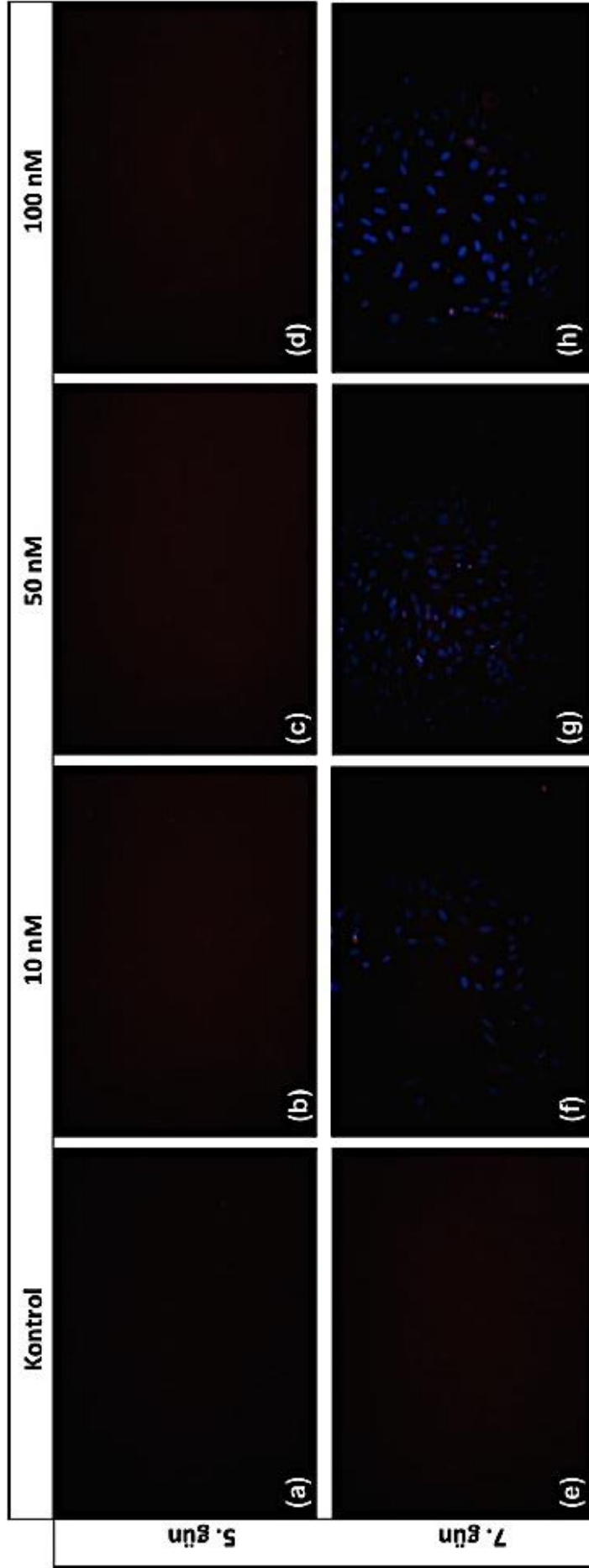
Şekil 4.22. Sıçan kalp dokusuna ait immüno Floresan Anti-MLC2 (a, b) ve Anti-TNT (c, d) boyamalar, a ve c) 10 X, b ve d) 32 X.

Farklılaştırma çalışması yapılan hücrelerin kültürün 5. ve 7. günlerine ait Anti-MLC2 ve Anti-TNT immüno Floresan boyama fotoğrafları sırası ile Şekil 4.23 ve 4.24'te verilmiştir. Anti-MLC2 boyama sonuçlarında pozitif boyama gözlenememiş, RA uygulanan gruplar ve günler arasında çok fazla farklılık olmadığı belirlenmiştir. Anti-TNT boyamalarında ise 7. gün 100 nM konsantrasyon grubunda daha spesifik boyanan hücrelerin olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.23. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait 5. (a, b, c, d) ve 7. (e, f, g, h) gün Anti-MLC2 immünofloresan boyama fotoğrafları:

Kontrol (a ve e), RA uygulaması b ve f) 10 nM, c ve g) 50 nM, d ve h) 100 nM RA: 20 X



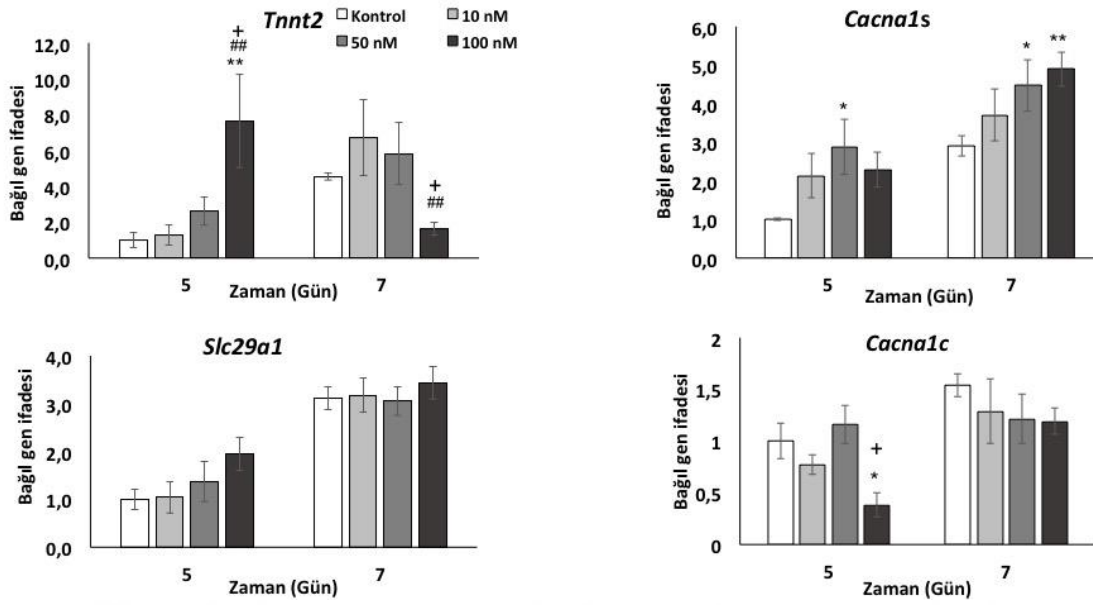
Şekil 4.24. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait 5. (a, b, c, d) ve 7. (e, f, g, h) gün Anti-TNT immünofloresan boyama fotoğrafları:

Kontrol (a ve e), RA uygulaması b ve f) 10 nM, c ve g) 50 nM, d ve h) 100 nM RA: 20 X

4.3.1.3. RT-PCR

Retinoik asit uygulaması sonunda farklılaşmanın incelenmesi amacıyla gen ifadeleri incelenmiş, RT-PCR grafikleri Şekil 4.25'te verilmiştir. Önemli bir kardiyak farklılaşma belirteci olan *Tnnt2* gen ifadesinin 5. gün 100 nM konsantrasyonda yaklaşık 8 kat arttığı, 7. günde ise azaldığı gözlenmiştir, literatüre benzer sonuçlar elde edilmiştir (Pereira ve ark., 2011; Anene-Nzulu ve ark., 2013). RT-PCR analizinde 5. günde gen ekspresyon seviyesinin yüksek olması immünofloresan boyama sonuçlarında ise 7. günde boyamaların daha belirgin olması, 5. günden sonra artan ekspresyon ile üretilen protein miktarında artış olduğu şeklinde yorumlanmıştır. *Slc29a1* gen ekspresyonu 5. günde RA konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak artmış, fakat gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yedinci günde ekspresyonun artmaya devam ettiği gözlenmiş, gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Leung ve ark. yaptıkları çalışmada benzer şekilde H9C2 hücrelerinin RA uygulaması ile farklılaşmasını incelemişler ve farklılaşan hücrelerde *Slc29a1* gen ekspresyonunun 3 kat arttığını belirtmişlerdir (Leung, Tse ve Man, 2007). *Cacna1c* gen ifadesinde ise 5. günde 100 nM konsantrasyonda bir miktar düşüş meydana geldiği, 7. günde ekspresyon seviyesinin arttığı, fakat gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı belirlenmiştir. *Cacna1s* gen ekspresyonu ise 5. gün 50 nM konsantrasyonda anlamlı oranda artmış, 7. günde 50 ve 100 nM konsantrasyonda kontrole göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Tüm gen ekspresyonları birlikte değerlendirildiğinde kardiyomiyojenik farklılaşmayı en iyi destekleyen koşulun 5. gün 100 nM konsantrasyon olduğuna karar verilmiştir.

Literatürde H9C2 hücrelerinin kolaylıkla kardiyomiyojenik yöne farklılaştırılabileceği belirtilmesine rağmen Patten ve ark. (2017) yayınladıkları çalışmada hücrelerin heterojen özellikte olması, pasaj numarasının farklı olması, RA'nın ışığa aşırı duyarlı ve hidrofobik olması nedeniyle etkin şekilde çözünememesi, farklılaşma için yeterli süre uygulama yapılmaması ya da hücrelerin üzerinde kültüre edildikleri yüzeylerin farklı olmasının hücrelerin farklılaşma verimlerini etkileyebildiği belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında daha önce başarılı olduğu belirtilmiş 2 farklı farklılaşma prosedürünü uygulamış ve yöntemlerin birinde farklılaşmanın başarılı olmadığını belirtmişlerdir.



Şekil 4.25. RA uygulaması yapılan H9C2 hücrelerine ait bağıl gen ifadesini gösteren RT-PCR grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=4, Her gün kendi arasında kontrol grubuna göre *p<0,05, ** p<0.01; 10 nM RA grubuna göre ## p<0.01; 50 nM RA grubuna göre +p<0.05.

4.3.2. Kardiyovasküler Hücre Tabakalarının Üretilmesi ve Karakterizasyonu

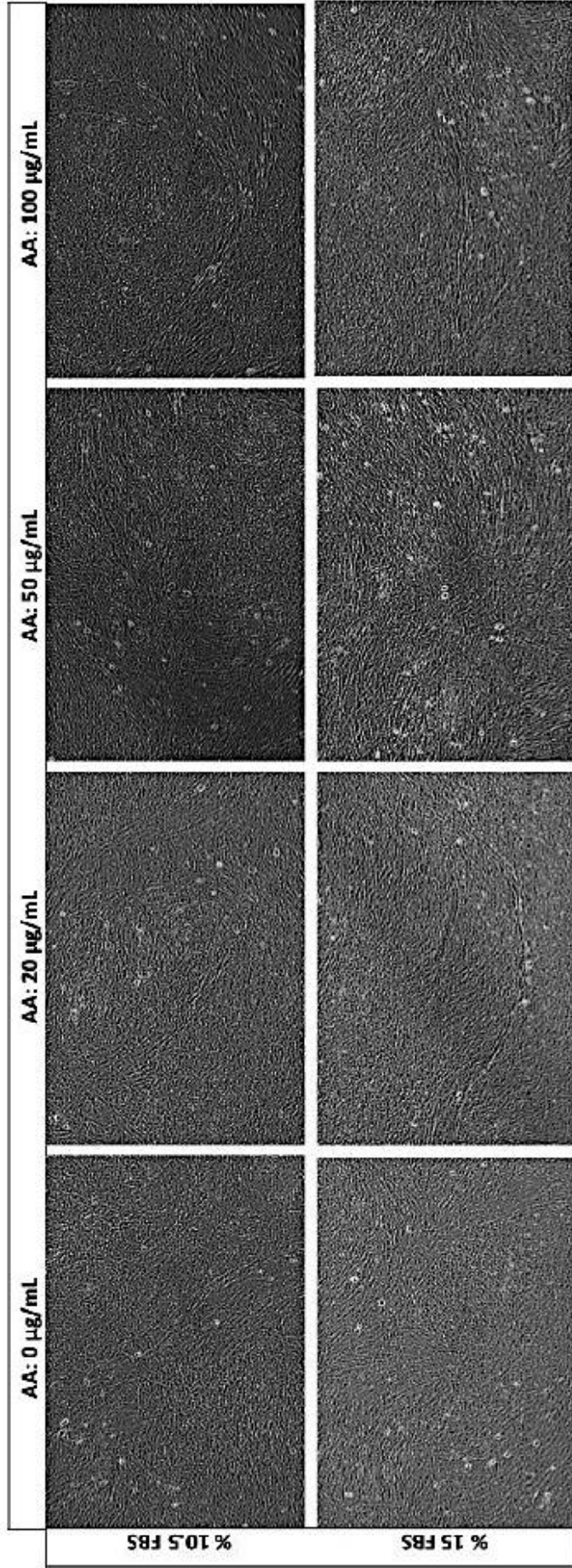
Kardiyovasküler hücre tabakalarının üretilmesinde 22. pasajdaki farklılaştırılmış H9C2 ve 7. pasajdaki endotel hücreleri kullanılmıştır. Endotel hücrelerin, özellikle kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin enfarktüs sonrası anjiyogeneze önemli rol oynadıkları bilinmektedir, fakat bu hücrelerin ilerleyen pasajlarda senesense bağılı olarak etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (Cao ve ark., 2009). Bu nedenle ileri pasaj kullanılmamaya özen gösterilmiştir.

Ko-kültür ortamında damarlanmayı desteklemek amacıyla VEGF ve bFGF kullanılmıştır. VEGF vasküler gelişimde önemli olduğu bilinen bir faktördür ve VEGF-A en baskın formudur. bFGF ise tanımlanan ilk öncül-anjiyogenik moleküldür ve FGF reseptörüne bağlanması ile pek çok metabolik sinyalizasyon yolağını aktive eder (Cross ve Claesson-Welsh, 2001). Ayrıca yapılan bir çalışmada VEGF yanında bFGF kullanımının ko-kültür hücre tabakasında daha büyük çaplı damarların oluşmasını sağladığı belirtilmiştir (Sakaguchi ve ark., 2013). bFGF'in endotel hücrelerinde vaskülerizasyonu desteklemenin yanında H9C2 hücrelerinde de canlılığı destekleyici bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Cui ve ark., 2016).

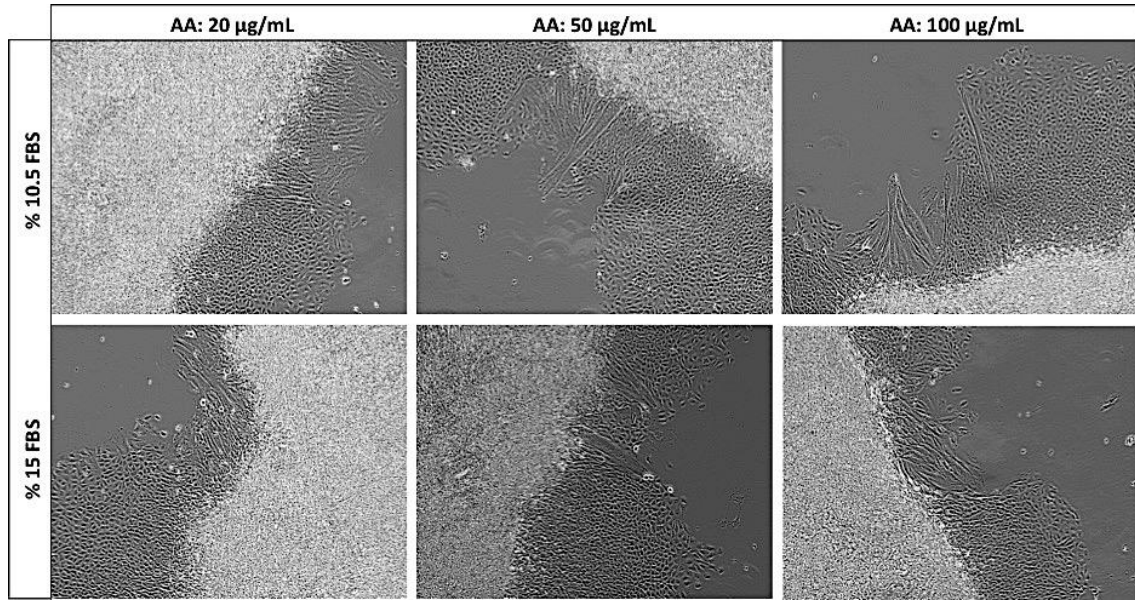
Literatürde kardiyomiyosit ve endotel hücreleri ile ko-kültür şeklinde hücre tabakalarının üretildiği çalışmalarda tüm sonuçlar ko-kültürün daha başarılı olduğunu göstermektedir. Endotel hücreler ile ko-kültür yapılan kardiyomiyosit hücre tabakalarında daha fazla VEGF, bGFG ve HGF gibi sitokinlerin salındığı, böylece damarlanmayı daha çok desteklediği belirtilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada sitokin salımını incelemek için endotel hücrelerinin kardiyomiyosit hücreleri dışında, fibroblast hücreleri ile ko-kültürü gerçekleştirilmiş ancak, sitokin salımında bir artış gözlenmemiştir. Böylelikle sitokin salımının kardiyomiyositler ile endotel hücreleri arasındaki spesifik etkileşim sayesinde arttığı belirtilmiştir (Sekine ve ark., 2008; Sakaguchi, Shimizu ve Okano, 2015). Ayrıca H9C2 hücrelerinin kültür ortamında immün yanıt baskılanması, ECM'nin yeniden düzenlenmesi ve anjiyogeneze rol alan pek çok sitokin ve büyüme faktörünün olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Makhoul ve ark., 2016). Başka bir çalışmada ise kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinde spesifik vWF üretiminin yalnızca kardiyak miyositler ile ko-kültür yapıldığında arttığı, hepatosit ve fibroblastlar ile birlikte kültüre edildiğinde bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (Aird ve ark., 1997). Sekine ve ark. kardiyomiyosit hücre tabakasını sıçan embriyonik kalbindeki orana eşit oranda endotel hücreler ile ko-kültür halinde üretilen sıçan kalbine implante ettiklerinde oluşan fibrotik dokunun da küçüldüğünü belirtmişlerdir (Sekine ve ark., 2008). Kardiyomiyositlerde VEGF salımının TGF β 1'in otokrin etkileşimi ile MAPK yolağını aktive etmesi sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (Brutsaert, 2003). Endotel hücre ve kardiyomiyositlerin karşılıklı olarak etkileşimlerinde TGF β 'nın rol aldığı bilinmektedir, fakat yetişkin sıçan kalbinde her iki hücre de immünohistokimyasal açıdan TGF β 1 pozitif boyanmıştır. Dolayısı ile her iki hücreden salgılanan sitokinlerin hem birbirlerini hem de otokrin olarak kendilerini etkiledikleri düşünülebilir. Ayrıca endotel hücreler tarafından salgılanan ve ko-kültürde aktive olan TGF β 'nın kardiyomiyosit hücrelerinde gen ekspresyonu ve kasılma üzerinde etkin endotelin salgılanmasını da sağladığı belirtilmiştir (Nishida ve ark., 1993). Endotel hücrelerin salgıladıkları sitokinlerin kardiyomiyositlerde canlılık, ritmik kasılma, metabolik fonksiyonlar ve üreme gibi pek çok aktivitenin düzenlenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Brutsaert, 2003; Kuramochi ve ark., 2004; Narmoneva ve ark., 2004; Hsieh ve ark., 2006; Murdoch ve ark., 2014). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* uygulaması yapılan bir çalışmada endotel hücrelerin kardiyomiyositlerin yeniden düzenlenmesinde de önemli rol aldıkları gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015).

Kardiyovasküler hücre tabakalarının üretimi için daha önce kullanılan 3 yöntemin avantaj ve dezavantajları değerlendirilerek AA uygulaması yöntemi seçilmiştir. Askorbik asitin H9C2 hücreleri üzerindeki olumlu etkilerinin yanında endotel hücreleri üzerinde de kollajen tip 4 üretimini arttırmak, üremeyi desteklemek, apoptozu önlemek, radikal türleri uzaklaştırmak gibi çeşitli olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Korantzopoulos ve Galaris, 2003; Martinez ve ark., 2010; May ve Harrison, 2013). Özellikle kalp endotel hücreleri üzerinde iyileştirici etkisi olduğu yapılan *in vivo* ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Rössig ve ark., 2001; Molyneux, Glyn ve Ward, 2002).

Tez çalışması kapsamında üretilen kardiyovasküler hücre tabakalarının kaldırma öncesi ve yeni kültür kabına tutunma sonrası optik mikroskop fotoğrafları Şekil 4.26 ve 4.27’de verilmiştir. Fotoğraflar dikkatli incelendiğinde endotel hücrelerin H9C2 hücreleri arasında damar ağı benzeri yapıları meydana getirdiği görülmektedir. Morfolojik açıdan incelendiğinde FBS ve AA konsantrasyonlarının hücreler arasında önemli farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. Kültürün 5. gününde AA uygulaması gerçekleştirilen tabakaların yüzeyden kolaylıkla bir bütün halinde ayrılması gerçekleştirilmiş ve tabakayı oluşturan hücreler aktarıldıkları yeni kültür kabının yüzeyine tutunup yayılmaya başlamıştır. Bu sonuç hücre tabakalarının canlılıklarını devam ettirdiklerini göstermektedir.



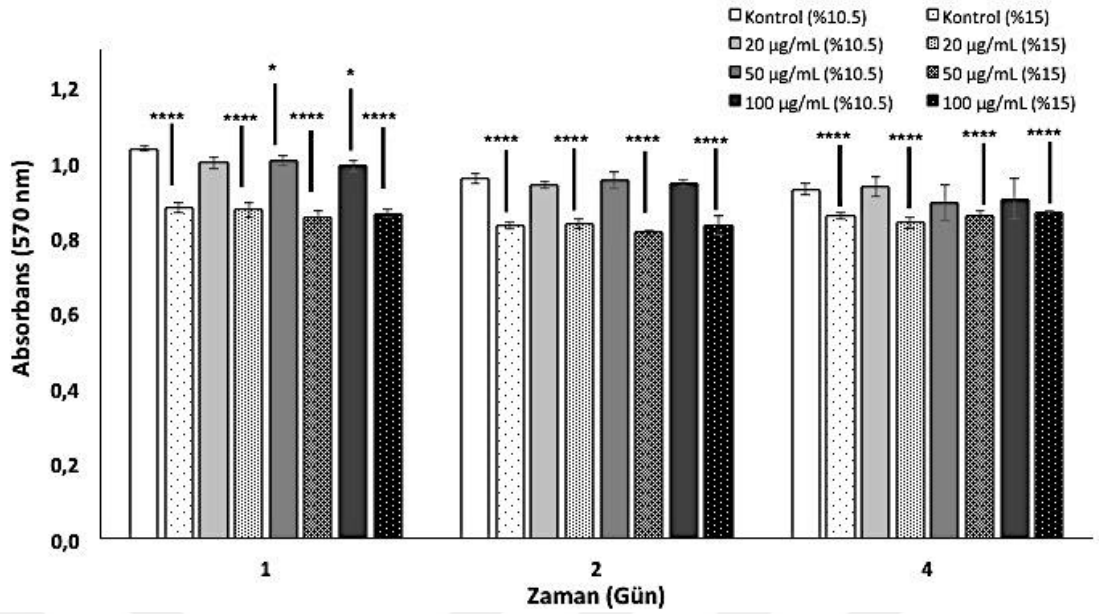
Şekil 4.26. Kaldırma öncesi kardiyovasküler (H9C2 hücreleri ve KMEH oranı 6:1) hücre tabakalarına ait optik mikroskop fotoğrafları: 10 X.



Şekil 4.27. Kardiyovasküler hücre tabakalarının yüzeyden kaldırılıp yeni yüzeye tutunmasından 1 gün sonra 110ptic mikroskop fotoğrafları: 10 X.

4.3.2.1. PrestoBlue Analizi

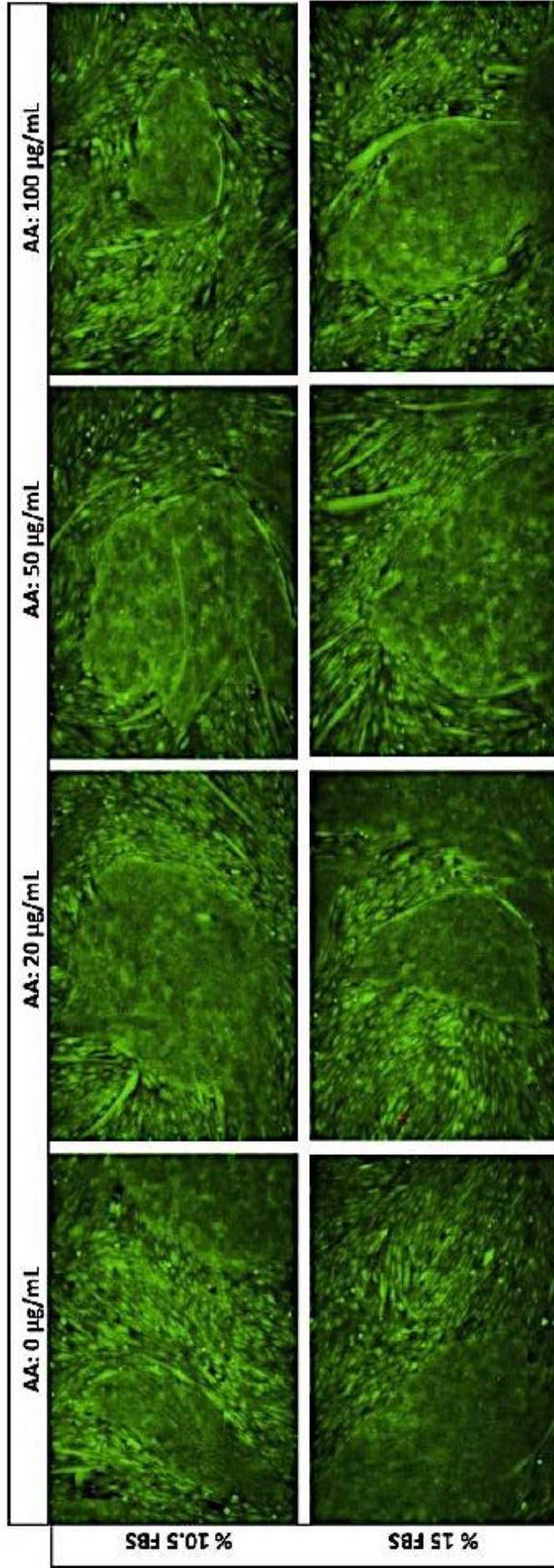
Hazırlanan farklı FBS ve AA konsantrasyonlarına sahip ortamların ko-kültürdeki hücrelerin canlılıkları üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan PrestoBlue analizi sonucunda %10.5 (v/v) FBS kullanılan ortamın tüm gruplarında daha yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.28). Kültür sonunda değişen AA konsantrasyonlarının ilk gün dışında önemli bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir. Farklılaştırılan H9C2 hücreleri %1 (v/v) FBS içeren ortama adapte oldukları için serum konsantrasyonunun hızla yükselmesinin hücreleri etkileyebileceği, o nedenle düşük FBS konsantrasyonunun hücre canlılığını daha iyi desteklemiş olabileceği düşünülmüştür.



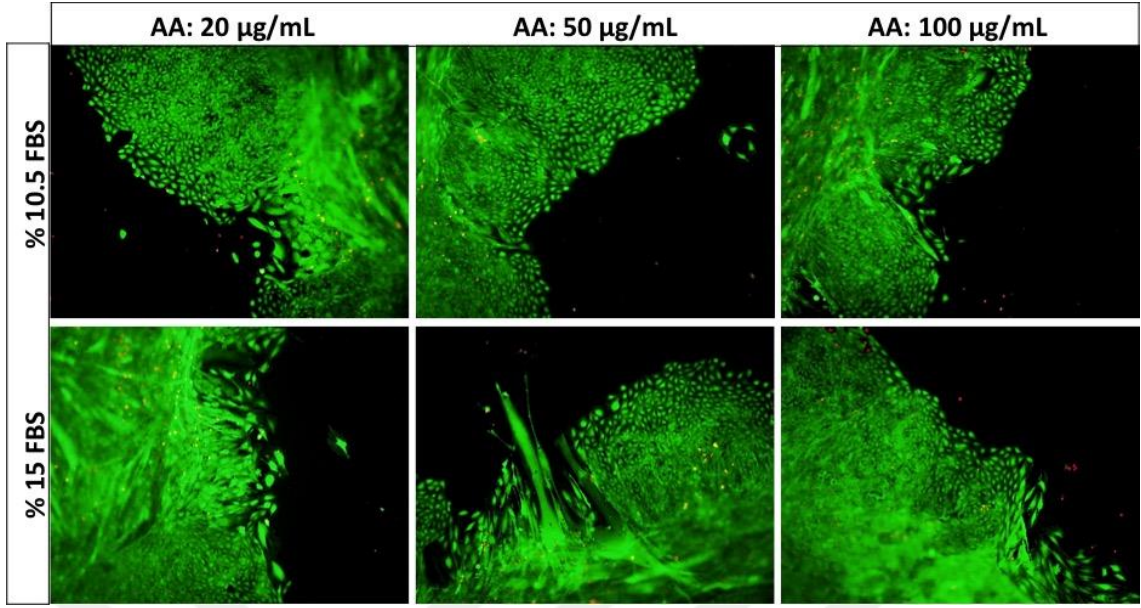
Şekil 4.28. Ko-kültür hücre tabakalarına ait PrestoBlue grafiği. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, günler kendi arasında %10.5 (v/v) FBS gruplarına 111pti * p<0.05, **** p<0.0001.

4.3.2.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Kardiyovasküler hücre tabakalarının kaldırma öncesinde ve sonrasında canlılıkları canlı/ölü hücre boyama analizi ile de incelenmiş, boyama sonucu alınan fotoğraflar Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da verilmiştir. Tüm gruptaki hücrelerin kaldırma öncesi ve sonrasında canlılıklarını yüksek oranda korudukları gözlenmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde endotel hücrelerin oluşturduğu damar benzeri tübüler yapılar 111ptic mikroskop fotoğraflarından daha belirgin şekilde görülmüştür.



Şekil 4.29. Yüzeyden kaldırma öncesi kardiyovasküler hücre tabakalarına ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları. 10 X.

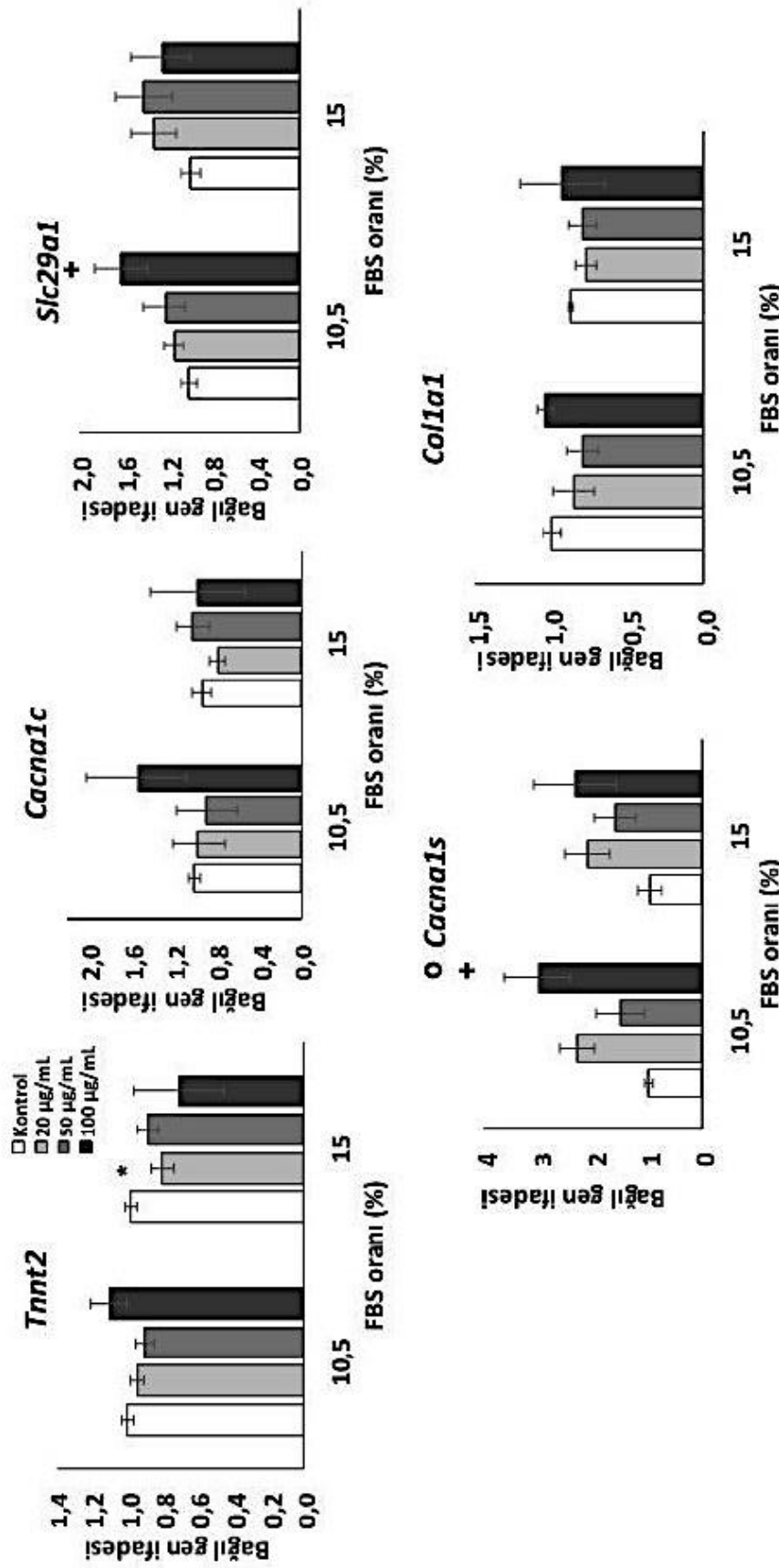


Şekil 4.30. Yüzeyden kaldırma sonrası kardiyovasküler hücre tabakalarına ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 10 X.

4.3.2.3. RT-PCR Analizi

Kardiyovasküler hücre tabakalarında kültür süresince kullanılan ortamların farklılaşan H9C2 hücrelerine etkisinin belirlenmesi için gen ekspresyonları incelenmiştir (Şekil 4.31). *Cacna1c* ve *Col1a1* gen ekspresyonlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *Tnnt2* gen ekspresyonu 20 µg/mL AA konsantrasyonunda FBS konsantrasyonunun artması ile azalmış, diğer gruplarda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *Slc29a1* gen ifadesinde ise %10.5 (v/v) FBS grubunda 100 µg/mL AA konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir.

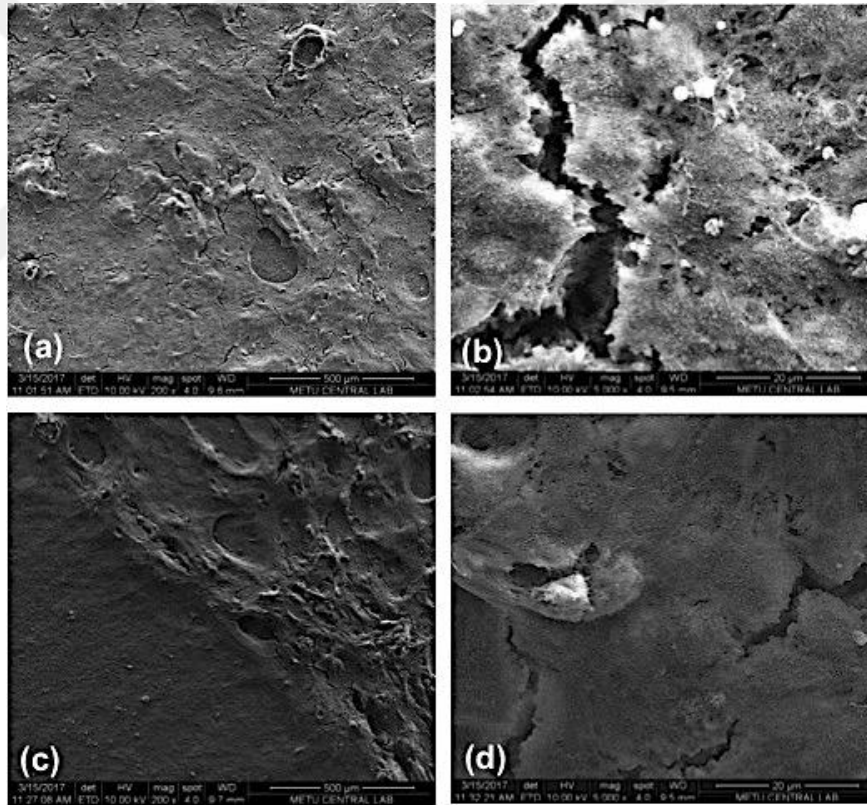
Genel olarak yapılan RT-PCR analizi değerlendirildiğinde %10.5 (v/v) FBS ve 100 µg/mL AA konsantrasyon grubunda tüm kardiyak spesifik genlerde anlamlı bir fark olmasa da ortalama olarak bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu koşullar kullanılarak elde edilen kardiyovasküler hücre tabakaları kullanılmıştır.



Şekil 4.31. AA uygulaması ve FBS konsantrasyonunun kardiyovasküler hücre tabakasında bağıl gen ifadeleri üzerindeki etkisini gösteren RT-PCR analiz grafikleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3; %10.5 (v/v) ve %15 (v/v) FBS grupları kendi arasında kontrole göre + p<0.05; 50 µg/mL AA grubuna göre o p<0.05; %15 (v/v) FBS grubu, %10.5 (v/v) FBS grubuna göre * p<0.05.

4.3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

H9C2 hücrelerinin farklılaştırılmadan ve farklılaştırıldıktan sonra endotel hücreleri ile ko-kültür şeklinde hücre tabakası oluşturması durumunda morfolojik açıdan bir değişiklik meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi için 2 farklı kardiyovasküler hücre tabakası üretimi gerçekleştirilmiştir. Hücre tabakaları %10.5 (v/v) FBS ve 100 µg/mL konsantrasyonda AA uygulaması yöntemi ile üretilmiş ve SEM analizi sonucu elde edilen fotoğraflar Şekil 4.32’de verilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde her iki grupta da optik mikroskop görüntüleri ile uyumlu olacak şekilde tabakanın belirli bölgelerinde endotel hücrelerin *in vivo* düzene benzer şekilde sırandıkları ve damar lümenine benzer tübüler yapılar oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.32a ve c). Daha yüksek büyütme görüntülerinde ise H9C2 hücrelerine ait pürüzlü hücre membranı yapısı gözlenmiş, farklılaşmış ve farklılaşmamış hücreler arasında önemli bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.32b ve d).

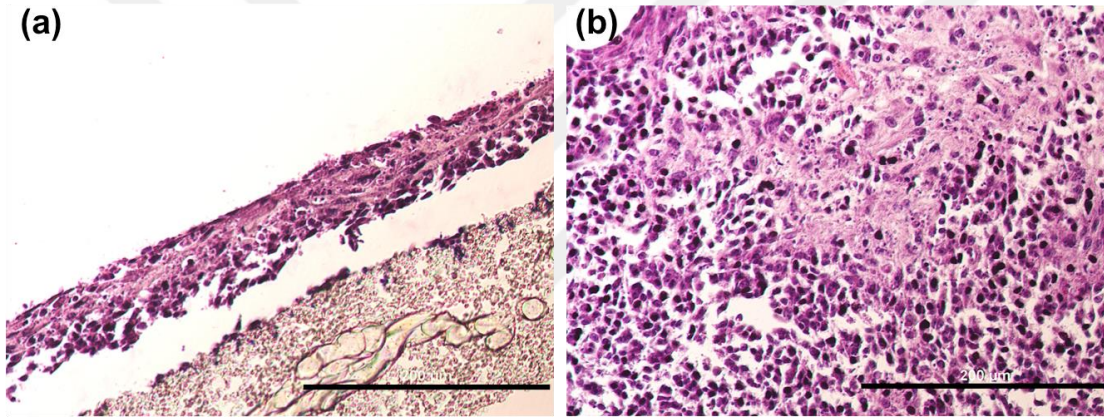


Şekil 4.32. Kardiyovasküler hücre tabakalarına ait SEM fotoğrafları:

- a ve b) Farklılaştırılmamış H9C2/endotel hücre tabakası,
- c ve d) Kardiyomiyosite farklılaştırılmış H9C2/endotel hücre tabakası:
- a ve c) 200 X, bar 500 µm; b ve d) 5,000 X, bar 20 µm.

4.3.2.5. Histolojik Boyama

Farklılaştırılmış H9C2 hücrelerinin kullanıldığı %10.5 (v/v) FBS ve 100 µg/mL konsantrasyonda AA uygulaması yöntemi ile üretilmiş kardiyovasküler hücre tabakasının dikey ve yatay kesitlerine ait H&E boyama fotoğrafları Şekil 4.33'te verilmiştir. Fotoğraflarda görüldüğü üzere H&E boyamada hücrelerin çekirdeklerindeki nükleik asitler hematoksilin ile koyu mavi-mor renkte, sitoplazma ve ECM'deki proteinler ise eozin ile pembe renkte boyanmaktadır. Dikey kesit fotoğrafı incelendiğinde hücre tabakasının çok katmanlı olduğu görülmüştür, ayrıca endotel hücrelerin kullanıldığı benzer ko-kültür hücre tabakası çalışmalarında (Asakawa ve ark., 2010) olduğu gibi tabakanın aralarında endotel hücrelerin oluşturduğu düşünülen lümen benzeri boşluklu yapılar görülmüştür.



Şekil 4.33. Kardiyovasküler hücre tabakasına ait dikey (a) ve yatay (b) kesit H&E boyama fotoğrafları: 20 X, bar 200 µm.

4.4. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Üretimi

4.4.1. SDS Yöntemi

Hücresizleştirme işlemlerinde ilk uygulanan SDS yöntemi Oberwallner ve ark. tarafından 0.3 mm kalınlıkta insan miyokardiyumunu hücresizleştirmek amacıyla kullanılmış, hücresizleştirmenin başarılı olduğu ve ECM yapısının en iyi korunduğu yöntem olarak seçilmiştir. Yöntemin ilk basamağında Tris-EDTA içeren liziz çözeltisi ile hücrelerin parçalanması ve hücre-ECM adezyonunda görevli metalik iyonların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ancak bu basamak hücresel bileşenlerin ve DNA'nın yapışkan doğası nedeniyle tamamen uzaklaştırılmasını sağlayamamaktadır (Gilbert, Sellaro ve Badylak, 2006; Üçgül ve Aras, 2017). SDS uygulamasında negatif baş grupları olan anyonik deterjan çözünür, ya da membrana bağlı proteinlerin kovalent olmayan bağlarını kopararak denatürasyona neden olur. Böylece proteinlerin doğal

yapılarını bozar (Xu ve ark., 2014). Son aşamadaki serum uygulaması ise hücresizleştirme çalışmalarında yardımcı ajan olarak, özellikle DNA'yı uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (Gui ve ark., 2010; Shao ve ark., 2012; Oberwallner ve ark., 2014). Gui ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada serumun DNA kalıntılarını uzaklaştırmada sitoplazmik kalıntıları uzaklaştırmaktan daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. DNA kalıntılarının uzaklaştırılması ile zenopatojen geçiş riski ve transgenin alıcıya aktarılma olasılığı da düşürülmektedir.

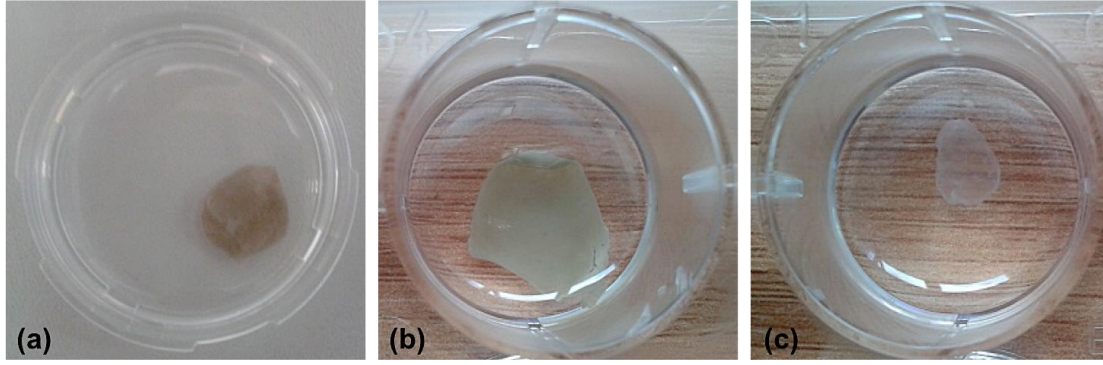
4.4.2. OGP Yöntemi

Hücresizleştirme amacıyla uygulanan 2. yöntem ise Dong ve ark. tarafından domuz perikardiyumunu hücresizleştirmek için kullanılmıştır. OGP yüksek biyobozunur, düşük tahriş edici ve toksik özelliklerinden dolayı tercih edilen, bakteri membranına hasar vererek antibakteriyal özelliği gösterilmiş iyonik olmayan bir deterjandır (Dong, Li, ve Mo, 2013). Yöntemde ilk aşamada kullanılan Tris-HCl, EDTA, PMSF ve OGP içeren liziz çözeltisinde hücreler parçalanmış, aynı zamanda deterjan ile hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hücresizleştirme sırasında parçalanan hücrelerden salınan proteazlar ECM yapısına zarar verebilir. Bu zararın önlenmesi için PMSF proteaz inhibitörü kullanılmıştır. Aynı zamanda kullanılan tampon çözeltilerin pH değerinin 7-8 aralığında tutulması da proteazların etkisini inhibe etmektedir (Gilbert, Sellaro ve Badylak, 2006). İkinci aşamada uygulanan nükleaz parçalama çözeltisi ile DNA ve RNA'nın parçalanması gerçekleştirilmiş, yıkamalar ile kalıntılar uzaklaştırılmıştır.

4.5. Hücresizleştirilmiş Miyokardiyal ECM İskelelerin Karakterizasyonu

Kalp kesitleri alındıktan sonra belirtilen yöntemler ile hücresizleştirme işlemleri gerçekleştirilmiş, Şekil 4.34'te alınan kesitlerin hücresizleştirme öncesinde ve farklı yöntemler ile hücresizleştirme sonrasındaki makroskopik görüntüleri verilmiştir. Fotoğraflarda görüldüğü üzere doğal dokuda bulunan miyogloblin nedeniyle hücresizleştirme uygulanmamış kalp kesiti kahverengi olarak görülmektedir. OGP yöntemi ile hücresizleştirilen dokunun rengi doğal dokuya daha yakın bir tondadır, SDS yönteminde ise doku tamamen şeffaf hale gelmiştir. DNA, kollajen ve GAG analizi sonuçları normalizasyon için Oberwallner ve ark.'nın (2013) yaptığına benzer şekilde örneklerin hücresizleştirme öncesi ıslak ağırlıkları başına hesaplanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda analiz sonuçları çok farklı şekillerde (hücresizleştirme öncesi ya da hücresizleştirme sonrası, ıslak ağırlık ya da kuru ağırlık başına vb.) sunulmaktadır.

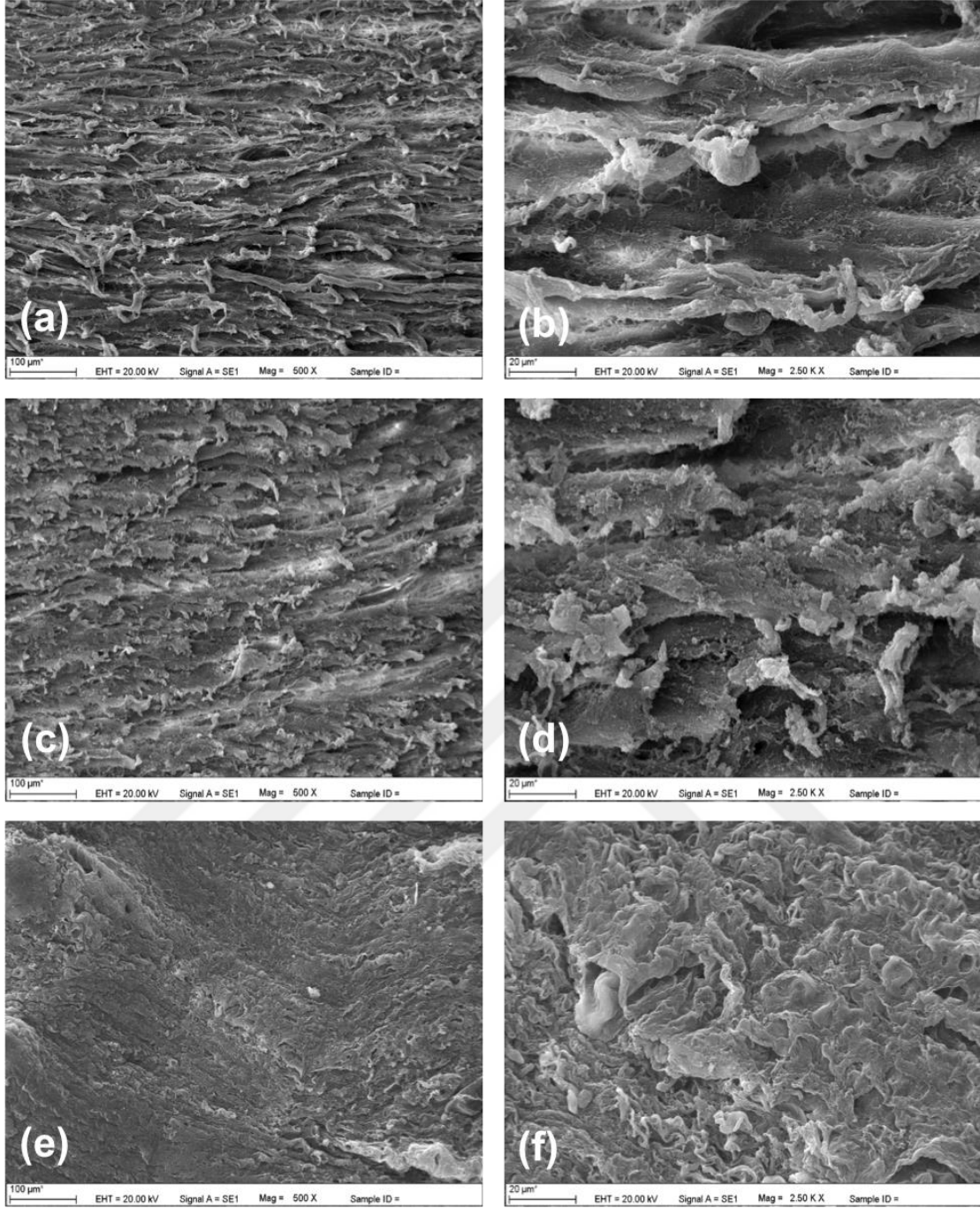
Sonuçlar aynı tip dokuda benzer normalizasyon yapılarak hesaplanmasına rağmen farklı hücreleştirme prosedürleri sonunda dokuda tutulan su miktarları farklı olmaktadır (Bruyneel ve Carr, 2017). Bu nedenle analiz sonuçlarını farklı çalışmalar ile karşılaştırmak kolay olmamaktadır.



Şekil 4.34. Hücreleştirme işlemi uygulanmamış (a), OGP yöntemi (b) ve SDS yöntemi (c) uygulanmış kalp kesitlerine ait makroskopik fotoğraflar.

4.5.1. SEM Analizi

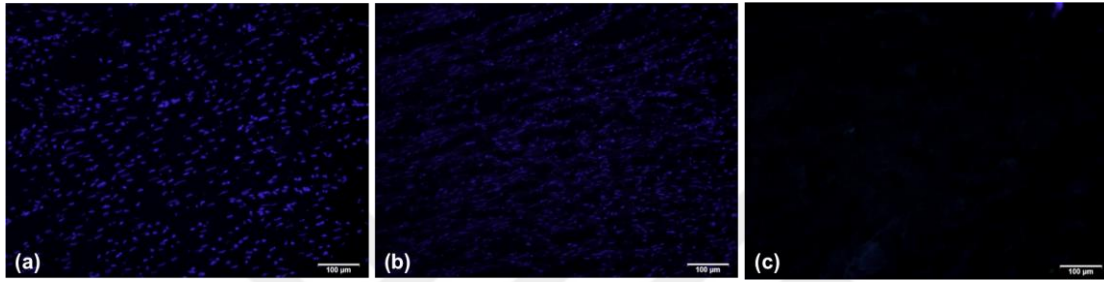
Hücreleştirilmiş (SDS ve OGP yöntemi ile) ve hücreleştirilmemiş dokuların yüzey morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.35'te gösterilen SEM fotoğrafları incelendiğinde hücreleştirilmemiş doku ile OGP yöntemi uygulanan dokunun benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Doğal doku yüksek büyütmede incelendiğinde dokudaki hücrelerin varlığı görülmüştür. OGP yöntemi uygulanan dokuda doku organizasyonunun bozulmadığı ve hücresel bileşenin dokudan uzaklaştırılmadığı belirlenmiştir. SDS yönteminde ise doku organizasyonunda, kollajen fiberlerin yönlenişinde ve düzenlenmesinde bir bozulma olmadan hücresel bileşenlerin uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. Fakat örneklerin analize hazırlanma aşamasında hekzametildisilazan kullanılması dokuların büzüşmesinde neden olmuştur. Bu nedenle özellikle SDS yöntemi ile hazırlanan dokuda bazı bölgelerde katlanmalar meydana gelmiştir. Elde edilen SEM fotoğrafları sıçan kalbi ile gerçekleştirilen hücreleştirme çalışmalarında alınan görüntülere benzerlik göstermektedir (Carvalho ve ark., 2012).



Şekil 4.35. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (a, b), OGP yöntemi (c, d) ve SDS yöntemi (e, f) uygulanmış kalp kesitlerine ait SEM fotoğrafları: a, c ve e) 500 X, bar 100 µm; b, d ve f) 2,500 X, bar 20 µm.

4.5.2. İmmüno Floresan Boyama

Hücresizleştirme işlemi sonrasında yapıdaki nükleer materyal kalıntısını belirlemek için DAPI ile boyama gerçekleştirilmiş, elde edilen fotoğraflar Şekil 4.36'da gösterilmiştir. SEM fotoğraflarını destekleyecek şekilde OGP yöntemi ile doku kesitlerinin hücresizleştirilmesinde başarılı olunamadığı, dokuda hücre çekirdeklerinin yoğun şekilde korunduğu gözlenmiştir. SDS yöntemi uygulanan doku kesitinde ise çekirdeklerin yüksek oranda uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Rajabi-Zeleti ve ark. (2014) benzer şekilde hücresizleştirdikleri insan perikardiyum dokusunda DAPI boyaması ile çekirdeklerin uzaklaştırıldığını göstermişlerdir.

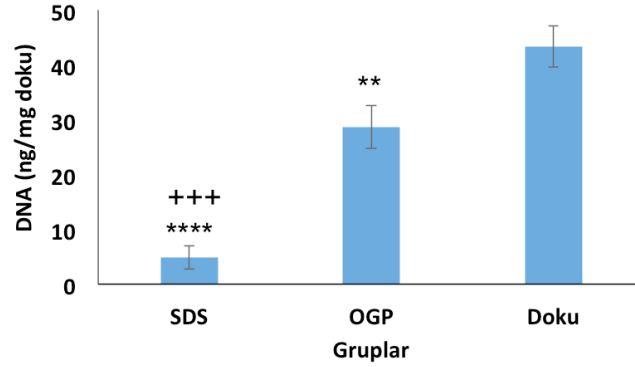


Şekil 4.36. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (a), OGP yöntemi (b) ve SDS yöntemi (c) uygulanmış kalp kesitlerine ait immüno floresan fotoğraflar: 20 X, Bar 100 µm.

4.5.3. DNA Analizi

Doğal doku ve hücresizleştirme amacıyla OGP ya da SDS yöntemi uygulanan doku kesitlerinin DNA analizi sonuçları Şekil 4.37'de gösterilmiştir. OGP yöntemi kullanıldığında hücresizleştirme işlemi uygulanmamış dokuya göre ~%33 oranında, SDS yöntemi kullanıldığında ise ~%89 oranında DNA'nın uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Oberwallner ve ark. (2013) insan miyokardiyumunda gerçekleştirdikleri çalışmada DNA'yı ~%98 oranında uzaklaştırdıklarını belirtmişlerdir. Hücresizleştirmenin uygulandığı doku kaynağının farklı olması (insan/sıçan), çalkalama sırasında kullanılan hızların makalede belirtilmemesi nedeniyle farklı hızlarda çalkalama yapılmış olma ihtimali, sonuçların farklı çıkmasına neden olmuş olabilir. Elde edilen sonuçlar immüno floresan boyama sonuçlarını destekler niteliktedir. Şuana kadar yapılan analizler değerlendirildiğinde OGP yönteminin hücresizleştirme işleminde başarılı olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle yapılacak olan GAG analizi ve histolojik boyama analizlerinde yalnızca doğal doku ve SDS yöntemi ile hücresizleştirilmiş doku kesitleri kullanılmıştır. Ferng ve ark. (2017) perfüzyon sistem ile bütün domuz kalbinde hücresizleştirme için çeşitli ajanlar kullanmışlar, yaptıkları

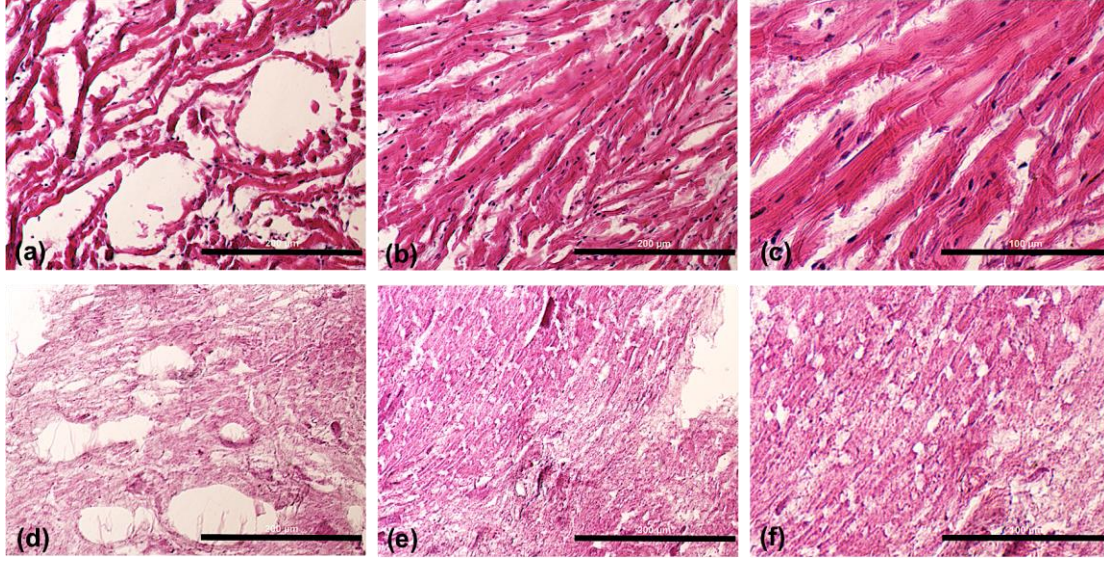
analizler sonucunda tez çalışmasına benzer şekilde OGP yönteminin hücresizleştirmede başarısız olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4.37. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve OGP yöntemi ya da SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait DNA analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=3$; kontrol grubu doğal doku ise ** $p<0.01$, ***** $p<0.0001$; kontrol grubu OGP ise +++ $p<0.001$.

4.5.4. Histolojik Boyama

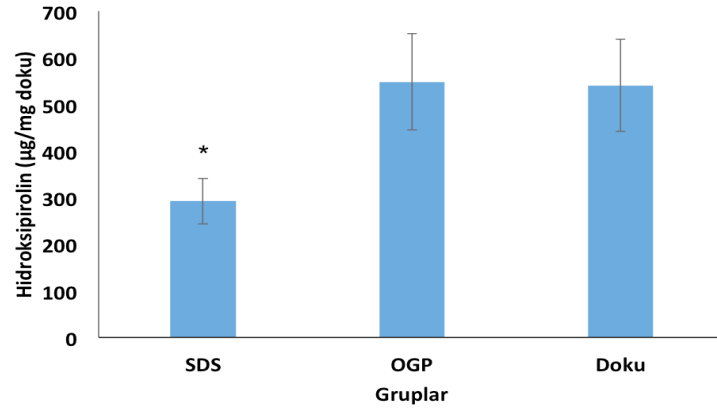
Hücresel içeriğin uzaklaştırılmasındaki başarıyı belirlemek için yapılan H&E boyama sonuçları (Şekil 4.38) yapılan diğer analizleri destekler niteliktedir. Hücresizleştirme işlemi uygulanmayan doğal kalp kesitinde çekirdeklerin hematoxilen ile koyu mavimor renkte, hücresel sitoplazmanın ise eozin ile koyu pembe renkte boyandığı gözlenmiştir. SDS uygulaması yapılan doku kesitinde ise çekirdeklerin uzaklaştırıldığı, belirli bölgelerde çekirdeklerin uzaklaşması ile açılan boşlukların olduğu belirlenmiştir. Hücresizleştirme sonrası dokudaki damar yapılarının (Şekil 4.38d) ve kollajen fiberler yönelimlerinin korunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.38 e, f). Lee ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada 10 μm kalınlığındaki sıçan kalp kesitlerini hücresizleştirdikleri çalışmada benzer H&E boyama görüntülerini elde etmişlerdir.



Şekil 4.38. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış doğal doku (a, b, c) ve SDS yöntemi uygulanmış (d, e, f) kalp kesitlerine ait H&E boyama görüntüleri: a, b, d, e) 20 X, bar 200 µm; c, f)40 X, bar 100 µm.

4.5.5. Kollajen Analizi

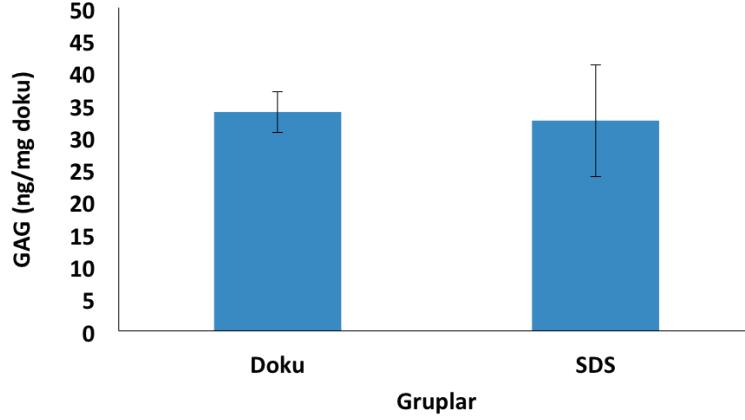
Hidroksipirolin miktarındaki değişim hücresizleştirme yöntemlerinin dokudaki kollajen içeriğine etkisini belirlemek için kullanılmaktadır (Hrebikova, Diaz ve Mokry, 2015). Yetişkin sıçan kalp matrisinde en fazla bulunan protein ~%38 oranı ile kollajen tip 1'dir ve yüksek fiber organizasyonu ile büyük fiber demetleri oluştururlar (Williams ve ark., 2014). Kollajenin yapıda korunmuş olması ECM'in yapısal bütünlüğü açısından önemlidir. Örneklere uygulanan hidroksipirolin analizi sonuçları Şekil 4.39'da verilmiştir. Tez çalışmasında OGP uygulamasının dokudaki kollajen miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı, SDS uygulamasının ise dokudaki kollajen içeriğini bir miktar düşürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.39. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve OGP yöntemi ya da SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait hidroksipirolin analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: $n=3$; kontrol grubu doğal doku ise * $p<0.05$.

4.5.6. Glikozaminoglikan Analizi

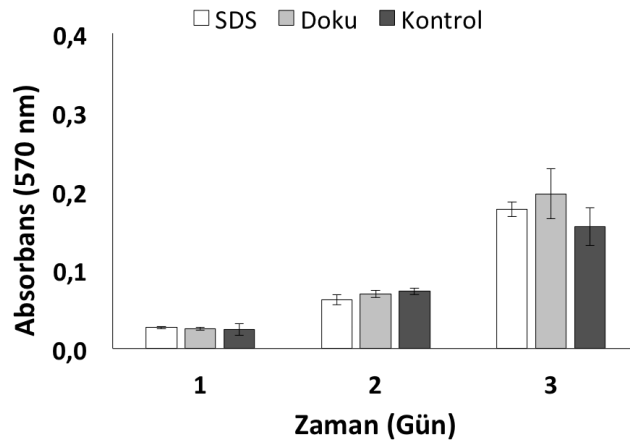
Glikozaminoglikanlar hücrenin, kollajen ve elastin fiberlerin içine gömüldüğü matrisin temel bileşenlerindendir, pek çok protein ile etkileşime girerek büyüme faktörlerini, kemokin ve sitokinleri proteolize karşı korur. Aynı zamanda VEGF, FGF ve HGF gibi sinyalizasyon yollarında da görev alır. Bu nedenle hücresizleştirilmiş dokuda GAG yapılarının korunması büyüme faktörleri ve biyolojik aktivitelerinin de korunmasını sağlamaktadır (Di Meglio ve ark., 2017). Referans makalelerde SDS (Oberwallner ve ark., 2014) ve OGP (Dong, Li, ve Mo, 2013) uygulamasının dokudaki GAG içeriğini azalttığı belirtilmiştir. Tez kapsamında yapılan GAG analizi sonucunda doğal doku ile SDS yöntemi kullanılarak hücresizleştirilen doku kesitleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ve Ott ve ark.'nın (2008) sıçan kalbinde gerçekleştirdiği hücresizleştirme çalışmasına yakın GAG değerleri elde edilmiştir. GAG yapılarının SDS uygulaması ile korunduğunu belirten farklı çalışmalar da mevcuttur (Mirsadraee ve ark., 2006; Rajabi-Zeleti ve ark., 2014; Di Meglio ve ark., 2017).



Şekil 4.40. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait GAG analizi sonuçları.

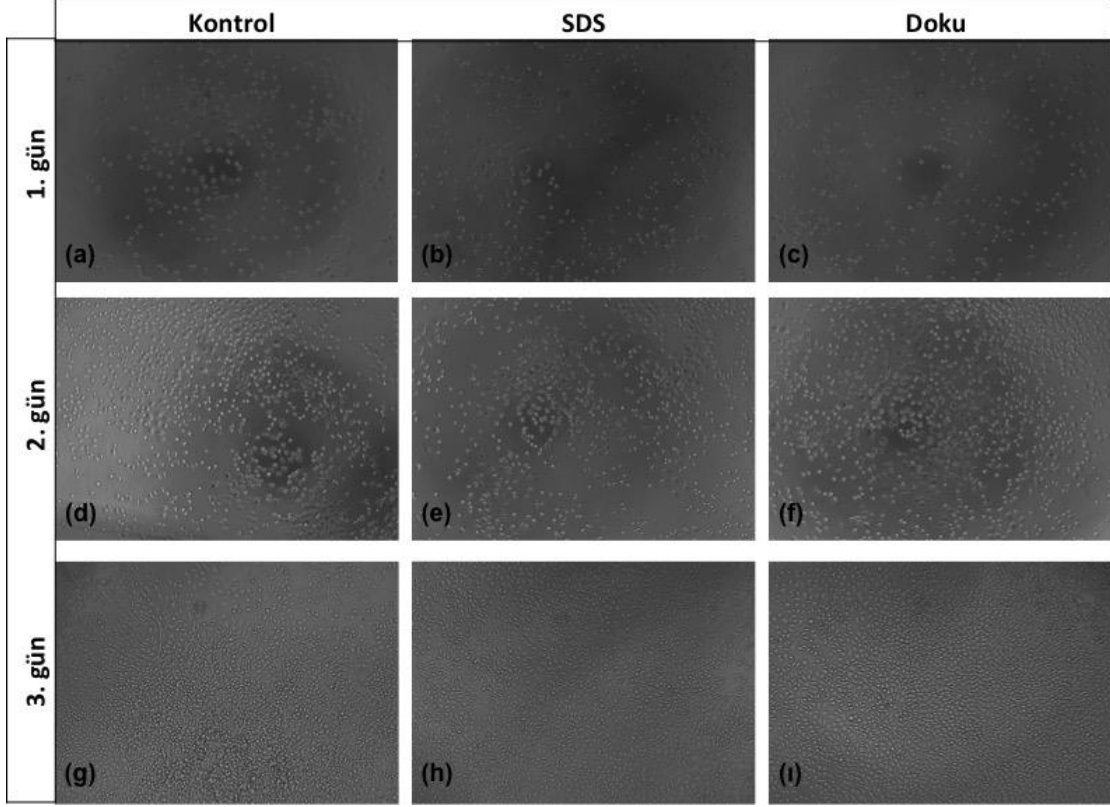
4.5.7. Sitotoksosite Testi

Hücresizleştirme sonrası dokuda bulunabilecek kimyasal kalıntılar hücrelere sitotoksik etki gösterebileceği gibi, hücresizleştirilmiş ECM'nin avantajlarını da etkisiz hale getirebilir (Dong, Li, ve Mo, 2013). Bu nedenle pek çok çalışmada farklı hücre türleri kullanılarak sitotoksosite testleri uygulanmaktadır (Xu ve ark., 2014; Sanchez ve ark., 2015; Jones ve ark., 2017). Tez kapsamında doku kesitlerinin hücrelere toksik etki gösterip göstermediğini belirlemek için L929 hücre hattı ile *in vitro* hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiş ve MTT analizi sonuçları Şekil 4.41'de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi hücreler ortamdaki hiçbir ekstrakttan olumsuz etkilenmemiş, hücre çoğalmasında ve mitokondriyal aktivitelerinde istatistiksel açıdan farklı herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.



Şekil 4.41. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait sitotoksosite çalışmasına ait MTT sonuçları.

In vitro kültür çalışması boyunca her gün hücrelerin optik mikroskop görüntüleri alınmış, fotoğraflar karşılaştırıldığında gruplar arasında hücre morfolojisi ve yoğunlukları açısından fark edilir bir değişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.42).



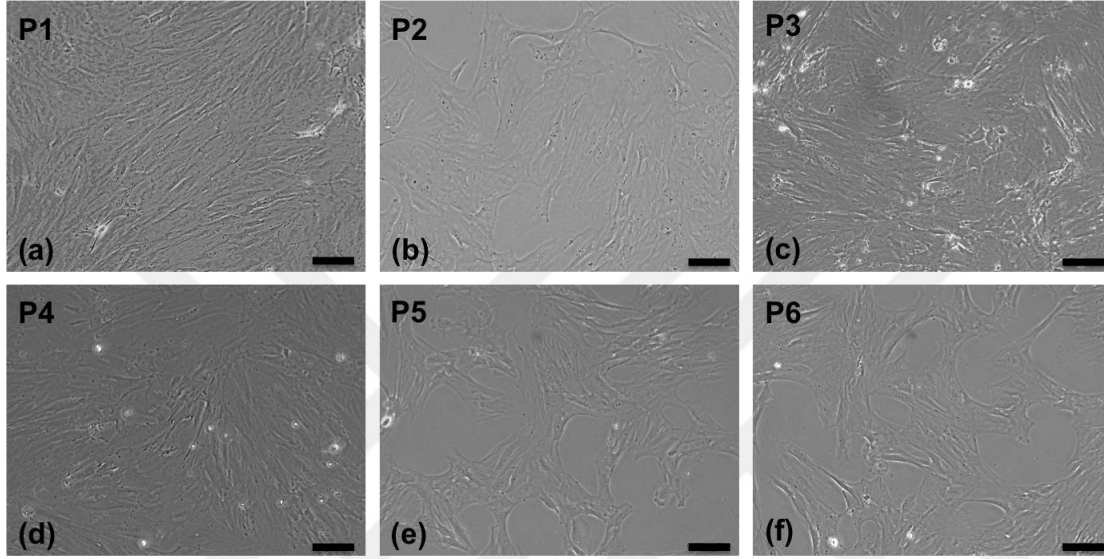
Şekil 4.42. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış (doğal doku) ve SDS yöntemi uygulanmış kalp kesitlerine ait sitotoksosite çalışmasında L929 hücrelerini gösteren optik mikroskop fotoğrafları: 10 X.

Sonuç olarak yapılan sitotoksosite analizi ile SDS yöntemi ile hücresizleştirilen ECM yapısında hücrelere toksik bir bileşen olmadığı, yeterli ve uygun yıkamalar ile kalıntıların başarılı şekilde uzaklaştırıldığı gösterilmiştir.

4.6. AKMKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu açısından sahip olması gereken ve Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen 3 temel özelliği bulunmaktadır: i) standart kültür koşullarında plastik yüzeylere tutunurlar, ii) spesifik yüzey belirteçlerini ifade ederler, iii) *in vitro* koşullarda osteoblast, adiposit ve kondroblast hücrelerine farklılaşabilirler (Dominici ve ark., 2006). Tez çalışması kapsamında izole edilen AKMKH'ler kültür kabına alındıktan bir kaç saat sonra yüzeye tutunmaya başlamış, böylece izolasyon sırasında

uzaklaştırılmayan eritrositler gibi diğer istenmeyen hücrelerden ayrılmışlardır. Kültürün 5. gününde taze ortam değişimi yapılarak ortamda bulunan az miktardaki adipositler ve eritrositler uzaklaştırılmıştır. İzole edilen hücrelere ait optik mikroskop fotoğrafları Şekil 4.43'te verilmiştir. Hücreler literatürde belirtildiği gibi tipik fibroblastik morfoloji göstermiş ve pasaj numarasının artmasına bağlı bir farklılık olmadığı, yoğunluğa bağlı sıkışma nedeniyle iğsi bir form aldıkları gözlenmiştir (Niyaz ve ark., 2012).



Şekil 4.43. İzole edilen farklı pasaj numarasına (P1-P6) sahip AKMKH'lere ait optik mikroskop fotoğrafları: 20 X, bar 100 μ m.

Hücrelerin spesifik karakterizasyonları için 5. pasajda osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaları gerçekleştirilmiştir. Osteojenik farklılaşma için dekzametazon, askorbik asit ve β -gliserol fosfat içeren farklılaşma ortamı kullanılmış, kültürün 28. gününde yapılan von Kossa boyamaları ile hücrelerin ürettiği kalsiyum fosfat mineralleri koyu kahverengi/siyah renge boyanmıştır. Adipojenik farklılaşma IBMX, deksametazon, insulin ve indometazin içeren ortam ile gerçekleştirilmiş ve farklılaşmanın belirteci olan yağ damlacıkları kültürün 20. gününde Oil Red O boyamaları ile kırmızı renkte boyanarak gösterilmiştir. Kondrojenik farklılaşma için ise hücreler askorbik asit, deksametazon ve TGF- β 3 bulunduran farklılaşma ortamında kültüre edilmiş, kültürün 28. gününde Safranin O/ Fast Green boyamaları ile farklılaşan hücrelerin ürettikleri GAG yapıları kırmızı renge boyanmıştır. Böylece AKMKH'lerin karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

4.7. Hücresizleştirilmiş ECM İskele Üzerinde Ko-Kültür ve Kardiyomiyojenik Farklılaşma Çalışmaları ile Miyokardiyal Yama Üretimi

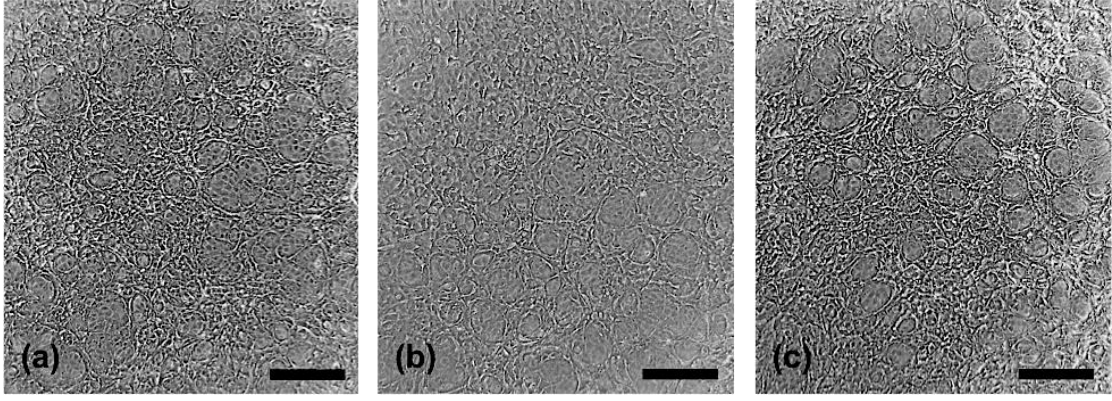
Hücresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde AKMKH ve endotel hücrelerin birlikte ekilmesi ile 3B doğrudan ko-kültür gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu ko-kültür etkileşiminin sağladığı avantajların yanında 3B iskele yapısında ko-kültür etkileşimi doğal dokuyu taklit etmektedir. Böylece parakrin sinyalizasyon yanında hücre-ECM adezyonu ve farklı hücre türleri arasında doğrudan adezyon ile 3 farklı etkileşim gerçekleşmiş olmaktadır (Paschos ve ark., 2015). Hücre-ECM etkileşiminin matris kaynaklı mekanik kuvvetler ile hücre içi sitoskeletal gerilimi yönlendirdiği ve kök hücre farklılaşmasını RhoA-ROCK yolağı ile belirlediği gösterilmiştir (Cohen ve Chen, 2008). Lee ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada kalp ECM yapısının kardiyomiyositlerin canlılık ve çoğalmasını desteklediği ve kardiyak belirteçlerinin ifadesinde artış sağladığı gösterilmiştir. Wang ve ark. (2010) ise benzer şekilde domuz kalp kesitini hücresizleştirip 5-Aza uygulaması ile farklılaştırdıkları ve farklılaştırmadıkları kemik iliği kökenli MKH'lerini ECM iskele üzerinde kültüre ettiklerinde hücrelerin kardiyomiyojenik fenotiplerinin desteklendiğini, ayrıca damar kanallarının yakınlara yerleşen hücrelerin de anjiyogenik potansiyellerinin olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmasında endotel hücre ekimi AKMKH ekiminden 1 gün önce gerçekleştirilmiştir. Literatürde benzer şekilde endotel hücreleri ile önceden damarlandırılan iskele yapısında kardiyomiyositlerin daha iyi organize oldukları belirtilmiştir (Narmonova ve ark., 2004).

Ko-kültür ekiminden sonra AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için 5-Azasitidin (5-Aza) kullanılmıştır. 5-Aza, sitozin nükleozidinin kimyasal analogudur ve DNA metilasyonunu inhibe eder (Shen ve ark., 2015). DNA yapısındaki sitozinin C5 atomundaki metilasyon gen ekspresyonunu düzenleyen, kalıtsal ve tersine çevrilebilir bir epigenetik mekanizmadır. 5-Aza, metiltransferaz ile kovalent bağ oluşturarak tersinir bir inhibitör görevi görür, böylece hücre bölünmesinden sonra DNA metilasyonu önlenir ve daha önce baskılanan kardiyak farklılaşmada etkin Gata4, Nkx2.5 gibi genlerin tekrar aktive olması sağlanabilir. Ancak 5-Aza kullanımının gen aktivasyonu nedeniyle onkogeneze ya da istenmeyen farklılaşmalara neden olabileceği belirtilmiştir (Takeda ve ark., 2004; Balana ve ark., 2006). 5-Aza'nın kardiyomiyojenik farklılaşmayı hangi mekanizma ile gerçekleştirdiğini belirlemek için yapılan çalışmalarda insan göbek kordonu MKH'lerinin ERK (ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz) (Qian ve ark.,

2012) ve Notch sinyalizasyon yolağı (Ruan ve ark., 2010) üzerinden aktive olduğu gösterilmiştir.

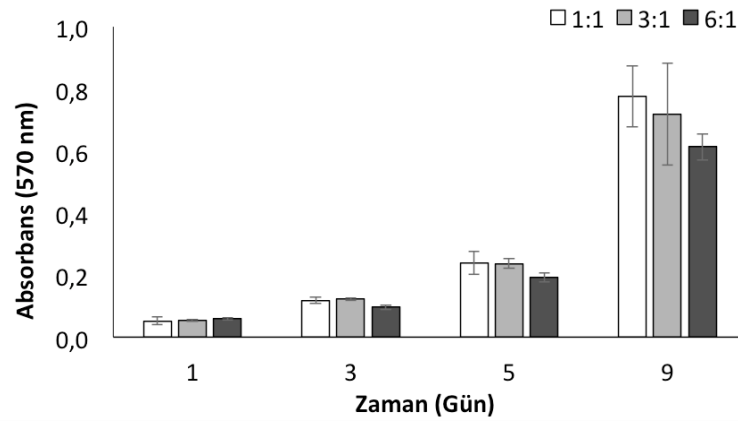
5-Aza ilk kez Wakitani ve ark tarafından kemik iliğı MKH'lerinin kardiyomiyojenik farklılaşmasında kullanılmış (Wakitani ve ark., 1995) ve sonrasında da pek çok çalışmada kimyasal indükleyici ajan olarak kullanılmaya devam edilmiştir. 5-Aza'nın kardiyomiyojenik farklılaşma üzerindeki etkisinin kök hücre türü ve kaynağına göre değişiklik gösterdiği belirtilmektedir (Balana ve ark., 2006). Kemik iliğı kökenli MKH (Cao ve ark., 2004, Deng, Li ve Zhang, 2009; Zhang ve ark., 2009; Gao ve ark., 2014; Gonzalez-Garza ve ark., 2014), AKMKH (Rangappa ve ark., 2003; Strem ve ark., 2005; Zhu ve ark., 2008; Choi ve ark., 2010; Carvalho ve ark., 2013), dermal MKH (Potdar ve Prasannan, 2013), göbek kordonu (Qian ve ark., 2012; Nartprayut ve ark., 2013) ve plesenta kaynaklı MKH (Nartprayut ve ark., 2013) ve endotelial öncül hücrelerinde (Lopez-Ruiz ve ark., 2014) farklılaşmayı desteklediğini belirten çalışmaların yanında, kemik iliğı kökenli MKH (Liu ve ark., 2003), AKMKH (Lee ve ark., 2009; Safwani ve ark., 2012) farklılaşmasında herhangi bir indükleyici etkisi olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Ayrıca ko-kültür ortamında damarlanmayı desteklemesi amacıyla kullanılan VEGF'in embriyonik kök hücrelerin ve AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında önemli rol aldığı gösterilmiştir (Song ve ark., 2007).

AKMKH ve endotel hücrelerin ko-kültüründe uygun ortam bileşiminin belirlenmesi için farklı oranlarda (1:1, 3:1 ve 6:1) karıştırılan ortamlarda kültüre edilen hücreler optik mikroskop altında incelenmiş ve 1., 3., 5. ve 9. günlerde metabolik aktiviteleri MTT analizi ile belirlenmiştir. Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde gruplar arasında hücre morfolojileri açısından önemli bir fark görülmemiş, tüm gruplarda endotel hücrelerin damar ağı benzeri yapılar meydana getirdiğı gözlenmiştir (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. a)1:1, b)3:1 ve c)6:1 oranda karıştırılan ortamda kültüre edilen AKMKH ve endotel hücre ko-kültür çalışmasına ait 9. gün optik mikroskop fotoğrafları: 10 X, bar 200 μ m.

MTT analizi sonuçları incelendiğinde ise ortalama olarak en yüksek metabolik aktivite 1:1 grubunda gözlenmesine rağmen istatistiksel açıdan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.45). Yapılan incelemeler değerlendirildiğinde ECM iskele üzerinde gerçekleştirilecek ko-kültür çalışmasına 1:1 oranda karıştırılarak elde edilen ortamda devam edilmesine karar verilmiştir.

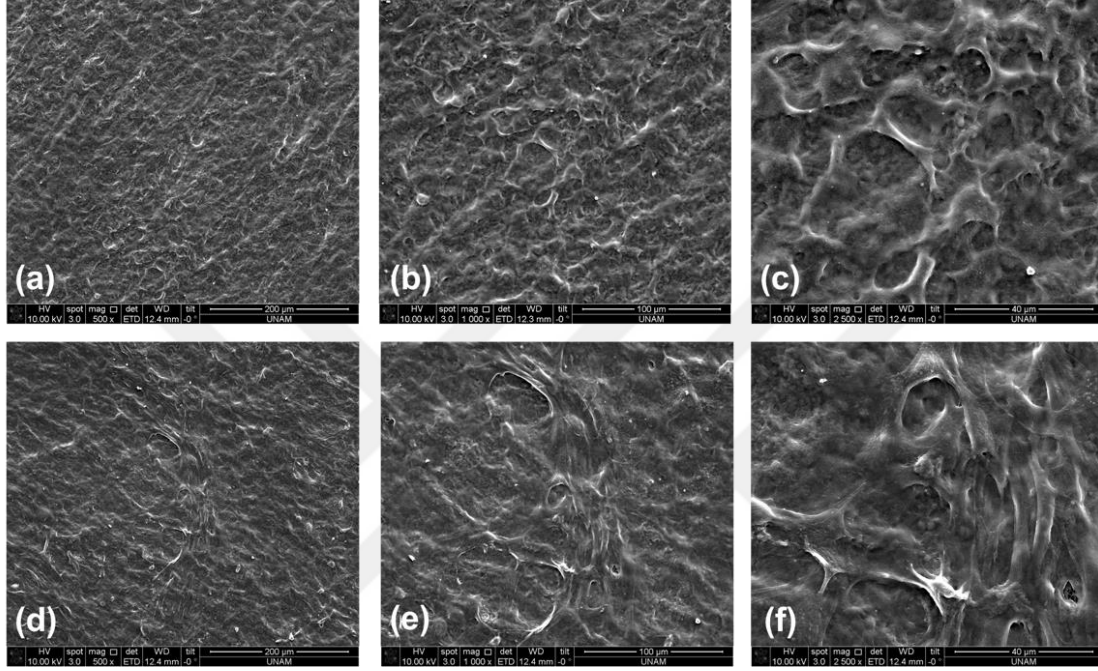


Şekil 4.45. 1:1, 3:1 ve 6:1 oranda karıştırılan ortamda kültüre edilen AKMKH ve endotel hücre ko-kültür çalışmasına ait MTT analizi sonuçları.

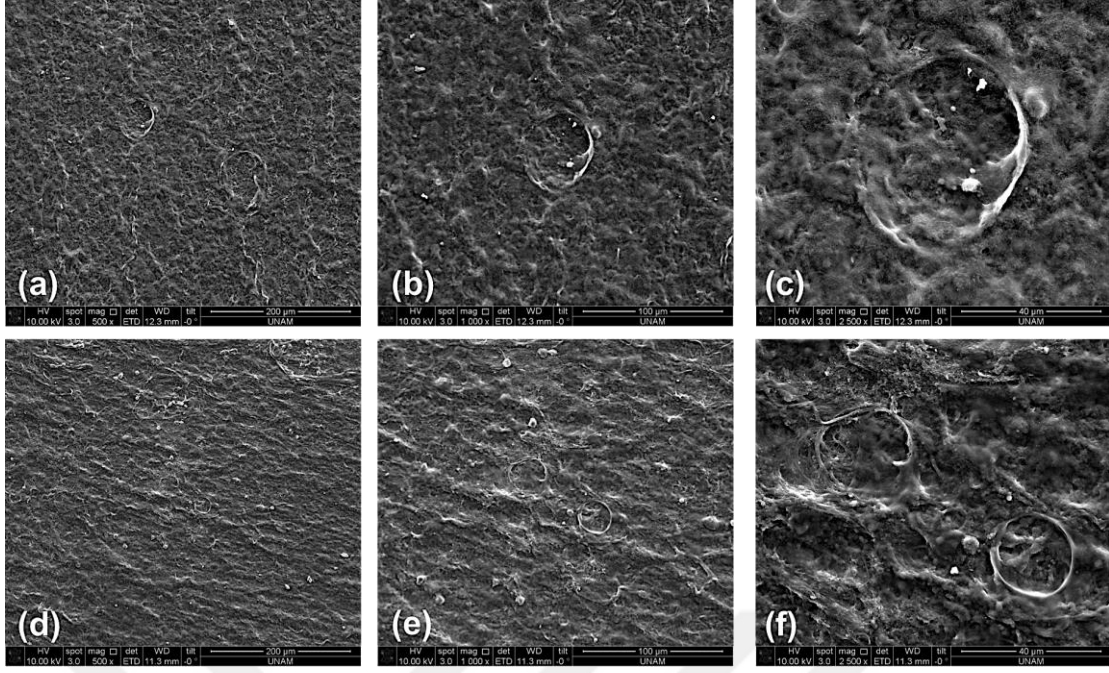
4.7.1. SEM Analizi

Miyokardiyal yama kültürünün 4. ve 11. günlerinde hücrelerin ECM iskele üzerindeki morfolojilerinin incelenmesi için SEM görüntüleri alınmıştır. Dördüncü gün fotoğrafları incelendiğinde AKMKH ve endotel hücrelerinin yüzeyde tamamen yayıldıkları ve birbirleri ile etkileşim halinde oldukları gözlenmiştir. Yüksek büyütme fotoğraflarında ise damar benzeri lümen yapılarını oluşturmaya başladıkları belirlenmiştir. On birinci

gün fotoğraflarında ise hücrelerin ilk yerleşimlerinin aksine daha düzenli halde oldukları ve lümen benzeri yapıların daha belirgin ve kararlı olduğu gözlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde hücresizleştirilmiş domuz kalp ventrikül kesiti üzerinde kültüre edilen kardiyomiyosit hücrelerinin kültürün 2. ve 15. gün SEM fotoğraflarında benzer görüntüler elde edilmiştir (Eitan ve ark., 2010). Morfolojik açıdan farklılaşma ve kontrol grubu arasında önemli bir farklılık belirlenmemiştir.



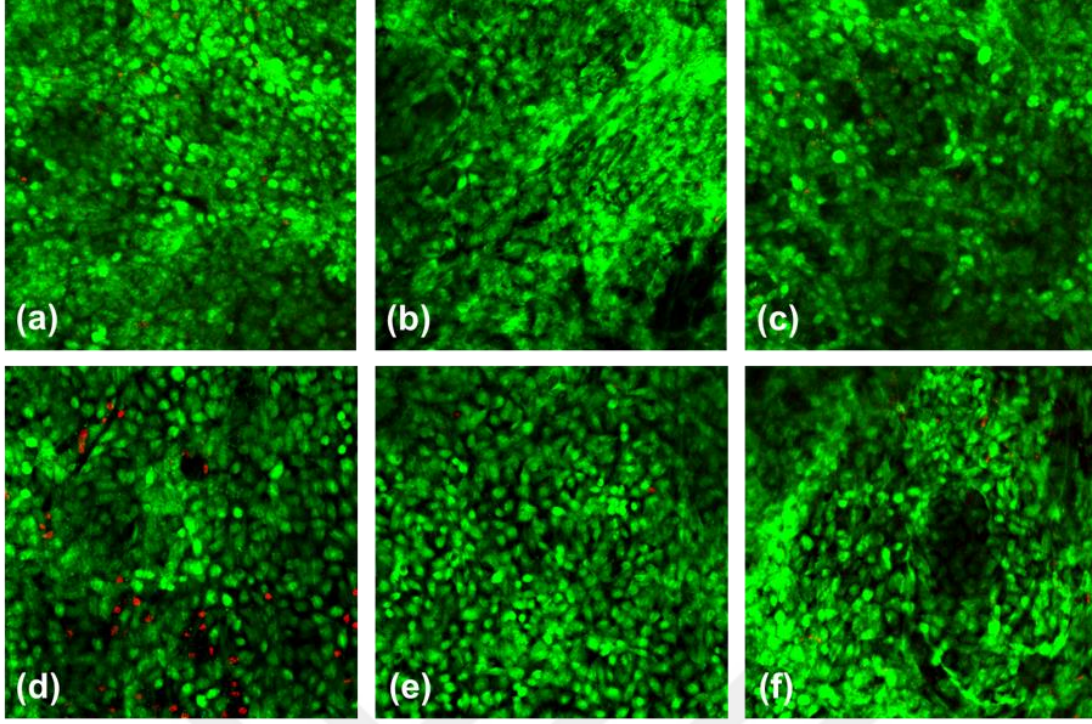
Şekil 4.46. Miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e) 1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.



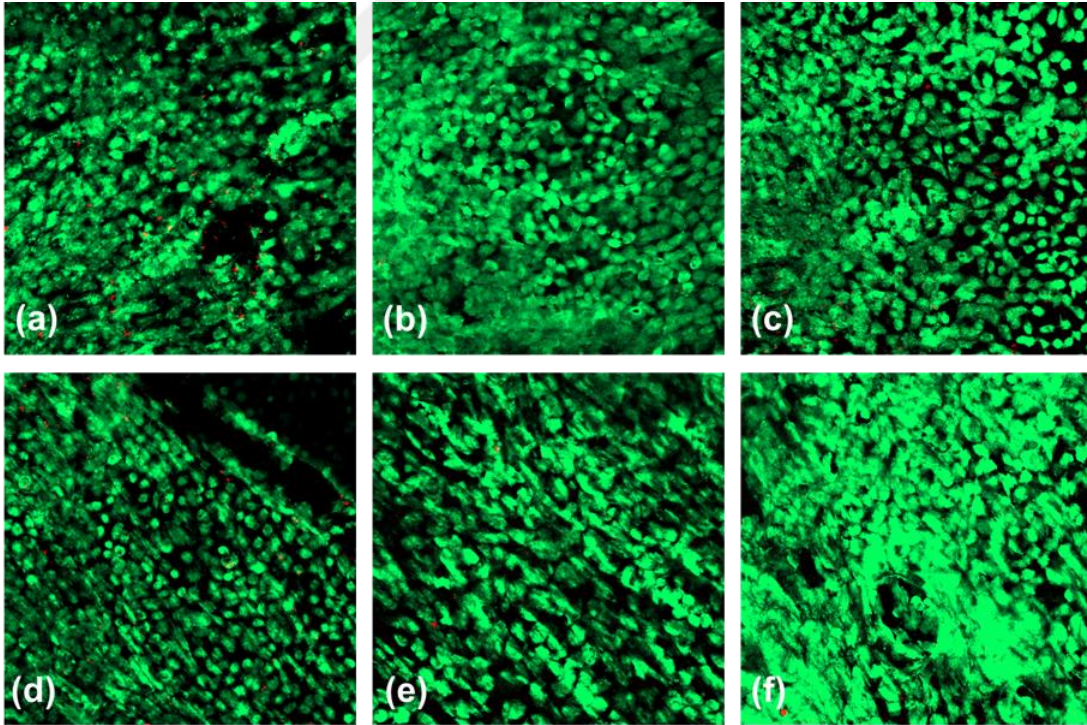
Şekil 4.47. Miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e) 1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.

4.7.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Ko-kültür hücre ekiminden sonra kültürün 4. ve 11. günlerinde hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için canlı/ölü hücre boyama analizi gerçekleştirilmiş ve iskelenin farklı bölgelerinden konfokal mikroskop görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.48 ve 4.49). Fotoğraflar incelendiğinde kültür süresince hücrelerin canlılıklarını yüksek oranda devam ettirdikleri gözlenmiştir. Dördüncü günde 5-Aza uygulanan farklılaşma grubundaki bazı bölgelerde kontrol grubuna göre ölü hücrelerin (kırmızı renkli) bir miktar daha fazla olduğu belirlenmiştir. Literatürde 5-Aza'nın konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır; 1 µM konsantrasyonda kullanıldığında insan AKMKH'ler üzerinde apoptotik gen ekspresyonunu azaltarak canlılığı olumlu etkilediği (Kornicka ve ark., 2017), 10 µM üzerindeki konsantrasyonlarda ise insan kemik iliği kökenli MKH'lerinde canlılığı olumsuz etkilediği (Deng, Li ve Zhang, 2009) gösterilmiştir. Kültürün 11. gününde alınan fotoğraflar incelendiğinde ise hücrelerin maruz kaldıkları toksik etkiyi tolere ettikleri ve canlılık açısından her iki grup arasında önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca fotoğraflarda SEM görüntülerini destekler nitelikte her iki grupta lümen benzeri yapıların varlığı gözlenmiştir.



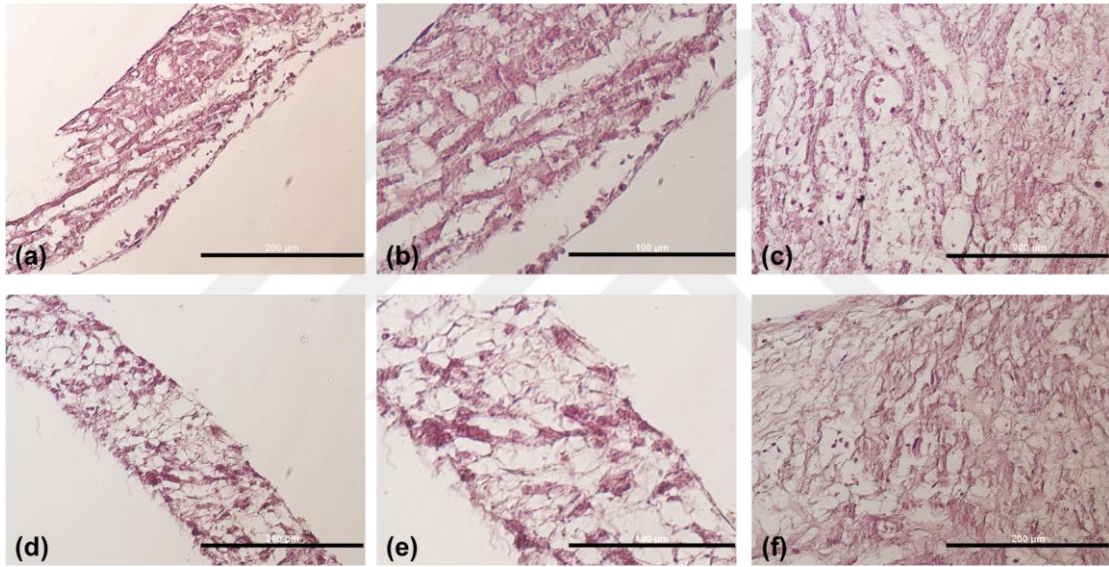
Şekil 4.48. Miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.



Şekil 4.49. Miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.

4.7.3. Histolojik Boyama

Ko-kültür hücre ekimi gerçekleştirilen hücreleştirilmiş ECM iskelerde hücrelerin dağılımını belirlemek için yapılan H&E boyama fotoğrafları Şekil 4.50’de verilmiştir. ECM yapısı açık pembe renkli boyanırken hücrelerin olduğu bölgeler daha koyu renkte boyanmıştır. Dikey kesitlerde mikrotom ile kesit alma sırasında parçalanmış bazı bölümlerin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.50a). Dikey kesit fotoğrafları incelendiğinde hücrelerin birbiri ile bağlantılı gözeneklere sahip ECM iskele içerisinde iç bölgelere doğru göç ettikleri, yatay kesit fotoğrafları incelendiğinde ise hücre dağılımının homojen gerçekleştirildiği hücrelerin iskele üzerinde belirli bir bölgede toplanmadığı, eşit şekilde dağıldığı gözlenmiştir.

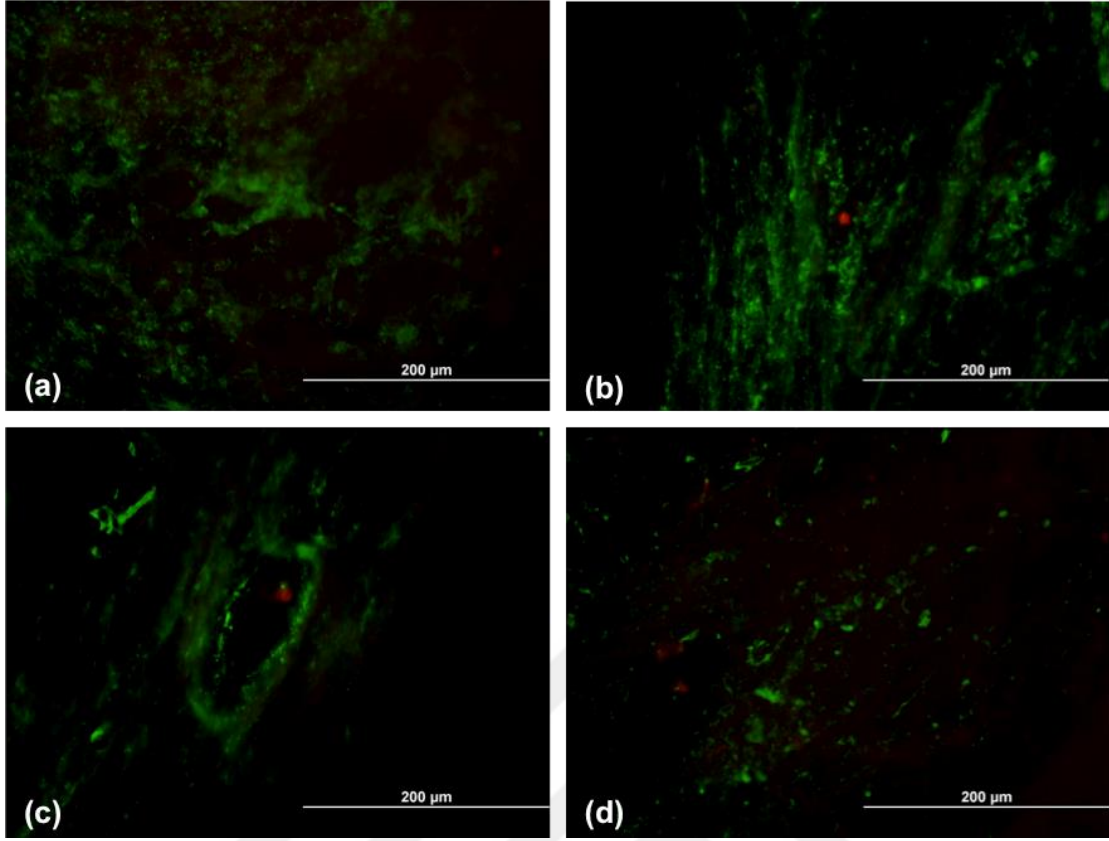


Şekil 4.50. Miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait dikey (a, b, d, e) ve yatay (c, f) kesit H&E boyama fotoğrafları: a, d) 20 X, bar 200 µm; b ve e) 40 X, bar 100 µm; c ve f) 20 X, bar 200 µm.

4.7.4. İmmüno Floresan Boyama

Kültürdeki farklılaşan AKMKH’lerde eksprese edilen TNT ve endotel hücrelerdeki spesifik vWF proteinlerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen immüno floresan boyama fotoğrafları Şekil 4.51’de gösterilmiştir. Ko-kültür durumunda hücreleri ayrı ayrı izole etmek ve incelemek kolay olmamaktadır ve farklılaşmış hedef hücrenin gerçekten farklılaşan kök hücre kaynaklı mı, yoksa birlikte kültüre edildiği diğer hücre ile füzyona uğramasıyla mı meydana geldiğini belirlemek gerekmektedir. Bu amaçla genellikle kök hücrelerin kültür öncesinde işaretlenmesi gerekir. Böylece işaretlenen hücre farklılaşma

belirteçleri yönünden de pozitif boyanırsa farklılaşmanın gerçekleştiği kanıtlanmış olmaktadır (Takeda ve ark., 2004). Tez kapsamında AKMKH'ler kültür öncesi 5-etinil-2'-deoksiüridin (EdU) ile işaretlenmiştir. Hücrelerin işaretlenmesi için nükleozit analogu olan 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) antikorumun kullanılması standart bir metot olarak görülmektedir. Ancak BrdU molekülüne bağlanacak büyük bir molekül olan anti-BrdU antikorumun çift sarmal DNA yapısına girmesi kolay olmamaktadır, bu nedenle DNA'nın sert kimyasal ya da enzimatik yöntemler uygulanarak tek sarmal haline getirilmesi gerekmektedir. Uygulanan bu yöntemler ise pek çok hücreyel antikör epitopa zarar vermektedir. Geliştirilen 'click reaksiyonu' ile BrdU yerine EdU kullanıldığında daha küçük reaksiyon komponentleri ile DNA çift sarmal yapısının bozulmasına gerek kalmadan EdU DNA'ya bağlanabilmektedir. EdU, timin nükleozidinin kimyasal analogudur ve aktif DNA sentezi sırasında DNA'ya bağlanır. Bakır katalizörü varlığında alkin (EdU) ve azid (Alexa Fluor) arasında meydana gelen kovalent reaksiyon ile işaretleme gerçekleştirilir (Buck ve ark., 2008; Robertson ve ark., 2010; Zeng ve ark., 2016). Tez kapsamında EdU ile işaretlenen hücre çekirdekleri kırmızı ile boyanmıştır. Ancak farklılaşma belirteci olarak kullanılan Anti-TNT boyaması (mavi renkte olması beklenmekteydi) gözlenememiştir. Endotel hücreler ise yeşil renkte boyanmış ve SEM fotoğraflarını destekler nitelikte damar lümeni benzer yapılar oluşturduğu gözlenmiştir. Wang ve ark. hücresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde kültüre edilen kemik iliği kök hücrelerinin anjiyogenik potansiyellerini Anti-vWF antikoru boyaması ile göstermiş, yoğun olarak damar lümeni etrafında yerleşen hücrelerin varlıkları tez çalışmasındaki fotoğraflara benzer şekilde gösterilmiştir (Wang ve ark., 2010). Neofytou ve ark. da çalışmalarında 2B ve 3B yüzeylerde AKMKH ve endotel hücreleri ko-kültür şeklinde ve ayrı ayrı kültüre etmişler, ko-kültürde AKMKH'ler tarafından salgılanan VEGF üretiminin daha fazla olduğunu ve 3B kültürde endotel hücrelerin benzer şekilde damar yapıları oluşturduğunu göstermişlerdir (Neofytou ve ark., 2011).



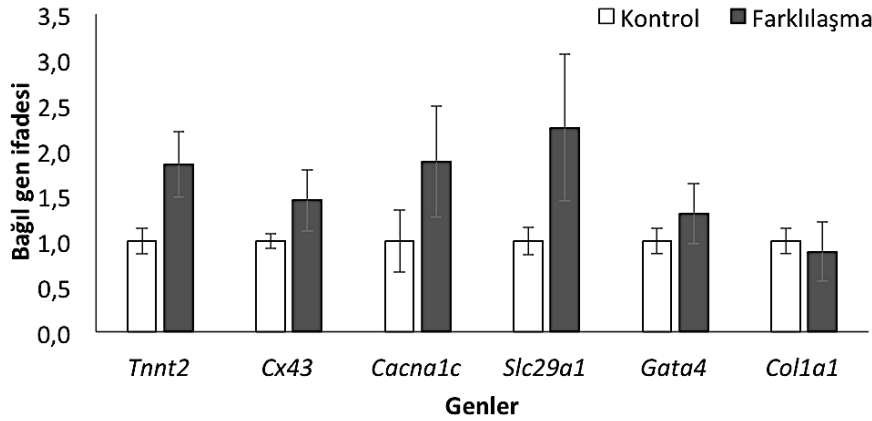
Şekil 4.51. Miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b) ve farklılaşma grubuna (c, d) ait immüno Floresan boyama fotoğrafları: 20 X, bar 200 µm.

4.7.5. RT-PCR

Kültürün 15. gününde kardiyomiyojenik farklılaşmanın belirlenmesi için RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kardiyomiyosite spesifik kasılmada görevli kardiyak troponin T (*Tnnt2*), aralık bağlantı (gap junction) proteini olan konneksin 43 (*Cx43*), kardiyak spesifik L-tipi voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalı (*Cacna1c*), dengeleyici nükelosit taşıyıcı-1 (*Slc29a1*) ve kardiyak transkripsiyonel düzenleyici *Gata4* genlerinin ekspresyonları ve hücrelerin kollajen tip 1 (*Col1a1*) ekspresyonları incelenmiştir. *Gata4* geni kalp gelişiminde yapısal ve düzenleyici genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörüdür (Ruan ve ark., 2010) ve erken kardiyak gelişim sürecinde önemli rol oynar, erken farklılaşma belirteci olarak incelenmektedir. *Cx43* geni ise senkronize kasılmada önemli rol oynayan aralık bağlantı bölgelerinin oluşturan CX43 proteininin ekspresyonundan sorumludur ve farklılaşan hücrelerde *Cx43* gen ifadesi interkalar disk yapısının varlığını belirtir (Shen ve ark., 2015).

Hücrelerin farklılaşmasında doğal kalp ECM nişinin de uyarıcı etkisi olduğu

bilinmektedir, ancak RT-PCR sonuçları 5-Aza'nın farklılaşma üzerindeki etkisini belirtecek şekilde kontrol grubunun katları olarak verilmiştir. Analiz sonucu incelendiğinde farklılaşma grubunda *Col1a1* geni dışında tüm genlerde ortalama olarak bir artış görülmesine rağmen standart sapmaların yüksek olması nedeni ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenememiştir. Safwani ve ark. 5. pasajda kullandıkları insan AKMKH'lerde 5-Aza uygulaması sonrasında *Gata4* gen ifadesinde yaklaşık 2 kat artış gözlemişler, *Cx43* gen ekspresyonunda bir artış belirlememişler, her iki gende de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını, *Tnnt2* gen ekspresyonunda ise anlamlı bir düşüş olduğunu belirlemişlerdir (Safwani ve ark., 2012). İnsan kaynaklı AKMKH kullanılan bir çalışmada yaşlanmaya bağlı olarak DNA metilasyonunda artış olduğu, dolayısıyla pluripotensi gen ekspresyonlarının genç bireylere göre düşük olduğu, 5-Aza uygulamasıyla pluripotensi gen ifadelerinin artırıldığı belirtilmiştir (Guo ve ark., 2017). Tez çalışmasında kullanılan kök hücrelerin izole edildiği sıçanların çok genç seçilmemiş olmasının AKMKH'ler üzerinde 5-Aza etkinliğinin düşük olmasına neden olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.52. Miyokardiyal yama kültüründe kontrol ve farklılaşma grubuna ait bağıl gen ifadelerini gösteren RT-PCR analiz grafiği, n=3.

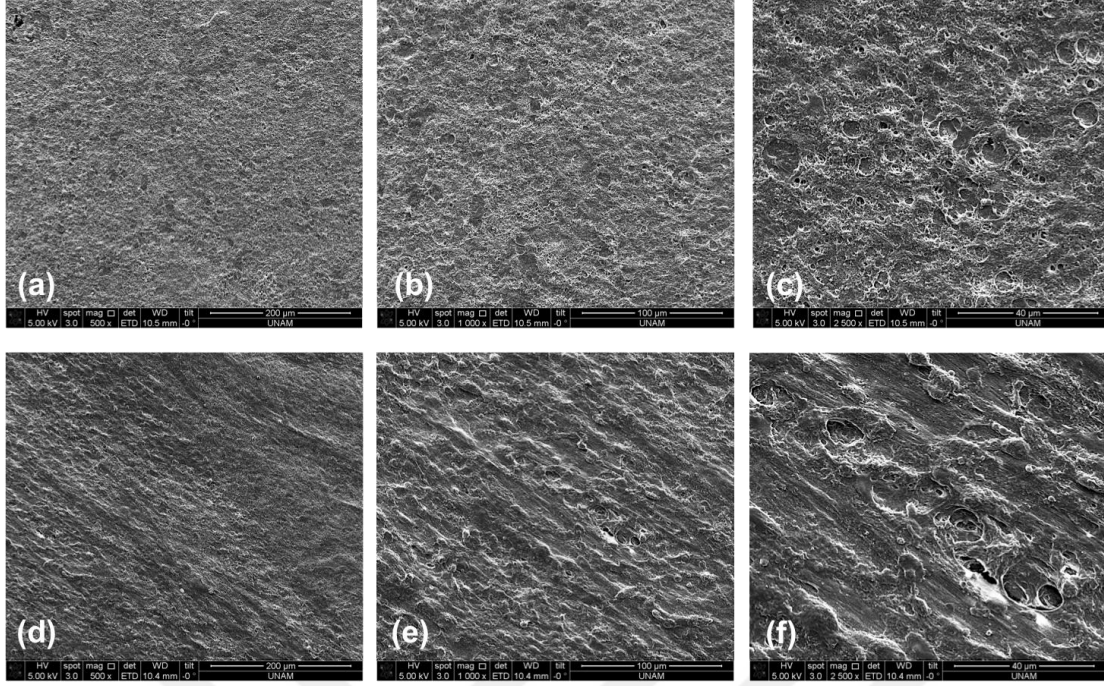
4.8. Kardiyovasküler Hücre Tabakaları ile Desteklenmiş Miyokardiyal Yama Üretimi

Oluşturulan kalp yamalarının klinikte etkin şekilde kullanılabilmesi ve olumlu sonuçlar alınabilmesi için kalın dokuların üretilmesi gerekmektedir. Yeniden hücrelendirilmiş ECM iskele ile kardiyovasküler hücre tabakalarının birleştirilmesi sonucu elde edilen kalp yamasının kalınlığının artırılması sağlanmıştır. Literatürde yer alan az sayıdaki çalışmada da benzer yaklaşımlar uygulanmıştır (Chen ve ark., 2008b; Hata ve ark., 2010).

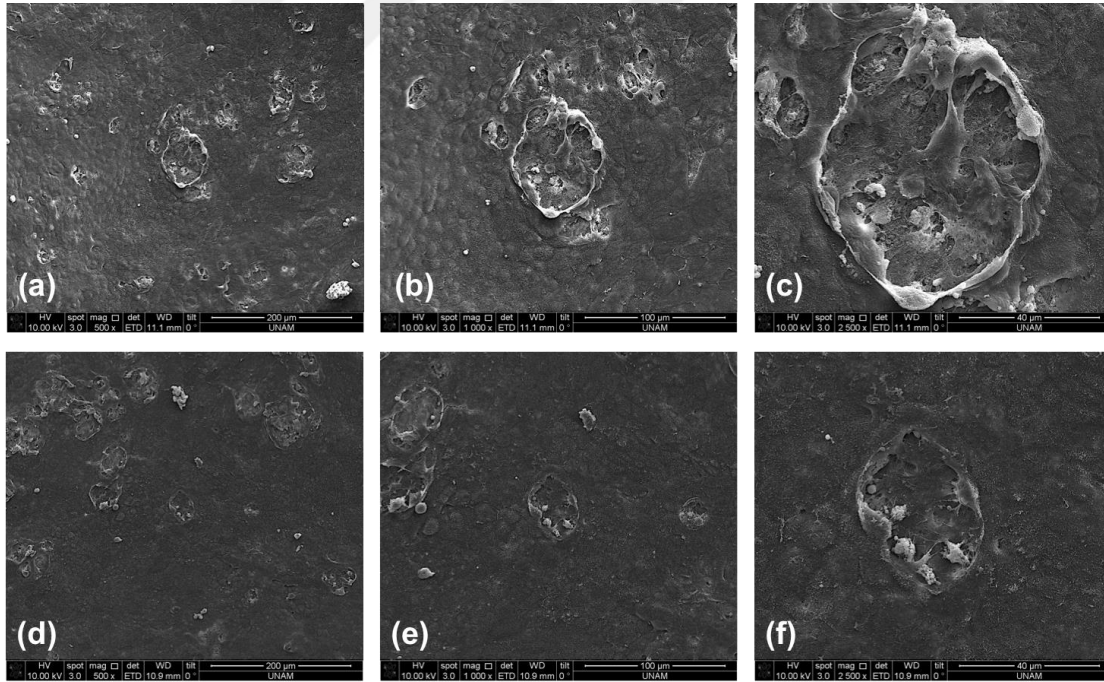
Kardiyak yamanın kardiyovasküler hücre tabakaları ile desteklenmesi doku kalınlığını arttırmanın yanında hücresiz ECM üzerine ekilen AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılmasında da uyarıcı etki göstermektedir. Hücrelerin salgıladıkları çözünür faktörler ile gerçekleşen parakrin sinyalizasyonun, ko-kültürdeki farklılaşmış hücreler ile kök hücreler arasındaki etkileşim sayesinde farklılaşmayı uyardığı belirtilmiştir (Paschos ve ark., 2015). Ayrıca MKH'lerin transplante edildiği doku ile bütünleşmesi de rejenerasyon açısından çok önemlidir. Preda ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada FGF-2 (bFGF) uygulamasının kemik iliği kökenli MKH'lerde hücreler arası iletişimi sağlayan bağlantı proteini konneksin 43 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. MKH'ler, H9C2 kardiyomiyoblast hücre hattı ile ko-kültür yapıldığında hücreler arasında bağlantı sağlandığı belirtilmiştir. Bu sayede alıcı dokuya implante edildiklerinde kolaylıkla bütünleşme sağlanabileceği düşünülmüştür. Tez çalışmasında ko-kültür ortamında endotel hücreleri desteklemesi amacıyla kullanılan FGF-2'nin AKMKH'ler üzerinde de benzer etki gösterebileceği düşünülmüştür.

4.8.1. SEM Analizi

Kardiyovasküler hücre tabakası ile birleştirildikten sonra elde edilen kalp yaması kültürünün 4. ve 11. gününe ait SEM fotoğrafları Şekil 4.53 ve Şekil 4.54'te verilmiştir. Dördüncü gün fotoğrafları incelendiğinde hücrelendirilmiş ECM üzerindeki hücre tabakasının alttaki yapı ile bütünleştiği, endotel hücrelerin damar lümeni benzeri yapılar oluşturduğu ve bu yapıların muhtemelen hücresizleştirilen dokudaki korunmuş damar bölgeleri ile birleşerek ECM içerisine doğru ilerlediği (Şekil 4.53 c ve f) gözlenmiştir. On birinci gün fotoğraflarında ise kültürün ilerleyen günlerinde çoğalan hücreler ile yüzeyin tamamen kaplandığı ve endotel hücrelerin oluşturdukları damar yapılarının daha büyük boyutlarda olduğu görülmüştür. Özellikle yüksek büyütmede alınan fotoğraflarda (Şekil 4.54 c ve f) endotel hücreler arasındaki etkileşim ve oluşturdukları lümen yapıları daha detaylı şekilde gözlenmiştir. Her iki günde de kontrol ve farklılaşma grupları arasında morfolojik açıdan önemli bir farklılık belirlenmemiştir.



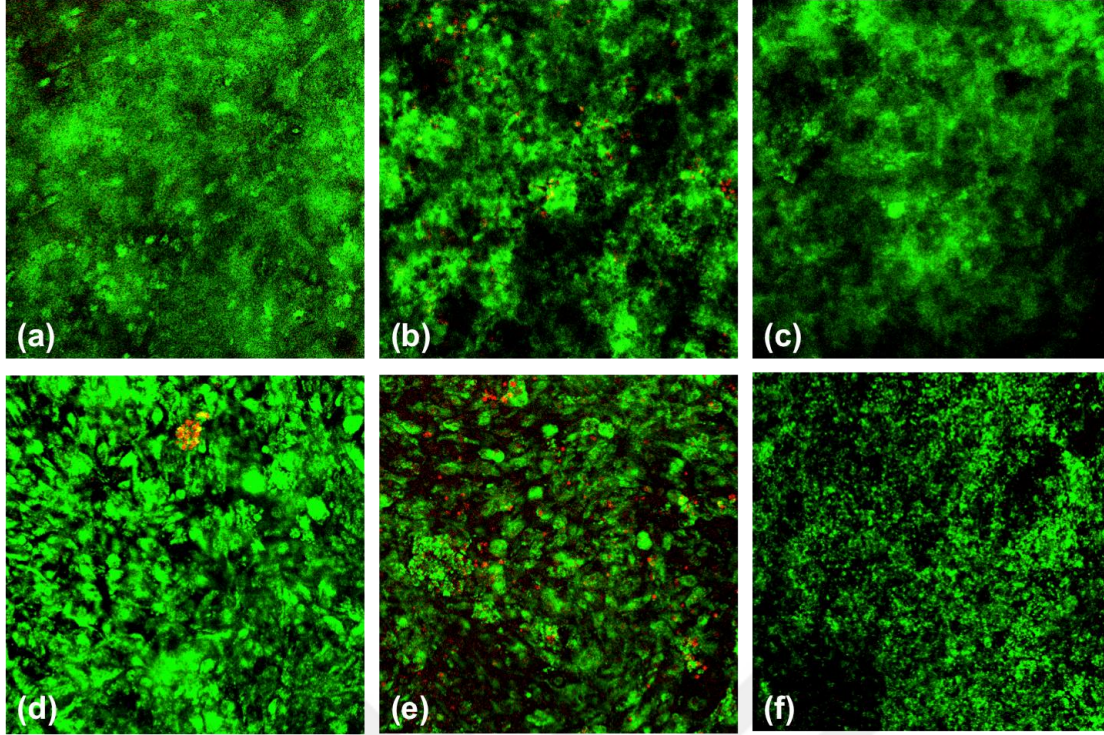
Şekil 4.53. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e) 1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.



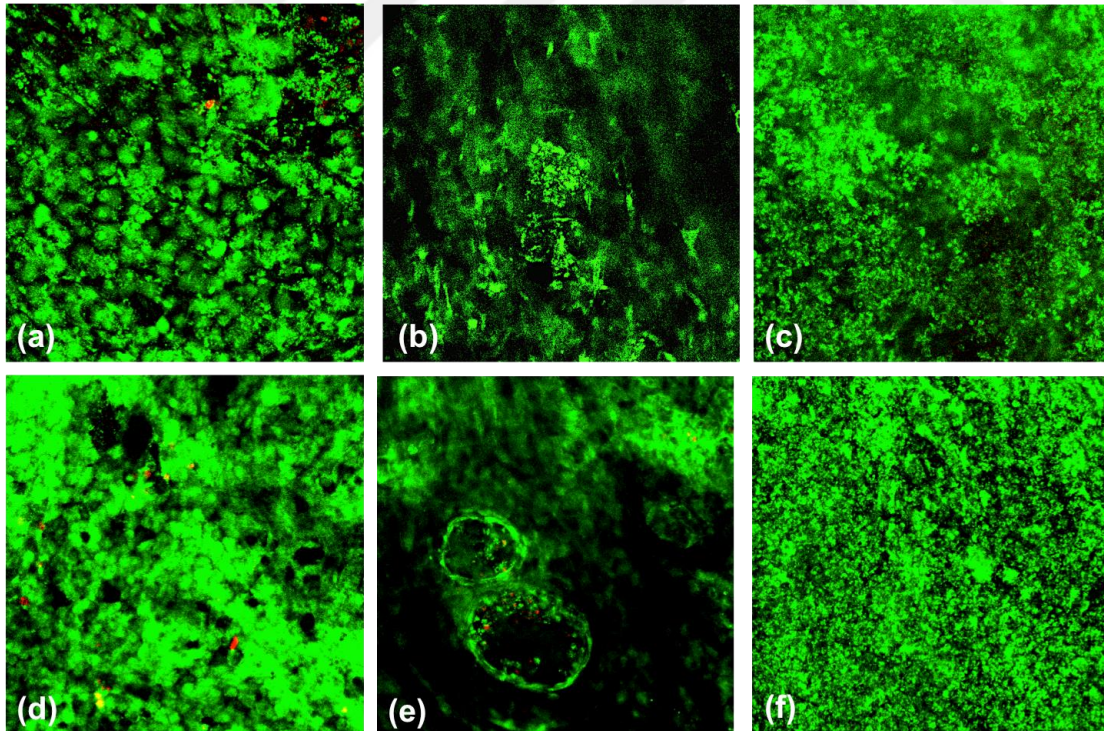
Şekil 4.54. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait SEM fotoğrafları: a ve d) 500 X, bar 200 µm; b ve e) 1,000 X, bar 100 µm; c ve f) 2,500 X, bar 40 µm.

4.8.2. Canlı/Ölü Hücre Boyama

Üretilen kalp yamasını oluşturan hücrelerin 4. ve 11. günde canlılıklarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen canlı/ölü hücre boyama analizi fotoğrafları Şekil 4.55 ve 4.56'da gösterilmiştir. Konfokal mikroskop yardımı ile alınan görüntülerde miyokardiyal hücre tabakası ayrı bir katman halinde netleştirilememiştir. Bu durum, tabakanın alttaki ECM yapısı ile bütünleştiği şeklinde yorumlanmıştır. Ancak Şekil 4.55 ve Şekil 4.56'da a ve d miyokardiyal yamanın en alt bölgesinden, b ve e orta bölgeden, c ve f ise en üst katmanından hücre tabakasının bulunduğu bölümden alınan fotoğrafları göstermektedir. SEM görüntülerini destekleyecek şekilde endotel hücrelerinin oluşturduğu damar lümeni benzer yapıların varlığı özellikle Şekil 4.56 b ve f'de gözlenmiştir. Genel olarak fotoğraflar incelendiğinde hücrelerin canlılıklarını yüksek oranda devam ettirdikleri, 3. günde farklılaşma grubunda ölü hücrelerin (kırmızı renkli) kontrol grubuna göre fazla olduğu, 11. günde gruplar arasında önemli bir farklılık olmadığı ve ölü hücre sayısının 3. güne göre daha az olduğu gözlenmiştir. Cselenyak ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada kemik iliği MKH'leri ile ko-kültür edilen H9C2 hücrelerinin iskemi durumunda ölü hücre sayısında azalma olduğunu göstermişlerdir. AKMKH'lerin de salgıladıkları biyosinyaller aracılığı ile kardiyoprotektif etki gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Tachida ve ark., 2016). Literatürde verilen bilgiler ışığında hücresiz ECM'ye ekilen AKMKH'lerin H9C2 hücrelerinin canlılığını da olumlu etkilediği düşünülmüştür.



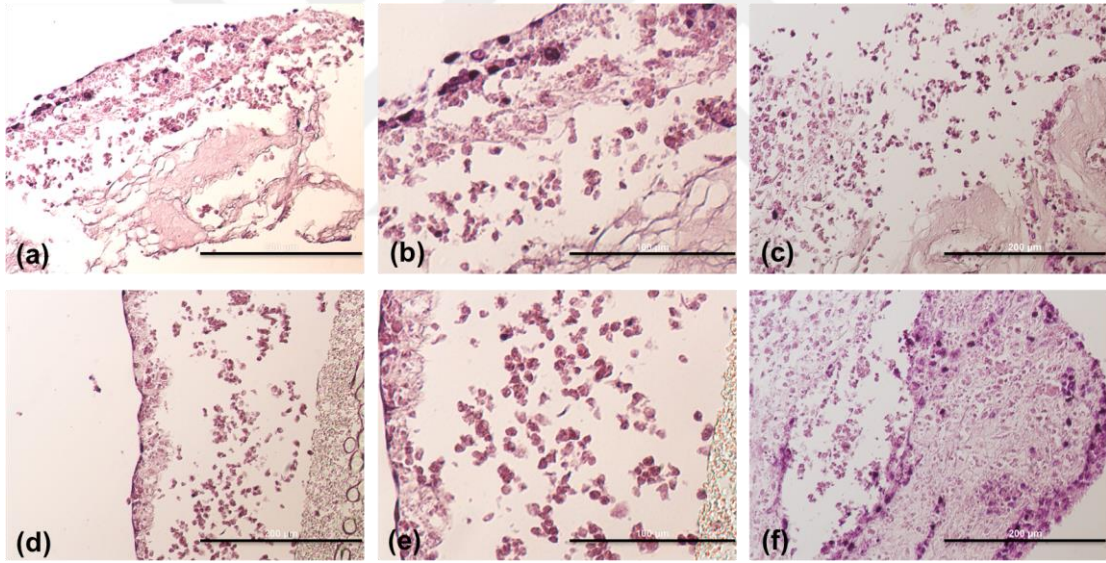
Şekil 4.55. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 4. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.



Şekil 4.56. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 11. gününde kontrol (a, b, c) ve farklılaşma (d, e, f) grubuna ait canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları: 20 X.

4.8.3. Histolojik Boyama

Üretilen kalp yaması kültürünün 15. gününde hücresel dağılımın incelenmesi için gerçekleştirilen H&E boyama fotoğrafları Şekil 4.57’de gösterilmiştir. Dikey kesit fotoğrafları incelendiğinde diğer analizleri destekleyecek şekilde, hücrelendirilmiş ECM iskele üzerine yerleştirilen hücre tabakasının alttaki yapı ile bütünleştiği, tabakanın ECM üzerinde ilk elde edildiği kalınlıkta kalmadığı, tabakayı oluşturan hücrelerin yapı içerisine doğru göç ettiği ve ECM’nin iç bölgelerinde hücrelerin homojen olarak dağıldığı gözlenmiştir. Ancak ECM yapısının muhtemelen kesit alma işlemleri sırasında parçalandığı düşünülmüştür. Özellikle farklılaşma grubundaki örnekte iç bölgelerde hücreler belirgin şekilde görülmelerine rağmen ECM yapısı net olarak gözlenmemiştir (Şekil 4.57d ve e). Yatay kesit fotoğraflarında ise hücrelerin ECM iskeleye homojen olarak dağıldığı gözlenmiş ve alınan kesitlerde hücre tabakasının bulunduğu bölgede hücrelerin daha koyu renkli ve sıkı yerleşimleri gözlenmiştir (Şekil 4.57c ve f). Farklılaşma ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

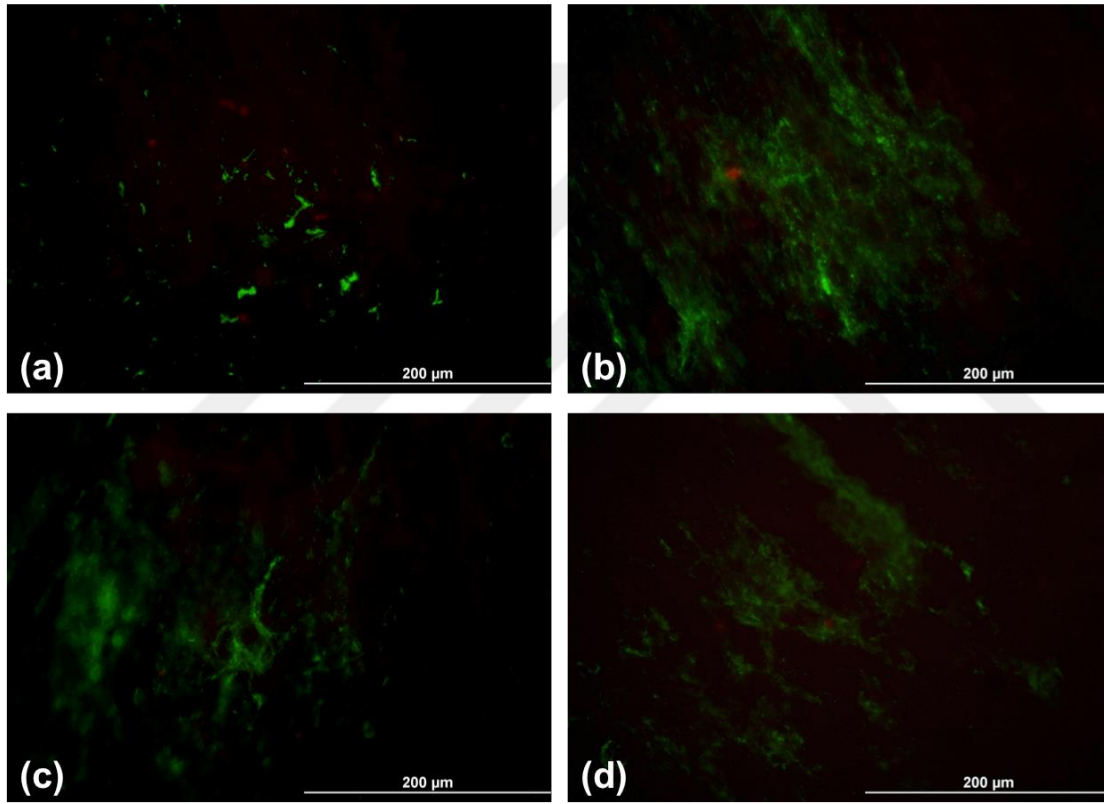


Şekil 4.57.Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b, c) ve farklılaşma grubuna (d, e, f) ait dikey (a, b, d, e) ve yatay (c, f) kesit H&E boyama fotoğrafları: a, d, f) 20 X, bar 200 µm; b ve e)40 X, bar 100 µm; c ve f) 20 X, bar 200 µm.

4.8.4. İmmüno Floresan Boyama

Kalp yamasının yapısında kardiyomiyojenik farklılaşan AKMKH’lerin ve endotel hücrelerin oluşturduğu damar yapılarının belirlenmesi için gerçekleştirilen

immünofloresan boyama fotoğrafları Şekil 4.58’de verilmiştir. Her iki grupta da ekim öncesinde EdU ile işaretlenen AKMKH’ler kırmızı renkte gözlenmiştir, ancak farklılaşma açısından pozitif Anti-TNT boyama gözlenmemiştir. Anti-VWF ile yeşil renkli işaretlenen endotel hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşim ya da mevcut ECM yapısında korunan damar lümeni etrafında yerleşerek damar benzeri yapılar oluşturduğu belirlenmiştir. Sarig ve ark. (2012) da domuz sol ventrikül kesitini hücresizleştirerek elde ettikleri ECM iskeleye floresan işaretli HUVEC ekimi yaptıklarında, endotel hücrelerin lümen etrafında yerleştiklerini belirtmişler, benzer görüntüler elde etmişlerdir. Fotoğraflar SEM ve canlı/ölü hücre boyama analizlerinde gözlenen damar yapılarını desteklemektedir.



Şekil 4.58. Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yama kültürünün 15. gününde kontrol grubu (a, b) ve farklılaşma grubuna (c, d) ait immünofloresan boyama fotoğrafları: 20 X, bar 200 µm.

4.8.5. RT-PCR

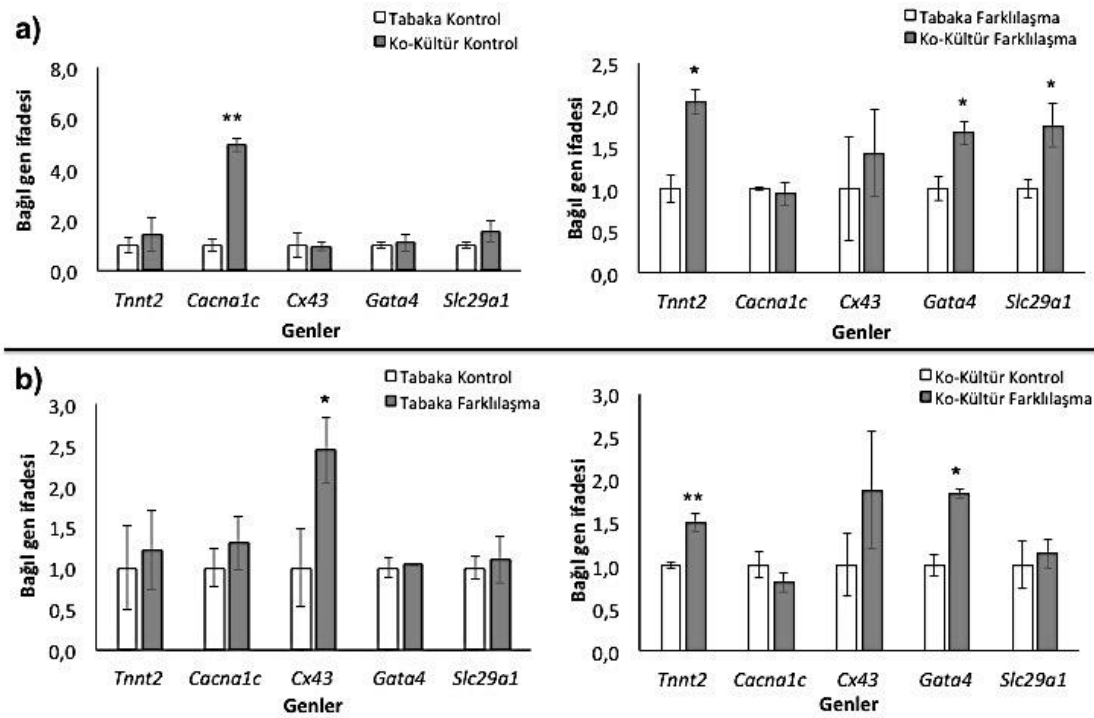
Kardiyovasküler hücre tabakasındaki farklılaştırılmış H9C2 hücreleri ile doğrudan ko-kültürün ve 5-Aza’nın AKMKH’lerin kardiyomiyojenik farklılaşması üzerine etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonuçları farklı açılardan değerlendirilmiş ve elde edilen grafikler Şekil 4.59’da gösterilmiştir. Şekil 4.59a soldaki

grafikte tabaka kontrol ve ko-kültür kontrol grupları karşılaştırılmış, böylece kontrol ortamında kimyasal bir uyarı olmadan hücresiz ECM üzerinde kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür etkisi incelenmiştir. Sonuçta *Cacna1c* gen ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu, kalp ECM nişi ve kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültürün AKMKH kardiyomiyojenik farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir. Tabaka farklılaşma ve ko-kültür farklılaşma grupları (Şekil 4.59a sağdaki grafik) karşılaştırıldığında ise kalp ECM nişi ve kimyasal uyarıcı ajan varlığında kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür etkisi incelenmiştir. Bu durumda *Tnnt2*, *Gata4* ve *Slc29a1* gen ifadelerinde anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. İki grafik birlikte değerlendirildiğinde doğal kalp ECM nişi, kimyasal uyarıcı ajan ve kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür olmak üzere farklılaşmayı uyarıcı 3 etken bir arada olduğu durumda AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarında daha fazla genin aktive olduğu gözlenmiştir.

Kalp ECM nişi üzerinde yalnızca 5-Aza'nın farklılaşmaya etkisini incelemek için yapılan değerlendirmede (Şekil 4.59b) ise tabaka grubunda H9C2 hücrelerinde *Cx43* gen ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı, ko-kültür grubunda ise *Cx43* gen ekspresyonunda ortalama olarak artış meydana gelmesine rağmen *Tnnt2* ve *Gata4* gen ifadelerinde istatistiksel açıdan anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. Sonuçta 5-Aza'nın hem H9C2 hücrelerinin hem de AKMKH'lerinin farklılaşmasında uyarıcı etki gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca miyokardiyal yama üretiminde, hücreleştirilmiş ECM üzerinde gerçekleştirilen ko-kültür çalışmasında yapılan RT-PCR analizi sonucunda (Bölüm 3.2.7.5. RT-PCR) 5-Aza'nın kardiyomiyojenik gen ifadelerinde ortalama olarak bir artış meydana getirirse de anlamlı bir farklılık meydana getirmemiş olduğu görülmüştür. Kardiyovasküler hücre tabakaları ile birleştirildiği durumda ise 5-Aza etkisi ile ko-kültür farklılaştırma grubunda *Tnnt2* ve *Gata4* gen ekspresyonlarında anlamlı artış meydana getirmiş olması da doğrudan ko-kültürün olumlu etkisini göstermektedir. Literatürde de kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültürün kardiyomiyojenik farklılaşmayı arttırdığını belirten pek çok çalışma bulunmaktadır. Takeda ve ark. yaptıkları çalışmada insan kemik iliği kökenli MKH'lerin yalnızca 5-Aza uygulaması ile kardiyomiyosite farklılaştırılamadığını, ancak fetal kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür varlığında 5-Aza uygulamasında farklılaşmanın gerçekleştiğini belirtmişlerdir (Takeda ve ark., 2004). Choi ve ark. (2010) insan derialtı yağ kökenli MKH'lerini

kardiyomiyosit hücrelerine farklılaştırmak için 4 farklı yöntem (5-azasitidin, trikostatın A, metil selüloz bazlı farklılaştırma ortamı ve sıçan kardiyomiyositleri ile dolaylı/doğrudan ko-kültür) uygulamışlar ve en başarılı yöntemin doğrudan ko-kültür uygulaması olduğunu vurgulamışlardır. Valarmathi ve ark. (2010) 3B kültürde gerçekleştirdikleri çalışmada kemik iliği kökenli MKH'leri, embriyonik sıçan kardiyomiyositleri ile doğrudan ko-kültür yaptıklarında kardiyomiyojenik farklılaşmanın desteklendiğini belirtmişlerdir. Zhu ve ark. (2009) ise insan derialtı yağ kökenli MKH'lerini doğrudan ve dolaylı olarak sıçan kardiyomiyositleri ile kültüre etmişler, çalışma sonunda çözünabilir faktörlerin yanında fiziksel etkileşimin de kardiyomiyojenik farklılaşmayı desteklediği ve doğrudan ko-kültürün daha etkili olduğu belirtmişlerdir.



Şekil 4.59. Hüresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde kültüre edilen kardiyovasküler hücre tabakasının ve kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenen miyokardiyal yamanın kontrol ve farklılaşma gruplarına ait bağli gen ifadelerini gösteren RT-PCR analiz grafikleri: a) Tabaka ve ko-kültür gruplarına ait kontrol gruplarının ve farklılaşma gruplarının karşılaştırılması, b) Tabaka ve ko-kültür gruplarının kendi içinde kontrol ve farklılaşma gruplarının karşılaştırılması. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık: n=3; a) kontrol grubu tabaka, b) kontrol grubu kontrol ise * p<0.05, ** p<0.01.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında kardiyovasküler hücre tabakası ve yeniden hücrelendirilmiş miyokardiyal dokunun birleştirilmesi ile hedeflenen kalp yamasının üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk önce H9C2 kardiyomiyoblast hücreleri kullanılarak 3 farklı yöntem ile hücre tabakası elde etmek için çalışmalar gerçekleştirilmiş, en uygun yönteme karar verilmiştir. Daha sonra H9C2 hücreleri kardiyomiyositlere farklılaştırılmış ve KMEH'leri ile ko-kültür şeklinde kullanılarak kardiyovasküler hücre tabakası üretilmiş, elde edilen hücre tabakasının özellikleri çeşitli analizler ile belirlenmiştir. Daha sonra hücrelerinden arındırılmış ECM doku iskelesinin üretimi için sıçan miyokardiyal doku kesitleri üzerinde iki farklı hücresizleştirme yöntemi (SDS ve OGP yöntemi) uygulanmış, karakterizasyon çalışmaları ile başarılı olan yöntem belirlenmiştir. Miyokardiyal yama üretimi için AKMKH'ler endotel hücreleri ile ko-kültür şeklinde hücresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde kültüre edilmişler ve 5-Aza'nın kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmaları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında üretilen kardiyovasküler hücre tabakası ve AKMKH-endotel hücre ko-kültürü ile hücrelendirilmiş miyokardiyal dokunun birleştirilmesi gerçekleştirilmiş ve AKMKH'lerin kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültürü ve 5-Aza varlığında kardiyomiyojenik farklılaşması incelenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

- Kardiyovasküler hücre tabakalarının üretiminde kullanılacak olan H9C2 kardiyomiyoblast hücre hattı ve kardiyak mikrovasküler endotel hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları sonucunda sırası ile özgül üreme hızları ~ 54 sa ve ~ 15 sa, ikilenme süreleri ise 0.013 sa^{-1} ve 0.049 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.
- H9C2 kardiyomiyoblast hücre tabakalarının üretimi için 3 farklı yöntem uygulanmıştır. Sıcaklık duyarlı kültür kapları kullanılarak 7 günde, yüksek hücre ekim yoğunluğu ve FBS konsantrasyonu yöntemi ile 9 günde, AA uygulaması ile ise 5 günde hücre tabakaları başarılı şekilde elde edilmiştir.
- Hücre tabakalarının karakterizasyon çalışmalarında her üç yöntemde hücrelerin canlılıklarını yüksek oranda devam ettirdikleri, yeni bir yüzeye aktarıldıklarında tabaka dışına göç edip yayılmaya başladıkları gözlenmiştir.
- Hücrelerin kültüre edildikleri kültür kabı yüzeyinin ve hücre ekim yoğunluğunun gen ekspresyonlarını etkilediği belirlenmiş, PIPAAm kaplı

yüzeyin *Cacna1s* gen ifadesini arttırdığı, düşük hücre ekim yoğunluğunun ise *Cacna1s* ve *Tnnt2* ekspresyonunu azalttığı, *Col1a1* gen ifadesini arttırdığı belirlenmiştir.

- Yüksek serum ve askorbik asit uygulamasının hücrelerdeki kollajen sentezini arttırdığı ve AA uygulaması ile H9C2 hücrelerinin miyojenik karakterinde artış olduğu gözlenmiştir. Yüksek FBS ve AA birlikte uygulandığında ise kardiyomiyojenik karakteri yüksek hücre tabakalarının üretildiği belirlenmiştir.
- H9C2 hücrelerinin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için farklı sürelerde ve çeşitli konsantrasyonlarda (10 nM, 50 nM ve 100 nM) retinoik asit uygulaması yapılmış, en uygun koşulun 5 gün süresince 100 nM konsantrasyonda RA uygulaması olduğu belirlenmiştir.
- Kardiyovasküler hücre tabakalarının üretilmesi için farklılaştırılmış H9C2 hücreleri ve endotel hücreleri 6:1 oranında farklı FBS (%10.5 ve %15 v/v) ve AA (20, 50, 100 µg/mL) konsantrasyonu içeren ortamlarda kültüre edilmişlerdir. AA uygulanan tüm gruplarda hücre tabakası başarılı şekilde elde edilmiştir.
- Gruplar arasında %10.5 (v/v) FBS ve 100 µg/mL AA konsantrasyon grubunda kardiyomiyojenik özelliklerin en yüksek olduğu belirlenmiş, çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu grubun kullanılmasına karar verilmiştir. SEM analizinde üretilen hücre tabakasındaki endotel hücrelerin oluşturduğu damar lümeni benzeri yapıların varlığı belirlenmiştir.
- Hücrelerinden arındırılmış miyokardiyal ECM iskele üretimi için 2 farklı yöntem (SDS ve OGP) uygulanmıştır. SEM, immüno Floresan ve histolojik boyama ile DNA analizleri sonucunda SDS yönteminde hücresizleştirmenin başarılı şekilde gerçekleştirildiği belirlenmiştir.
- Dokudaki DNA'nın, OGP yönteminde ~%33, SDS yöntemi ise ~%89 oranında uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. Hidroksiprolin ve GAG analizi ile uygulanan işlemler sonucunda dokudaki kollajenin yüksek oranda korunduğu, GAG içeriğinde anlamlı bir değişim meydana gelmediği belirlenmiş, sitotoksiklik testinde ise SDS yöntemi ile hücresizleştirilen ECM yapısında hücrelere toksik bir kimyasal kalıntının bulunmadığı belirlenmiştir.
- Miyokardiyal yama üretimi için AKMKH'ler ve endotel hücreler hücresizleştirilmiş ECM iskele üzerinde 6:1 oranında doğrudan ko-kültür şeklinde kültüre edilmişlerdir. Yirmi dört sa süresince 5-Aza uygulaması ve 2

haftalık *in vitro* kültür çalışması sonucunda yapılan immüno Floresan boyama ve RT-PCR analizi ile kök hücrelerin, kalp ECM nişi üzerinde kardiyomiyojenik farklılaşmasında 5-Aza'nın tek başına yeterli olmadığı belirlenmiştir.

- Üretilen miyokardiyal yamanın yüksek hücre canlılığına, homojen hücre dağılımına ve endotel hücrelerin oluşturduğu lümen benzeri yapılar ile yüksek damarlanma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.
- Kardiyovasküler hücre tabakası ile desteklenmiş miyokardiyal yama üretimi için hücre tabakalarının eldesi ve hücreleştirilmiş ECM üzerinde AKMKH ile endotel hücrelerin ko-kültür çalışmaları eş zamanlı olarak yürütülmüş, tabakalar yüzeyden kaldırıldıktan sonra hücrelendirilmiş ECM iskele ile herhangi bir yapıştırıcı kullanılmasına gerek duyulmadan başarılı şekilde birleştirilmiştir.
- İki haftalık kültür sonunda elde edilen kalp yamasının yüksek canlılıkta olduğu, birleştirilen 2 katmanın bütünleştiği ve damar lümeni benzeri yapıların meydana geldiği belirlenmiştir.
- Kök hücrelerin kalp ECM nişi, 24 sa 5-Aza uygulaması ve 2 hafta kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür etkisinde kardiyomiyojenik farklılaşması incelenmiştir. 5-Aza'nın yalnızca kalp ECM nişi varlığında farklılaşma üzerinde olumlu etkisi görülmemiş, ancak kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültürün etkisi ile birleşince farklılaşmayı desteklediği gözlenmiştir.
- Ayrıca kontrol ortamında hücresiz ECM üzerinde yalnızca hücre tabakasının kültürü ile yapılan karşılaştırmada kimyasal bir uyaran olmadan hücresiz kalp ECM nişi varlığında kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültür etkisi incelenmiştir. Sonuçta kalp ECM nişi ve kardiyomiyositler ile doğrudan ko-kültürün birlikte etkisi ile AKMKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasının desteklendiği belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm deneyler ve elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ticari olarak sıcaklık duyarlı kültür kaplarına bağımlı olmadan kardiyovasküler hücre tabakalarının üretildiği, AKMKH'lerin uygun niş, kimyasal uyarıcı ajan (5-Aza) ve doğrudan ko-kültürün üçlü sinerjik etkisi ile kardiyomiyojenik olarak farklılaştırıldığı ve damarlanma potansiyeli yüksek, kalın bir kalp yaması modeli geliştirildiği yorumu yapılmıştır. Üretilen kalp yaması gelecek çalışmalarda *in vitro* model olarak kullanılabilir. Ayrıca çalışma tamamen sıçan hücreleri kullanılacak

şekilde planlanmıştır. Böylelikle, ileride *in vivo* çalışma yapılması durumunda meydana gelebilecek immün yanıt minimuma indirilmek istenmiştir. Hücre tabakası kullanımı ile de hazırlanan yamanın dikiş ya da ek bir yapıştırıcıya gerek duyulmadan hasarlı kalp dokusuna entegre olması sağlanabilecektir. Üretilen kalp yamasının, kalp hasarı oluşturulmuş sıçanlara implante edilmesi ile hasarlı kalp üzerindeki rejeneratif potansiyeli belirlenebilir. *İn vitro* çalışma başarı ile sonuçlandığı takdirde klinik çalışma aşamasına geçildiğinde, hibrid modelde kullanılan kardiyomiyoblast ve endotel hücre hatlarının yerine otolog olarak hastadan biyopsi ile alınan doku parçasından izole edilip çoğaltılacak kardiyomiyoblast ve endotel hücrelerinin kullanılabileceği düşünülmüştür.



KAYNAKLAR

- Ackermann, M.A., Hu, L-Y.R. ve Kontrogianni-Konstantopoulos, A., in *Cardiomyopathies From Basic Research to Clinical Management*, Veselka, J. (Eds.), IntechOpen, Chapter 13, **2012**.
- Agmon, G. ve Christman, K.L., *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 20(4) (**2016**) 193-201.
- Aird, W.C., Edelberg, J.M., Weiler-Guettler, H., Simmons, W.W., Smith, T.W. ve Rosenberg, R.D., *The Journal of Cell Biology*, 138(5) (**1997**) 1117–1124.
- Akahane, M., Nakamura, A., Ohgushi, H., Shigematsu, S., Dohi, Y. ve Takakura, Y., *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2 (**2008**) 196–201.
- Akbay, E. ve Onur, M.A. *Biomed J Sci &Tech Res* 5(3) (**2018**) Doi: 10.26717/BJSTR.2018.05.001191.
- Akhter, S.A., *Thoracic Surgery Clinics* 21 (**2011**) 205–217.
- Akyhari, P., Barth, M. ve Lichtenberg, A., in *Comprehensive Biomaterials*, Ducheyne, P., Healy, K.E., Humacher, D.W., Grainger, D.W. ve Kirkpatrick, J. (Eds.), Volume 6, Elsevier Science, Italy, **2011**.
- Alessandra, T., *Engineering Cardiac Microtissue In Vitro: Effect of The Scaffold and Culture Conditions on The Final Properties of Cardiac Micro-Muscles*, Ph.D Thesis, University of Naples Federico II, School of Engineering, Department of Chemical Engineering, Materials and Industrial Production, Napoli/İtalya, **2014**.
- Anatomy & Physiology. OpenStax College. 25 Nisan 2013. <http://cnx.org/content/col11496/latest/> (Erişim tarihi: 24 Eylül 2018)
- Andreu, I., Luque, T., Sancho, A., Pelacho, B., Iglesias-García, O., Melo, E., Farré, R., Prósper, F., Elizalde, M.R. ve Navajas, D., *Acta Biomaterialia* 10 (**2014**) 3235–3242.
- Anene-Nzelu, C.G., Choudhury, D., Li, H., Fraiszudeen, A., Peh, K.Y., Toh, Y.C., Ng, S.H., Leo, H.L. ve Yu, H., *Biomaterials* 34 (**2013**) 5078-5087.
- Anilkumar, K., Ari, G., N, A., John, C. ve Babu, B., *International Journal of Science and Research* 4(1) (**2015**) 1120-1124.
- Asakawa, N., Shimizu, T., Tsuda, Y., Sekiya, S., Sasagawa, T., Yamato, M., Fukai, F. ve Okano, T., *Biomaterials*; 31 (**2010**) 3903–3909.
- Badylak, S.F., Brown, B.N. ve Gilbert, T.W., in *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F. and Lemons, J., 3rd Edition Academic Press, Canada, Section 2.6, **2012**.
- Badylak, S.F., Freytes, D.O. ve Gilbert, T.W., *Acta Biomaterialia* 23 (**2015**) S17–S26.

- Badylak, S.F., Taylor, D. ve Uygun, K., *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13 (2011) 27–53.
- Balana, B., Nicoletti, C., Zahanich, I., Graf, E.M., Christ, T., Boxberger, S. ve Ravens, U., *Cell Research* 16 (2006) 949-960.
- Barnett, V.A., in *Handbook Of Cardiac Anatomy, Physiology, And Devices*, Iaizzo, P.A. (Eds.), Vol. 2, Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 8, 2005.
- Bel, A., Planat-Bernard, V., Saito A., Bonnevie, L., Bellamy, V., Sabbah, L., Bellabas, L., Brinon, B., Vanneaux, V., Pradeau, P., Peyrard, S., Larghero, J., Pouly, J., Binder, P., Garcia, S., Shimizu, T., Sawa, Y., Okano, T., Bruneval, P., Desnos, M., Hagège, A.A., Casteilla, L., Pucéat, M. ve Menasché, P., *Circulation*, 122 (2010) 118–123.
- Bouten, C.V.C., Dankers, P.Y.W., Driessen-Mol, A., Pedron, S., Brizard, A.M.A. and Baaijens, F.P.T., *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 221–241.
- Boyle, A., *Current Heart Failure Reports* 6 (2009) 28–33.
- Branco, A.F., Pereira, S.P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A.A. ve Oliveira, P.J., *PLoS ONE* 10(6) (2015) doi:10.1371/journal.pone.0129303.
- Brown, B.N. and Badylak, S.F., *Translational Research* 163 (2014) 268–285.
- Brutsaert, D.L., *Physiological Reviews*, 83 (2003) 59–115.
- Bruyneel, A.A.N. ve Carr, C.A., *Artificial Organs*, 41(8) (2017) 778-784.
- Buck, S.B., Bradford, J., Gee, K.R., Agnew, B.J., Clarke, S.T. ve Salic, A., *BioTechniques* 44 (2008) 927-929.
- Cao, F., Niu, L., Meng, L., Zhao, L., Wang, D., Zheng, M., Bai, C., Jia, G. ve Pei, X., *Journal of Geriatric Cardiology*, 1(2) (2004) 101-107.
- Cao, L., Shen, X., Mao, Y., Liu, S., Chan, J.Y.H. ve Cai, D. in 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 11-13 June 2009, IEEE, China, 2009. Doi: 10.1109/ICBBE.2009.5163316
- Carvalho, J.L., de Carvalho, P.H., Gomes, D.A. ve Goes, A.M. *Journal of Tissue Science and Engineering* S11:002. (2012) doi:10.4172/2157-7552.S11-002.
- Carvalho, P.H., Daibert, A.P.F., Monteiro, B.S., Okano, B.S., Carvalho, J.L., da Cunha D.N.Q., Favarato, L.S.C., Pereira, V.G., Augusto, L.E.F., Del Carlo, R.J., *Arq Bras Cardiol*, 100(1) (2013) 82-89.
- Chang, D. ve Okano, T., in *Comprehensive Biomaterials*, Ducheyne, P., Healy, K.E., Humacher, D.W., Grainger, D.W. ve Kirkpatrick, J. (Eds.), Volume 6, Elsevier Science, Italy, 2011.
- Chaudhuri, R., Ramachandran, M., Moharil, P., Harumalani, M. and Jaiswal, A.K., *Materials Science and Engineering C*, 79 (2017) 950–957.

- Chen, C.H., Wei, H.J., Lin, W.W., Chiu, I., Hwang, S.M., Wang, C.C., Lee, W.Y., Chang, Y. ve Sung, H.W., Cardiovascular Research (2008b) 80, 88–95.
- Chen, F.M., Gao, L.N., Tian, B.M., Zhang, X.Y., Zhang, Y.J., Dong, G.Y., Lu, H., Chu, Q., Xu, J., Yu, Y., Wu, R.X., Yin, Y., Shi, S. ve Jin, Y., Stem Cell Research & Therapy 7(33) (2016) 11pp.
- Chen, G., Qi, Y., Niu, L., Di, T., Zhong, J., Fang, T. ve Yan, W., Biomedical Reports 3 (2015) 749-757.
- Chen, Q-Z., Harding, S.E., Ali, N.N., Lyon, A.R. ve Boccaccini, A.R., Materials Science and Engineering R 59 (2008a) 1–37.
- Chien, K.R., Domian, I.J. and Parker K.K., Science 322 (5907) (2008) 1494-1497.
- Chiu, L.L.Y. ve Radisic, M., Current Opinion in Chemical Engineering 2 (2013) 41–52.
- Chiusa, M., Hool, S.L., Truetsch, P., Djafarzadeh, S., Jakob, S.M., Seifriz, F., Scherer, S.J., Suter, T.M., Zuppinger, C. ve Zbinden, S., Journal of Molecular and Cellular Cardiology 52 (2012) 1164–1175.
- Choi, Y.C., Morris, G.M., Lee F.S. ve Sokoloff, L., Connective Tissue Research, 7 (1980) 105-112.
- Choi, Y.S., Dusting, G.J., Stubbs, S., Arunothayaraj, S., Han, X.L., Collas, P., Morrison, W.A., Dilley, R.J., Journal of Cellular and Molecular Medicine, 14(4) (2010) 878-889.
- Choudhury, D., Tun, H.W., Wang, T. ve Naing, M.W., Trends in Biotechnology, 36(8) (2018) 787-805.
- Cohen, D.M. ve Chen, C.S., In StemBook, Bhatia S, Polak J (Eds.), The Stem Cell Research Community: Cambridge MA, USA, 1–16. 2008.
- Comelli, M., Domenis, R., Bisetto, E., Contin, M., Marchini, M., Ortolani, F., Tomasietig, L. ve Mavelli, I., Mitochondrion 11 (2011) 315–326.
- Crapo, P.M., Gilbert, T.W. ve Badylak, S.F., Biomaterials 32 (2011) 3233-3243.
- Cross, M.J. ve Claesson-Welsh, L., TRENDS in Pharmacological Sciences, 22(4) (2001) 201-207.
- Cselenyak, A., Pankotai, E., Horvath, E.M., Kiss, L. ve Lacza, Z., BMC Cell Biology 11:29 (2010), 11 pp.
- Cui, G., Chen, H., Cui, W., Guo, X., Fang, J., Liu, A., Chen, Y. ve Lee, S.M.Y., Cardiovascular Toxicology, 16 (2016) 46–53.
- Cui, H., Liu, Y., Cheng, Y., Zhang, Z., Zhang, P., Chen, X. ve Wei, Y., Biomacromolecules, 15 (2014) 1115–1123.

- Cui, H., Miao, S., Esworthy, T., Zhou, X., Lee S-J., Liu, C., Yu, Z-X., Fisher, J.P., Mohiuddin, M. ve Zhang, L.G., *Advanced Drug Delivery Reviews* 132 (2018) 252-269.
- Curtis, M.W. and Russell, B., *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2) (2009), 87–92.
- De Carvalho, C.A.M. ve Thomazini, J.A., *International Journal of Morphology*, 31(2) (2013) 724-728.
- De Luca L.M., *FASEB Journal*, 5 (1991) 2924-2933.
- Deng, F.G., Li, Y.L., Zhang, X.Y. *Journal of Geriatric Cardiology* 6(3) (2009) 182-188.
- Di Meglio, F., Nurzynska, D., Romano, V., Miraglia, R., Belviso, I., Sacco, AM., Barbato, V., Di Gennaro, M., Granato, G., Maiello, C., Montagnani, S. ve Castaldo, C., *Tissue Eng Part C Methods*. 23(9) (2017) 525-539.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. ve Horwitz, E.M., *Cytherapy*, 8(4) (2006) 315-317.
- Dong, J., Li, Y. ve Mo, X., *Journal of Surgical Research* 183 (2013) 56-67.
- Dott, W., Mistry, P., Wright, J., Cain, K. ve Herbert, K.E., *Redox Biology*, 2 (2014) 224-233.
- Duan, Y., Liu, Z., O'Neill, J., Wan, L.Q., Freytes, D.O. ve Vunjak-Novakovic, G., *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 4 (2011) 605–615
- DuRaine G.D., Brown W.E., Hu J.C., ve Athanasiou K.A., *Emergence of scaffold-free approaches for tissue engineering musculoskeletal cartilages. Annals of Biomedical Engineering*, 43(3) (2015) 543–554.
- Eitan, Y., Sarig, U., Dahan, N. ve Machluf, M., *Tissue Engineering: Part C*, 16(4) (2010) 671-683.
- Emmert, M.Y., Hitchcock, R.W. ve Hoerstrup, S.P., *Advanced Drug Delivery Reviews* 69 70 (2014) 254-269.
- Eng, G., Lee, B.W., Radisic, M. ve Vunjak-Novakovic, G., in *Principles of tissue engineering*, Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.P. (Eds.), Fourth edition, Academic Press, San Diego, Chapter 38, 2014.
- Enobakhare, B.O., Bader, D.L. ve Lee, D.A., *Analytical Biochemistry* 243 (1996) 189-191.
- Feridooni, T., Mac Donald, C., Shao, D., Yeung, P. ve Agu, R.U., *Acta Pharmaceutica*, 63 (2013) 493–503.
- Ferng, A.S., Connell, A.M., Marsh, K.M., Qu, N., Medina A.O., Bajaj, N., Palomares, D., Iwanski, J., Tran, P.L., Lotun, K., Johnson, K. and Khalpey, Z., *Journal of Clinical and Translational Research* 3(2) (2017); 260-270.

- Fields, M., Cai, H., Gong, J. ve Del Priore, L., *Cells* 5(44) **(2016)** 15 pp.
- Francescone III, R.A., Faibish, M. ve Shao, R., *Journal of Visualized Experiments* (55), e3040, Doi: 10.3791/3040 **(2011)**.
- French, K.M., Boopathy, A.V., DeQuach, J.A., Chingozha, L., Lu, H., Christman, K.L., Davis, M.E., *Acta Biomaterialia* 8 **(2012)** 4357-4364.
- Fujimoto, K.L., Ma, Z., Nelson, D.M., Hashizume, R., Guan, J., Tobita, K. ve Wagner, W.R., *Biomaterials* 30 **(2009)** 4357-4368.
- Fujita, B. and Zimmermann W.H., *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 27 **(2018)** 916–920.
- Furuta, A., Miyoshi, S., Itabashi, Y., Shimizu, T., Kira, S., Hayakawa, K., Nishiyama, N., Tanimoto, K., Hagiwara, Y., Satoh, T., Fukuda, K., Okano T. ve Ogawa, S., *Circulation Research*, 98 **(2006)** 705-712.
- Gaetani, R., Doevendans, P.A.F., Messina, E. and Sluijter, J.P.G., in *Myocardial Tissue Engineering*, Boccaccini, A.R. ve Harding, S.E. (Eds.), Springer, Heidelberg, **2011**.
- Galvez-Monton, C., Prat-Vidal, C., Roura, S., Soler-Botija, C. and Bayes-Genis, A., *Revista española de cardiología* 66(5) **(2013)** 391–399.
- Gao, Q., Guo, M., Jiang, X., Hu, X., Wang, Y. ve Fan, Y., *Stem Cells International* 2014:162024 **(2014)** 11pp.
- Garreta, E., Oria, R., Tarantino, C., Pla-Roca, M., Prado, P., Fernandez-Aviles, F., Campistol, J.M., Samitier, J. ve Montserrat N., *Materials Today* 20(4) **(2017)** 166-178.
- Gilbert, T.W., Sellaro, T.L. ve Badylak, S.F., *Biomaterials* 27 **(2006)** 3675–3683.
- Gilbert, T.W., Stewart-Akers, A.M., Simmons-Byrd, A. ve Badylak, S.F., *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 89(3) **(2007)** 621-630.
- Godier-Furnemont, A. ve Vunjak-Novakovic, G. in *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F. and Lemons, J., 3rd Edition Academic Press, Canada, Chapter 2, **2012**.
- Godier-Furnémont, A.F.G., Martens, T.P., Koeckert, M.S., Wan L., Parks J., Arai, K., Zhang, G., Hudson, B., Homma, S. ve Vunjak-Novakovica, G., *PNAS*, 108(19) **(2011)** 7974–7979.
- Gonzalez-Garza, M.T., Alcaraz, C., Gonzalez-Jara, L., Arcos, D. ve Cuevas, J.E.M., *Stem Cell Discovery* 4 **(2014)** 1-7.
- Grinnell, F., Fukamizu, H., Pawelek, P. ve Nakagawa, S., *Experimental Cell Research*, 181 **(1989)** 483-491.

- Grosjean, S., Devaux, Y., Seguin, C., Meistelman, C., Zannad, F., Mertes, P.M., Kelly, R.A. ve Ungureanu-Longrois, D., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2001) 33, 933–945.
- Gui, L., Chan, S.A., Breuer, C.K. ve Niklason, L.E., *Tissue Engineering: Part C* 16(2) (2010) 173-184.
- Guo, J.A., Yu, P.J., Wang, L.P., Shi, Y.Y., Liu, Y. ve Chen, W., *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 10(4) (2017) 4182-4190.
- Guo, P., Zeng, J.J., Zhou, N., *Scanning*, 37 (2015) 42–48.
- Hakimi, O., Poulson, R., Thakkar, D., Yapp, C., Carr, A., *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3(2) (2014) 119-127.
- Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, Sekine H, Sakaguchi K, Kikuchi T, Sekine W, Sekiya S, Yamato M, Umezu M, Okano T., *Nature Protocol* 7 (2012b) 850-858.
- Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. *Biomaterials* 27 (2006) 4765–4774.
- Haraguchi, Y., Shimizu, T., Yamato M. ve Okano, T., *RSC Advances*, 2 (2012a) 2184-2190.
- Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.A. in *Fundamentals of Toxicologic Pathology*, Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.A. (Eds.), 2nd Edition, Academic Press, Canada, Chapter 12, 2010.
- Hata, H., Bar, A., Dorfman, S., Vukadinovic, Z., Sawa, Y., Haverich, A. ve Hilfiker, A., *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 38 (2010) 450-455.
- Hata, H., Matsumiya, G., Miyagawa, S., Kondoh, H., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Shimizu, T., Okano, T., Matsuda, H. ve Sawa Y., *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 132 (2006) 918-924.
- Higuchi, S., Lin, Q., Wang, J., Lim, T.K., Joshi, S.B., Anand, G.S., Chung, M.C.M., Sheetz, M.P. ve Fujita, H., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(3) (2013) 320-325.
- Hinderer, S., Brauchle, E. ve Schenke-Layland, K., *Advanced Healthcare Materials*, 4 (2015) 2326–2341.
- Hoashi, T., Matsumiya, G., Miyagawa, S., Ichikawa, H., Ueno, T., Ono, M., Saito, A., Shimizu, T., Okano, T., Kawaguchi, N., Matsuura, N. ve Sawa, Y., *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 138 (2009) 460-467.
- Hoit, B.D., *Cardiology Clinics* 35 (2017) 481–490.
- Hrebikova, H., Diaz, D. ve Mokry, J., *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 159(1) (2015) 12-17.

- Hsieh, P.C.H., Davis, M.E., Lisowski, L.K. ve Lee, R.T., *Annual Review of Physiology*, 68 (2006) 51–66.
- Huang, C.H., Chen, H.W., Tsai, M.S., Hsu, C.Y., Peng, R.H., Wang, T.D., Chang, W.T. ve Chen, W.J., *Academic Emergency Medicine*, 16 (2009) 872–880.
- Iaizzo, P.A., in *Handbook Of Cardiac Anatomy, Physiology, And Devices*, Iaizzo, P.A. (Eds.), Vol. 2, Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 1, 2005.
- Imamura, T., Kinugawa, K., Sakata, Y., Miyagawa, S., Sawa, Y., Yamazaki, K. ve Ono, M., *Journal of Artificial Organs* 19 (2016) 80–86.
- Ishida, O., Hagino, I., Nagaya, N., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y., Mori, H. and Yagihara, T., *Translational Research* 165 (2015) 631–639.
- Ishida, O., Hagino, I., Nagaya, N., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y., Mori, H. ve Yagihara, T., *Translational Research* 165 (2015) 631–639.
- Itabashi, Y., Miyoshi, S., Kawaguchi, H., Yuasa, S., Tanimoto, K., Furuta, A., Shimizu, T., Okano, T., Fukuda, K. ve Ogawa, S., *Artificial Organs*, 29(2) (2005) 95–103.
- Ivanyuk, D., Budash, G., Zheng, Y., Gaspar, J.A., Chaudhari, U., Fatima, A., Bahmanpour, S., Grin, V.K., Popandopulo, A.G., Sachinidis, A., Hescheler, J. ve Šarić, T., *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(2) (2015) 810-30.
- Iwata, T., Yamato, M., Washio, K., Yoshida, T., Tsumanuma, Y., Yamada, A., Onizuka, S., Izumi, Y., Ando, T., Okano, T. ve Ishikawa, I., *Regenerative Therapy* 9 (2018) 38-44.
- Jadaun, P., Yadav, D. ve Bisen, P.S., *Cytotechnology* 70(2) (2018) 523-536.
- Jin, H., Zhang, K., Qiao, C., Yuan, A., Li, D., Zhao, L., Shi, C., Xu, X., Ni, S., Zheng, C., Liu, X., Yang, B. ve Sun, H., *International Journal of Nanomedicine* 9 (2014) 2179–2190.
- Jones, G., Herbert, A., Berry, H., Edwards, J.H., Fisher, J. ve Ingham, E., *Tissue Engineering: Part A*, 23(3-4) (2017) 124-134.
- Kanai, N., Yamato, M. ve Okano, T., in *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, Orlando, G., Lerut, J.P., Soker, S. ve Stratta, R.J. (Eds.), Elsevier, USA, Chapter 5, 2014.
- Karagiannis, T.C., Lin, A.J., Ververis, K., Chang, L., Tang, M.M., Okabe, J. ve El-Osta, A., *Aging*, 2(10) (2010) 659-668.
- Kato, S., Shanley, J.R. ve Fox, J.C., *American Journal of Pathology*, 149 (1996) 687-697.
- Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y., *Circulation*, 126 (2012) 29-37.

- KC, P., Shah, M., Liao, J. ve Zhang, G., ACS Applied Materials & Interfaces, 9 (2017) 2196–2204.
- Kimes, B.W. ve Brandt, B.L., Experimental Cell Research, 98 (1976) 367-381.
- Kirby, G.S., Michelmores, A., Smith, L.E., Whittle, J.D. and Short R.D., Cytotherapy 20 (2018) 169–180.
- Kondoh, H., Sawa, Y., Miyagawa, S., Sakakida-Kitagawa, S., Memon I.A., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Shimizu, T., Okano, T. ve Matsuda, H., Cardiovascular Research, 69 (2006) 466–475.
- Korantzopoulos, P. ve Galaris, D, Journal of Clinical and Basic Cardiology, 6 (2003) 3-6.
- Kornicka, K., Marycz, K., Marezdziak, M., Tomaszewski, K.A., Nicpo, J., Journal of Cellular and Molecular Medicine, 21(2) (2017) 387-401.
- Kubo, H., Shimizu, T., Yamato, M., Fujimoto, T. ve Okano, T., Biomaterials 28 (2007) 3508–3516.
- Kuramochi, Y., Cote, G.M., Guo, X., Lebrasseur, N.K., Cui, L., Liao, R. ve Sawyer, D.B., Journal Of Biological Chemistry, 279(49) (2004) 51141–51147.
- L'Heureux, N., Pâquet, S., Labbé, R., Germain, L., Auger, F.A., A completely biological tissue-engineered human blood vessel, FASEB Journal, 12 (1998) 47–56.
- Law, C.H., Li, J.M., Chou, H.C., Chen, Y.H. ve Chan, H.L., Toxicology, 303 (2013) 54-71.
- Lee, A.Y., Mahler, N., Best, C., Lee, Y-U. ve Breuer, C.K., Translational Research 163(4) (2014) 321-41.
- Lee, K.M., Kim, H., Nemen, J.G., Yang, W., Yoon J., Lee, S. ve Lee, J.I., Transplantation Proceedings, 47 (2015) 751-756.
- Lee, W.C.C., Sepulveda, J.L., Rubin, P., Marra, K.G., International Journal of Cardiology, 133(3) (2009) 399-401.
- Lenco, J., Lenčová-Popelová, O., Link, M., Jirkovská, A., Tambor, V., Potůčková, E., Stulík, J., Šimůnek, T., Štěrbá, M., Experimental Cell Research, 339 (2015) 174–186.
- Leung, G.P., Tse, C.M. ve Man, R.Y., International Journal of Cardiology, 116 (2007) 186–193.
- Li, F., Yuan, Y., Guo, Y., Liu, N., Jing, D., Wang, H. ve Guo, W., Bioelectromagnetics 36 (2015) 1-9.
- Liu, Y., Songa, J., Liu, W., Wan, Y., Chen, X., Hu, C., Cardiovascular Research 58 (2003) 460–468.

- Lopez-Ruiz, E., Perán, M., Picón-Ruiz, M., García, M.A., Carrillo, E., Enez-Navarro, M.J., Hernández, M.C., Prat, I., De Teresa, E. ve Marchal, J.A., *Cytotherapy*, 16 (2014) 1229-1237.
- Lui, P.P., Wong, O.T. ve Lee, Y.W., *Cytotherapy*, 18 (2016) 99–112.
- Lund, K.C., Peterson, L.L. ve Wallace, K.B., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7) (2007) 2531–2539.
- Maehara, M., Sato, M., Toyoda, E., Takahashi, T., Okada, E., Kotoku, T. ve Watanabe, M., *Inflammation and Regeneration*, 37:22 (2017) 10 pp.
- Makhoul, G., Jurakhana, R., Jaiswal, P.K, Ridwan, K., Li, L., Selvasandran, K., Duong, M., Schwertani, A. ve Cecere, R., *Life Sciences* 153 (2016) 213–221.
- Martinez, E.C., Wang, J., Gan, S.U., Singh, R., Lee, C.N. ve Kofidis, T., *Tissue Engineering Part A*, 16 (2010) 1349-1361.
- Martinsen, B.J. and Lohr, J.L., in *Handbook Of Cardiac Anatomy, Physiology, And Devices*, Iaizzo, P.A. (Eds.), Vol. 2, Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 2, 2005.
- Masuda, S., Shimizu, T., Yamato, M., and Okano, T., *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 277–285.
- Masumoto, H., Ikuno, T., Takeda, M., Fukushima, H., Marui, A., Katayama, S., Shimizu, T., Ikeda, T., Okano, T., Sakata, R. ve Yamashita, J.K., *Scientific Report*. 4:6716 (2014) Doi:10.1038/srep06716.
- Mathapati, S., Bishi, D.K., Guhathakurta, S., Cherian, K.M., Venugopal, J.R., Ramakrishna, S. ve Verma, R.S., *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 1561-1572.
- Matsuda, N., Shimizu, T., Yamato, M. and Okano, T., *Advanced Materials* 19 (2007) 3089–3099.
- Matsuura, K., Haraguchi, Y., Shimizu, T. and Okano, T., *Journal of Controlled Release* 169 (2013) 336–340.
- May, J.M. ve Harrison, F.E., *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(17) (2013) 2068–2083.
- Mejia-Alvarez, R., Tomaselli, C.F. ve Marban, E., *Journal of Physiology*, 478 (1994) 315-329.
- Memon, I.A., Sawa, Y., Fukushima, N., Matsumiya, G., Miyagawa, S., Taketani, S., Sakakida, S.K., Kondoh, H., Aleshin, A.N., Shimizu, T., Okano, T. ve Matsuda, H., *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 130 (2005) 1333-1341.
- Menard, C., Pupier, S., Mornet, D., Kitzmann, M., Nargeot, J. ve Lory, P., *Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 29063-29070.

- Mendoza-Novelo, B., Avila, E.E., Cauch-Rodríguez, J.V., Jorge-Herrero, E., Rojo, F.J., Guinea, G.V. ve Mata-Mata, J.L., *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 1241–1248.
- Michel, M., L’Heureux, N., Pouliot, R., Xu, W., Auger, F.A. ve Germain, L., *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 35 (1999) 318-326.
- Mirsadraee, S., Wilcox, H.E., Korossis, S.A., Kearney, J.N., Watterson, K.G., Fisher, J. ve Ingham, E., *Tissue Engineering*, 12(4) (2006) 763-773.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S. ve Mori, H., *Nature Medicine*, 12(4) (2006) 459-465.
- Molyneux, C.A., Glyn, M.C. ve Ward, B.J., *Microvascular Research*, 64 (2002) 265–277.
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W. and Anderson, R.H., *Heart* 89 (2003) 806–814.
- Moroni, F. ve Mirebella, T., *American Journal of Stem Cells* 3(1) (2014) 1-20.
- Murdoch, C.E., Chaubey, S., Zeng, L., Yu, B., Ivetic, A., Walker, S.J., Vanhoutte, D., Heymans, S., Grieve, D.J., Cave, A.C., Brewer, A.C., Zhang, M., Shah, A.M., *Journal of the American College of Cardiology*, 63(24) (2014) 2734-2741.
- Nakamura, A., Akahane, M., Shigematsu, H., Tadokoro, M., Morita, Y., Ohgushi, H., Dohi, Y., Imamura, T. ve Tanaka, Y., *Bone*, 46 (2010) 418–424.
- Narayanan, A.S., Page, R.C. ve Swanson, J., *Biochemical Journal*, 260 (1989) 463-469.
- Narmoneva, D.A., Vukmirovic, R., Davis, M.E., Kamm, R.D. ve Lee, R.T., *Circulation* 110(8) (2004) 962–968.
- Nartprayut, K., U-Pratya, Y., Kheolamai, P., Manochantr, S., Chayosumrit, M., Issaragrisil, S. ve Supokawej, A., *Molecular Medicine Reports* 7 (2013) 1465-1469.
- Naughton, G.K., Jacob, L. ve Naughton, B.A., in *Alternative Methods in Toxicology*, Goldberg, A.M. (Eds.), Volume 7, Mary Ann Lieberts, New York, 1989.
- Neofytou, E.A., Chang, E., Patlola, B., Joubert, L.M., Rajadas, J., Gambhir, S.S., Cheng, Z., Robbins, R.C. ve Beygui, R.E., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 8(3) (2011) 9383-9393.
- Ng, S.L.J., Narayanan, K., Gao, S. ve Wan, A.C.A., *Biomaterials* 32 (2011) 7571-7580.
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T. ve Tano, Y., *New England Journal of Medicine*, 351 (2004) 1187-1196.

- Nishida, M., Springhorn, J.P., Kelly, R.A. ve Smith, T.W., *Journal of Clinical Investigation*, 91 (1993) 1934-1941.
- Niyaz, M., Gürpınar, Ö.A., Günaydin, S. ve Onur, M.A., *Turkish Journal of Biology* 36 (2012) 658-664.
- Oberwallner, B., Brodarac, A., Choi, Y.H., Saric, T., Anić, P., Morawietz, L. ve Stamm, C., *Journal of Biomedical Materials Research A*, 102(9) (2014) 3263-3272.
- Ohki, T., Yamato, M., Ota, M., Takagi, R., Murakami, D., Kondo, M., Sasaki, R., Namiki, H., Okano, T. ve Yamamoto, M., *Gastroenterology* 143 (2012) 582–588.
- Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S.K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I. ve Taylor, D.A., *Nature Medicine*, 14(2) (2008) 213-221.
- Ovalle, W.K. ve Nahirney, P.C. (Eds.), *Netter's Essential Histology*, 2nd Edition, Elsevier Health Sciences, Philadelphia, Chapter 4, 2013.
- Owaki, T., Shimizu, T., Yamato, M. ve Okano, T., *Biotechnology Journal*, 9 (2014) 904-914.
- Paschos, N.K., Brown, W.E., Eswaramoorthy, R., Hu, J.C. ve Athanasiou, K.A., *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9 (2015) 488–503.
- Patnaik, S.S., Wang, B., Weed, B., Wertheim, J.A. ve Liao, J., in *Tissue Regeneration: Where Nano-Structure Meets Biology*, Liu, Q. ve Wang, H. (Eds.), Volume 2, World Scientific, Singapore, Chapter 3, 2013.
- Patten, V.A., Chabaesele, I., Sishi, B. ve Van Vuuren D., *SAHeart* 14(2) (2017) 96-107.
- Pecha, S., Eschenhagen, T. and Reichenspurner, H., *Journal of Heart and Lung Transplantation* 35 (2016) 294–298.
- Perea-Gil, I., Uriarte, J.J., Prat-Vidal, C., Gálvez-Montón, C., Roura, S., Lluçà Valdeperas, A., Soler-Botija, C., Farré, R., Navajas, D., Bayes-Genis, A., *American Journal of Translational Research* 7(3) (2015) 558-573.
- Pereira, S.L., Ramalho-Santos, J., Branco, A.F., Sardão, V.A., Oliveira, P.J. ve Carvalho, R.A., *Cardiovascular Toxicology* 11 (2011) 180–190.
- Potdar, P.D. ve Prasannan, P., *ISRN Stem Cells*, Volume 2013:687282, (2013) 9 pp.
- Preda, M.B., Rosca, A.M., Tutuianu, R. ve Burlacu, A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464 (2015) 667-673.
- Qian, Q., Qian, H., Zhang, X., Zhu, W., Yan, Y., Ye, S., Peng, X., Li, W., Xu, Z., Sun, L. ve Xu, W., *Stem Cells and Development*, 21(1) (2012) 67-75.
- Rajabi-Zeleti, S., Jalili-Firoozinezhad, S., Azarnia, M., Khayyatan, F., Vahdat, S., Nikeghbalian, S., Khademhosseini, A., Baharvand, H. ve Aghdami, N., *Biomaterials* 35 (2014) 970-982.
- Rana, D., Zreiqat, H., Benkirane-Jessel, N., Ramakrishna, S. ve Ramalingam, M.,

- Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 11(4) (2017) 942-965.
- Rangappa, S., Fen, C., Lee, E.H., Bongso, A. ve Wei, E.S.K., *Annals Thoracic Surgery*, 75 (2003) 775–779.
- Reis-Mendes, A., Alves, M., Carvalho, F., Remião, F., Bastos, M.L., Costa, V.M., *Interdisciplinary Toxicology*, 11(1) (2018) 13–21.
- Ricotti, L., Polini, A., Genchi, G.G., Ciofani, G., Iandolo, D., Vazão, H., Mattoli, V., Ferreira, L., Menciassi, A. ve Pisignano, D., *Biomedical Materials*, 7(3):035010 (2012) doi: 10.1088/1748-6041/7/3/035010.
- Robertson, F.M., Ogasawara, M.A., Ye, Z., Chu, K., Pickei, R., Debeb, B.G., Woodward, W.A., Hittelman, W.N., Cristofanilli, M., ve Barsky, S.H., *Journal of Biomolecular Screening*, (2010) 820-829.
- Robinson, K.A., Li, J., Mathison, M., Redkar, A., Cui, J., Chronos, N.A.F., Matheny, R.G. and Badylak, S.F., *Circulation*. 112[suppl I] (2005) I-135–I-143.
- Rodgers, B.D., Interlichia, J.P., Garikipati, D.K., Mamidi, R., Chandra, M., Nelson, O.L., Murry, C.E. ve Santana, L.F., *Journal of Physiology*, 587 (2009) 4873–4886.
- Rössig, L., Hoffmann, J., Hugel, B., Mallat, Z., Haase, A., Freyssinet, J.M., Tedgui, A., Aicher, A., Zeiher, A.M. ve Dimmeler, S., *Circulation*, 104 (2001) 2182-2187.
- Ruan, Z.B., Zhu, L., Yin, Y.G., Chen, G.C., *Indian Journal of Medical Sciences*, 64(9) (2010) 402-407.
- Safwani, W.K.Z.W., Makpol, S., Sathapan, S. ve Chua, K.H., *Journal of Negative Results in BioMedicine*, 11:3 (2012) 9pp.
- Sakaguchi, K., Hinata, Y., Kagawa, Y., Iwasaki, K., Tsuneda, S., Shimizu, T. ve Umezu, M., *Biochemistry and Biophysics Reports* 14 (2018) 89–97.
- Sakaguchi, K., Shimizu, T. ve Okano, T., *Journal of Controlled Release*, 205 (2015) 83-88.
- Sakaguchi, K., Shimizu, T., Horaguchi, S., Sekine, H., Yamato, M., Umezu, M. ve Okano, T., *Scientific Reports*, 3:1316 (2013), 7 pp.
- Saldin, L.T., Cramer, M.C., Velankar, S.S., White, L.J. ve Badylak, S.F., *Acta Biomaterialia* 49 (2017) 1–15.
- Sanchez, P.L., Fernandez-Santos, M.E., Costanza, S., Climent, A.M., Moscoso, I., Gonzalez-Nicolas, M.A., Sanz-Ruiz, R., Rodríguez, H., Kren, S.M., Garrido, G., Escalante, J.L., Bermejo, J., Elizaga, J., Menarguez, J., Yotti, R., a, Perez del Villar, C., Espinosa, M.A., Guillem, M.S., Willerson, J.T., Bernad, A., Matesanz, R., Taylor, D.A. and Fernandez-Aviles, F., *Biomaterials* 61 (2015) 279-289.
- Sarig, U., Au-Yeung, G.C.T., B Wang, Y., Bronshtein, T., Dahan, N., Boey, F.Y.C., Venkatraman, S.S. ve Machluf, M., *Tissue Engineering: Part A*, 18(19-20) (2012) 2125-2137.

- Sawa, Y., Miyagawa, S., Sakaguchi, T., Fujita, T., Matsuyama, A., Saito, A., Shimizu, T. ve Okano, T., *Surgery Today*, 42 (2012) 181–184.
- Seif-Naraghi, S.B. ve Christman, K.L., in *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy*, Goldenberg, R.C.S. ve Carvalho, A.C.C. (Eds.), Elsevier, United States, Chapter 3, 2013.
- Seif-Naraghi, S.B., Salvatore, M.A., Schup-Magoffin, P.J., Hu, D.P. ve Christman, K.L., *Tissue Engineering: Part A* 16(6) (2010) 2017-2027.
- Sekine, H., Shimizu, T., Dobashi, I., Matsuura, K., Hagiwara, N., Takahashi, M., Kobayashi, E., Yamato, M. ve Okano, T., *Tissue Engineering Part A*, 17(23-24) (2011) 2973-2982.
- Sekine, H., Shimizu, T., Hobo, K., Sekiya, S., Yang, J., Yamato, M., Kurosawa, H., Kobayashi, E. ve Okano, T., *Circulation*, 118 (2008) 145–152.
- Sekine, H., Shimizu, T., Kosaka, S., Kobayashi, E., ve Okano, T., *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 25 (2006a) 324 –332.
- Sekine, H., Shimizu, T., Yang, J., Kobayashi E. ve Okano, T., *Circulation*, 114 suppl (2006b) I-87-I-93.
- Sekiya, S., Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A. ve Okano, T., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341 (2006) 573–582.
- Shahabipour, F., Banach, M., Johnston, T.P., Pirro, M. and Sahebkar, A., *International Journal of Cardiology* 228 (2017) 319–326.
- Shao, Y., Yu, Y., Pei, C.G., Zhou, Q., Liu, Q.P., Tan, G., Li, J.M., Gao, G.P. ve Yang, L., *International Journal of Ophthalmology* 5(4) (2012) 415-418.
- Shen, H., Wang, Y., Zhang, Z., Yang, J., Hu, S. ve Shen, Z., *Stem Cells International* 2015:524756. (2015) doi: 10.1155/2015/524756.
- Shevach, M., Soffer-Tsur, N., Fleischer, S., Shapira, A. ve Dvir, T., *Biofabrication* 6 (2014) 024101 (12pp).
- Shikhaliyeva, İ., *Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının Bor Katkılı Hap-Kaplı Kitosan Doku İskelelerinde İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.
- Shimizu, T., *Circulation Journal*, 78 (2014) 2594-2603.
- Singla, D.K., Long, X., Glass, C., Singla, R.D. ve Yan, B., *Molecular Pharmaceutics*, 8 (2011) 8 1573–1581.
- Song, Y.H., Gehmert, S., Sadat, S.S., Pinkernell, K., Bai, X., Matthias, N., Alt, E., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354 (2007) 999–1003.
- Sonnaert, M., Papantoniou, I., Luyten, F.P. ve Schrooten, J., *Tissue Engineering: Part C*, 21(6) (2015) 519-529.

- Steffens, D., Braghirolli, D.I., Maurmann, N. ve Pranke, P., *Drug Discovery Today* 23(8) **(2018)** 1474-1488.
- Strem, B.M., Zhu, M., Alfonso, Z., Daniels, E.J., Schreiber, R., Begyui, R., MacLellan, W.R., Hedrick, M.H. ve Fraser, J.K., *Cytotherapy*, 7(3) **(2005)** 282-291.
- Sumi, D., Abe, K. ve Himeno, S., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436 **(2013)** 175–179.
- Tachida, Y., Suda, K., Nagase, H., Shimada, K., Isono, F. and Kobayashi, H., *Biochemistry and Biophysics Reports* 7 **(2016)** 266–272.
- Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Hida, N., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S. ve Umezawa, A., *Journal of Gene Medicine*, 6 **(2004)** 833–845.
- Tan, M.Y., Zhi, W., Wei, R.Q., Huang, Y.C., Zhou, K.P., Tan, B., Deng, L., Luo, J.C., Li, X.Q., Xie, H.X. ve Yang, Z.M., *Biomaterials* 30 **(2009)** 3234–3240.
- Tang, Z. ve Okano, T., *Regenerative Biomaterials*; **(2014)** 91–102.
- Tao, H., Nuo, M. ve Min, S., *Cytotechnology* 70(1) **(2018)** 169-176.
- Taylor, D.A., Sampaio, L.C., Ferdous, Z., Gobin, A.S. ve Taite, L.J., *Acta Biomaterialia* 74 **(2018)** 74–89.
- Trottier, V., Marceau-Fortier, G., Germain, L., Vincent, C. ve Fradette, J., *Stem Cells*, 26 **(2008)** 2713–2723.
- Üçgül, İ. and Aras, S., *ANKA e-dergi*, 2(2) **(2017)** 19-34.
- Ülger, H., Karabulut, A.K. ve Pratten, M.K., *Anatomia Histologia Embryologia*, 31 **(2002)** 31-35.
- Valarmathi, M.T., Goodwin, R.L., Fuseler, J.W., Davis, J.M., Yost, M.J. ve Potts, J.D., *Biomaterials* 31 **(2010)** 3185–3200.
- Valiente-Alandi, I., Schafer, A.E. and Blaxall, B.C., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 91 **(2016)** 228–237.
- Van Vleet, J.F., Ferrans, V.J. and Herman, E. in *Handbook of Toxicologic Pathology*, Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.A (Eds.), Second Edition, Volume 2, Academic Press, **2002**.
- Vermette, M., Trottier, V., Menard, V., Saint-Pierre, L., Roy, A. ve Fradett, J., *Biomaterials*, 28 **(2007)** 2850–2860.
- Vunjak-Novakovic, G., Tandon, N., Godier, A., Maidhof, R., Marsano, A., Martens, T.P., ve Radisic, M., *Tissue Engineering: Part B* 16(2) **(2010)** 169-187.
- Wakitani, S., Saito, T. ve Caplan, A. I., *Muscle & Nerve*, 18(12) **(1995)** 1417–1426.
- Wan, L., Chen, Y., Wang, Z., Wang, W., Schnull, S., Dong, J., Xue, S., Imboden, H. ve Li, J., *Scientific Reports* | 7:39988 **(2017)**.
- Wang, B., Borazjani, A., Tahai, M., de Jongh Curry, A.L., Simionescu, D.T., Guan, J.,

- To, F., Elder, S.H., ve Liao, J., *Journal of Biomedical Material Research Part A*: 94A (2010) 1100–1110.
- Wang, L., Chen, Q., Li, G. ve Ke, D., *Peptides* 33 (2012) 92–100.
- Watkins, S.J., Borthwick, G.M. ve Arthur, H.M., *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 47 (2011) 125–131.
- Wei, F.L., Qu, C.Y., Song, T.L., Ding, G., Fan, Z.P., Liu, D.Y., Liu, Y., Zhang, C.M., Shi, S. ve Wang, S.L., *Journal of Cellular Physiology*, 227(9) (2012) 3216–3224.
- Weinhaus, A.J. and Roberts, K.P. in *Handbook Of Cardiac Anatomy, Physiology, And Devices*, Iaizzo, P.A. (Eds.), Volume 2, Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 4, 2005.
- Williams, C., Quinn, K.P., Georgakoudi, I. ve Black III, L.D., *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 194–204.
- Williams, C., Sullivan, K. ve Black III, L.D., *Advanced Healthcare Materials*, 4 (2015) 1545–1554.
- Witek, P., Korga, A., Burdan, F., Ostrowska, M., Nosowska, B., Iwan, M., Dudka, J., *Cytotechnology* 68(6) (2016) 2407–2415.
- Xiao, X., Xu, S., Li, L., Mao, M., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Ye, F. ve Huang, L., *Frontiers in Pharmacology* 8:601 (2017) doi: 10.3389/fphar.2017.00601
- Xu, H., Xu, B., Yang, Q., Li, X., Ma, X., Xia, Q., Zhang, Y., Zhang, C., Wu, Y. ve Zhang, Y., *PLoS One*. 24;9(1):e86723 (2014) doi:10.1371/journal.pone.0086723.
- Yamaguchi, N., Isomoto, H., Kobayashi, S., Kanai, N., Kanetaka, K., Sakai, Y., Kasai, Y., Takagi, R., Ohki, T., Fukuda, H., Kanda, T., Nagai, K., Asahina, I., Nakao K., Yamato, M., Okano, T. ve Eguchi, S., *Scientific Reports*, 7:17460 (2017) Doi:10.1038/s41598-017 17663-w
- Yamamoto, K., Yamato, M., Morino, T., Sugiyama, H., Takagi, R., Yaguchi, Y., Okano, T. ve Kojima, H., *npj Regenerative Medicine* 2(6) (2017) doi:10.1038/s41536-017-0010-7
- Yamato, M. ve Okano, T., *Materials Today*, 7 (2004) 42–47.
- Yan, J., Zhang, C., Zhao, Y., Cao, C., Wu, K., Zhao, L. ve Zhang, Y., *Biomaterials*, 35 (2014) 7734–7749.
- Yanamandala, M., Zhu, W., Garry, D.J., Kamp, T.J., Hare, J.M., Jun, H.W., Yoon, Y.S., Bursac, N., Prabhu, S.D., Dorn II, G.W., Bolli, R., Kitsis, R.N. ve Zhang, J. *Journal of The American College of Cardiology* 70 (2017) 766–775.
- Ye, X., Wang, H., Gong, W., Li, S., Li, H., Wang, Z. ve Zhao, Q., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27:70 (2016) 8 pp.

- Yeh, T.S., Fang, Y.H.D., Lu C.H., Chiu, S.C., Yeh C.L., Yen, T.C., Parfyonova, Y. ve Hu, Y.C., *Biomaterials*, 35 (2014) 174-184.
- Yu, J., Tu, Y.K., Tang, Y.B. ve Cheng, N.J., *Biomaterials*, 35 (2014) 3516-3526.
- Zaffran, S., El Robrini, N. ve Bertrand, N., *Journal of Developmental Biology*, 2 (2014) 50-71.
- Zeng, B., Tong, S., Ren, X. ve Xia, H., *Cytotechnology* (2016) 68:763–770.
- Zhang, H., Yu, N., Zhou, Y., Ma, H., Wang, J., Ma, X., Liu, J., Huang, J. ve An, Y., *Tissue and Cell*, 48 (2016) 488–495.
- Zhang, Y., Chu, Y., Shen, W. ve Dou, Z., *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 9 (2009) 943–946.
- Zhang, Y., Li, H., Wei, R., Ma, J., Zhao, Y., Lian, Z., Liu, Z., *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35 (2015) 1808-1820.
- Zhou, T., Zhou, Z., Zhou, S. ve Huang, F., *Analytical Methods*, 8 (2016) 488–495.
- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X. ve Cui, Z., *Cell Biochemistry and Function*, 26 (2008) 664–675.
- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Ning, R., Ma, X. ve Cui, Z., *Molecular and Cellular Biochemistry*, 324 (2009) 117–129.
- Zimmermann, W-H., Melnychenko, I. ve Eschenhagen, T., *Biomaterials* 25 (2004) 1639- 1647.

EK 1



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.05.08.007
Sayı: 52338575 - 48

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 14.04.2015 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2015/04
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2015/24
KARAR NUMARASI	: 2015/24-09
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Merve Çapkın YURTSEVER
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Gökçe KAYNAK
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	: 48 adet wistar albino
SAYISI	

Üniversitemiz Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'nun araştırma yürütücüsü olduğu 2015/24 kayıt numaralı *"Hücrelerinden Arındırılmış Miyokardiyal Doku ile Hücre Tabakası Destekli Kalp Yaması Geliştirilmesi: İn-Vitro ve İn Vivo Çalışmalar"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ

: 14.04.2015 (SALI)

TOPLANTI SAYISI

: 2015/04

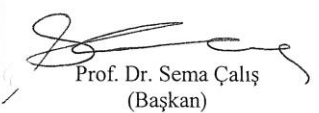
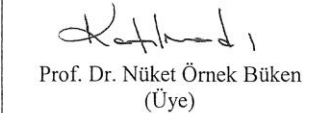
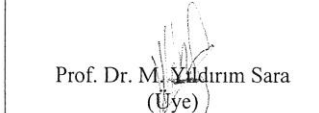
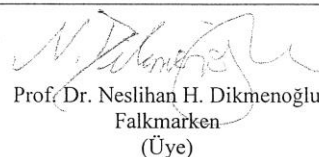
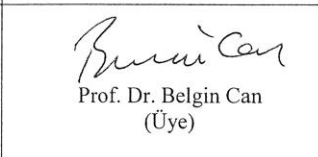
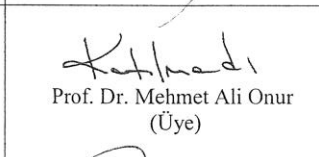
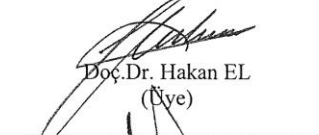
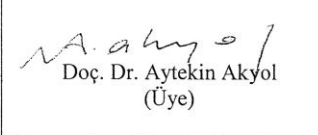
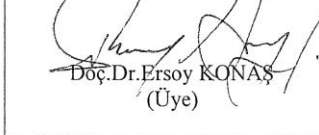
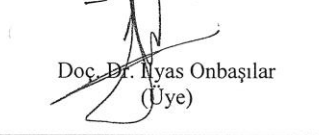
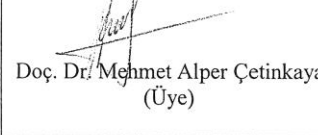
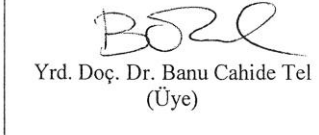
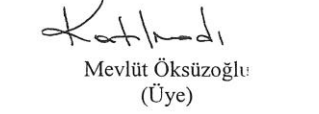
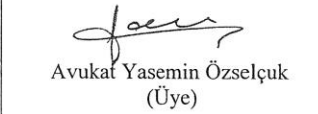
TOPLANTI SAATİ

: 14.00

Gündem	Karar
1. 2015/29 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL)	Oy birliği ile kabul edilmiştir. Tez çalışacak kişinin deneylere başlayınca caya kadar deney hayvanı kullanımı sertifikası alınacaktır.
2. 2015/30 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Doç. Dr. Ersoy KONAŞ)	Proje oy birliği ile kabul edilmiştir. Tez çalışacak kişinin deneylere başlayınca caya kadar deney hayvanı kullanımı sertifikası alınacaktır.
3. 2015/31 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Prof. Dr. Yıldırım SARA)	Proje kabul edilmiştir. Tez çalışacak... (Aynısı)
4. 2015/32 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR)	Proje oy birliği ile kabul edilmiştir.
5. 2015/33 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Doç. Dr. Aytekin AKYOL)	Proje oy birliği ile kabul edilmiştir. Tez çalışacak kişinin deneylere başlayınca caya kadar deney hayvanı kullanımı sertifikası alınacaktır.
6. 2015/34 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Prof. Dr. Neslihan DİKMENOĞLU FALKMARKEN)	Proje oy birliği ile kabul edilmiştir. Tez çalışacak kişinin deneylere başlayınca caya kadar deney hayvanı kullanımı sertifikası alınacaktır.
7. 2015/35 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA)	Çeşitli düzeltmelerin yapılmasında sonra ilkönce gündeme alınacaktır.
8. 2015/36 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR)	Proje oy birliği ile kabul edilmiştir. Prof. Dr. Sara Alın Fikar çalışması nedeniyle tez ayları ve gündeme alınacaktır.

9.	2015/03 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL)	Tekrar Değerlendirme: Proje ay birliği ile kabul edilmiştir. Pilot çalışma yapılması uygun bulunmuştur.
10.	2015/24 dosya kayıt numaralı başvurunun görüşülmesi. (Raportör Prof. Dr. Yıldırım SARA)	Tekrar Değerlendirme: Proje ay birliği ile kabul edilmiştir.
11.	311, 312, 313 ve 314 nolu sertifika taleplerinin görüşülmesi.	311, 312, 313 ve 314 Numaralı Sertifika talepleri görüşülür ve uygun bulunmuştur.

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
TOPLANTI TARİHİ : 14.04.2015 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2015/04
TOPLANTI SAATİ : 14.00

 Prof. Dr. Sema Çalış (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)	 Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)
 Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoglu Falkmarken (Üye)	 Prof. Dr. Belgin Can (Üye)	 Prof. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)
 Doç. Dr. Hakan EL (Üye)	 Doç. Dr. Aytekin Akyol (Üye)	 Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
 Doç. Dr. Niyas Onbaşlılar (Üye)	 Doç. Dr. Mehmet Alper Çetinkaya (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel (Üye)
 Mevlüt Öksüzoglu (Üye)	 Avukat Yasemin Özselçuk (Üye)	



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 101

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 26.09.2017 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2017/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2015/24
KARAR NUMARASI	: 2015/24 -04 (Onay Tarihi: 14.04.2015)
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Dr. Gökçe Kaynak BAYRAK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	
SAYISI	: 48 Adet Wistar Albino (7-12 Ay)

Kurulumuzun 14.04.2015 tarihli toplantısında onaylanmış olan 2015/24 kayıt numaralı *“Hücrelerinden Arındırılmış Miyokardiyal Doku ile Hücre Tabakası Destekli Kalp Yaması Geliştirilmesi: İn-Vitro ve İn Vivo Çalışmalar”* başlıklı projeniz için vermiş olduğunuz 19.09.2017 tarihli dilekçeniz, Kurulumuzun 26.09.2017 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, Yrd. Doç. Dr. Merve Çapkin YURTSEVER’ in proje ekibinden ayrılması, proje başlığının *“Hücrelerinden Arındırılmış Miyokardiyal Doku ile Hücre Tabakası Destekli Kalp Yaması Geliştirilmesi: İn-Vitro Çalışmalar”* olarak değiştirilmesi ve projenin 14.04.2019 tarihine kadar geçerli olması nedeni ile Etik Kurul izninin güncellenmesi talebiniz uygun bulunmuş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Başkan



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
~~YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU~~

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/02/2019

Tez Başlığı / Konusu: HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMIŞ MİYOKARDİYAL DOKU İLE HÜCRE TABAKASI DESTEKLİ KALP YAMASI GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 149 sayfalık kısmına ilişkin, 19/02/2019 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dahil~~
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Gökçe KAYNAK BAYRAK
Öğrenci No: N12142427
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı:
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

19.02.2019

Gökçe Kaynak

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Menemşe G

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı	Gökçe KAYNAK BAYRAK
Doğum Yeri	Aydın
Medeni Hali	Evli
E-Posta	gokce.kaynak88@gamil.com
Adresi	Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

Eğitim

Lise	Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi (2006)
Lisans	Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü (2010)
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı (2012)
Doktora	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı (2019)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce	İleri derece
Almanca	Başlangıç

Deneyim Alanları

- Hayvan hücre kültürü teknikleri, kök hücreler ve farklılaştırma protokolleri.
- Polimerik, seramik ve kompozit biyomalzemelerin üretilmesi, karakterizasyonları ve doku mühendisliği amaçlı kullanımları.
- Nanopartikül üretimi ve karakterizasyonu ile kontrollü salım sistemlerinin kullanımı.
- Hücre tabaka teknolojisi
- Hücresizleştirilmiş doku iskeleleri
- Primer yağ doku ve kemik iliği kökenli kök hücre izolasyonu
- Deney hayvanı kullanımı
- Histolojik ve immünofloresan boyama yöntemleri
- Kriyostat ve mikrotom kullanımı

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

- Hacettepe Üniversitesi Kapsamlı Araştırma Projesi Proje No: FBA-2017-16248 Hücrelerinden Arındırılmış Miyokardiyal Doku ile Hücre Tabakası Destekli Kalp Yaması Geliştirilmesi : *İn-Vitro* Çalışmalar 2017, Proje bütçesi 188.462,70 TL

Diğer Projeler

- Beyin Tümörü Hedeflenmiş Salinomisin Yüklü Nanopartiküllerin Geliştirilmesi, Proje yürütücüsü Doç Dr. Seda Tıǧlı Aydın, TÜBİTAK, Proje No: 112M021, 2013.
- Mikrodalga-desteǧi ile Biyomimetik Hidroksiapatit (Hap)/Bor-katkılı Hap Oluşumu ve Kitosan-Hap Kemik Doku İskelelerinin Geliştirilmesi, Proje yürütücüsü Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioǧlu, TÜBİTAK, Proje No: 112M705, 2015.
- Kitosan/Biyomimetik Nano Hidroksiapatit Doku İskelesinin Diş Pulpa-Dentin Kompleksinin Rejenerasyonunda Kullanılması, Proje yürütücüsü Prof. Dr. Arlin Kiremitçioǧlu, TÜBİTAK, Proje No: 114S755, 2016.
- Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin 3 Boyutlu Hidrojellerde Kahverengi ve Beyaz Adipoz Dokuya Farklılaşmalarının İncelenmesi, Proje yürütücüsü Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioǧlu, Hacettepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Grubu, Yüksek Lisans Tez Projesi, Proje ID: 17299, 2019.
- Periferik sinir defekt onarımında biyolojik konduit modeli: De-epitelize insan amniyotik membranı ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücre içeren sinir konduit modelinin sinir iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi, Proje yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Mert ÇALIŞ, TÜBİTAK 1001 Projesi değerlendirme aşamasında.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. Construction of Cardiomyoblast Sheets With Three Ways For Cardiac Tissue Repair (Başvuru aşamasında)
2. Cardiovascular Tissue Fabrication with Cell Sheet Technology (Hazırlık aşamasında)
3. *In Vitro* Cardiac Patch Model Development With Cardiovascular Cell Sheet Supported Decellularized Myocardial Tissue (Hazırlık aşamasında)

Diğer Yayınlar

1. Demirtaş T. T., Kaynak G., Gümüşderelioǧlu M., Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation. *Materials Science and Engineering C* 49; 713–719, 2015.
2. Gümüşderelioǧlu M., Tunçay E. Ö., Kaynak G., Demirtaş T.T., Tıǧlı Aydın S., Hakkı S.S., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128, 2015.

3. Aydın Tıǧlı R. S., Kaynak G., Gümüşderelioǧlu M. Salinomycin encapsulated nanoparticles as a targeting vehicle for glioblastoma cells, J Biomed Mater Res Part A, 104(2):455-64, 2016.
4. Kaynak Bayrak G., Demirtaş T.T., Gümüşderelioǧlu M. Microwave-induced Biomimetic Approach for Hydroxyapatite Coatings of Chitosan Scaffolds. Carbohydrate Polymers 157:803-813, 2017.
5. Asghari Sana F., Çapkın Yurtsever M., Kaynak Bayrak G., Tunçay Ö. E., Kiremitçi A., Gümüşderelioǧlu M., Spreading and Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Chitosan Scaffolds Immobilized with RGD or Fibronectin, Cytotechnology, 69(4):617-630, 2017.

Popüler Bilim Dergilerindeki Makaleler

1. Gümüşderelioǧlu, M., Kaynak, G., Mikrodalgalar ve uygulamaları, Bilim ve Teknik Dergisi, Temmuz, 38-42. 2012.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Kaynak Bayrak G., Bozoglu U., Gümüşderelioǧlu M.. Fabrication of Cardiomyoblast Cell Sheets by a Simple Method for Cardiac Tissue Treatment. Biomed 2015, Antalya-Türkiye, 22-24 Ekim 2015 (Poster, Biomed 2015 Abstract Book P65, 190 pp.).

Diğer Sunumlar

1. **Kaynak G.**, Demirtaş T. T., Gümüşderelioǧlu M., Synthesis and Characterization of Bone Like Hydroxyapatite in 10x SBF Like Solution Using Microwave Irradiation, Biomed 2011, Ankara- Türkiye, 23-25 Kasım 2011 (Poster, P31, Biomed 2011 Abstract Book 80 pp.).
2. **Kaynak G.**, Tıǧlı A. S., Gümüşderelioǧlu M., Determination of Salinomycin Effective Dose for Glioblastoma Cells, Termis-Eu 2013, İstanbul-Türkiye, 17-20 Haziran 2013 (Poster, TERMIS EU 2013 Tissue Engineering and Regenerative Medicine Abstract Book, 15 pp.)
3. **Kaynak G.**, Demirtaş T. T., Gümüşderelioǧlu M., Microwave-Assisted Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite Coated Chitosan/HA Scaffolds for Bone Tissue Engineering, 25th European Conference on Biomaterials and 10th Young Scientific Forum, Madrid- İspanya, 8-12 Eylül 2013 (**Poster, T5P050, Abstract 00748, 2013 Rudolf Cimdins öğrenci burs ödülü**).
4. Gümüşderelioǧlu M., Tunçay E.Ö., **Kaynak G.**, Demirtaş T.T., Tıǧlı Aydın S., Hakkı S.S., Development of Boron-doped Tissue Scaffolds for Bone Regeneration, Genova-İtalya, TERMIS/EU 2014, 10-13 Haziran 2014 (Poster, P527, J Tissue Eng Regen Med 2014; 8 (Suppl. 1): 207–518., 509-510 pp).

5. Asghari Sana F., **Kaynak G.**, Çapkın Yurtsever M., Tuncay E.O., Kiremitçi A., Gümüşderelioğlu M., Nano-scale Interactions Of Human Dental Pulp Stem Cells On Fibronectin Immobilized Chitosan Scaffolds, 10. Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İstanbul- Türkiye, 17-21 Haziran 2014 (**Poster**, NANOTR10 Abstract Book 292 pp., **ikincilik ödülü**)
6. Asghari Sana F., **Kaynak G.**, Çapkın Yurtsever M., Kiremitçi A., Gümüşderelioğlu M., Applications of nanoscale Technologies for regenerative dentistry, Kış Island- İran, ANFC 2015, 8-11 Mart 2015 (Poster, ANFC2015 Abstract Book 15 pp.).
7. Asghari Sana F., **Kaynak G.**, Çapkın Yurtsever M., Tuncay E.O., Kiremitçi A., Gümüşderelioğlu M., Pulp–Dentin Complex Regeneration by Boron Doped Biomimetic Nano Hydroxyapatite Coated Chitosan Scaffolds 27th European Conference on Biomaterials, Kraków-Poland, 30 August - 3 September 2015 (Poster).
8. **Kaynak Bayrak G.**, Bozoglu U., Gümüşderelioğlu M.. Fabrication of Cardiomyoblast Cell Sheets by a Simple Method for Cardiac Tissue Treatment. Biomed 2015, Antalya-Türkiye, 22-24 Ekim 2015 (Poster, Biomed 2015 Abstract Book P65, 190 pp.).
9. Karanfil A. S., **Kaynak Bayrak G.**, Gümüşderelioğlu M., Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin 3b Hidrojellerde Kahverengi Adipoz Dokuya Farklılaşmalarının İncelenmesi, İstanbul-Türkiye, 15-16 Aralık 2018 (Poster, Biomed 2018 Abstract Book P020, 66 pp.).

Katılınan Kongre, Sempozyum, Çalıştay ve Sertifika Eğitimleri

1. IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, İzmir- Türkiye, 15- 18 Ekim 2008.
2. I. Kök Hücre Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET), İzmir- Türkiye, 16 Mart 2009.
3. Vth International Bioengineering Congress, İzmir- Türkiye, 16-19 Haziran 2010.
4. II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, Ankara- Türkiye, 24-25 Haziran 2011.
5. ‘Novel Approaches on Biological Engineering Workshop’ Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Ankara- Türkiye, 8 Eylül 2011.
6. 17th International Biomedical Science & Technology Symposium Biomed 2011, Ankara- Türkiye, 23-25 Kasım 2011.
7. QIAGEN SABioscience PCR Array Semineri, Ankara- Türkiye, 30 Mart, 2012.
8. İncekaralar Olympus Mikroskopi Semineri, Ankara- Türkiye, 29 Mayıs 2012.
9. TMMOB Kimya Mühendisleri Odası ‘Doğru ve Güvenilir Deney Sonuçlarının Elde Edilmesi ve Sonuçların Verilme Şekli’ Semineri, Ankara- Türkiye, 14 Mart 2013.
10. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2013), İstanbul- Türkiye, 17-20 Haziran 2013.

11. 25th European Conference on Biomaterials and 10th Young Scientific Forum, Madrid-İspanya, 8-12 Eylül 2013.
12. Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi ‘Kök Hücre Günü 2013 Toplantısı’, Ankara-Türkiye, 8 Kasım 2013.
13. Springer Author Workshop ‘How to publish a scientific journal article’, Ankara-Türkiye, 27 Mayıs 2014.
14. Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü ‘Laboratuvar Güvenliği Eğitimi’, Ankara-Türkiye, 2 Temmuz 2014.
15. Advanced Technologies on Health Sciences Symposium, Ankara-Türkiye, 15-16 Eylül 2014.
16. TÜBA-Kök Hücre Tedavilerine Güncel Yaklaşımlar Sempozyumu, Ankara-Türkiye, 20 Ekim 2015.
17. Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Komitesi Laboratuvar Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ankara-Türkiye, 23 Ağustos 2016.
18. TÜBİTAK ARDEB 1000 - Üniversitelerin Araştırma ve Geliştirme Potansiyelinin Artırılmasına Yönelik Destek Programı kapsamında, Hacettepe Üniversitesi “Biyomalzemeler” Alanı Ar-Ge Strateji Belgesi’nin hazırlanması çalışmalarına yönelik çalıştay, Ankara-Türkiye, 05 Aralık 2016.
19. TÜBİTAK ARDEB 1000 - Üniversitelerin Araştırma ve Geliştirme Potansiyelinin Artırılmasına Yönelik Destek Programı kapsamında, Hacettepe Üniversitesi ‘Rejeneratif ve Restoratif’ Tıp Alanı Ar-Ge Strateji Belgesi’nin hazırlanması çalışmalarına yönelik çalıştay, Ankara-Türkiye, 16 Aralık 2016.