

**KONJENİTAL SEPTAL DEFEKTLERİN ONARIMINA
YÖNELİK PERİKARD BAZLI REJENERATİF
KARDİYAK YAMALARIN DOKU MÜHENDİSLİĞİ
YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF PERICARDIUM BASED
REGENERATIVE CARDIAC PATCHES BY TISSUE
ENGINEERING APPROACH TO REPAIR CONGENITAL
SEPTAL DEFECTS**

ŞÜKRÜ ÖZTÜRK

PROF. DR KEZBAN ULUBAYRAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

KONJENİTAL SEPTAL DEFEKTLERİN ONARIMINA YÖNELİK PERİKARD BAZLI REJENERATİF KARDİYAK YAMALARIN DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLMESİ

Şükrü ÖZTÜRK

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Haziran 2021, 196 sayfa

Kardiyak yamalar konjenital kalp hastalıklarının ve miyokardiyal enfarktüs (MI) tedavisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte henüz ideal bir kalp yaması geliştirilmemiştir. Bu tez kapsamında konjenital septal defektler, MI onarımı gibi çeşitli kardiyak doku hasarlarında kullanılmak üzere rejeneratif kardiyak yamaların doku mühendisliği yöntemi ile geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla tez çalışmasının birinci bölümünde sıçan kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücreler (rt-MKH) aselüler perikard dokusuna ekilerek 10 μ M 5-Azasitidine (5-Aza) maruz bırakılmış ve kalp atımının mekanik ve elektriksel uyarımlarla taklit edildiği biyomimetik biyoreaktör sisteminde kültür edilmiştir. Uygulanan biyofiziksel uyarımların kardiyomiyosit farklılaşması üzerine etkileri incelenmiştir. qPCR analiz sonuçları kök hücrelerin elektromekaniksel uyarımlar altında kardiyak spesifik belirteçlerini (*GATA-4*, *MEF2C*, *NKX2.5* ve *CACNA1C*) ifade ettiğini göstermiştir. Elektromekaniksel uyarım uygulanarak geliştirilmiş kardiyak yamaların *in vivo* etkinlikleri MI modelinde test edilmiştir. İmplantasyondan 21 gün sonra denekler sakrifiye edilerek histolojik analizler yapılmıştır. Sonuçlar, MI modelinin başarılı bir biçimde oluşturulduğunu, yara bölgesinde yama kaynaklı kalsifikasyonunun görülmediğini, elektromekaniksel olarak uyarılmış yamaların kullanıldığı grupta daha fazla hücrelerin yamadan yara bölgesine göç ettiği ve daha düşük düzeyde inflamasyonun geliştiğini göstermiştir. Ayrıca hem yara bölgesinde hem de yara bölgesinden çıkarılan yamada temel kasılma birimi olan sarkomer yapısı ile ilişkili proteinleri (kardiyak troponin T (cTroT), miyozin ağır zinciri (MHC), sarkomerik alfa aktinin (SAC)) ve hücreler arasındaki mekanik bağlantı birimi

olan N-kaderini (nCAD)) ifade eden hücrelerin olduğu görülmüştür. Çalışmanın ilk bölümünde umut vaden sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte biyofiziksel uyarımların kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında yeterli olmadığı ve yeni stratejilerin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu nedenle tez çalışmasının ikinci bölümünde ise rt-MKH'lerde kimyasal (5-Aza ve dimetilsülfoksit (DMSO)) ve biyolojik stimülatörlerin (TGF- β 1, FGF-2 ve BMP-2) birlikte kullanılarak çeşitli farklılaştırma prosedürleri test edilmiştir. 7. günün sonunda 5-Aza (10 μ M) ve DMSO'nun (%1) birlikte kullanıldığı grupta yüksek hücre canlılığı ve en yüksek kardiyak spesifik belirteçlerin elde edildiği gözlenmiştir. 5-Aza ve DMSO'ya maruz bırakılan hücrelerin kardiyak spesifik proteinleri (cTroT, SAC, konneksin 43 (Cnx43) ve α -düz kas aktini (α -SMA)) ifade ederek kardiyomiyositlere farklılaştıkları, ancak organize olmayan bir sarkomer yapısı ve protein paterni bakımından fetal dönem kardiyomiyosit yapısı gösterdikleri gözlemlenmiştir. Organize sarkomer yapısı ve yetişkin dönem fonksiyonel kardiyomiyositler elde etmek için insan ve sıçan kaynaklı kemik iliği MKH'leri (h-MKH ve rt-MKH) epigenetik yeniden programlama (asetilasyon aktivasyonu ve metilasyon inhibisyonu) ve biyolojik yolak manipülasyonlarını (WNT ve TGF β sinyal yollarının inhibisyonu) sağlayacak küçük moleküllere (valproik asit (Va), 5-Aza, DMSO, IWP-2 (WNT inhibitörü), repsox (TGF β inhibitörü)) maruz bırakılmış ve hücre morfolojisi, hücre canlılığı, kardiyak spesifik belirteçlerin gen ve protein düzeyindeki ifadesi incelenmiştir. Sonuçlar, hücre kaynağına ve küçük molekül kombinasyonuna bağlı olarak farklı hücre morfolojisi ve kardiyak spesifik gen ifadesinin elde edildiğini göstermiştir. h-MKH'lerde yüksek hücre canlılığı ile birlikte kardiyomiyosit benzeri homojen bir morfoloji (uzamış iğsi bir görünüm) ve *GATA-4*, *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadelerinde rt-MKH'lerine göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiği izlenmiştir. 14 gün sonunda yapılan immünfloresan boyama analiz sonuçları uygulanan farklılaştırma prosedürüne ve hücre kaynağına bağlı olarak protein ifade paterni ve sarkomer organizasyonunun değiştiğini göstermiştir. Her iki hücre tipinin uygulanan tüm farklılaştırma prosedürleri ile translasyonel düzeyde kardiyomiyositlere farklılaştığı ancak rt-MKH'lere kıyasla h-MKH'lerin Cnx43, cTroT ve α -SMA ifadesi bakımından yetişkin kardiyomiyositlere daha çok benzediği ve daha organize sarkomer yapısına sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında çeşitli küçük molekül kombinasyonları kullanılarak MKH'lerin daha yüksek verimle kardiyomiyosit

hücrelerine farklılaştır labildiği gösterilmiştir. Ayrıca yetişkin kardiyomiyositlerin elde edilmesinde h-MKH'lerin daha uygun hücre kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kardiyak yama, mezenkimal kök hücreler, elektromekaniksel uyarım, kardiyomiyojenik farklılaşma, valproik Asit, WNT



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PERICARDIUM BASED REGENERATIVE CARDIAC PATCHES BY TISSUE ENGINEERING APPROACH TO REPAIR CONGENITAL SEPTAL DEFECTS

Şükrü ÖZTÜRK

Doctor of Philosophy, Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

June 2021, 187 pages

Cardiac patch has been used in the treatment of congenital heart disease and myocardial infarction (MI) while an ideal cardiac patch has not been developed yet. This study aimed to engineer regenerative cardiac patches by cardiac tissue engineering strategies to be used in various cardiac tissue damage such as congenital heart defect and MI repair. In the first part, rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (rt-BMSCs) were seeded into acellular bovine pericardium-based 3-dimensional (3D) tissue scaffolds and differentiated into cardiomyocytes using a biomimetic bioreactor system that mimics excitation-contraction coupling in the heart following 10 μ M 5-azacytidine (5-Azc) treatment. The effect of applied biophysical stimulations on cardiomyogenic differentiation was investigated. qPCR analysis showed that cardiac-specific markers (*GATA-4*, *MEF2C*, *NKX2.5* and *CACNA1C*) were upregulated in electromechanically stimulated stem cells. The performance of electromechanically stimulated cardiac patches was assessed in a rat MI model and histological stainings were performed after 21 days of post-implantation. Results showed that MI was induced successfully and patch-related calcification was not observed in all tested groups. Moreover, a higher number of BrdU-labelled cells and a low level of CD68 positive cells were observed in the infarct region under electromechanically stimulated conditions compared to static conditions. In addition, cTroT, MHC, SAC, and nCAD positive cells were observed in both infarct region and retrieved patch after 3 weeks. Although promising results were obtained in the first part of the study, it was concluded that biophysical stimulations are not sufficient for

cardiomyogenic differentiation of stem cells and novel strategies should be unveiled to enable more effective cardiomyogenic differentiation.

Within this scope, we tested several protocols in which chemical (5-Aza and Dimethylsulfoxide (DMSO)) and biological stimulators (TGF- β 1, FGF-2 and BMP-2) were used in different combinations to increase cardiomyogenic differentiation of rt-BMSCs in the second part of this study. qPCR results indicated that the highest cardiac-specific marker expressions were measured in the combination of 5-Aza (10 μ M) and DMSO (1%) after 7 days. Immunofluorescence analysis results demonstrated that rt-BMSCs expressed cardiac-specific proteins (cTroT, SAC, Cnx43, and α -SMA) and differentiated into cardiomyocytes in 5-Aza and DMSO induction while rt-BMSCs-derived cardiomyocytes showed fetal cardiomyocyte-like proteins expression patterns and disorganized sarcomere structure. Both rt-BMSCs and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (h-BMSCs) were exposed to a variety of small-molecules (valproic acid (Va), 5-Aza, DMSO, IWP-2 (WNT inhibitor) and RepSox (TGF- β inhibitor)] combinations to manipulate epigenetic profile (acetylation activation and methylation inhibition) and signaling pathways (WNT and TGF β signaling pathway inhibition) to develop adult-like contractile cardiomyocytes with highly organized sarcomere structure. Cell morphology, cell viability, cardiac specific gene and protein expressions were evaluated. Results showed that cell morphology and cardiac-specific gene expression level were highly dependent on small molecule combination and stem cell resources. It was observed that h-BMSCs had a homogeneous morphology (elongated spindle-shaped) with high cell viability and *GATA-4*, *NKX2.5*, and *MEF2C* genes were significantly higher expressed in these cells compared to rt-BMSCs. Immunofluorescence analysis was also performed after 14 days and results clearly showed that protein expression pattern and sarcomere organization were highly dependent on stem cell source and differentiation protocol. Both rt-BMSCs and h-BMSCs were successfully differentiated into cardiomyocytes at the translational level and expressed cardiac-specific proteins including cTroT, SAC, Cnx43, and α -SMA. However, adult-like protein expression patterns and more organized sarcomere structure were observed in h-BMSCs-derived cardiomyocytes compared to rt-BMSCs-derived cardiomyocytes.

In conclusion, mesenchymal stem cells showed higher cellular differentiation into cardiomyocytes in the presence of small molecules and h-BMSCs were more convenient cell type to derive adult-like cardiomyocytes for cardiac tissue engineering applications.

Keywords: Cardiac patch, mesenchymal stem cell, electromechanical stimulation, cardiomyogenic differentiation, valproic acid, WNT



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her anında maddi ve manevi olarak yanımda olan, bu sürenin en verimli şekilde geçmesi için gerekli tüm koşulların oluşmasını sağlayan, engin bilgi ve tecrübesiyle bana hocalık, danışmanlık ve arkadaşlık yapan, çok kıymetli bilim insanı değerli hocam **Prof. Dr. Kezban Ulubayram**'a tüm destek, katkı, güven ve sabrı için teşekkür ederim.

Tez çalışmamın birinci bölümünde yer alan deneylerin ve analizlerin yapılmasında bana eşlik eden **Dr. Reza Shahbazi**'ye tüm destek ve katkıları için çok teşekkür ederim.

Tez kapsamındaki histolojik analizlerin gerçekleşmesini bizzat zaman ayırarak sağlayan, tüm bilgi ve deneyimini paylaşmaktan çekinmeyen kıymetli hocam, **Doç. Dr. Naciye Dilara Zeybek**'e ve tüm Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı çalışanlarına destek ve katkıları için teşekkür ederim.

Sıçan MI modelinin geliştirilmesindeki kritik katkı ve yönlendirmelerinden dolayı Kırıkkale Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı'ndan sayın **Prof. Dr. Barış Kürüm**'e teşekkür ederim.

Küçük moleküllerin kardiyomiyosit farklılaşması üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmaların gerçekleşmesi için tüm laboratuvar imkanlarını sunan, kıymetli vakit ve bilgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen **Doç. Dr. Z. Ekim Taşkiran**'a ve qPCR analizlerin yapılmasında büyük emek ve katkıları olan sevgili **Dr. Öğr. Gör. Beren Karaosmanoğlu**'na değerli katkıları için teşekkür ederim.

Sıçan kaynaklı kök hücrelerin karakterizasyonunda yardımlarını esirgemeyen sayın **Prof. Dr. Gamze Torun Köse**'ye ve analizi gerçekleştiren **Dr. Öğr. Üyesi Görke Gürel Peközer**'e destekleri için teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın her anında yardımlarını ve bilgilerini benden esirgemeyen **Dr. Öğr. Üyesi Merve Gültekinoğlu Bayram**'a, **Prof. Dr. İpek Eroğlu**'na, **Doç. Dr. Eda Ayşe Aksoy**'a, laboratuvarda benimle birlikte çalışmalarını yürütmüş ve yürütmekte olan tüm kıymetli arkadaşlarıma ve tüm Eczacılık Temel Bilimi Anabilim Dalı çalışanlarına destekleri için teşekkür ederim.

Bu süreçte desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli dostlarım **Müjde Burcu Akboncuk, Esra İlhan Ayışığı, Erdem Sefa Şahin, Numan Eczacıoğlu, Hacer Aksel, Gülben Avşar, Emel Kökre ve Erdi Güneş**'e teşekkür ederim

Tez çalışmalarımın birinci bölümünü; 1003-Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında 213M685 numaralı proje ile destekleyen **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu**'na ve ikinci bölümünü THD-2015-7924 ve THD-2021-19037 numaralı projeler ile destekleyen **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi**'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu süreçte de benden sevgi, samimiyet, muhabbet, dua ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemi sağlayan, varlıklarıyla bana her zaman güç veren ve şükürüm olan annem **Emine Öztürk** ve babam **Mustafa Öztürk**'e; sevgi, muhabbet, saygı ve hürmetlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve seslerini her duyduğumda tüm zorluk ve umutsuzluklarımı unuttuğum canım kardeşlerim **Fatma Zehra Öztürk, Abdulkasım Öztürk, Abdülkerim Öztürk** ve **Sultan Öztürk**'e varlıkları için önce şükür sonra da teşekkür ederim.

Güzel aileme katılarak ailemi daha da güzelleştiren, öncelikle güzel bir insan ve sonra da güzel bir eş olan, sevgi ve dualarıyla hep yanımda olan, benimle birlikte zorluklara göğüs geren, sevmeyi bilen eşim ve hayat arkadaşım **Pervin Öztürk**'e öncelikle varlığı sonra tüm destek ve sabrı için çok teşekkür ederim.

Hayatıma dokunmuş tüm bu güzel insanlar;

Hepiniz iyi ki varsınız, iyi ki hayatımdasınız...

Şükrü Öztürk

Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	6
2.1.1. Konjenital Kalp Defektleri.....	6
2.1.2. İskemik Kalp Hastalıkları	9
2.2. Kardiyovasküler Hastalıklardaki Tedavi Stratejileri.....	9
2.2.1. Kök Hücre Terapisi.....	9
2.2.2. Kardiyak Yamalar	11
2.3. Kardiyak Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Kardiyak Yamalar	12
2.3.1. Hücre Kaynakları.....	16
2.3.2. Doku İskeleleri.....	23
2.3.3. Biyoaktif Moleküller.....	33
2.4. Kardiyak Doku Mühendisliğinde Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması.....	36
2.4.1. Küçük Kimyasal Moleküller ile Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	37
2.4.2. Biyofiziksel Uyarımlar ile Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	42

2.5. Kardiyak Doku Mühendisliğinde Karşılaşılan Problemler	46
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	50
3.1. Mezenkimal Kök Hücreleri İçeren Aselüler Perikard Bazlı Kardiyak Yamaların Geliştirilmesi	50
3.1.1. Sığır Perikardiyumundan 3-Boyutlu Aselüler Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu	50
3.1.2. Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	54
3.1.3. 3B Aselüler Doku İskelelerinin Biyouyumluluklarının Tespit Edilmesi ..	57
3.1.4. rt-MKH'lerin 3B Aselüler Doku İskelesi Üzerindeki Morfolojileri ve İnfiltrasyonu	58
3.1.5. Biyomimetik Biyoreaktör Sisteminde rt-MKH'lerin Aselüler Doku İskeleleri Üzerinde Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	59
3.1.6. Sıçan Miyokardiyal Enfarktüs Modelinin Oluşturulması ve Elektromekaniksel Olarak Uyarılmış Kardiyak Yamaların Değerlendirilmesi	65
3.1.7. İstatistiksel Analiz	70
3.2. Küçük Moleküllerin Mezankimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasına Etkisi	70
3.2.1. Sıçan Kaynaklı Kemik İliği Mezankimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaşmasında Kimyasal ve Biyolojik Stimülatörlerin Sinerjik Etkisi.....	70
3.2.2. Epigenetik Yeniden Programlama ve Biyolojik Yolak Manipülasyonu ile Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	72
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	79
4.1. Mezenkimal Kök Hücreler İçeren Aselüler Perikard Bazlı Kardiyak Yamalar.....	79
4.1.1. 3-Boyutlu Aselüler Doku İskelelerinin Histolojik ve Morfolojik Özellikleri.....	79
4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi ve Köklük Özellikleri.....	88

4.1.3. Biyomimetik Biyoreaktör Sisteminde rt-MKH'lerin Aselüler Doku İskeleleri Üzerinde Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	95
4.1.4. Elektromekaniksel Olarak Uyarılmış Kardiyak Yamaların Sıçan Miyokardiyal Enfarktüs Modelinde <i>in vivo</i> Performansları	104
4.2. Küçük Moleküllerin Mezenkimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasına Etkisi.....	111
4.2.1. Kimyasal ve Biyolojik Stimülatörlerin Sinerjik Etkisi	111
4.2.2. Epigenetik Yeniden Programlama ve Biyolojik Yolak Manipülasyonun Kardiyomiyosit Farklılaştırılmasına Etkisi.....	125
5. YORUM.....	151
6. KAYNAKLAR	153
EKLER.....	190
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi.....	190
EK 2 – Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	191
EK 3 – Tezden Türetilmiş Bildiriler	192
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	193
ÖZGEÇMİŞ	194

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Konjenital septal defektler ve perikard bazlı kapatma malzemeleri ile kapatılması A) ASD ve B) ASD'nin perikard bazlı kapatma malzeme ile kapatılması [45] C) VSD ve D) VSD'nin perikard bazlı kapatma malzemesi ile kapatılması [46]. Beyaz oklar ASD ve VSD'yi siyah oklar ise perikard bazlı kapatma malzemesi ile kapatılmış ASD ve VSD'yi göstermektedir.....	8
Şekil 2.2. Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan hücre kaynakları, biyoaktif moleküller ve doku iskeleleri malzemeleri.....	14
Şekil 2.3. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ve piyasada bulunan aselüler perikard bazlı ürünler [196]	32
Şekil 2.4. MKH'lerin farklılaşmasında etkili olan faktörler	37
Şekil 2.5. Kardiyomiyogenezde WNT sinyal yolağının etkisi.....	42
Şekil 2.6. MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını konu edinmiş çalışmalarda kardiyomiyojenik farklılaşma açısından elde edilen pozitif ve negatif sonuçların oranı.....	46
Şekil 3.1. İşlem görmemiş sığır perikardiyumu. A) Bütün olarak çıkarılan perikardiyum, B ve C) Deselülerizasyon işlemi için hazırlanan 4x4 cm boyutlarındaki perikardiyum örnekleri.	51
Şekil 3.2. A) Biyomimetik biyoreaktör sisteminin genel görünümü. B) Demonte edilmiş biyoreaktörün parçaları. C) Kardiyak yamaların fiziksel uyarımlara maruz bırakılacağı odacıkların ana motor sistemine yerleştirilmesi. D ve E) Uyarımlardan önce odacıklara kardiyak yamaların yerleştirilmesi ve yamalar üzerine hücre büyütme ortamının eklenmesi.....	61
Şekil 3.3. Akut MI modelinin oluşturulması ve kardiyak yamaların yara bölgesine implantasyonu işleminin basamakları. MI modelinin oluşturulması için uygulanan tüm prosedürler anestezi altında etik kurulu onayına göre yapılmıştır. 1 ve 2) Ameliyat bölgesinin tıraşlanarak temizlenmesi ve aseptik koşulların sağlanması 3) Pozitif basınçlı ventilasyon işlemi için kânülün trakeotomi ile soluk borusuna yerleştirilmesi 4 ve 5) Kalbe ulaşılması amacıyla göğüs derisinin kesilmesi ve torakotomi ile göğüs kafesinin açılması 6) “Cryoinjury” yöntemi ile MI modelinin oluşturulması (parlak, gri bölge) 7) Kardiyak yamanın MI bölgesine implantasyonu ve 8) İşlemin bitmesi ve hayvanın göğsünün kapatılması.	67

Şekil 3.4. MKH'lerin epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonlarının bir arada kullanılmasıyla kardiyomiyositlere farklılaştırılmasında uygulanan yöntemin akış şeması.	73
Şekil 3.5. Epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonu amacıyla kullanılan küçük moleküllerin kimyasal yapıları.....	75
Şekil 4.1. Doğal perikardiyum dokusu. A) Aselülerizasyon işlemi için temin edilen ve yağlarından temizlenen doğal perikardiyum. B) Doğal perikardiyum H&E boyaması. Sarı ok bağ doku içerisinde uzamış fibroblastları göstermektedir. C) Doğal perikardiyumun MT boyaması. Beyaz ok kollajen fibrilleri göstermektedir. D) Doğal dokunun VG boyaması. Kırmızı ok elastin fiber yapısını göstermektedir. H&E: Hematoksilen eozin boyama (kollajen fiberler pembe ile boyanmıştır.), MT: Masson's Trikrom (kollajen fibriller mavi renk ile boyanmıştır), VG: Verhoeff Van Gieson (Elastik fiberler siyah ile, kollajen fibriller kahverengi ile boyanmıştır.). Ölçek çizgisi: 50 µm.	80
Şekil 4.2. Perikard dokularının histolojik görünümü: A) Dondur-çözdür uygulanmış, B) Triton-X100 uygulanmış. Hücre çekirdekleri (mor ile boyanmış) kollajen fiberler arasında belirgin bir biçimde görülmektedir. Ölçek çizgisi: 50 µm.	81
Şekil 4.3. Aselülerizasyon işleminden sonra sığır perikardiyum dokularında uygulanan protokole göre kollajen fibril ve elastik fiberlerin görünümü. Panel A) Triton-X100 uygulanan grup. Panel B) SDS uygulanan grup ve Panel C) Triton-X100 ve SDS'in beraber uygulandığı grup. H&E: Hematoksilen eozin boyama (kollajen fiberler pembe ile boyanmıştır.), MT: Masson's Trikromu boyama (kollajen fibriller mavi renk ile boyanmıştır), VG: Verhoeff Van Gieson boyama (Elastik fiberler siyah ile, kollajen fibriller kahverengi ile boyanmıştır.). 24 ve 48 sa. hipotonik tris tamponun uygulama süresini göstermektedir. Sarı oklar elastik fiberleri göstermektedir. H&E için ölçek çizgisi: 100 µm, MT ve VG için ölçek çizgisi: 50 µm.	83
Şekil 4.4. Aselüler perikardın morfolojik ve histolojik görüntüleri. A ve B) Aselüler perikardın SEM görüntüsü ve VG boyaması. C ve D) Asetik asit (1 M) ve kollajenaz (0.5 U/mL) uygulanmış aselüler perikardların SEM görüntüsü ve VG boyaması. VG boyamada kollajen fiberler kahverengi, elastik fiberler ise siyaha boyanmıştır. Ölçek çizgisi: SEM için 100 µm, VG boyama için 50 µm.	85
Şekil 4.5. A) MTT sonuçları. Test edilen tüm gruplarda sitotoksik etki görülmemiştir. B) Canlı&ölü hücre analizi sonuçları. Yapılan mikroskopik gözlem rt-MKH'lerin aselüler doku iskelelerinin yüzeyine tutundukları ve yüksek oranda canlılıklarını koruduklarını göstermiştir. dSP: doğal sığır perikardı. aSP: aselüler sığır perikardı, AA: asetik asit, Gen:	

Genipin. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı ile boyanmıştır. Ölçek çizgisi: 100 μ m.....	87
Şekil 4.6. Sıçan kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin izolasyondan sonraki görünümü. A) 10X ve B) 20X büyütme. Ölçek çizgisi 100 μ m	88
Şekil 4.7. P0 seviyesindeki kemik iliği rt-MKH'lerin morfolojik görünümleri. A) İzolasyon sonrası morfolojik görünüm, B) 2. gün C) 4. gün ve D) 9. gündeki hücre morfolojisinin görünümü. Ölçek çizgisi: 100 μ m	89
Şekil 4.8. Kemik iliği rt-MKH'lerin farklı pasaj seviyelerindeki morfolojik görünümleri A) Pasaj 1, B) Pasaj 2, C) Pasaj 3 ve D) Pasaj 4. Ölçek çizgisi:100 μ m	90
Şekil 4.9. Kemik iliği rt-MKH'lerin akış sitometri analizi sonuçları	91
Şekil 4.10. Kemik iliği rt-MKH'lerin uygun indükleyici varlığında osteojenik (A-C) ve adipojenik (D-F) farklılaşmaları. A) Alizarin kırmızısı ile boyanan kontrol grubu hücreleri. B) Hücrelerin bir araya gelerek oluşturdukları agregatlarda oluşan kalsiyum depolarının görüntüsü. C) Alizarin kırmızısı ile kırmızıya boyanan kalsiyum depoları. D) Oil kırmızısı ile boyanan kontrol grubu hücreleri. E) Adipojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerde oluşan lipit vakuolleri. F) Lipit vakuollerinin Oil kırmızısı ile boyanma görüntüsü.	93
Şekil 4.11. 3B aselüler doku iskelelerinde rt-MKH'lerin morfolojik görünümleri. Kırmızı oklar rt-MKH'leri, mavi oklar doku iskelesindeki fiber yapısını göstermektedir. Ölçek çizgisi: 40 μ m.....	94
Şekil 4.12. Statik koşullarda zamana bağlı olarak rt-MKH'lerin 3B aselüler doku iskelelerindeki göçü. Siyah oklar yapı içine göç eden kök hücreleri göstermektedir. Ölçek çizgisi: 50 μ m.....	95
Şekil 4.13. Zamana ve 5-Aza konsantrasyonuna bağlı olarak rt-MKH'lerin morfolojilerinde meydana gelen değişim. Ölçek çizgisi: 100 μ m.	97
Şekil 4.14. A) Canlı&Ölü analiz sonuçları: farklı gerinim altında aselüler sıgır perikardi üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin canlılık ve morfolojileri B) qPCR analiz sonuçları: uygulanan gerinime bağlı olarak kardiyak spesifik genlerde meydana gelen ifadeler. Ölçek çizgisi: 100 μ m. $p<0,01$ ** ile gösterilmiştir.....	99
Şekil 4.15. Farklı mekaniksel gerinim uygulanan gruplarda gözlemlenen hücre dizilmesi. Ölçek çizgisi: 50 μ m	100
Şekil 4.16. A) Canlı&Ölü analiz sonuçları: farklı gerinim altında aselüler sıgır perikardi üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin canlılık ve morfolojileri B) qPCR analiz sonuçları:	

uygulanen gerilime bağılı olarak kardiyak spesifik genlerde meydana gelen ifadeler. Ölçek çizgisi: 100 µm. $p<0,001$ *** ve $p<0,0001$ **** ile gösterilmiştir.....	101
Şekil 4.17. Aselüler perikardlar üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin A) 2 gün ve B) 4 gün boyunca elektromekaniksel uyarıma maruz bırakıldığında elde edilen kardiyak spesifik gen ifadeleri. $P<0,05$ için * kullanılmıştır. E.Sti: Sadece elektriksel stimülasyon, M.Sti: Sadece mekaniksel stimülasyon ve E.+M. Sti: Elektromekaniksel stimülasyon.....	103
Şekil 4.18. 21 günlük <i>in vivo</i> implantasyon süresi sonunda elektromekaniksel uyarıma maruz bırakılmış ve bırakılmamış yamaların implante edildiği yara bölgesinin histolojik incelenmesi. A) H&E boyaması gruplara göre yara bölgesinin histolojik görünümünü, B) BrdU boyama yamadan yara bölgesine göç eden hücrelerin gösterilmesi ve C) von Kossa boyama ise yara bölgesinde kalsifikasyonun oluşup oluşmadığının gösterilmesi için yapılmıştır. MI: Miyokardiyal Enfarktüs bölgesi, DD: Doğal Doku bölgesi.	107
Şekil 4.19. 21 günlük <i>in vivo</i> implantasyon süresi sonunda yara bölgesinden çıkarılan implanta edilmiş yamanın histolojik boyaması. A) Yamanın H&E boyaması, B) Yamanın BrdU boyaması. Sarı oklar BrdU pozitif hücreleri göstermektedir. C) Yamanın DAPI boyaması. Mavi renk hücre çekirdeğini göstermektedir. D) İmmünohistokimyasal analizin negatif kontrol boyaması.	108
Şekil 4.20. 21 günlük <i>in vivo</i> implantasyondan sonra yara bölgesinden alınan örneklerde kardiyak spesifik proteinlerin boyanması. Sarı oklar pozitif boyamaları göstermektedir. MI : Miyordiyal Enfarktüs bölgesi. cTroT: Kardiyak Troponin T; MHC: Miyozin Ağır Zincir; nCAD: N-kaderin; SAC: Sarkomerik Alfa Aktinin.....	109
Şekil 4.21. Biyolojik ve kimyasal uyarımların ayrı ayrı ve beraber uygulandığı gruplardaki rt-MKH'lerin 5 ve 12 gün sonundaki morfolojik görünümleri	113
Şekil 4.22. STRING veri tabanı kullanılarak A) insan (<i>Homo sapiens</i>) ve B) rat (<i>Rattus norvegicus</i>) için çizilen GATA-4, NKX2.5, MEF2C ve TBX5 transkripsiyon faktörlerine ait protein-protein etkileşim ağı. Ağda yer alan iki protein arasındaki çizginin kalınlığı iki protein arasındaki etkileşimin güvenilirliği ile doğru orantılıdır. İki nod arasında çizgi ne kadar kalın ise bu iki nod o kadar güvenilir olarak etkileşmektedir. Ayrıca her iki ağda transkripsiyon faktörlerin görev aldığı biyolojik prosesler çeşitli renklerle gösterilmiştir. A'da; kırmızı: kardiyosit farklılaşmasının pozitif regülasyonu, sarı: sarkomer organizasyonunu, mavi: ikincil kalp bölgesinin spesifikasyonu, yeşil: kardiyosit farklılaşmasının regülasyonu, mor: kalp gelişimi göstermektedir. B'de ise kırmızı: kalp	

kasılmasının düzenlenmesi, mavi: kardiyosit farklılaşmasının pozitif regülasyonu, sarı:kardiyak doku hücrelerinin farklılaşması, yeşil: kalp gelişimi göstermektedir.....	116
Şekil 4.23. Çeşitli biyolojik ve kimyasal ajanların ayrı ayrı veya beraber kullanılarak 2B kültür sisteminde kültüre edilen rt-MKH'lerde zamana bağlı olarak (A) GATA-4, (B) NKX2.5, (C) MEF2C ve (D) CACNA1C gen ifadelerine ait qPCR analiz sonuçları (** P<0,001, ** P<0,01, *P<0,05).	120
Şekil 4.24. Kardiyak spesifik proteinlerin immünofloresan boyama ile aktivitelerinin tespit edilmesi. Panel A) 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta 14 günlük kültür süresi sonunda tespit edilen kardiyak spesifik proteinlerin ifadesi, Panel B) 14 günlük kültür süresi sonunda kontrol grubunda tespit edilen kardiyak spesifik proteinlerin ifadesi. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiştir. Ölçek çizgisi 50 µm.....	124
Şekil 4.25. A) h-MKH ve B) rt-MKH kök hücrelerine uygulanan küçük molekül kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Deneysel gruplar ile kontrol arasında elde edilen verilerin istatistiksel analizi tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmış olup, gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma Bonferroni testi kullanılarak yapılmıştır. * p<0,05, ** p<0,01 ve *** p<0,001 temsil etmektedir.....	126
Şekil 4.26. Hücre kaynağına ve uygulanan küçük molekül kombinasyonlarına göre elde edilen % hücre canlılık verileri. rt-MKH: Sıçan kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreleri; h-MKH: İnsan kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreleri; Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi iki yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmış olup, gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma Bonferroni testi kullanılarak yapılmıştır. * p<0,05 ve **** p<0,0001 temsil etmektedir.....	127
Şekil 4.27. h-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için kullanılan farklılaştırma prosedürlerinden sonra hücrelerde meydana gelen morfolojik değişim ve hücre canlılığı. Büyük fotoğraflar 10X, küçük fotoğraf 20X büyütmede çekilmiştir. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiş olup mavi renkte görünmektedir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.....	130
Şekil 4.28. rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için kullanılan farklılaştırma prosedürlerinden sonra hücrelerde meydana gelen morfolojik değişim ve hücre canlılığı. Büyük fotoğraflar 10X, küçük fotoğraf 20X büyütmede çekilmiştir. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiş olup mavi renkte görünmektedir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.....	131

Şekil 4.29. h-MKH'lerde uygulanan farklılaştırma prosedürlerine bağlı olarak meydana gelen kardiyak spesik genlerin ifadesi. Test edilen prosedürler ve kontrol grubu arasında fark olup olmadığının tespit edilmesi için tek yönlü ANOVA analizi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırmalar Bonferroni testi ile yapılmıştır. $p<0,05$ * ve $p<0,0001$ **** ile gösterilmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; .R: RepSox.....	135
Şekil 4.30. rt-MKH'lerde uygulanan farklılaştırma prosedürlerine bağlı olarak meydana gelen kardiyak spesik genlerin ifadesi. Test edilen prosedürler ve kontrol grubu arasında fark olup olmadığının tespit edilmesi için tek yönlü ANOVA analizi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırmalar Bonferroni testi ile yapılmıştır. $p<0,05$ * ve $p<0,0001$ **** ile gösterilmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.....	136
Şekil 4.31. Kardiyak spesifik genlerin ifade profilinin kullanılan farklılaştırma prosedürü ve kök hücre kaynağına göre karşılaştırılması. Her bir gen için aynı farklılaştırma prosedüründe hücre kaynağının etkisinin tespit edilmesi için istatistiksel analiz olarak iki yönlü ANOVA testi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan farklar grafik üzerinde gösterilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** ise $p<0,0001$ göstermektedir. h-MKH: İnsan Kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreler; rt-MKH: Sıçan Kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreler; Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.....	139
Şekil 4.32. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde Cnx43 ifadesi. Konneksin yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 μm	141
Şekil 4.33. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde SAC ifadesi. SAC kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 μm	142
Şekil 4.34. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde cTroT ifadesi. cTroT yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 μm	144
Şekil 4.35. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde α -SMA ifadesi. α -SMA kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 μm	145

Şekil 4.36. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde Cnx43 ifadesi. Cnx43 yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.....	146
Şekil 4.37. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde SAC ifadesi. SAC kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.....	147
Şekil 4.38. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde cTroT ifadesi. cTroT yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.....	148
Şekil 4.39. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde α-SMA ifadesi. α-SMA kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm...	149

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 3.1. rt-MKH'ler için yapılan <i>q</i> PCR analizinde kullanılan primer dizileri	64
Tablo 3.2. rt-MKH'ler için yapılan <i>q</i> PCR analizinde kullanılan zaman ve sıcaklık parametreleri	64
Tablo 3.3. İmmünohistokimyasal analiz için kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile çalışılan dilüsyon oranları	70
Tablo 3.4. rt-MKH'lerin kimyasal ve biyolojik stimülatörlerin sinerjik etkisi altında farklılaştırma için kullanılan kombinasyonlar	71
Tablo 3.5. Küçük moleküllerin uygulama koşulları ve test edilen kombinasyonlar.....	76
Tablo 3.6. h-MKH'lerin <i>q</i> PCR analizinde kullanılan primer dizileri	78
Tablo 3.7. h-MKH'lerin <i>q</i> PCR analizinde kullanılan sıcaklık ve zaman parametreleri	78

KISALTMALAR

KH	Kardiyovasküler Hastalıklar
ASD	Atrial Septal Defekt
VSD	Ventriküler Septal Defekt
MI	Miyokardiyal İnfraktüs
ECM	Ekstraselüler Matriks
kECM	Kardiyak Ekstraselüler Matriksi
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
EKH	Embriyonik Kök Hücre
iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
PDGF	Platelat Büyüme Faktörü
BMP-2	Kemik Morfojenik Proteini-2
IGF-1	İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
5-Aza	5-Azasitidin
Va	Valproik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
LVEF	Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu
PET	Poli(etilen tereftalat)
PTFE	Poli(tetrafloroetilen)
PGS	Poli(gliserol sebakat)
PLGA	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PU	Poliüretan
PLA	Poli(laktik asit)
PCL	Polikaprolakton
PGA	Poli(glikolik asit)
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
iPKH-KM	iPKH Kaynaklı Kardiyomiyositler
GAG	Glikozaminoglikan
EV	Ekstraselüler Veziküller
DMSO	Dimetilsülfoksit
Triton-X100	Oktilfenoksipolietoksietanol
PMSF	Fenilmetil-Sülfonil Florit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
HE	Hematoksilen-Eozin
VG	Verhoeff Van Gieson
MT	Masson'un Trikrumu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

NHN	Ninhidrin
FE	% Fiksasyon Endeksi
FBS	Fetal Sığır Serumı
α -MEM	α -Minimum Essential Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FACS	Akış Sitometrisi
EthD-1	Etidyum bromid homodimeri
BrdU	5-bromo-2-deoksiüridin
rt-MKH	Sıçan Kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreleri
h-MKH	İnsan Kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreleri
cTroT	Kardiyak Troponin T
SAC	Sarkomerik Alfa Aktinin
Cnx43	Konneksin 43
α -SMA	Alfa Düz Kas Aktini
nCAD	N-kaderin
MHC	Miyozin Ağır Zinciri
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindol
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
cTroI	Kardiyak Troponin I
cTroC	Kardiyak Troponin C
HDAC	Histon Deasetilaz Enzimi

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KH) tüm dünyada ve ülkemizde en önemli sağlık sorunu olup mortalite ve morbidite nedenleri arasında ilk sıralarda yer alırken aynı zamanda sağlık ekonomisine ağır yük getirmektedir. KH kapsamında değerlendirilen konjenital kalp defektleri gebeliğin ilk 8 haftası içinde ortaya çıkan ve dünya çapında en yaygın görülen doğumsal anomalilerdir [1]. Bu hastalıklar en sık ventriküler septal defekt (VSD) ve atrial septal defekt (ASD) olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte dünyada meydana gelen KH kaynaklı ölümlerin %49,2'si iskemik kalp hastalıkları kaynaklıdır [2, 3]. Ayrıca, iskemik kalp hastalıkları sonucu septal nekroza bağlı VSD ya da serbest duvar rüptürü de oluşmaktadır. Tüm bu rahatsızlıklar kalbin fonksiyonlarını yitirmesi ile sonuçlanmakta olup hala çözüm aranan problemler arasındaki yerini korumaktadır. Bu kapsamda, araştırmacılar hasarlı dokunun yerini alarak kalbin fonksiyonunu yeniden kazandırılmasını sağlayan ve doğal dokuya benzer biyolojik, kimyasal ve mekanik özelliklere sahip kardiyak yamalar geliştirmek için çalışmalar yürütmektedir.

KH'lerin tedavisi için yeni yöntem ve malzemelerin geliştirmesine yönelik çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Bunlar arasında sentetik kalp yamaların geliştirilmesi, hücre terapileri ve kardiyak doku mühendisliği ürünü olan rejeneratif özellikte kalp yamalarının geliştirilmesi sayılabilir. Sentetik yamaların dokuya entegre olmaması, mekanik kuvvetin zamanla kaybı, rejeneratif olmaması, enfeksiyon ve anevrezma riskinde artışa neden olması, yabancı vücut reaksiyonu göstermesi, anastomoz bölgesinde hiperplazi, tromboz riski, organa spesifik yapının ve hücre tipi spesifik nişlerin yetersizliği gibi dezavantajları vardır [4-6].

Klinikte kalp hastalıklarının tedavisine yönelik olarak anjiyotensin reseptörü blokörleri, aldosteron antagonistleri ve β -blokörleri kullanılmaktadır. Ancak bunların kalp krizi sonrası oluşan yara dokusunun iyileştirilmesinde başarılı olmadıkları tespit edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı rejeneratif tıp yöntemlerinden olan kök hücre terapileri son zamanlarda oldukça önemli ve umut vadeden stratejiler arasında yerini almıştır [7]. Ancak klinik çalışmalar sonucunda hücre terapilerinin faydalarının sınırlı olduğu, erken dönemde kalp fonksiyonların iyileştirilmesinde olumlu sonuçlar alındığı ancak uzun dönemde bu olumlu durumun ortadan kalktığı tespit edilmiştir [8, 9]. Bununla birlikte hücre terapilerinde kullanılan hücrelerin yara bölgesinde uzun süre kalamadıkları,

uygulamadan kısa bir süre sonra yara bölgesinden uzaklaştıkları ya da canlılıklarını yitirdikleri tespit edilmiştir [10].

Hücre terapisinin kısıtlı olan bu faydalarının ve klinik başarının artırılması için araştırmacılar doku mühendisliği prensiplerini kullanarak kardiyak doku mühendisliği üzerine yoğunlaşmış ve rejeneratif etkileri olan yapılar geliştirmiştir. Bu yapıların geliştirilmesi için araştırmacılar sentetik ve doğal biyomalzemeleri veya kardiyak ekstraselüler matriksi (kECM)'nin yapısal ve mekaniksel özellikleri daha iyi taklit etmek için bunları birlikte kullanarak hibrid nanofiber veya poroz doku iskeleleri üretmişlerdir. Bununla birlikte sentetik ve doğal biyomalzemelerin dezavantajlarını elimine etmek için araştırmacılar doğal dokuları hücrelerinden arındırarak aselüler matrisler elde etmeyi başarmıştır. Bu matrislerin diğer doğal biyomalzemelere göre üstünlükleri kECM'nin yapısal ve mekaniksel olarak daha iyi taklit edilmesi olarak bildirilmiştir.

Diğer taraftan kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında ideal bir malzemenin yanında ideal bir hücre kaynağının kullanılması da kritik öneme sahiptir. Kardiyak doku rejenerasyonunda kullanılacak hücre kaynağı, tüm kardiyak hücre tiplerine dönüşme ve fonksiyonel entegrasyon yeteneğine sahip olmalıdır. Aynı zamanda malign transformasyonuna dirençli bir hücre hattı seçilmelidir [11]. Yetişkin dokudan izole edilen, kendi kendini yenileyebilen, sınırsız çoğalabilen ve farklılaşma yeteneğinde olan Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) birçok pre-klinik ve klinik araştırmada tek başına ya da bir doku iskelesi ile birlikte kullanılmıştır [12]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında ise İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)'lerin ön plana çıktığı görülmektedir. iPKH'ler embriyonik kaynaklı olmayan hücrelerden (örneğin yetişkin somatik hücreler) ektopik ekspresyon gibi dışsal etkilerle elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. Yapılan çalışmalarla bu hücrelerden kasılabilir fakat olgunlaşmamış kardiomyositlerin elde edildiği gösterilmiştir [13].

Kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin etkin ve başarılı olması implante edildiği bölgede doğal doku ile entegrasyonuna bağlıdır. Bunun için kullanılan doku iskelesi ve hücre tipi ne kadar önemli ise biyoaktif moleküller de o kadar önem arz etmektedir. Dolayısıyla araştırmacılar bu ürünlerin iyileştirme ve onarma etkilerini artırmak için çeşitli büyüme faktörleri; vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (FGFb), insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) vb. kullanmışlardır [14]. Bununla birlikte biyolojik bilgi kargoları ile gittikleri yerde rejeneratif etkiyi

sağlayan eksozomlar son zamanlarda giderek önemi artan biyoaktif ajanlar olup kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında da kullanılmaya başlanmıştır [15].

Kardiyak doku mühendisliğinde MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşması en kritik basamak olup temel olarak epigenetik profilde inhibisyonlar sağlayarak kardiyak spesifik genlerin aktive edilmesi sağlanır. DNA metilasyon/demetilasyonu ve post-translasyonel histon modifikasyonları süreçleri (asetilasyon, fosforilasyon ve metilasyon) fonksiyonel olarak birbirleri ile ilişkilidir. Oldukça karmaşık olmasına rağmen, epigenetik olarak bir genin inaktifleşmesi işlemi üç kritik basamakta gerçekleşir; i. hedef genin regülasyon bölgesinde metilasyonun meydana gelmesi, ii. histon deasetilazlar tarafından histon3 ve/veya histon 4'ün deasetilasyonu ve iii. histon 3'te lizin 9'un metilasyonu (H3K9) [16]. Dolayısıyla MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında kullanılan temel strateji epigenetik profilde inhibisyonlar sağlayarak kardiyak spesifik genlerin aktive edilmesi temeline dayanmaktadır. Gen, protein ve metabolik aktivite bakımından kimliksiz olarak nitelendirilebilecek olan MKH'lerde DNA metilasyonunu inhibe ederek epigenetik düzeyde etkisini gösteren ve böylece kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinden sorumlu genlerin aktive edilmesini non-spesifik olarak sağlayan 5-Azasitidin (5-Aza), MKH kaynaklı kardiyomiyositlerin elde edilmesinde sıklıkla kullanılan küçük bir kimyasal moleküldür. Ancak 5-Aza'nın kardiyomiyojenik farklılaşmadaki etkisine dair literatürde çelişkili sonuçlar elde edildiği görülmektedir [17, 18]. Bu sebeple 5-Aza'ya alternatif olabilecek ve daha yüksek oranda kardiyomiyojenik farklılaşmasını epigenetik profilde değişimler sağlayarak gösterecek olan küçük molekül ya da molekül kombinasyonların tespit edilmesi kritik öneme sahiptir. Epigenetik profilin modülasyonunun yanında kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında kullanılan diğer bir strateji de çeşitli biyolojik yolların manipülasyonudur. Bu bakımdan embriyonik dönemde kardiyomiyositlerin oluşmasında WNT yolağı kritik bir biyolojik yolak olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmacılar, bu sinyal yolağının mezoderm indüksiyonu için aktif olduğunu, kardiyomiyojenik mezodermden kardimiyositlerin farklılaşması için ise bu yolağının inhibe olduğunu göstermişlerdir [19]. WNT yolağının yanında kardiyomiyogenezde etkisi bilinen diğer bir sinyal yolağı TGFβ'dir [20].

Epigenetik profil ve biyolojik yollar kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında ne kadar kritik bir role sahip ise fizyolojik koşullarda kalp kası hücrelerinin maruz kaldığı biyofiziksel koşullar da eşit düzeyde kritiktir. Çünkü doğal kalp dokusu *in vivo* koşullarda elektrik ve mekanik uyarımların etkisi altındadır. Türe bağlı olarak kalp, 1 Hz'den (insan)

10 Hz'e (fare) kadar hücre, doku ve organ düzeyinde döngüsel olarak kasılma ve gevşeme davranışı gösterir. Hücresel mikro çevrenin mekaniksel özellikleri kalp kasının fonksiyonu ve farklılaşmasında kilit rol oynamaktadır [21, 22]. Bu kapsamda yapılan çalışmalar mekaniksel ya da elektriksel uyarımların kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını belirli bir düzeyde sağladıklarını göstermiştir [23-25].

1.1. Tezin Amacı

Kalp kası hücreleri fizyolojik koşullarda embriyonik ve yetişkin dönem boyunca elektriksel ve mekaniksel uyarımlara maruz kalmakta ve bu biyofiziksel uyarımlar MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında oldukça kritiktir. Ancak literatürde sınırlı sayıda çalışmada MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında elektriksel ve/veya mekaniksel uyarımlarının etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte bildiğimiz kadarıyla 3-Boyutlu (3B) aselüler doku iskelelerinde biyofiziksel uyarımlarla MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşması henüz incelenmemiştir.

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde aselüler perikard bazlı doku iskelelerinde kimyasal ajan (5-Aza) ve elektromekaniksel uyarımların birlikte kullanılması ile sıçan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını sağlamak ve elektromekaniksel uyarımlara maruz kalmış MKH'leri içeren kalp yamalarının sıçan Miyokardiyal İnfraktüs (MI) modelinde performanlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak hücre işleme teknolojisi ile sığır perikardiyumu hücrelerinden arındırılmış ve rt-MKH'ler elde edilen 3B aselüler doku iskelelerinde kültür edilerek kimyasal (5-Aza'ya) ve biyofiziksel uyarımlara maruz bırakılmıştır. Bu uyarımların hücre canlılığı ve kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinden sorumlu olan genlerin ifade düzeylerine etkileri incelenerek kardiyak farklılaşmasında etkili parametreler tespit edilmiştir. Daha sonra optimize edilen parametreler (gerinim (%) ve gerilim (V/cm)) kullanılarak elektromekaniksel uyarımlara maruz bırakılan kardiyak yamalar sıçanda oluşturulan MI bölgesine implante edilerek kalsifikasyon, hücre göçü, immün reaksiyon ve kardiyak spesifik protein ifadesi bakımından kardiyak yamaların performansı test edilmiştir. Bu bölümde elde edilen *in vitro* ve *in vivo* sonuçlar; 5-Aza ve elektromekaniksel uyarımların MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında kısıtlı oranda etkili olduğunu, kültür koşullarının ve farklılaştırma prosedürünün iyileştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Bu nedenle bu tez

çalışmasının ikinci bölümünde *in vitro* koşullarda farklı kaynaklardan izole edilen MKH'lerin yüksek düzeyde kardiyomiyojenik farklılaşmalarını sağlayarak organize sarkomer yapısına sahip kasılabilir yetişkin kardiyomiyosit benzeri hücrelerin elde edilmesinde kullanılabilecek yeni protokollerin geliştirilmesi için epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonunu sağlayacak çeşitli küçük moleköl kombinasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak çeşitli biyolojik ve kimyasal stimölatorler ayrı ayrı veya birlikte kullanılarak sıçan kaynaklı MKH'ler kardiyomiyositlere farklılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda kimyasal stimölatorlerin biyoljik stimölatorlerden daha etkili oldukları ancak elde edilen kardiyomiyositlerin organize olmayan bir sarkomer yapısına sahip olduğu, fetal dönem özelliği gösterdiği ve fonksiyonel olmadıkları tespit edilmiştir. Kasılabilir fonksiyonel kardiyomiyositlerin elde edilmesinde organize bir sarkomer yapısının olması oldukça önemlidir. Dolayısıyla epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipölasyonları yapılarak daha etkin bir kök hücre farklılaşması ve daha organize bir sarkomer yapısına sahip kardiyomiyositlerin geliştirilebileceği düşünölmüş ve epigenetik düzeyde hem asetilasyon aktivasyonu (valproik asit (Va)) hem de metilasyon inhibisyonunu (5-Aza) sağlayarak MKH'ler kardiyomiyositlere farklılaştırılmıştır. Epigenetik yeniden programlamanın yanında kardiyomiyojenezde etkisi olduğu bilinen sinyalyolakların inhibisyonunu (WNT yolak inhibitörü olarak IWP-2 ve TGF β yolak inhibitörü olarak RepSox) sağlayan küçük molekölle de farklılaşma prosedürlerine eklenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada hücre kaynağının kök hücre farklılaşmasında ve daha olgun ve düzenli sarkomer yapısına sahip kardiyomiyositlerin elde edilmesinde etkin bir unsur olup olmadığının tespit edilmesi için insan ve sıçan kaynaklı kemik iliği MKH'leri kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

İskemik kalp hastalıkları, inme, kronik kalp yetmezliği, periferial arter hastalığı, kalp kapakçıkları hastalıkları, kardiyak ve vasküler malformasyonlar, kardiyomiyopatiler, mikrovasküler hastalıklar ve kalp ve damar ile ilgili diğer hastalıkları içeren KH dünya genelinde ölüm ve yaşam kalitesinin azalması ile sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre KH'nın dünya genelinde görülme sıklığı son 20 yılda (1990-2019) yaklaşık 2 katına çıkmıştır. 1990 yılında 271 milyon kişiye KH tespit edilirken 2019 yılında bu sayı 523 milyon olmuştur. Hayatını kaybeden kişi sayısı ise 1990 yılında 12,1 milyon iken bu değer 2019 yılında 18,6 milyon kişiye yükselmiştir. 2017 yılında ise 17,8 milyon kişi hayatını kaybetmiştir. Dünya genelinde toplum ve yaşlı nüfusun artması KH'nın görülme sıklığını doğru orantılı olarak artırmıştır. KH'nın temel sebepleri arasında kardiyometabolik, davranışsal, çevresel ve sosyal risk faktörleri vardır [3, 26, 27]. Ülkemizde ise 2018 yılı ölüm nedenleri istatistikleri incelendiğinde meydana gelen ölümlerin %38,4'nün KH kaynaklı olduğu anlaşılmaktadır (<https://tuikweb.tuik.gov.tr/>).

2.1.1. Konjenital Kalp Defektleri

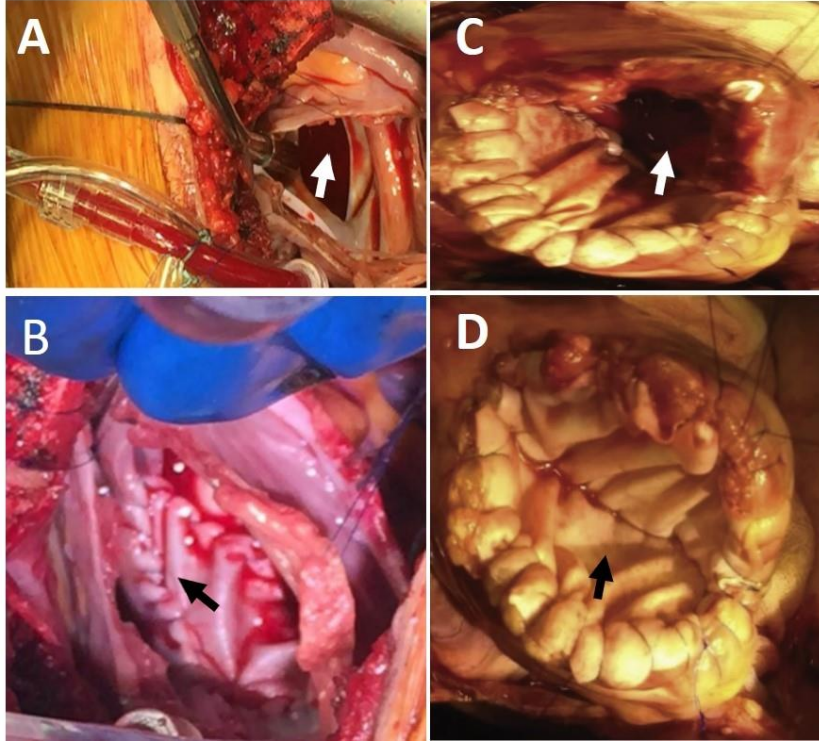
Konjenital kalp defektleri, ana kan damarlarını, kalp odacıklarını ve kalp kapaklarını etkileyebilen kalbin malformasyonudur. Bununla birlikte Michelle ve ark. konjenital kalp anomalisini “kalpte ya da hayati fonksiyonları olan intratorasik büyük damarlarda meydana gelen çok büyük yapısal anomaliler” olarak tanımlamışlardır [28]. Bu tanımda damarlar ön plana çıkmaktadır. Ancak konjenital kalp defektleri üzerine hazırlanan birçok epidemiyolojik raporda biküspit aortik kapakçık, mitral kapak prolapsusu, Marfan Sendromu, kardiyomiyopatiler ve konjenital aritmilerin de bu defektlere sebep oluşturduğu ifade edilmiştir. Bu durum konjenital kalp defektlerin tanımının bahsedilen anomalileri kapsayacak şekilde genişletilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır [29]. Bu defektler, gebeliğin ilk 8 haftası içinde ortaya çıkan ve dünya çapında en yaygın görülen doğumsal anomalilerdir [1]. Konjenital kalp defektleri, canlı doğan bebeklerin %0,8' inde görülme sıklığındadır [30]. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa'da 19 milyondan fazla sayıda çocuk kalp hastası olup; bunların 230.000'den fazlası ölümlerle sonuçlanmaktadır. Bu durum yılda 140 milyar dolar gibi oldukça önemli bir ekonomik yük getirmektedir. Dünya çapına yansıtıldığında ise her yıl 2,5 milyon çocuğun konjenital

kalp rahatsızlığıyla doğduğu ve bu vakaların büyük bir kısmının sonradan kalp hastası olduğu bilinmektedir [31]. ABD’de 2010-2014 yılları arası baz alınarak yapılan değerlendirmede atrioventriküler septal defektlerin oranı 10.000 canlı doğumda 5,38 olarak hesaplanmıştır [32]. Konjenital kalp rahatsızlıkları, siyanotik kalp hastalığı, sol-tarafli obstrüksiyon (tıkanıklık) defektleri ve septum defektleri olarak üç ana kategoride sınıflandırılabilir [33]. ASD, VSD, çift çıkışlı ventriküler ve hipoplastik sol kalp sendromu ve benzeri konjenital kalp defektleri, iskemik kalp hastalıklarında da olduğu gibi, defektli ve nekrotik miyokardiyal yapıyla ilişkilidir [34].

Normal bir kalp anatomisi incelendiğinde sağ ve sol üst odacıkların (atrium) birbirileri ile bağlantı kurmayan bağımsız yapılar oldukları görülür. Ancak bu iki odacık arasında bulunan duvarda (septum) meydana gelen çeşitli malformasyonlar sonucu bu iki yapı arasındaki duvarın bütünlüğü bozulur ve odacıklar arasında etkileşim meydana gelir (Şekil 2.1A). Bu malformasyonlar ASD olarak tanımlanmaktadır [35]. Malformasyonların neden olduğu açıklık embriyonik dönemde meydana gelen anomalilerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, *TBX5*, *GATA-4* ve *NKX2.5* gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar da ASD oluşumu ile ilişkilendirilmiştir [36]. Yetişkinlerde en fazla görülen ASD’lerin dört ana türü bulunmaktadır. Bu türlerden en fazla görüleni ostium sekundum defektir ve ASD vakalarının %80’ni teşkil etmektedir [37]. ASD’ler yetişkinlerde asemptomatik olarak görülmekte olup birçok vakada nefes darlığı ve egzersizlerde yaşanan problemler gibi spesifik olmayan semptomlarla kendini göstermektedir [38]. Günümüzde ASD’nin tedavisi için kullanılan iki temel yaklaşım vardır. Bunlardan ilki torakotomi cerrahi ile kapatma ve ikincisi ise girişimsel kapatma tedavisidir. Girişimsel kapatma tedavisinde kullanılan birçok araç vardır. Bu araçlarda kısmen ve tamamen biyobozunur olan malzemeler kullanılmaktadır. Biyobozunur malzeme olarak polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve polikaprolakton (PCL) sıkça kullanılmaktadır [39]. Biyobozunur malzemeler yanında perikard bazlı yamalar da ASD tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.1B) [40].

VSD en sık görülen konjenital kalp rahatsızlığı olup, tüm kalp anomalilerinin %40’nı oluşturmaktadır. VSD’nin görülme sıklığı yaş faktörü ile değişkenlik göstermektedir. Çünkü doğumda görülen birçok malformasyon doğum sonrasında kapanmaktadır. Yapılan çalışmalarda ASD’de olduğu gibi *TBX5* ve *GATA-4* genlerinde meydana gelen mutasyonlar VSD ile ilişkilendirilmiştir [41]. VSD tedavisinde açık kalp ameliyatı standart yöntem olarak karşımıza çıksa da kateter temelli girişimsel cerrahi uygulamaları

da kullanılmıştır [42]. Kardiyovasküler cerrahi ve pediyatrik kardiyak cerrahide kardiyak yama uygulaması, kardiyovasküler rahatsızlıkların onarımı veya rekonstrüksiyonu için kritik bir cerrahi tekniktir [43]. Bu kapsamda kalbin iki ventrikülü arasındaki açıklık (septum) ile karakterize edilen VSD, bu açıklığın kendiliğinden kapanmadığı durumda, kardiyak yama kullanılarak tedavi edilmektedir (Şekil 2.1 C ve D). Bu kapsamda sıgır perikardiyumu yama malzemesi olarak kullanılabilecek önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Us ve ark. yaptıkları çalışmada VSD hastalarında kapatma malzemesi olarak sıgır perikardiyumu kullanılmış ve elde ettikleri sonuçlar hastalarda anevrizma görülmediğini ancak 1 yıl sonunda yer yer kalsifikasyonun meydana geldiğini göstermiştir [44].



Şekil 2.1. Konjenital septal defektler ve perikard bazlı kapatma malzemeleri ile kapatılması A) ASD ve B) ASD'nin perikard bazlı kapatma malzeme ile kapatılması [45] C) VSD ve D) VSD'nin perikard bazlı kapatma malzemesi ile kapatılması [46]. Beyaz oklar ASD ve VSD'yi siyah oklar ise perikard bazlı kapatma malzemesi ile kapatılmış ASD ve VSD'yi göstermektedir.

2.1.2. İskemik Kalp Hastalıkları

İskemik kalp hastalığı ya da MI, miyokardiyumda (kalp kası) gerçekleşen hücre ölümü ve enflamasyonla sonuçlanan iskemik (vücutta bir bölgenin yerel kanlanma eksikliği) bir olaydır [47]. MI neticesinde görülen kalp rahatsızlıkları dünya çapında yüksek oranda mortalite ve morbiditeye sebep olurken 2019 verilerine göre dünya genelinde KH kaynaklı ölümlerin %49,2'si MI sebebiyle meydana gelmiştir [2, 3]. 2018 yılı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre ise ülkemizde KH'lar arasında iskemik kalp hastalığı ölüm nedeni bakımından %39,7 ile ilk sırada yer almaktadır (<https://tuikweb.tuik.gov.tr/>). MI takiben oluşan güçlü enflamatuvar yanıt ile ölü hücreler makrofajlar tarafından kaldırılır. Sonraki haftalarda enfarktüs bölgesine fibroblastlar ve endotel hücrelerin göçüyle kalın ve sert kollajen skar dokusuna dönüşen granülasyon dokusu oluşur [48]. Bu hastalarda kalpteki hasarlı dokunun fibrotik hale gelmesiyle miyokardiyal duvarlarda incelmeye bağlı olarak, yetersiz kasılma sonucu genişleme ve organ yetmezliği görülmektedir. Kaybedilen kardiyomiyositlerin telafi edilmesi için hücreler hipertrofiye girerek kalbin mimari yapısını korumaya çalışırlar [2, 47]. Organ yetmezliği semptomlarının azaltılması için çeşitli farmakolojik uygulamalar ve cerrahi müdahaleler yapılmaktadır. Kalp yetmezliğinin ilerlemesinin önlenmesi için β -blokörler, Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Öte yandan, koroner arter baypas greftleri kullanılarak miyokardiyal dokunun yeniden vaskülerizasyonu da sağlanabilmektedir. Fakat en iyi ilaçlar veya koroner arter baypas greftleriyle bile şiddetli miyokard enfarktüslerin ventriküler fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanmasının önüne geçememektedir. Bu durumda tedavi seçenekleri “transplantasyona köprü” olarak kullanılan sol ventrikül destek cihazlarının kullanımı veya kalp transplantasyonudur. Kalp transplantasyonu kısıtlı organ donörü desteğinin olması ve organ reddi problemleri nedeniyle organ ihtiyacını karşılamada yetersiz kalmaktadır [2, 47].

2.2. Kardiyovasküler Hastalıklardaki Tedavi Stratejileri

2.2.1. Kök Hücre Terapisi

Klinikte kalp hastalıklarının tedavisine yönelik olarak anjiyotensin reseptörü blokörleri, aldosteron antagonistleri ve β -blokörleri kullanılmaktadır. Ancak bunların kalp krizi sonrası oluşan yara dokusunun iyileştirilmesinde başarılı olamadıkları tespit edilmiştir. Kalp nakli ise en son başvurulanan yöntemdir ancak uygun donörün bulunması önemli bir

problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebeplerden dolayı rejeneratif tıp yöntemlerinden olan kök hücre terapileri son zamanlarda oldukça önemli ve umut vadeden stratejiler arasında yerini almıştır [7]. Kalp kası hastalıklarının tedavisine yönelik yapılan pre-klinik ve klinik çalışmaların önemli bir kısmında MKH'ler kullanılmıştır [49]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise iskemik kalp hastalığının tedavisinde iPKH ve Embriyonik Kök Hücreler (EKH) umut vaat eden hücre kaynakları olarak anılmıştır [50]. MKH'lerin tercih edilme sebepleri arasında kemik iliği ve yağ doku gibi ulaşılması kolay olan dokulardan izole edilmeleri, *ex vivo* koşullarda yüksek sayıda çoğaltılabilme, immün sistemi baskılama yeteneklerinin olması ve yüksek farklılaşma yeteneğine sahip olmalarıdır [49].

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda araştırmacılar kök hücrelerin güvenliğini ve etkinliğini test etmeyi amaçlamışlardır. İlk sonuçlar umut verici olmasına rağmen geniş kapsamlı yapılan klinik çalışmalar hücre terapilerinin ancak kısıtlı bir yarar sağladığını göstermiştir. Hayvan deneylerinde kök hücre terapisinin kalp kası hasarının ilerlemesini durdurduğu ve hasarlı bölgenin onarıldığı tespit edildikten sonra klinik çalışmalar başlamıştır. 2004 yılında yayınlanan ve 60 hasta ile yapılan bir klinik çalışmada (BOOST) [51], araştırmacılar kemik iliği kaynaklı kök hücre terapisinin 6. ayında Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu (LVEF) değerinde önemli bir artış meydana getirdiğini ancak 18. ayında bu faydanın tamamen ortadan kalktığını raporlamıştır [9]. 200 hasta ile yapılan başka bir çalışmada da (REPAIR-AMI) BOOST deneyinde olduğu gibi tedavinin altıncı ayında LVEF değerinde önemli bir artış olduğu ve bu değerin 2 yıl boyunca normal değerlerde olduğu tespit edilmiştir [52]. Bu umut verici sonuçlara rağmen kemik iliği kaynaklı kök hücrelerle sonradan yapılan diğer birçok klinik çalışmada önemli bir fayda sağlanmadığı raporlanmıştır. Yakın zamanda yayınlanan ve 2.732 kişinin katıldığı çalışmanın sonuçları, kök hücre terapisinin güvenli olduğunu ancak ne kısa ve ne de uzun dönemde hayat kalitesi ve LVEF değerinde kayda değer bir iyileşme sağlayamadığını göstermiştir [53]. ABD'de yapılan ve kök hücre tedavisinin kalp hastalıklarında kullanıldığı en geniş katılımlı klinik çalışmanın (PreSERVE-AMI) sonuçları, kök hücre kaynaklı herhangi bir güvenlik sorunu oluşmadığı ancak tedavinin herhangi bir fayda sağlamadığını göstermiştir [54]. Yaşanan bu olumsuzlara ek olarak hücre terapilerinin başarısız olmasının önemli bir nedeni kullanılan hücrelerin yara bölgesinde tutulmasının düşük seviyede olmasıdır [55]. Yara bölgesine transplante edilen hücreler, enjeksiyon alanında hızlı bir şekilde kaybolmaktadır. Çünkü, hücreler ya canlılıklarını yitirmekte ya

da dolaşım sistemine girerek “wash out” olmaktadır [10]. Enjeksiyon bölgesinde düşük sayıda hücre sayısının olması enjeksiyon yöntemi ile direkt ilişkilendirilmektedir. Sıklıkla tercih edilen enjeksiyon yöntemleri arasında intramiyokardiyal enjeksiyon, intrakoronar, transendokardiyal ve transepikardiyal enjeksiyon bulunmaktadır [56] . Bu yöntemlerle yapılan hücre terapisi çalışmalarında kısa dönemde enjeksiyon bölgesinde implante edilen hücrelerin yaklaşık %10-15’i [57], uzun dönemde ise (>1 ay) sadece %1’lik bir kısmı tespit edilebilmektedir [58]. MI durumunda kalp dokusunda 1 milyar hücrenin zarar gördüğü düşünöldüğünde bu oranların ne denli yetersiz kaldığı net bir biçimde anlaşılmaktadır [59]. Intramiyokardiyal enjeksiyon yöntemi ile implante edilen hücrelerin önemli bir kısmı (%35) ise akciğerlerde tespit edilmiştir [60]. Öte yandan doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak intramiyokardiyal enjeksiyona kıyasla 10 kat daha fazla hücrenin yara bölgesinde tutunabildiğı ifade edilmiştir [55].

2.2.2. Kardiyak Yamalar

Birçok klinik öncesi çalışmada, kök hücrelerin, genlerin ve büyüme faktörlerin enjeksiyonunun terapötik etkinlikleri değerlendirilmiş ve bu stratejilerin düşük stabilite ve raf ömrüne sahip oldukları raporlamışlardır. Dolayısıyla yüksek terapötik performansın elde edilmesinde tedavi edici ajanın yara bölgesine taşınma yöntemi kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda kardiyak yamalar ön plana çıkmıştır. Kardiyak yamaların bileşenleri basit olarak iki kısma ayrılabilir; taşıyıcı unsur olarak kullanılacak substrat ve tedavi ajanı [61].

Kardiyovasküler cerrahi ve pediatrik kardiyak cerrahide kardiyak yama uygulaması, kardiyovasküler rahatsızlıkların onarımı veya rekonstrüksiyonu için kritik bir cerrahi tekniktir [43]. Klinik kullarımdaki mevcut kardiyak yamalar; sentetik (polietilen tereftalat (PET) veya Dakron® ve politetrafloroetilen (PTFE)) ve perikardiyum (otolog, allojenik veya zenojenik) ile kısıtlıdır [62-64]. Mevcut yama ürünleri sentetik olup dokuya entegre olamayan yapılardır ve mekanik kuvvetin zamanla kaybı, rejeneratif olamama, enfeksiyon ve anevrezma riskinde artış gibi dezavantajlara sahiptir. Sentetik malzemelerden Dakron® ve PTFE’ nin yüzey modifikasyonu, cerrahi işlenebilirliği, iyi porozite özellikleri olmasına rağmen; yabancı vücut reaksiyonu, elastik uygunluğu sağlayamaması, anastomoz bölgesinde hiperplazi, tromboz riski gibi dezavantajları vardır [4]. Bunlara ek olarak organa spesifik yapının ve hücre tipi spesifik nişlerin yetersizliği de bu yamaların dezavantajıdır [5, 6]. Gluteraldehit ile fıkse edilmiş ya da edilmemiş olan

otolog perikardiyum ya da zenoperikardiyum yamalar ise kalsifikasyon, katılaşma, büzülme ve uzun dönemde parçalanma gibi sorunlara kaynaklık etmektedir [65]. ASD ve VSD gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılacak ideal bir yamanın sahip olması gereken özellikler şu şekilde sıralanmıştır; immünojenik olmamalı, doğal doku ile orantılı büyüyebilme, uzun süren mükemmel hemodinamik profile sahip olma, farklı boyutlarda bulunabilme, esnek olma, tromboembolizm riski taşımama, kalsifikasyona dirençli olma ve düşük yapısal dejenerasyon insidansına sahip olma. Birçok çalışma yapılmasına rağmen henüz tüm bu özellikleri taşıyan bir yama geliştirilememiştir [66]. Kardiyak doku mühendisliği yukarıda bahsedilen ideal yama özelliklerine sahip yapıların geliştirilmesi için oldukça umut vadeden bir disiplin olarak görülmekte ve bu alandaki çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir.

2.3. Kardiyak Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Kardiyak Yamalar

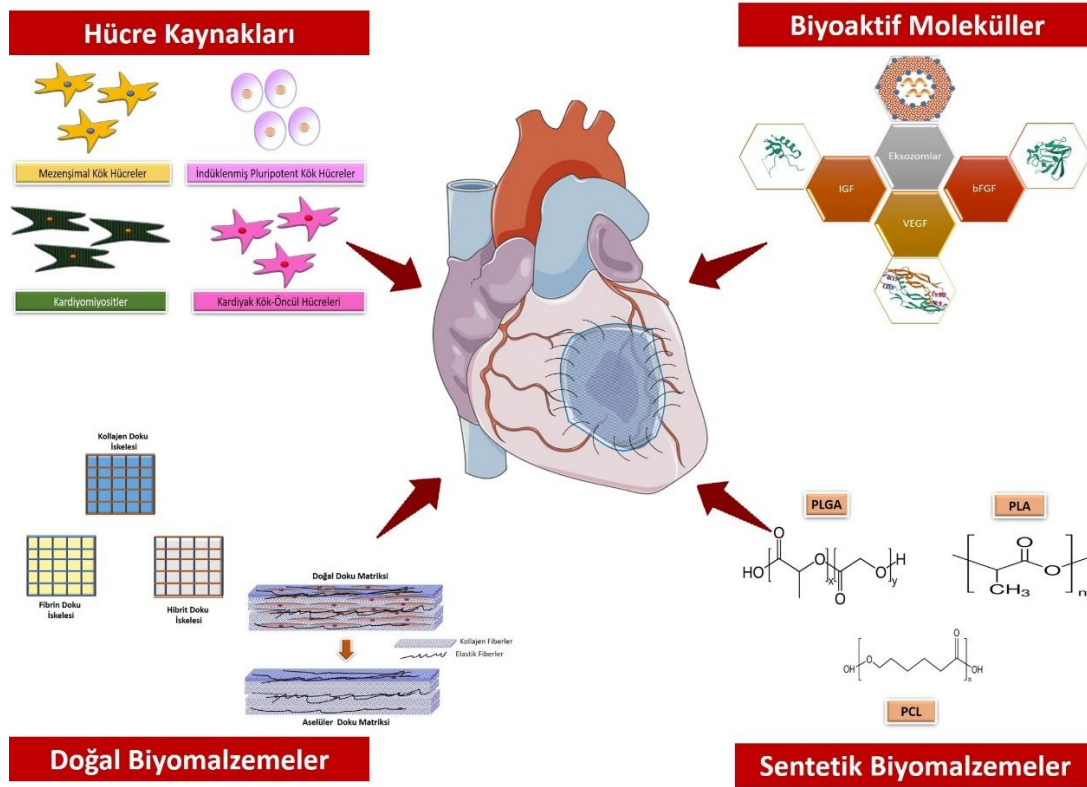
Son evre kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecek fonksiyonel 3B kardiyak dokuların geliştirilmesi hem araştırmacıların hem de hekimlerin önünde çözüm bekleyen oldukça zor bir problemdir [67]. İlk olarak 1990'ların başlarında bir disiplin olarak ortaya çıkan ve zarar görmüş doku ve organların onarılması için yeni nesil yaklaşımlar geliştirmeyi hedefleyen doku mühendisliği önemli bir araştırma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır [68]. Doku mühendisliği yöntemlerini kullanarak bir dokunun inşası sürecini, bir evin inşası ile analogi yaparak anlamak mümkündür. Bir evde sağlamlık için duvarlara, malzemelerin taşınması için kapılara, su ve elektriğin taşınması için sıhhi tesisat ve devrelere ve oksijenin sirkülasyonu için pencerelere nasıl ihtiyaç varsa doku mühendisliği yapılırken de benzer konular -sırasıyla tutunma, difüzyon, entegrasyon ve vaskülarizasyon- dikkate alınmalıdır. Böyle bir tasarımın temel amacı evin sakinleri için, ki doku mühendisliği uygulamalarında bunlar hedef dokunun inşası için kullanılan hücrelerdir, yaşanabilir bir çevre oluşturmaktır [69]. Doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilen ürünleri 2 farklı kategoride değerlendirmek mümkündür. Bunlardan ilki, kaybedilen ya da zarar görmüş doku veya organların yerine kullanılabilecek dokuların geliştirilmesi, ikincisi ise doğal dokuyu taklit eden *in vitro* modellerin geliştirilmesidir. Bir doku *in vitro* model olarak geliştirildiğinde, geliştirilen model hedef dokunun fonksiyonel ve fizyolojik özelliklerini taşımalı ve biyolojik faktörlerin test edilmesine olanak sağlamalıdır. Bunun yanı sıra, bu modellerin, maliyeti düşürmek için küçük boyutta olması ve taramayı kolaylaştırması arzu edilmektedir [70, 71].

Doku mühendisliği yaklaşımı zamanla kardiyak alanda da kullanılmaya başlanmıştır [72]. Çünkü kalp kası hücrelerinin kaybı ile sonuçlanan durumlarda kalp kası kendini yenileyememekte ve bu durum zamanla daha kötü hale gelerek kalbin fonksiyonunu yitirmesi ile sonuçlanmaktadır [73]. Bu da kalbi, doku mühendisliği alanında çalışan araştırmacılar açısından fonksiyonel doku mühendisliği ürünleri ile yaranın onarılması ve kalp fonksiyonlarının eski haline getirilmesi için çok cazip bir alan haline getirmektedir [74].

Genel olarak kardiyak doku mühendisliği stratejileri kalp spesifik morfogenezinin ve hücre canlılığının korunmasının sağlanması üzerinedir [75]. Kardiyak yamalar fonksiyonunu yitirmiş bir kalp parçasının yerine konulan yapılar olarak tasarlanır ve tanımlanırlar. Bir yama terapötik ajanın yara bölgesine taşınması için tasarlandığında hangi hücre popülasyonunun ve malzemenin kullanılacağına tespit edilmesi eşit değerde önemlidir [76]. Kardiyak doku mühendisliği ürünü olan kardiyak yamaların biyobozunur, biyoyumlu, biyoaktif, kalp dokusunun mikroyapısı ile fizyolojik olarak uyumlu ve kalp dokusunun mekanik özelliklerine benzer sertlik ve esneklik gibi özelliklere sahip olmalıdır [77]. Bunlarla birlikte kuvvetli ve stabil kasılma ve damarlanmaya olanak sağlama aranan diğer önemli özelliklerdir [78].

Genel olarak kardiyak doku mühendisliği sistemleri 2 temel kategoride değerlendirilebilir: doku iskelesi temelli ve doku iskelesinin kullanılmadığı sistemler (hücre tabakaları yöntemi). Son 20 yılda doku mühendisliği ürünü olan kardiyak yamaların küçük ve büyük hayvan modellerinde MI sonrasında kalp fonksiyonlarını artırdığı yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Tek hücre katmanından oluşan kardiyak yamalarda beslenmenin yeterli düzeyde olmaması nedeniyle transplantasyondan sonra hücre ölümünün meydana geldiği ifade edilmiştir [79]. Dolayısıyla araştırmacılar, bu problemin üstesinden gelmek için kalp yamasına EKH'ler, iPKH'ler, endotel hücreleri [80] ya da damarlandırmayı artıracak çeşitli malzemeleri [81] eklemişlerdir. Bu eklemeler, beklendiği üzere kardiyak yamanın doğal dokuya başarılı bir biçimde entegre olmasını ve kalp fonksiyonlarını artırma noktasında başarılı sonuçlar alınması ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte yaşanan teknolojik gelişmelere paralel olarak kalp yaması mühendisliğinde kullanılabilecek birçok malzeme geliştirilmiş ve bilim insanların hizmetine sunulmuştur. Bu malzemelerin kalp yamaları mühendisliğinde kullanılması ile yamamanın doğal dokuya entegre olması bakımından hücre tabakaları stratejine göre daha başarılı sonuçların alındığı ifade edilmiştir [82]. Kalp yamalarının geliştirilmesinde

kullanılan malzeler arasında kollajen ve fibrin sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bunların yanında çeşitli dokuların hücrelerinden arındırılarak aselüler hale getirilmesi ile elde edilen doku iskeleleri de kalp yaması mühendisliğinde kullanılmaktadır. Bu doku iskeleleri çeşitli terapötik hücreler veya biyoaktif moleküllerle birlikte kullanılarak yamalar geliştirilmektedir [61] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan hücre kaynakları, biyoaktif moleküller ve doku iskeleleri malzemeleri.

Kardiyak doku mühendisliği ürünleri olan kardiyak yamalar ile yapılmış çeşitli klinik çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda yamalar hücreli veya hücretsiz olarak uygulanmıştır. Bu alanda yapılan ilk klinik çalışma MAGNUM adlı çalışmadır. Bu çalışmada araştırmacılar, kemik iliğinden izole ettikleri mononükleer hücreleri tip I kollajen kullanılarak üretilen doku iskelesinde kültüre etmiş ve hastalara implante etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar yamanın implante edildiği grupta ejeksiyon fraksiyonu, yara kalınlığı ve sol ventrikülün kan ile dolma hızının arttığı tespit edilmiştir [83]. Başka bir klinik çalışmada, aselüler hale getirilmiş domuz kaynaklı ekstraselüler matriks (ECM, (CorMatrix®)) yamaları insanlarda konjenital kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır [43]. Yine domuz MI modellerinde CorMatrix®'in MI takiben oluşan hasarın iyileştirilmesinde olumlu sonuçlar elde edildiği raporlanmıştır [84]. Bunlarla

birlikte ileri derecede kalp rahatsızlığı olan hastalara enjekte edilebilir kalsiyum aljinat hidrojelilerin kullanıldığı AUGMENT-HF çalışması [85] ve yine kalp krizi geçirmiş hastalarda sodyum aljinat ve kalsiyum glükonat kullanılarak geliştirilen doku iskelesinin test edildiği PRESERVATION [86] adlı klinik çalışmalar yapılmış ve sonuçlar yayınlanmıştır.

Her ne kadar kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesinde birincil amaç zarar görmüş kalp dokusunu rejenere etmek olsa da *in vitro* koşullarda geliştirilen 3B kardiyak doku mühendisliği ürünleri KH'lerin modellenmesi, araştırılması ve anlaşılması için de önemli bir platform olarak karşımıza çıkmaktadır [87]. KH'lerin araştırılmasına yönelik yapılan araştırmalarda, sıklıkla geleneksel 2-Boyutlu (2B) hücre kültürü sistemleri kullanılmaktadır. 2B hücre kültürü sistemlerinin basit ve ucuz olmasına rağmen, hücre fenotip ve davranışların çalışılması için uygun ortamlar olmadıkları ifade edilmiştir. 2B kültürlerde hücre gelişiminde hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonu, çoğalma özellikleri, hücre yoğunluğu ve metabolik fonksiyonları farklıdır [88]. Bu sistemlerdeki hücrelerin ECM yapısında, sinyal yollarında, hücre tutunma molekülleri ve büyüme faktörü sentezinde gözlenen değişimler sonucunda hücre polaritesi, farklılaşması gibi birçok fonksiyonu değiştirerek *in vivo* doku özelliklerini yitirmektedir [89]. Etkinlik ve güvenlik parametreleri bakımından incelendiğinde, *in vivo* hayvan modelleri hala önemini korumaktadır. Ancak, hayvan modellerinde insan patofizyolojisinin etkin ve güvenilir bir şekilde taklit edilmesi bakımından çeşitli zorluklar olduğu da bilinmektedir. Bu problemler de etkin ve güvenilir teknik ve tedavilerin geliştirilmesinde başarı şansının azalmasına neden olmaktadır. *in vivo* hayvan modellerin kaynaklık ettiği diğer önemli bir problem de etik kaygılardır [90-92]. Klinik öncesi ilaç araştırmalarında fare modelleri sıklıkla tercih edilirler. Ancak, insan ile fare arasındaki fizyolojik ve filogenetik farklılıkların olduğu ve bu farklılıkların Faz-1 denemelerinde başarısız sonuçların alınmasına kaynaklık ettiği bilinmektedir. Bu başarısızlık, bir ilaç adayı molekülün Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay alarak klinikte ilaç olarak kullanılması için 0,8 ile 1,8 milyar dolar toplam maliyet ve 8-12 yıllık bir süre gerektirdiği düşünüldüğünde üzerinde durulması ve çözülmesi gereken önemli bir sorundur [93, 94]. 2B hücre kültür sistemleri ve *in vivo* hayvan modellerinin bu dezavantajları gerek ilaç araştırmalarında gerekse de KH'lerin araştırılması ve yeni nesil tedavi stratejilerinin önerilmesinde kardiyak doku mühendisliği ürünü olan 3B *in vitro* modellerin önemini artırmaktadır.

Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarının ürünü olan 3B *in vitro* yapılar, 2B kültür sistemleri ile *in vivo* modeller arasındaki boşluğu doldurarak maliyet, zaman ve etik problemlerin azalmasında önemli olan yeni nesil araçlardır [93]. 3B ortamda hücrelerin kültüre edilmesi ile geliştirilen yapıların, *in vivo* fizyolojik koşulların oluşturulması bakımından etkin yapılar olduğu ve bu özellikleri sebebiyle 2B ile *in vivo* modeller arasında köprü görevi görerek geliştirilen ilaç ya da tekniğin mekanizması ve etkinliğinin test edilmesi için yararlı araçlar olduğu vurgulanmıştır [91]. İdeal 3B modeller hem anatomik makro yapıyı hem de doku ve hücre düzeyinde mikro yapıyı göstermelidir. Bu özellikleri taşıyan *in vitro* modellerin kullanılması ile klinikteki başarı şansı belirgin bir biçimde artacağı düşünülmektedir [93].

Kardiyak doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda kullanılan üç temel araç vardır. Bunlar; i. hücre kaynağı, ii. doku iskelesi, iii. biyoaktif moleküller. Aşağıda bu üç araç detaylı bir biçimde işlenerek örneklemeler yapılmıştır.

2.3.1. Hücre Kaynakları

Kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin başarısı için kullanılacak hücre kaynağı en önemli parametrelerin başında gelmektedir. Kardiyak doku rejenerasyonunda kullanılacak hücre kaynağı, tüm kardiyak hücre tiplerine dönüşme ve fonksiyonel entegrasyon yeteneğinde olmalıdır. Aynı zamanda malign transformasyonuna dirençli bir hücre hattı seçilmelidir [11]. Klinik uygulamalar için doku mühendisliği ürünü yapının fenotipik olarak stabil kardiyak hücre popülasyonları (miyositler, fibroblastlar, vasküler hücreler) içermesi gerekmektedir [48]. Allojenik hücreler kullanıldığında görülecek kanser oranının ve enfeksiyon tekrarını artıran immun baskılayıcı tedavinin önüne geçmek için, otolog veya immun toleranslı hücre kaynağının kullanılması önerilmektedir [47, 48]. Aynı zamanda hücreler, dokunun elektro-mekanik özellikleriyle örtüşebilen kasılma yetisinde olmalıdır. Koordine olmayan kasılmalar aritmelere yol açabilmektedir. Koordine hücresel kasılmalar geniş hacimlerde kanın itilmesinde etkilidir [47].

Kalbin kasılan hücreleri olan kardiyomiyositler, üç boyutlu sınırsız yapı oluşturarak kanı ileri pompalayan mekanik kasılmanın gerçekleşmesi için elektriksel sinyallerin yayılmasını sağlarlar [48]. Major kardiyak yaralanmadan sonra bile kardiyomiyositler popülasyonun en yoğun hücreleridir. Kalpteki kardiyomiyosit olmayan hücrelerin büyük çoğunluğunu ise miyokardiyumun fonksiyonuna katkı sağlayan kardiyak fibroblastlar oluşturur. Kardiyak fibroblastlar ventriküler duvara hızla infiltre olarak, basit skar

dokusuyla yaranın iyileşmesini sağlarlar. Kardiyak fibroblastlar sağlıklı ve hastalıklı miyokardiyumun mekano-elektriksel indükleyicileri olarak fonksiyon görmektedirler [95]. Kasılan kalp hücreleri olan kardiyomiyositlerin, kasılamayan kalp hücreleri olan fibroblast hücrelerine oranı yapının kasılabilir özelliği açısından kardiyak doku mühendisliğinde oldukça kritiktir [75].

Kardiyak doku mühendisliğinde sıkça kullanılan hücre kaynağı kök hücrelerdir. Kök hücreler, embriyonik, yetişkin ve pluripotent kök hücreler olmak üzere üç temel gruba ayrılmaktadır. EKH'lerin yetişkin kök hücrelere kıyasla en önemli avantajları bu hücrelerin yüksek genomik stabilite, farklılaşma ve çoğalma kapasitelerinin olmasıdır. Ancak tümör oluşturma ve immünojenisite bu hücrelerin kaynaklık ettiği en temel problemlerdir. Bunlarla birlikte etik sorunlar ve EKH kaynaklı spesifik dokuların geliştirilmesinin zorluğu da sorunlar arasında yerini almaktadır. Yetişkin kök hücreler iki ana kategoride incelenmektedir: Hematopoetik Kök hücreler ve MKH [96].

2.3.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler

1981 yılında keşfedilen ve sınırsız çoğalma kabiliyetine sahip, kendini yenileyebilen ve ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından türevlenen doku tiplerine farklılaşabilen EKH'ler [97, 98], izolasyon yöntemleri ve kaynakları bakımından etik kaygılara kaynaklık etmektedirler. Bununla birlikte bu hücrelerin teratom oluşturma potansiyeline sahip oldukları da ifade edilmiştir [99]. Bu problemler EKH'lere alternatif olarak kullanılabilen ve yetişkin dokulardan izole edilebilecek multipotent kök hücrelere olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır.

1970'lerin ortasında kemik iliğinden izole edilen ve kültür kabının yüzeyine tutunan işçi hücrelerin keşfinden bu yana yapılan araştırmalar bu hücrelerin osteoblast ve kondrosit hücrelerine farklılaştığını göstermiştir [100]. Birçok organda bulunan bağ dokusu hücrelerine farklılaşma yeteneğinde olan bu hücreler için “Mezenkimal Kök Hücreler (MKH ya da MSC)” terimi 1991 yılında Arnold I. Caplan tarafından kullanılmıştır [101]. Literatürde MKH (MSC) kısaltması için Multipotent Stromal Hücreler, Kemik İliği Stromal Hücreleri, Mezodermal Kök Hücreler, Mezenkimal Stromal Hücreler ve daha birçok açılım kullanılmıştır [102, 103]. Caplan, son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, bu hücrelerin salgıladıkları çeşitli biyoaktif faktörler (terapötik ilaçlar olarak da nitelendirilebilir) aracılığıyla terapötik etkilerini (immünmodülatör ve rejeneratif) gösterdikleri sonucunu göz önünde bulundurarak bu hücrelerin, “*Medicinal Stem Cells*”

olarak yeniden isimlendirilmesi gerektiğini savunmuştur [104]. Uluslararası Hücre Terapi Derneğinin 2006 yılında yayınladığı ve bilimsel çevrelerce kabul gören rehberine göre bir hücrenin MKH olarak kabul edilebilmesi için taşıması gereken minimum 3 önemli kriter vardır. Bunlar; i. hücrenin substrata tutunup çoğalması, ii. CD73, CD90, CD105 gibi hücre yüzey belirteçlerini pozitif, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a ya da CD19 gibi belirteçlerini ise negatif olması ve son olarak iii. osteoblast, adiposit ve kondrositlere farklılaşabilme kabiliyetinde olmasıdır [105].

MKH ile ilgili yapılan çalışmaların çok büyük bir kısmı bu hücrelerin *in vitro* koşullardaki karakterizasyonlarına ve bu karakteristik özelliklerin açıklanmasına yönelik olarak yapılırken, bu hücrelerin *in vivo* orijinlerinin araştırılması sınırlı sayıda çalışmaya konu olmuştur [106]. Bağ doku tipleri (stroma) vücudumuzun her yerinde ortak olarak bulunan dokulardır. Bununla birlikte her organda kan damarlarının bulunması, damarların MKH'lere kaynaklık edebileceği hipotezinin ortaya atılmasını sağlamıştır [107]. Dolayısıyla bu durum, bulundukları dokunun homeostatik mekanizmalarının devamlılığını sağlayan ve yara oluşumu durumunda dokunun onarımından sorumlu olan MKH'lere kaynaklık edebilecek ortak lokal öncül hücrelerin varlığını düşündürmektedir. Neredeyse tüm doku tiplerinde, doku spesifik MKH'lerin izole edilmiş olması bu durumu açıklamaktadır. 1800'lerin sonlarına doğru keşfedilip daha sonraları perisitler olarak isimlendirilen ve damarların çevresinde bulunan hücreler ile MKH'ler CD73, CD105, CD90 ve CD44 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmektedir [106, 108]. Bunlara ek olarak pankreas, plasenta, iskelet kası ve yağ dokusu gibi birçok insan ve fare dokusunda CD146, platelet büyüme faktörü (PDGF) reseptörü ve nöral glial antijeni 2 pozitif hücreler perisitler ile ilişkilendirilmiştir [109]. Bu belirteçler kullanılarak izole edilen perisitlerden uygun kültür koşullarında adiposit, osteoblast ve kondrosit benzeri hücrelerin elde edilebildiği ifade edilmiştir [107]. Tüm bu veriler, bu konuda çalışan araştırmacıların perisitlerin MKH'lerin öncülleri olduğunu kabul etmesini sağlamıştır.

Perisitlerin yanında MKH'lere kaynaklık ettiği düşünülen diğer hücre tipi fibroblastlardır. Fibroblast hücreleri, birçok dokunun hücre dışı matriksinin sentezinden sorumlu olan ve hemen hemen her doku ve organda bulunan hücrelerdir. MKH ile fibroblast hücreleri arasında büyük benzerlikler bulunmaktadır [110]. Her iki hücre tipi yüzeye bağımlı hücreler olup aynı morfolojik görünüme sahiplerdir. İnsan dermal fibroblast hücreleri, MKH'lerin izolasyonunda kullanılan birçok belirteç bakımından pozitiflerdir [111]. Bunlarla birlikte multipotensi özellikleri bakımından çelişkili sonuçlar olsa da fibroblast

hücrelerinin osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve hepatositlere farklılaşma yetisinde oldukları gösterilmiştir [112, 113]. Son olarak insan dermal fibroblast hücrelerinin MKH'lerin gösterdiği immün sistemi düzenleme fonksiyonunu da gösterdikleri raporlanmıştır [112].

Wagner ve ark. yaptıkları çalışmada yağ, kemik iliği ve kordon kanından izole ettikleri MKH'leri fibroblast hücreleri ile farklılaşma, yüzey belirteç ifadesi ve gen profili bakımından karşılaştırmış ve elde ettikleri sonuçlar, kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma yetisinde olduklarını ancak fibroblastların farklılaşmadıklarını göstermiştir. Fenotipik hücre yüzey belirteçleri bakımından kök hücreler ve fibroblast hücreleri arasında bir fark tespit edilememiştir. Ancak, global gen profili bakımından her iki hücre tipi arasında önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir [114]. Öte yandan Blasi ve ark. yağ dokudan izole edilen MKH'leri morfoloji, büyüme hızı, multipotensi (osteoblast, adiposit ve kardiyomiyosit benzeri hücelere farklılaşma), fenotipik, anjiogenez ve anti-inflamatuvar etki bakımından fibroblast hücreleri ile kıyasladıkları çalışmada, bu iki hücre tipi arasında morfoloji, büyüme hızı, multipotensi ve fenotipik özellikler bakımından bir fark tespit edilmemiştir. Ancak, anjiyogenez ve anti-inflamatuvar etki bakımından MKH'lerin daha etkili oldukları bulgularla desteklenmiştir [115]. Covas ve ark. tarafından yapılan kapsamlı çalışmada ise fetal ve yetişkin dönem dokulardan izole edilen kök hücreler, perisitler ve fibroblast hücreleri morfoloji, farklılaşma yetisi, fenotip ve global gen profili bakımından kıyaslanmış, hücre morfolojisi, farklılaşma ve fenotip bakımından üç hücre tipi arasında fark tespit edilmemiştir. Global gen profili bakımından ise MKH'ler perisitler ile benzerlik gösterirken, fibroblastlar düz kas ve miyofibroblastlar ile benzer profil göstermiştir [116].

Kaynak olarak MKH'ler yetişkin (kemik iliği, yağ doku, kas doku ve periferik kan), perinatal (plasenta, umbilikal kordon, umbilikal kordon kanı, kordon-plasenta bağlantısı ve Wharton's Jelly) ve fetal (amniyotik sıvı ve kan, kemik iliği, kalp, pankreas ve karaciğer gibi fetal dokular) dokulardan izole edilebilmektedir [103]. Kemik iliği, MKH'lerin izolasyonu için en iyi şekilde karakterize edilen kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte MKH'lerin farklılaşma yetilerine dair birçok bulgu kemik iliğinden izole edilen hücreler kullanılarak elde edilmiştir. Kemik iliğinde MKH'lerin kısıtlı sayıda oldukları ve MKH oranı 1 milyon hücrede 10 hücre olarak ifade edilmiştir [117]. MKH'lerin ve kemik iliği kaynaklı MKH'ler prelinik ve klinik denemelerde çeşitli kalp hastalıklarının tedavisine yönelik olarak kullanılmış ve elde edilen veriler bu

hücrelerin kardiyak fonksiyonunu ve kalp dokusunun rejenerasyonunu sağladığını göstermiştir [12]. Literatür verileri incelendiğinde MKH'lerin kullanıldığı birçok çalışmada birçok kardiyak grefti/yaması geliştirildiği görülebilir. Bu amaç için gerek sentetik gerekse de doğal biyomateryaller doku iskelesi malzemesi olarak hidrojel, poroz ya da nanofiber formunda kullanılmaktadır [118, 119]. Ayrıca herhangi bir destekleyici doku iskelesinin kullanılmadığı MKH hücrelerinden geliştirilen hücre tabakalarının kullanıldığı uygulamalar da mevcuttur [120].

2.3.1.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında hücre kaynağı olarak iPKH'ler ön plana çıkmaktadır. iPKH'ler embriyonik kaynaklı olmayan hücrelerden (örneğin yetişkin somatik hücreleri) ektopik ekspresyon gibi dışsal etkilerle elde edilen pluripotent hücrelerdir. İlk olarak 2006 yılında Yamanaka grubu tarafından, fare fibroblast hücrelerinden, *Klf4*, *Sox2*, *Oct4* ve *c-Myc* genlerinin retroviral transdüksiyonu ile elde edilmiştir [121]. 2007 yılında ise c-Myc onkogenik transkripsiyon faktörü dışında aynı kombinasyon ve faktörlerin farklı kombinasyonları kullanarak insan hücrelerinden pluripotent kök hücreler elde edilmiştir [122, 123]. iPKH'ler somatik hücrelerden elde edildiği için etik sorunları aşarak, ilaç araştırmalarında, doku mühendisliği uygulamalarında ve hücre tedavilerde kullanıma potansiyellerinin yüksek olduğu belirtilmektedir [122]. Embriyonik kök hücrelerin birçok karakteristik özelliği iPKH'lerde de bulunmaktadır. iPKH'ler, alkalen fosfataz pozitif hücrelerdir, morfolojileri embriyonik kök hücrelere benzemekte ve her üç germ tabakasına da (ektoderm, endoderm, mezoderm) farklılaşabilmektedir. Bunlara ek olarak, gen ifade profili, DNA metilasyon modeli, limitsiz proliferasyon aktivitesi, teratom oluşturma yeteneği ve kimerik canlılar oluşturabilme potansiyeli bakımından benzerlik göstermektedir [124]. iPKH'ler; otolog hücre tedavisinde, monogenik ve multigenik hastalıkların modellenmesinde, kompleks genetik özelliklerin ve alel varyasyonun çalışılmasında ve ilaç, toksisite, farklılaşma ve tedavi için substrat olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, son yıllarda iPKH üretimi için çok sayıda protokol geliştirilmiş ve farklı fare ve insan hücre popülasyonları kullanılmıştır [125].

Son yıllarda *in vitro* koşullarda kardiyomiyositlerin geliştirilmesi konusunda oldukça önemli gelişmeler yaşanmıştır. Bu gelişmelerden biri pluripotent hücrelerden ventriküler, atrial ve nodal benzeri kardiyomiyositlerin geliştirilmesidir. İkinci önemli gelişme ise miyosit olmayan hücrelerin kardiyomiyositlere transdiferasyonudur [126-128].

EKH'lerin fonksiyonel kardiyomiyositlere farklılaştırılması, ilk defa 2001 yılında Kehat ve ark. [129] tarafından ve iPKH'lerin ise 2009 yılında Zhang ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada, iPKH kaynaklı kardiyomiyositlerin (iPKH-KM), EKH kaynaklı kardiyomiyositler ile kardiyak spesifik gen paterni, çoğalma ve elektrofizyolojik olarak benzerlik taşıdıklarını göstermiştir [13]. Öte yandan, embriyonik dönemde pluripotent kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında Aktivin/Nodal, TGF- β , GSK3, WNT ve BMP gibi yolların görev aldığı tespit edilmiştir [130]. Dolayısıyla *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda bu yolların inhibisyonu ve/veya aktivasyonunu temel almış farklılaştırma protokolleri de kullanılmaktadır. Laflamme ve ark. yaptıkları çalışmada EKH'lerin matrijel kaplı kültür kabında aktivin A ve kemik morfojenik proteini-2 (BMP-2) büyüme faktörünü kullanarak kardiyomiyositlere farklılaşması sağlanmıştır. Yapılan analizler EKH kaynaklı kasılabilen kardiyomiyosit hücre oranının %30'dan düşük olduğunu göstermiştir [131]. Başka bir çalışmada ise EKH'ler veya iPKH'ler, mTeSR-1 serumsuz besi ortamında kültüre edilip, WNT yolağının inhibisyonunu sağlayan küçük moleküllere maruz bırakıldıklarında, kültür ortamında kendiliğinden kasılabilen kardiyomiyosit oranının %82-95 aralığında olduğu tespit edilmiştir [132]. Yine aynı şekilde farklılaştırma protokolüne GSK3 ve WNT inhibisyonunu sağlayan küçük moleküllerle beraber BMP-4 ve askorbik asidin eklenmesiyle elde edilen oran yaklaşık olarak %80 olarak tespit edilmiştir [133].

Birçok kalp hastalığının yetişkin kardiyomiyosit fizyolojisi ile ilişkili olmasından dolayı ilaç araştırmalarında kullanılan testlerde yetişkin kardiyomiyositlerin kullanılması kritik önem taşımaktadır. Kök hücrelerin kardiyomiyositlere geliştirilmesi konusunda umut vaat eden birçok gelişmenin olmasına rağmen, kardiyomiyosit kültürlerinin saflığının ve elde edilen kardiyomiyositlerin olgun olmaması hala çözüm aranan sorunlardır. iPKH-KM'ler, yetişkin kardiyomistlerle kıyaslandığında bazı akımların yoğunluklarının farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, bu hücrelerin elektrofizyolojik olarak olgunlaşmamış hücreler olarak tarif edilmesine neden olmaktadır [134]. Çeşitli küçük kimyasal moleküller kullanılarak hiPKH'ler kardiyomiyositlere başarılı bir şekilde farklılaştırılmasına rağmen, geliştirilen bu hücreler, fizyolojik yapı, gen ekspresyon profili ve fonksiyon bakımından olgun kardiyak dokusunu taklit edemedikleri ifade edilmiştir [135, 136]. İmmünfloresan boyamalar alfa aktin gibi yapısal proteinlerin ifade olduğunu göstermesine rağmen, iPKH-KM'lerin morfolojik ve sarkomer organizasyonu

bakımından yetişkin kardiyomiyositlerden çok fetal kardiyomiyositlere benzedikleri bildirilmiştir. iPKH-KM'lerin olgunlaşmamış olduğunu gösteren diğer bazı kanıtlar ise gelişmemiş T tubüler sistem, oluşan gap bağlantılarında erken dönem *in vivo* kalp gelişiminin belirteci olan konneksinlerin ifade olması, embriyonik ve fetal dönemle ilişkilendirilen düz kas aktinin ifade olması olarak sıralanabilir [137-140].

2.3.1.3. Diğer Hücre Kaynakları

Kardiyomiyositler: Kalp dokusunda en fazla bulunan hücre tipi kardiyomiyositlerdir. Dolayısıyla bu hücrelerin izole edilmesi ve kullanılmasına dair çalışmalar yapılmıştır. Uygun bölünme hızına sahip olmaları ve *in vivo* koşullardaki sağ kalım oranlarının yüksek olması neonatal ve fetal dönem kardiyomiyositlerin tercih edilme sebepleridir [141]. Ancak bu hücrelerin immünojenik etki, tümör oluşturma riski, az elde edilme ve etik problemler gibi önemli sorunları mevcuttur [142]. Ayrıca doğal doku ile entegrosyonları noktasında küçük hayvan denemelerinde başarılı sonuçlar olsa da büyük hayvan denemelerinde aynı başarıdan söz etmek mümkün değildir [143]. Bununla beraber, kardiyomiyositlerin izolasyonu için kullanılabilecek insan kalbinin limitli olması, hastadan alınan kalbin hücre izolasyonunun yapılacağı merkeze götürülmesi sürecinin özel lojistik yöntemlerle yapılması ve kardiyomiyosit izolasyonunu her an yapabilecek uzman bir kadronun olması gibi aşılması zor durumların da olduğu literatürde ifade edilmiştir [144]. Tüm bu dezavantajlar primer kardiyomiyositlerin kardiyak doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımlarını önemli düzeyde kısıtlamış ve yeni hücre kaynağı arayışlarını artırmıştır.

Çizgili kas hücreleri: Primer kardiyomiyosit hücrelerine kıyasla elde edilme kolaylığı, kültürde yüksek sayıda üretilebilme, *in vivo* da canlılıklarını koruyabilme, hastadan kolaylıkla temin edinebilme ve immünreaksiyon ihtimalinin düşük olması gibi önemli avantajları olsa da çizgili kas miyoblastlarının kardiyak doku hücrelerinin sahip olduğu elektromekaniksel özelliklere sahip olmamaları bu hücrelerin kalp hastalıklarının tedavisine yönelik olarak kullanılmasını kısıtlamaktadır [141]. Yapılan pre-klinik çalışmalarda bu hücrelerin doğal doku ile yüksek oranda entegre olduğu, miyotüp oluşumlarını sağladığı ve kalp fonksiyonlarını artırdığı tespit edilmiştir. Faz I klinik çalışmalarda, bu hücrelerin kullanılabildiğini ve fakat kalp fonksiyonlarının iyileştirilmesinde çok da etkili olmadıkları ve aritmilere sebep oldukları gösterilmiştir [145]. Yanı sıra bu hücrelerin adezyon ve gap bağlantı proteinlerini ifade

edememelerinden dolayı kalp dokusu ile elektromekaniksel olarak uyum sağlamayarak elektrofizyolojik problemlere neden oldukları da bildirilmiştir [141].

Kardiyak Kök-Öncül Hücreleri: İlk defa 2003 yılında yetişkin sıçan kalbinde tanımlanan bu hücrelerin kök hücre belirteçlerini ifade ettiği (c-kit^{poz}), kendini yenilebildiği, multipotent karakter gösterdiği ve yetişkin sıçanlarda geliştirilen MI modelinde test edildiklerinde yara bölgesinde rejeneratif etki gösterdiği ve damarlanmayı sağladıkları görülmüştür. Bu hücreler daha sonra fare, insan ve domuz kalp dokularında da tanımlanmış ve karakterize edilmiştir [146]. Kalp kası hücrelerinin yanında *in vitro* koşullarda düz kas ve endotel hücrelerine farklılaşma yeteğinde olan ve miyokardiyumdan alınan örneklerden eksplant kültürü yöntemi ile izole edilebilen bu hücreler, kardiyosfer oluşturma yetisinde olup CD34 ve CD45 gibi belirteçleri ifade etmemektedir [147, 148]. Yapılan çalışmalar bu hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere kıyasla daha etkili kardiyomiyositlere farklılaştıkları [149] ve daha az sayıda kullanımına rağmen kalp fonksiyonlarını geliştirme, doğal doku ile entegrasyon, *in vivo* koşullarında farklılaşma ve yara onarımı sağladıkları gösterilmiştir [150]. c-kit^{poz} hücrelerinin yanında kalp dokusunda izole edilen ve PDGFR α , ISL1 ve SCA1 belirteçlerini pozitif olarak ifade eden hücre popülasyonların da kök hücre özelliklerini gösterdiği ve *in vitro* koşullarda kardiyomiyosit, endotel ve düz kas hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir [151]. Önemli avantajlarına rağmen bu hücrelerin izole edilmesi için insan kalp dokusundan örnek alınmasının getireceği sorunlar bu hücrelerin dezavantajı olarak nitelendirilebilir.

2.3.2. Doku İskeleleri

Kardiyak doku mühendisliğinde doku iskelelerine olan ihtiyacın anlaşılması için öncelikle kECM fonksiyonları bilinmelidir. kECM'nin kalp fonksiyonların sağlanması için çok kritik bir role sahiptir. kECM kalp hücrelerine fiziksel olarak destek sağlamakta, kalp dokusunun aşırı gerinmesini önlemekte ve fibrotik yara dokusu oluşması sonrasında elektriksel akımın iletilmesini sağlamaktadır [78]. Dolayısıyla kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında hücreleri destekleyecek sentetik ya da doğal doku iskeleleri kullanılarak kECM'nin taklit edilmesi kritik öneme sahiptir. *in vivo* kECM yapısı bu çalışmalarda kullanılacak doku iskelesinin hangi özelliklere sahip olması açısından önemli veriler sunmaktadır. Yetişkin kECM yapısında %70 oranında fibril kollajen tip I ve tip V bulundurduğu görülmektedir [152]. Bununla birlikte kECM'nin

%20'sini oluşturan basement membranda kollajen tip IV ve az da olsa agrin, laminin, perlikan ve nidojen bulunmaktadır. Hücreler tarafından oluşturulan aksiyon potansiyelin iletilmesini sağlayan glikoproteinler ve proteoglikanlar ise kECM'nin %4'ünü oluşturmaktadır. Son olarak lumikan, prolarjin, periostin, trombospontin-2, fibronektin, emilin, dermatopontin, fibulin ve kollajen VI'ün kECM'in %3'ünü oluşturduğu tespit edilmiştir [153]. Fetal ve yetişkin dönem kalp dokularından alınan örneklerle yapılan çalışmada yetişkin kalp dokusunda kECM'in daha kalın kollajen fiberler (42.34 ± 0.55 nm), daha iyi organize olmuş basement membran ve kardiyomiyosit kümelerinin oluşturduğu geniş boşluklardan oluşan heterojen bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir [154]. Bu bilgiler *in vitro* koşullarda geliştirilecek bir kardiyak doku mühendisliği ürünüde kullanılacak doku iskelesinin yapısal bileşiminin ve fonksiyonunun ne olacağı hakkında yol göstermektedir. Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarına bakıldığında genel olarak iki tip doku iskelesi yapısı karşımıza çıkmaktadır. Bunlar; sentetik polimerler kullanılarak geliştirilen doku iskeleleri ve doğal dokularından elde edilen doku iskeleleri.

2.3.2.1. Sentetik Doku İskeleleri

Sentetik polimerik doku iskeleleri, doğal dokunun istenen özelliklerinin elde edilmesi için kolaylıkla üretilebilmeleri ve işlenebilmeleri nedeniyle kardiyak doku mühendisliği uygulamaları için oldukça önemli malzemelerdir. Yüksek biyouyumluluk, istenen mekanik özellikte üretilebilme ve bozunma hızlarının istenilen şekilde ayarlanabilmesi polimerlerin ilk akla gelen olumlu özellikleridir. Bununla birlikte, sentetik polimerin sahip olduğu porozite, mikroyapı ve dayanıklılık gibi özelliklerin kalp dokusunun başarılı bir biçimde taklit edilmesi için arzu edilen şekilde ayarlanabilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır. Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelelerinin belirli bir oranda elastisite ve mekaniksel dayanıma sahip olmaları göz önünde bulundurularak, bu özelliklerin sağlanması için farklı sentetik polimerler birbirleri ile karıştırılarak çok çeşitli kardiyak doku iskelesi geliştirilmiştir [77]. Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında en sık kullanılan sentetik polimerler arasında PCL, poligliserol sebasat (PGS), poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA), biyobozunur poliüretan (PU) ve PLA bulunmaktadır [155].

Kolay bulunma, düşük maliyet ve FDA tarafından onaylanma, PCL'li sıkça kullanılan bir sentetik polimer haline getirmiştir. Elektroegirme yöntemi ile örgü ("*mesh*") formunda üretilen PCL doku iskelelerinde sıçan kaynaklı kardiyomiyositler kültüre edilerek, *in vitro* koşullarda miyokardiyum benzeri yapı geliştirilmiş ve bu yapıda hücrelerin yüksek canlılığa sahip olduğu, üç gün sonunda kasılabildiği ve kardiyak spesifik proteinlerini

ifade ettiği raporlanmıştır [156]. PCL fiberlerin çapının hücre adezyonu ve fonksiyonunda kritik önem sahip olması ve PCL rg doku iskelelerinin mekanik özelliklerinin kalp dokusunu taklit etmek için yeterli olmaması araştırmacıları PCL polimerini kollajen ve elastin gibi doğal polimerlerle birlikte kullanarak hibrit doku iskeleleri geliştirmeye itmiştir [157]. Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak farklı üretim teknikleri kullanılarak farklı yapıda ve kompozisyonda PCL doku iskeleleri geliştirilmiştir [158]. Bununla birlikte kalp dokusundaki elektriksel iletimin desteklenmesi için araştırmacılar tarafından PCL doku iskelelerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak taklit başarısı yüksek ve elektriksel iletimin sağlanması pozitif yönde etkisi olan doku iskeleleri geliştirilmiştir [159, 160].

Miyokardiyuma benzeyen yapısal ve mekaniksel zellikleri (PGS'in E-modülüsü:0,025-1,2 MPa, insan miyokardiyumun E-modülüsü: 0,01-0,5 MPa) nedeniyle kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında karşımıza çıkan diğer bir sentetik polimer de PGS'tir [161]. PGS polimeri kullanılarak farklı formlarda (kanal yapısında, poroz ve fiber) doku iskeleleri geliştirilmiş ve etkinlikleri hayvan modellerinde geliştirilen MI modellerinde test edilmiştir. Sonuçlar vaskülarizasyonun arttığını [162], yara alanın azalığı [163], doğal doku ile entegrasyonun başarılı bir biçimde meydana geldiğini göstermiştir [164].

Yüksek biyobozunurluk, biyouyumluluk ve kolay işlenebilirliği nedeniyle PLGA ko-polimeri birçok doku mühendisliği uygulamasında doku iskelesi malzemesi olarak kullanıldığı gibi kardiyak doku mühendisliğinde de başarılı bir biçimde kullanılmıştır. Elektroirme yöntemi ile geliştirilen PLGA doku iskelesi üzerinde sıçan kaynaklı kemik iliği kök hücreleri kültüre edilmiş ve hücreli doku iskelesinin etkinliği sıçan MI modelinde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ventriküler dokuda rejenerasyonun meydana geldiğini ve kardiyak fonksiyonlarında iyileşme meydana geldiğini göstermiştir [165]. Yine yakın bir zamanda Cristallini ve ark. tarafından yapılan çalışmada jelatin-PLGA hibrit doku iskelesi adenoizin ile fonksiyonlaştırılmış ve bu doku iskelesinin etkisi domuzda iskemi modelinde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar adenoizin ile modifiye edilmiş PLGA doku iskelesinin fibrotik doku oluşumunu engellediğini ve çeşitli sinyal yolaklarının aktiveşlemesi sonrası yara bölgesinde hücre sayısının arttığını göstermiştir [166].

Sentetik polimerler kolay işlenebilirlik, yüksek biyouyumluluk, düşük maliyet, yüksek biyobozunma hızı gibi avantajlara sahip olsa da kECM'in oldukça kompleks olan

biyokimyasal ve fiziksel yapısı ile mekaniksel özelliklerini taklit etmede yetersiz kalmaktadır. Daha önce de ifade edildiği üzere kECM yapısında birçok proteini bulunduran oldukça kompleks bir iskeledir. Bununla birlikte sentetik malzemeler, canlıya implante edildiklerinde güçlü bir yabancı cisim reaksiyonunu tetiklemekte ve fibrotik kapsül oluşumu meydana gelmesi ile malzeme ve çevre dokunun entegrasyonunu engellenmektedir [167]. Öte yandan doğal doku kaynaklı malzemeler ya da aselüler malzemeler, doku ile malzeme arasında arayüzey oluşturabilecek ECM bileşenleri içerdiğinden daha hafif bir yabancı cisim reaksiyonunu oluşturmaktadır. ECM kaynaklı malzemeler doğal bağışıklık sistemini harekete geçirerek konak doku ile entegrasyonu yardımcı olabilecek yeni matriks oluşumunu sağlayabilmektedir. Ancak, sonradan kazanılmış bağışıklığı harekete geçirebilme ve sitokin salımına neden olma gibi problemler allojenik ya da ksenojenik kaynaklı malzemelerin uygulamasını sınırlamaktadır [168, 169]. Dolayısıyla araştırmacılar bu kompleks yapıyı yüksek oranda taklit edecek yeni biyomimetik doku iskelelerini geliştirmek için doğal dokuları aselüler hale getirerek kullanmışlardır [78].

2.3.2.2. Doğal Doku İskeleleri

Doğal biyomalzemeler hayvan ya da bitkilerden izole edilmiş ve büyüme faktörü ya da hücrelerin tutunmasını kolaylaştıracak malzemelerdir. Doğal doku kaynaklı biyomalzemeler denilince ilk akla gelen malzeme kollajendir. Kollajenin doğada çok bulunması, kolaylıkla modifiye edilmesi, yüksek biyouyumluluk, adhezif olması, dikilebilir olması, poroz olması ve diğer malzemelerle birlikte rahatlıkla kullanılması bu malzemenin kullanımını önemli düzeyde artırmıştır [170]. Bununla birlikte kollajenin geri dönüşümsüz olarak hidrolize edilmesiyle geliştirilen jelatin sıklıkla tercih edilen diğer bir doğal biyomalzemedir. Bu iki malzeme yüksek saflıkta sığır ve domuzdan elde edilmekte ve biyomedikal uygulamalarda başarılı bir biçimde kullanılmaktadır. Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında yeni nesil üretim metotları [171] ya da geleneksel üretim metotları [172] kullanılarak geliştirilen kollajen bazlı doku iskeleleri kullanılarak birçok çalışma yapılmış ve elde edilen sonuçlar derlenerek yayınlanmıştır [170, 173]. Kollajenin yanında fibrin, kitosan, aljinat, hiyaloronik asit, matrijel gibi biyolojik kaynaklı malzemeler ve bu malzemelerin birlikte kullanılması ile geliştirilen hibrid yapılar kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu malzemeler kullanılarak kardiyak yamaların geliştirilmesine yönelik yapılan birçok

Çalışma mevcut olup literatürde bu konuda kapsamlı derlemeler bulmak mümkündür [155, 170, 174].

ECM'den saflaştırılan doğal biyomateryaller klinik uygulamalar için her ne kadar umut vaad etse de doğal ECM ile kıyaslandığında yapısal özellikler ve hücelere sağladıkları çevre bakımından dezavantajlara sahiptirler [175]. Öte yandan doğal biyomalzemeler kategorisinde değerlendirilen ve doku ya da organlardan elde edilmiş aselüler doku iskeleleri ideal bir doku iskelesinde bulunması gereken komplek kompozisyon, vasküler aę ve özgün doku spesifik yapıya sahiplerdir. Bunlarla birlikte yüksek biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoaktiviteye sahip olan biyolojik matrislerin kullanılması ile zarar görmüş doğal dokuda biyokimyasal, mekaniksel ve vasküler yapının desteklenmesi ile hücre sağ kalımının artırılması ve hücelere *in vivo* benzeri uyarımlar sağlayarak hücre temelli rejenerasyon prosedürlerinin etkinliğinin artırılması mümkündür [176, 177].

Bu tez çalışmasında yukarıdaki bilgiler dikkate alınarak kardiyak yamalarının geliştirilmesi için sığır perikardiyumu kullanılmıştır. Dolayısıyla aselüler doku iskelelerinin elde edilmesinde kullanılan yöntem ve ajanların detaylı irdelenmesi gerektiği düşünölmüş ve aşağıda yer alan bilgiler bu kapsamda verilmiştir.

Aselülerizasyon ve Aselüler Doku İskeleleri

Aselülerizasyon teriminin evrensel bir tanımı henüz yapılamamıştır. Öte yandan bir dokunun aselüler olarak tanımlanması için belirlenen 3 kriter vardır. Bunlar; 1) dokunun mg kuru ağırlık başına 50 ng DNA'dan fazla DNA içermemesi, 2) 200 bp'den uzun DNA fragmentlerin bulunmaması ve son olarak 3) matriste gözle görölebilir hücre bileşeni kalmamasıdır. Başka bir ifade ile aselölarizasyon, bir dokuda tüm hücrenel ve immünojenik bileşenler uzaklaştırılırken, doku ECM'inin yapısal, biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerinin korunmasıdır [178, 179].

Aselölarizasyon prosedürünün etkinliğini belirleyen üç temel parametre vardır. Bunlar 1) aselölarizasyon amacıyla kullanılan ajanın tipi, 2) ajanın konsantrasyonu ve 3) ajanın uygulama süresidir. Aselölarizasyon ajanının türü ve/veya konsantrasyonu uygulanan protokolün etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Bunlarla birlikte, etkili olan diğer parametreler arasında solösyonun pH'sı ve sıcaklık vardır [180].

Fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamaların birlikte kullanıldığı yöntemler en etkin aselülerizasyon yöntemleridir. Genel olarak bir aselölarizasyon prosedürü hücre

membranının fiziksel ya da iyonik solüsyonlar ile parçalanması ile başlar. Ardından çeşitli enzimler kullanılarak ECM'den hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması işlemi yapılır. Bu işlemi takiben çeşitli deterjanlar kullanılarak sitoplazmik ya da genetik materyal kalıntıları uzaklaştırılır. Son olarak hücresel kalıntılar uzaklaştırılarak aselüler dokular elde edilir. Aselülarizasyon işlemi uygulandıktan sonra konakçıda istenmeyen bir etkinin görülmemesi için kimyasal kalıntıların etkili bir biçimde uzaklaştırılması şarttır [181].

Hipotonik solüsyonlar, osmotik etki ile hücrelerin parçalanmasını sağlarken, ECM bileşenlerinin yapısında minimum değişiklikler meydana getirmektedir. Maksimum osmotik etkinin elde edilebilmesi için aselüler edilecek dokuların hipotonik solüsyonlarla birkaç kere maruz bırakılması gerekmektedir. Yanı sıra, bu solüsyonlar hücre kalıntılarının uzaklaşmasını da sağlamaktadır [179].

Literatür verileri incelendiğinde doku tipine ve kullanılan aselülarizasyon ajanına göre elde edilen sonuçların farklılık arz ettiği görülmektedir. Doku tipinin yanında aselülarizasyonun başarısını direkt olarak etkileyen diğer faktörler dokunun bileşimi, doku yoğunluğu ve dokunun kaynağıdır. Bunlara ek olarak doku kaynağının yaşı da oldukça önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü doku matrisinin bileşimi ve mekanik özelliklerinin zamanla değiştiği bilinmektedir [169]. Dolayısıyla çalışılacak her doku çeşidi için kabul edilebilir düzeyde hücrelerin uzaklaştırılması için optimum protokolün belirlenmesi gerekmektedir. Dokuların aselülarizasyon işlemlerinde kullanılan ajanların hücreler üzerindeki olumsuz etkileri açık bir biçimde bilinmektedir. Dolayısıyla asellülarizasyon işleminde kullanılan kimyasalların kalıntılarının iyi temizlenmesi, *in vitro* koşullarda aselüler dokular üzerinde kültürü yapılan hücrelerin canlılığı ve bu ürünlerin *in vivo* implantasyonunda konak hücreleri üzerinde toksisitenin oluşmasının engellenmesi için hayati öneme sahiptir [181].

Aselülarizasyon Prosedüründe Kullanılan Ajanlar

Deterjanlar: İyonik (Sodyum dodesil sülfat(SDS), sodyum deoksikolat, Triton-X200), iyonik olmayan (oktilfenoksipolietoksietanol (Triton-X100)) ve zitteriyonik (CHAPS, Sülfobetain 10 ve 16) deterjanlar hücre membran yapısını çözmek, proteinlerden DNA'nın ayrıştırmasını ve hücresel yapıların dokulardan uzaklaştırılmasını sağlayarak etki ederler [182]. Ancak bu deterjanlar, doku matrisindeki proteinleri ayrıştırmasına ve parçalanmasına neden olmaktadır [183]. ECM proteinlerinin ve DNA'nın uzaklaştırılması verimi deterjanın uygulama süresi ile artmaktadır. Bununla birlikte bu verim, kullanılan

dokunun tipi ve dokunun alındığı kaynağın yaşı ile de direk ilintilidir [184, 185]. Aselülarizasyon prosedürlerinde sıklıkla tercih edilen iki deterjan bulunmaktadır. Bunlar Triton-X100 ve SDS'dir. Triton-X100, enzimatik ve ozmotik yöntemlerin yetersiz kaldığı kalın dokuların aselülarizasyon işleminde hücrelerin başarılı bir biçimde uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca ECM proteinlerinin kaybına neden olmakta ve bu da *in vivo* uygulamalarda bağışıklık sistemi tarafından ret edilmesini azaltmaktadır [186]. Triton-X100 ile kıyaslandığında, SDS böbrek gibi daha yoğun doku ve organlardan hücre çekirdeklerinin uzaklaştırılmasında daha etkilidir. Aselülarizasyon prosedürlerine SDS gibi deterjanların eklenmesi, hücrelerden arındırma bakımından başarılı sonuçların alınmasına olanak tanımaktadır ancak yapıya zarar verme ve büyüme faktörlerin eliminasyonuna neden olma gibi önemli problemlere kaynaklık etmektedir [187, 188]. Triton-X100 gibi iyonik olmayan deterjanlar, iyonik deterjanlarla (örk. deoksikolat) kıyaslandığında dokuların yağlarından arındırılması bakımından daha etkili oldukları ifade edilmiştir. Zitteriyonik deterjanlar ise akciğer gibi daha ince olan dokuların aselülarizasyon işleminde daha başarılı olmaktadır. Bu deterjanlar, SDS ile beraber kullanıldığında kalın dokuların aselülarizasyon işleminde istenen başarının elde edilemeyeceği ifade edilmiştir. Periferik sinir dokusunun aselüler hale getirilmesi için yapılan çalışmada iyonik olmayan ve zitteriyonik deterjanların doku yapısının korunmasında, hücrelerden arındırma bakımından ise iyonik deterjanların daha başarılı olduğu tespit edilmiştir [189-191].

İyonik olmayan deterjanlar lipit-lipit ve lipit-protein etkileşimlerini kırarak etki gösterirler. Bu deterjanlar protein-protein etkileşimlerine zarar vermedikleri için doku içerisinde proteinlerin fonksiyonel konformasyonda kalmalarını sağlar [192]. En çok tercih edilen iyonik olmayan deterjan olan Triton-X100 maruz kalma süresi doku tipine göre değişkenlik gösterip birkaç sa. ile 14 gün aralığında olabilmektedir [187, 193, 194]. Literatür verileri incelendiğinde Triton-X100 uygulamalarında, deselülerize edilen doku tipine, uygulama süresine bağlı olarak farklı sonuçların rapor edildiği görülmektedir [181]. İyonik deterjanlar hem hücre zarı hem de çekirdek zarını çözebilmektedir. Ancak non-iyonik deterjanlara kıyasla protein-protein etkileşimlerini bozması nedeniyle yapıdaki proteinlerin fonksiyonel konformasyonlarını yitirmelerine neden olmaktadır [192].

Alkoller: Alkoller lipaz enzimine kıyasla dokulardaki yağ dokularının uzaklaştırılması bakımından çok daha başarılı olmaktadır. Ancak etanol, metanol gibi alkollerin hücreleri

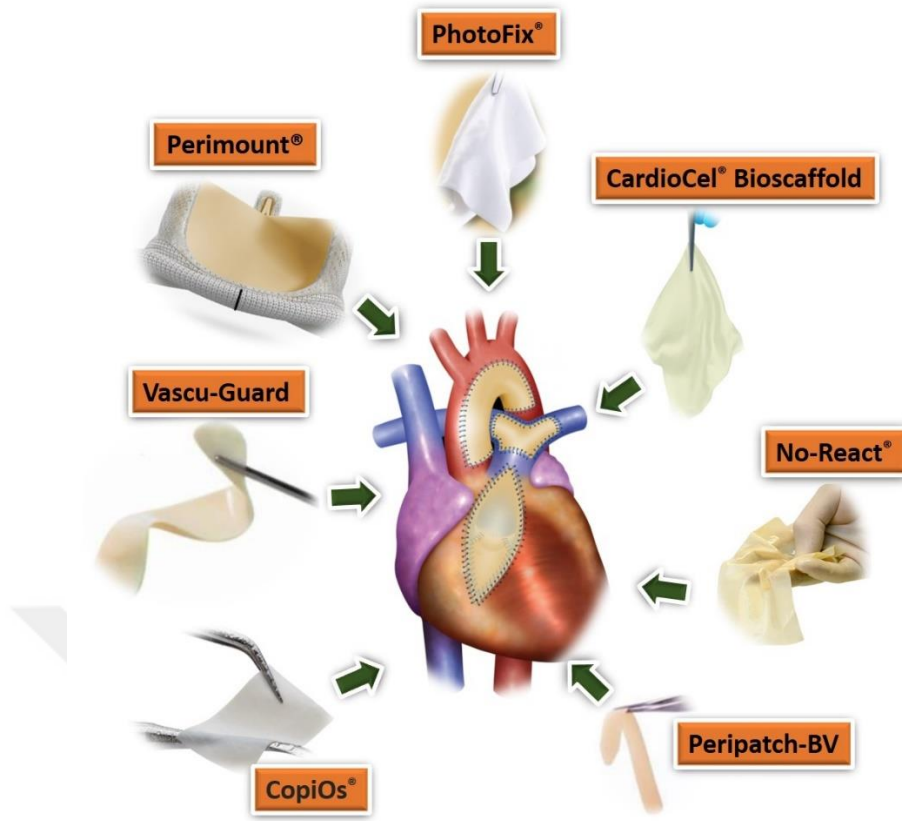
fikse etme ve ECM'nin ultrayapısına verdiği zarar, alkollerin dezavantajı durumundadır. Alkollerin yanında deselülarizasyon işleminde dokulardan yağların temizlenmesi için kullanılan diğer bir solvent asetonur. Dokulardan lipitlerin uzaklaştırılmasında kullanılan aseton da alkoller gibi doku fiksatiği olarak kullanılmaktadır. Deterjanlarla kıyaslandığında asetonun çapraz bağlamaya özelliğinden kaynaklı olarak mekanik özellikler bakımından daha sert aselüler dokular elde edilmektedir. Tribütil fosfat organik solventi tendon gibi yoğun dokuların aselüler hale getirilmesinde kullanılmış ve Triton - X100 ve SDS gibi deterjanlara göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir [195].

Enzimler: Nükleazlar (DNaz ve RNaz), tripsin, kollajenaz, lipaz, dispaz, termolizin ve α -galaktosidaz aselülarizasyon prosedürlerinde kullanımı rapor edilen enzimlerdir. Bu prosedürlerde enzimlerin kullanılması, yüksek özgülükte hücre atıklarının ve ECM'in istenmeyen bileşenlerinin uzaklaştırılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır. Fakat, dokuların hücresizleştirme işleminde enzimlerin tek başına kullanılmasının yeterli olamayacağı ve enzim artıklarının istenmeyen immün cevap oluşumuna neden olabileceği ifade edilmiştir. Nükleazlar, hücre parçalanmasından sonra dokuda atık olarak kalan nükleik asitlerin parçalanmasını sağlamaktadır.

Bir serin proteaz olan tripsin deselülarizasyon işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Deterjanlar ile kıyaslandığında, tripsin uygulaması sonunda kollajen ve elastin fiberin daha fazla kırılarak yapılarının zarar gördüğü ve hücresizleştirme işleminin daha uzun sürdüğü tespit edilmiştir. Ancak, glikozaminoglikan (GAG) içeriği bakımından deterjanlara göre daha az zararlı olduğu anlaşılmıştır. Tripsin ile dokuların hücrelerinden arındırılması işlemi zaman bağımlı olup uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Tripsin, dokunun yapısına zarar vererek diğer deselülarizasyon ajanlarının doku içerisine daha iyi bir şekilde penetre olmasını sağlayacağı ve dolayısıyla deselülarizasyon protokolünde ön işlem basamağı olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir [195].

Doku İskelesi Olarak Aselüler Sığır Perikardiyumu: Hayvan kaynaklı perikardiyal ürünlerin klinik uygulaması ilk olarak kalp kapakçığının tedavisine yönelik olarak 1971 yılında yapılmıştır. Bu uygulamada elde edilen başarılar, perikardiyum dokusu temelli ürünlerin diğer kardiyovasküler alanlarda kullanımını artırmıştır [196]. Otolog insan perikardiyum dokusunun sınırlı olması, ksenojenik sığır perikardiyum dokusunu birçok klinik çalışmada kullanılmasına neden olmuştur [197]. Sığır perikardiyumu,

kardiyovasküler cerrahide biyoprotez, yama malzemesi ya da ASD ve VSD onarılması için aselüler biyolojik doku iskelesi olarak çokça kullanılan doğal bir biyomalzemedir [198]. Sığır perikardiyum dokusunun biyoprotez olarak kullanılmasında olası immünojenik yanıtın önlenmesi, mekaniksel özelliklerinin artırılması amacıyla gluteraldehit gibi çapraz bağlacılar kullanılmaktadır. Ancak gluretal aldehit kalıntılarının toksik etki yaratması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır [199]. Bu sebeple araştırmacılar toksik etki oluşturmayacak çapraz bağlayıcı ajanlar ile ilgili araştırmalar yürütmüş ve gluteraldehite göre toksisitesi ve kalsifikasyon düzeyi düşük olan genipin molekülü önerilmiştir [200]. Aselüler sığır perikardiyumu temelli malzemeler klinikte yumuşak doku hastalıklarının tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun sebepleri arasında yüksek biyouyumluluğa sahip olması, ucuz olması, kolay temin edilebilmesi, doğal doku ile kolay entegrasyona uğraması, hücre çoğalması ve migrasyonuna olanak tanınması, endotelizasyonu ve doku rejenerasyonunu artırması, enfeksiyon hızını azaltması ve tromboembolizmin görülme sıklığını düşürmesi sayılabilir [201]. Sentetik ya da mekanik protezlerin KH'lerin kullanılmasında karşılaşılan en önemli problem tromboembolizmdir. Bu da hastalarda hayat boyu anti-koagulant tedavisini zorunlu kılmaktadır [202]. Bununla birlikte sentetik malzemelerin hücresel entegrasyon ve rejenerasyonda etkisiz kaldıkları ifade edilmiştir [198]. Günümüzde, sığır ve domuzlarda elde edilen ve aselüler hale getirilerek kimyasal ajanlarla fiks edilen birçok perikardial ürünleri piyasada bulmak mümkündür [196]. Piyasada satılan ve KH'lerin tedavisinde kullanılan aselüler hale getirilmiş sığır veya domuz kaynaklı bazı perikardiyal ürünler Şekil 2.1 'de gösterilmiştir. CardioCel®, sığır perikardiyumunun aselüler hale getirilerek, gluteraldehit ile fiks edilen ve kalsifikasyonu önlemek için çeşitli kimyasal ajanlarla muamele edilmiş bir üründür (<https://www.lemaitre.com>). Yine aynı şekilde Perimount® sığır perikardiyumunun aselüler hale getirilerek kalp kapakçığı olarak kullanılan bir üründür. Bu ürünün fiksasyon işlemi de gluteraldehit kullanılarak yapılmıştır (<https://www.edwards.com>).



Şekil 2.3. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ve piyasada bulunan aselüler perikard bazlı ürünler [196]

Sığır perikardiyumun aselüler hale getirilmesi için literatür verileri incelendiğinde iyonik olmayan (Triton-X100), katyonik, anyonik (SDS), zitteriyonik deterjanlar, NaOH ve Tripsin-EDTA gibi ajanların kullanıldığı çalışmaların olduğu görülmektedir. Bunlarla birlikte bu ajanların birlikte kullanıldığı (örneğin: SDS ve Triton-X100) çalışmalar da yapılmıştır [203]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Li ve ark. sığır perikardiyumun aselüler hale getirilmesi amacıyla SDS, Triton-X100, sodyumdeoksikolat ve dondur-çözdür yöntemlerini ayrı ayrı ve birlikte kullanmıştır. Elde edilen sonuçlar biyouyumluluk ve kollajen ile elastin içeriği ve yapısının korunması bakımından en iyi sonuçların Triton-X100, SDS ve dondur-çözdür işlemlerin birlikte kullanıldığı grupta elde edildiğini göstermiştir [204]. Yine yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar SDS ile birlikte vakum işlemi uygulayarak sığır perikardiyumunu aselelüler hale getirerek uygulanan yöntemin aselüler matriksin mikroyapısına ve biyouyumluluğuna etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak SDS ile birlikte vakum işleminin uygulanmasının yapının mikroyapısına zarar vermediği tespit edilmiştir [205]. Ancak, deselülarizasyon işleminden sonra elde edilen aselüler sığır perikardiyumun

küçük por çapı (yaklaşık 25 µm) ve porozitesi (yaklaşık %60), bu yapılar üzerinde kültürü yapılan hücrelerin tutunması, migrasyonu ve çoğalmasını zorlaştırmaktadır [206]. Bu nedenle aselüler sıgır perikardiyumun bahsedilen morfolojik özelliklerinin uygun hale getirilmesi için araştırmacılar asetik asit uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar, bu uygulama ile kök hücrelerin tutunması, çoğalması ve migrasyonu için uygun por çapına sahip aselüler doku iskeleleri geliştirebildiklerini raporlamışlardır [207].

2.3.3. Biyoaktif Moleküller

2.3.3.1. Büyüme Faktörleri ve Eksozomlar

Büyüme faktörleri komşu hücrelerden doğal olarak salgılanan protein yapısındaki sitokinlerdir. Bu proteinler hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre canlılığını devam ettirme, inflamasyon ve doku onarımında etkin görevlere sahiptirler [208]. Doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesine tutunan hücrelerden ortama salınan büyüme faktörleri sınırlı olduğundan hücrelerin fizyolojik proseslerini yerine getirmesi ve fonksiyonel yapıların elde edilmesi için büyüme faktörlerin kullanılması kritik öneme sahiptir [209]. VEGF anjiyogenez ve vaskülogenezde kritik öneme sahip olduğundan dolayı kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir büyüme faktörüdür [210]. Ayrıca kardiyak doku onarımına yönelik olarak VEGF'in kullanıldığı klinik çalışmalar da yapılmış ve sonuçları yayınlanmıştır [211]. Araştırmacılar insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını indüklemek için PCL-jelatin nanofiberleri geliştirmiş ve bu fiberlere VEGF enkapsüle etmişlerdir. Yapılan analizler, kök hücrelerin VEGF yüklü nanofiberler üzerinde kardiyak spesifik proteinlerinden α -aktinin ve cTroT ifade ederek farklılaştıklarını göstermiştir [212]. Yine başka bir çalışmada araştırmacılar VEGF-A enkapsüle ettikleri polietilen glikollenmiş fibrojen hidrojellerin performansını sıçan MI modelinde test etmiş ve elde edilen veriler VEGF yüklü hidrojellerin uygulamadan 4 hafta sonra damar oluşumu ve kardiyak fonksiyonlarını artırdığını göstermiştir [213]. Kardiyak doku ve kan damarlarında anjiyojenik ve mitojenik sinyallere kaynaklık eden diğer bir büyüme faktörü bFGF'dür [214]. Dolayısıyla bFGF de kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında uygulama alanı bulmuştur. Lakshmanan ve ark. yaptıkları çalışmada geliştirdikleri nanofiber formundaki doku iskelesine VEGF ve bFGF2'i birlikte yüklemiş ve büyüme faktörü yüklü doku iskelesinin etkinliğini tavşan MI modelinde test etmişlerdir. Deneysel çalışmalar büyüme faktörü yüklü kardiyak yamanın kalp fonksiyonlarını artırdığını ve yara bölgesinde damarlanmayı tetiklediğini göstermiştir [14]. IGF-1 karaciğerde salgılanıp dolaşım

sistemine karışan ve hücre canlılığı, çoğalması, farklılaşması ve metabolizmasını düzenleyen bir proteindir [215]. IGF-1 seviyesinin düşmesi, iskemik kalp rahatsızlıkları, akut MI ve kalp yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir. Bunların yanında *in vitro* koşullarda IGF-1'in kardiyak kök hücrelerin canlılığını desteklediği ve IGF-1 uygulamasının akut MI'da yara boyutunun azalttığı ve kardiyak fonksiyonlarını iyileştirdiği de tespit edilmiştir [216]. Dolayısıyla IGF-1 de kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir büyüme faktörü olmuştur. Bu kapsamda Park ve ark. yaptıkları çalışmada PGS nanofiberlerinden oluşan doku iskelesi üzerinde kardiyomiyositleri kültüre etmiş ve IGF-1 ile elektriksel uyarıya maruz bırakmışlardır. Elde edilen veriler IGF-1 ve elektriksel uyarımın birlikte kullanılması ile kasılma süresinin ve gap bağlantı birimlerinden sorumlu olan konneksin 43 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [217]. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar IGF-1 yüklü jelatin mikrosferler geliştirmiş ve bu yapıların etkinliklerini sıçan MI modelinde test etmişlerdir. Yapılan çalışmalar yara iyileşmesinin tetiklendiği, fibrozisin azaldığı ve yara bölgesine hücrelerin göç ettiği tespit edilmiştir [218] VEGF, FGF ve IGF-1'in yanında kardiyak doku mühendisliğinde uygulama alanı bulan diğer büyüme faktörleri arasında transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) [219], kemik morfojenik proteini-2 ve 4 (BMP-2 ve 4) [220] vardır.

Gerek kardiyak doku mühendisliğinde gerekse de diğer doku mühendisliği uygulamalarında umut vaat eden ve yakın zamanda etkinlikleri birçok çalışmada gösterilen eksozomlar biyoaktif moleküller olarak nitelendirilebilir. İskemik kalp hastalığında sıklıkla kök hücrelerin tercih edilmesinin altında yatan sebep bu hücrelerin farklılaşarak yara bölgesinde zarar görmüş hücrelerin yerini almalarıdır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar kök hücrelerin MI bölgesinde çok nadir kalp kası hücrelerine farklılaştıkları [221], esas etkilerini salgıladıkları bazı salgılar sebebiyle göstermiş olabileceğini göstermişlerdir [222, 223]. Bunun yanında kök hücrelerin etki göstermeleri için yara bölgesine göç etme gereksinimlerinin olmadığı yönünde bulgular da raporlanmıştır. Bu hipotez hücre terapilerinde sıklıkla kullanılan MKH'lerde test edilmiştir [224]. Elde edilen veriler MKH'lerle şartlandırılmış besi ortamının tek başına kardiyo koruma ("*cardioprotection*"), renal tübül hücrelerinin canlılıklarını desteklediği, karaciğer yetmezliğine karşı koruma sağladığı ve immünmodülatör etkileri ile bağışıklık sistemi hastalıklarında başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir [225]. Bunun yanı sıra son zamanlarda yapılan birçok araştırmada, transplante edilen kök hücrelerin etkilerini

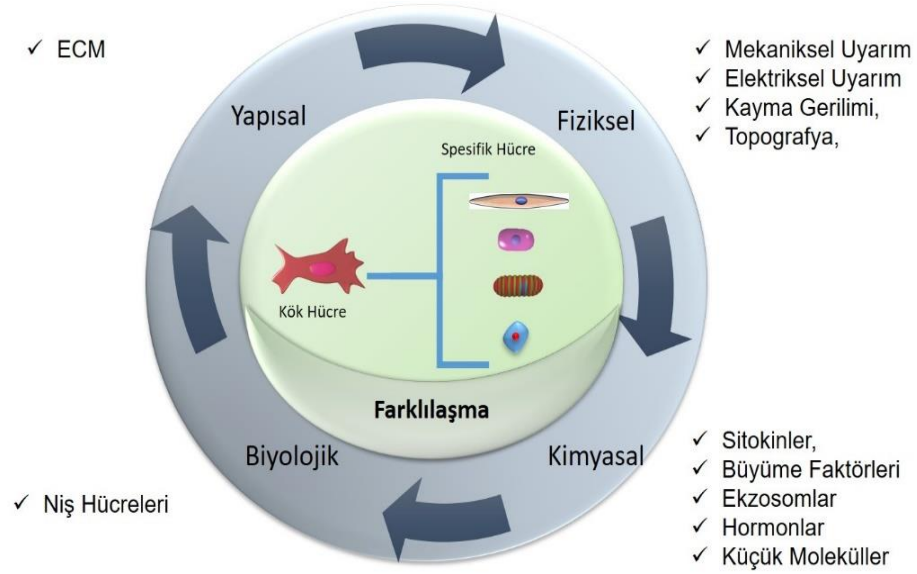
anjyogenezin indüklenmesi, anti-enflamatuvar etki, anti-fibrotik etki, konakçı dokudaki kardiyomiyositleri koruma gibi indirek mekanizmalarla gösterdikleri raporlanmıştır [226]. Bu süreçlerin MI bölgesine transplante edilen hücrelerin ürünü olan çeşitli küçük moleküller, proteinler, miRNA'lar ve parakrin faktörler tarafından regüle edildiği ifade edilmiştir [227]. Bunlarla birlikte kök veya kardiyak hücrelerin çeşitli sitokin, büyüme faktörü ve büyüme faktörlerini salgıladıkları da gösterilmiştir. Son zamanlarda ise moleküler süreçlerin regüle edilmesinde ve kök hücrelerin parakrin yoluyla etkilerini göstermede eksozom veya mikropartiküllerin oldukça önemli oldukları tespit edilmiştir [228]. Eksozomların kalp hastalıklarındaki tedavi etkinliği yapılan çalışmalarla belirlenmiş olup, bu biyoaktif moleküllerin taşıdıkları fonksiyonel protein ve/veya miRNA ile çeşitli sinyal yollarını aktive ederek bu etkiyi sağladıkları tespit edilmiştir. Kardiyak doku ile ilgili hastalıkların onarılmasına yönelik yapılan çalışmalarda eksozomların izolasyonu için birçok hücre kaynağı bulunsa da en çok c-kit pozitif öncül hücreleri, kardiyosfer kaynaklı hücreler ve mezenkimal kök hücreler kullanılmaktadır. Bu hücrelerden elde edilen eksozomların rejeneratif sinyalleri indükledikleri gösterilmiştir [229, 230]. Bunlarla birlikte kök hücre kaynaklı eksozomların taşıdıkları ve yara bölgesindeki hücrelere tranfer ettikleri kargolar aracılığıyla kardiyo koruma da sağladıkları rapor edilmiştir [231]. Tedavi etkinlikleri umut verici olsa da eksozomların *in vivo* uygulamalarında karşılaşılan en önemli problem *in vivo* uygulama yapıldıktan sonra hızlı bir şekilde etkinliklerini yitirmelerine neden olan oldukça kısa yarı ömürlerinin olmasıdır [232]. Araştırmacılar bu problemin üstesinde gelmek için eksozomları hidrojellere enkapsüle ederek *in vivo* uygulaması yapmış ve elde edilen sonuçlar eksozomların kalp dokusunda uzun süreli kalımlarının sağlandığını göstermiştir [233]. Başka bir çalışmada araştırmacılar endotel öncül hücrelerinden izole edip karakterize ettikleri eksozomları hidrojellere enkapsüle etmiş ve sıçan MI modelinde etkinliklerini test etmiştir. Elde edilen sonuçlar eksozom yüklü hidrojellerin kullanıldığı grupta anjiyogenezin arttığı, kalbin hemodinamik fonksiyonlarının düzeldiği ve ventriküllerin geometrisinin korunduğunu göstermiştir [234].

Hücre membranı bileşenleri içeren Ekstraselüler Veziküller (EV) ökaryot, prokaryot ve bitki hücrelerinde evrimsel olarak korunmuş bir şekilde salgılanan veziküllerdir ve nano boyutta olup hem sağlıklı hem de hastalık durumunda doğal olarak hücreler tarafından salgılanan yapılardır. EV'ler nükleik asit, protein, lipid ve metabolit gibi bilgi aktarımında önemli rollere sahip biyokimyasal molekülleri içermektedir. Taşıdıkları protein

yapılarına bağı olarak lokal veya uzaktaki hedef hücre ile spesifik olarak etkileşime girerek sahip oldukları bilgileri tranfer etmektedirler [235-237]. EV'ler ilk olarak 1946 yılında Chargaff ve West tarafından normal plazmada platelet kaynaklı partiküller olarak tanımlanmış ve daha sonra 1967 Wolf tarafından "platelet dust" olarak isimlendirilmiştir. 2006-2007 yılına kadar geçen sürede farklı kaynaklarda ve biyolojik süreçlerde EV'ler tespit edilmiş ve bu veziküllerin biyogenezi hakkında aydınlatıcı çalışmalar yapılmıştır [236]. 2006-2007 yıllarına gelindiğinde ise EV'lerin mikroRNA içeriğine sahip oldukları ve hücre-hücre etkileşiminde oldukça önemli bir rol üstlendikleri keşfedilmiş [238, 239] ve bu gelişmeden sonra EV'ler tüm dünyada araştırmacıların dikkatini çekerek biyomedikal ve rejeneratif tıp alanlarında önemli bir yer edinmeye başlamıştır. EV'ler boyut ve biyogenez mekanizmasına göre 3 kategoriye ayrılmaktadır: ekzosomlar (50-150 nm), mikro veziküller (100 – 1.000 nm) ve apoptotik cisimcikler (500 – 5.000 nm) [240]. Bu yapıların özellikleri literatürde derlenerek yayınlanmıştır [241].

2.4. Kardiyak Doku Mühendisliğinde Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

Kök hücreler, sahip oldukları genetik, fenotipik ve yapısal özellikler bakımından farklılaşmamış, kimliksiz olarak nitelendirilebilecek hücre tipleridir. Bu hücreler kardiyak doku mühendisliği uygulamalarını da içinde barındıran biyomedikal uygulamalarda çeşitli uyarımlarla istenilen doku tipine farklılaştırılabilmektedir. Kök hücrelerin farklılaştırılmasında hedef dokunun özellikleri kritik öneme sahiptir. Örneğin; eğer kök hücreler farklılaştırılarak kalp kası hücresi olan kardiyomiyositler elde edilmek hedeflenmiş ise, *in vivo* koşullarda kalp kası hücrelerinin bulunduğu çevrenin yapısal, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin dikkate alınması gerekmektedir. Bu kapsamda kök hücrelere yeni bir kimlik kazandırmak için etkili olabilecek faktörler Şekil 2.2'de özetlenmiştir. Bu tez çalışmasında MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılmalarının sağlanması amacıyla fiziksel ve kimyasal faktörler test edilmiş ve bu faktörlerin kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarındaki etkileri aşağıda detaylı incelenmiştir.



Şekil 2.4. MKH'lerin farklılaşmasında etkili olan faktörler

2.4.1. Küçük Kimyasal Moleküller ile Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Literatürde yapılan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalarda, MKH'lerin kardiyomiyojik farklılaşma yetisinde oldukları gösterilmiştir. MKH'lerin kardiyomiyosit farklılaşmasında/transdiferasyonunda küçük molekül 5-Aza yaygın olarak kullanılmaktadır [242]. Sistidin analogu olan ve hem DNA hem de RNA ile etkileşime girebilen 5-Aza epigenetik yeniden programlama etkisini metiltransferaz enzimi üzerinden göstermektedir. Bu molekülün metiltransferaz enzimi ile kovalent bağlanması, enzimin geri dönüşümsüz olarak inhibe olması ile sonuçlanır. Bu durumda hücre bölünmesinden sonra DNA'nın metilasyona uğramasını engelleyerek daha önce inaktif olan genin aktifleşerek ilgili proteinin üretilmesini sağlamaktadır [17]. Araştırmacılar, 5-Aza'nın fonksiyonunu tespit etmek için yaptıkları epigenetik çalışmalarda, 5-Aza'nın genomik histon modifikasyonlarında (H3K9 metilasyonu inhibisyonu) önemli düzeyde değişiklik meydana getirdiğini ve böylece hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmaya uğradıklarını göstermişlerdir [243].

Yapılan çalışmalarda MKH'lerin 5-Aza'ya maruz bırakıldıklarında kardiyomiyositlere farklılaştıkları gösterilmiştir [17]. Qian ve arkadaşları göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşması için hücreleri 5-Aza ile muamele etmiş ve elde ettikleri veriler 5-Aza uygulamasının NKX2.5 (erken dönem kardiyak belirteci),

miyozin ağır zinciri (MHC, kasılma proteini), cTroT, a-tipi natriüretik peptit (ANP) ve desminin (miyojenik farklılaşma belirteci) ifadelerinde artış sağladığını göstermiştir [244]. Benzer şekilde yapılan diğer çalışmalarda da 5-Aza uygulaması ile MKH kaynaklı kardiyak spesifik gen ve protein ifade eden hücrelerin elde edilebildiği raporlanmıştır [245-248]. Ancak, tek başına 5-Aza uygulaması ile kök hücre temelli fonksiyonel ve kasılabilen kardiyomiyositlerin elde edilmesi oranının oldukça düşük olduğu ve hatta kardiyomiyosit benzeri hücrelerin elde edilemediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [18, 249-252]. Tüm bu çelişkili sonuçlar tek başına 5-Aza'nın MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında etkin bir yöntem olmadığını, bu konuda daha detaylı araştırmaların yapılması ve yeni stratejilerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmaktadır.

MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında/transdiferasyonunda kullanılan diğer bir küçük organik molekül DMSO'dür. DMSO suda çözünmeyen maddelerin çözdürülmesinde sıklıkla kullanılan amfipatik bir moleküldür. Bu molekül metabolik ve enzimatik aktivite gibi hücre fonksiyonlarda oldukça önemli bir role sahiptir. Ayrıca DMSO, hücre farklılaşması, hidrojen bağlarının kırılması, hidroksi radikallerinin temizlenmesi, kroyoprotektan etki ve hücre içi düşük yoğunluklu lipoprotein kaynaklı kolesterolün mobilize edilmesi gibi etkilere de sahiptir. Tüm bunlara ek olarak bu molekül beyin ödemi, amiloidoz, şizofreni ve interstisyel sistitiz gibi hastalıkların tedavisine yönelik olarak da kullanılmaktadır [253]. 1982 yılında yapılan araştırmalar bu küçük organik molekülün fare teratokarsinom kaynaklı EKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını sağladığını göstermiştir [242]. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da DMSO uygulamasının EKH'lerde kardiyak spesifik genlerin (*GATA-4* ve *NKX2.5*) ifadesinde artış sağladığı tespit edilmiştir [254, 255]. DMSO'nun etki mekanizmasının anlaşılması için yapılan çalışmada DMSO'nun sitoplazmadaki Ca iyonu konsantrasyonunu önemli düzeyde artırarak hücre farklılaşmasına neden olduğu tespit edilmiştir [253]. Ayrıca, 5-Aza ve DMSO kimyasal indükleyici ajanların sinerjik etkisinin EKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir [256]. İnsan yağ dokusu kaynaklı MKH'ler ile yapılan çalışmalarda ise DMSO uygulamasının (%0,1, 48 sa.) kardiyak spesifik belirteçlerin (*NKX2.5*, *GATA-4*, *MHC*, *MLC*) ifadesinde anlamlı bir artış sağladığı gösterilmiştir [257]. Ancak Deng ve ark. tarafından yapılan çalışmada, DMSO'nun tek başına ya da 5-Aza ile beraber kullanılmasıyla karaciğer kaynaklı MKH'lerde kardiyomiyojenik farklılaşmanın yüksek düzeyde tetiklenemediği, kültür

ortamına bu moleküllerin yanında retinoik asidin eklenmesinin farklılaşmayı tetikleme açısından önemli olduğunu rapor etmiştir [252].

Histonların postranslasyonel modifikasyonlarını içeren epigenetik kod gen regülasyonlarında yüksek düzeyde bir kompleksiteye neden olmaktadır. Epigenetik kod, gen ifadesi, hücre döngüsü, hücre kaderi, hücre farklılaşması ve transdiferansiye olma kapasitesi gibi birçok süreçte kritik öneme sahiptir [258]. DNA sarmalındaki sitozin nükleotidinin 5. karbon atomundan (C5) metilasyonu, gen ifadesini regüle eden geri dönüşümlü ve korunmuş bir epigenetik mekanizmadır. Doku spesifik genlerin promoter bölgelerindeki CpG kritik bölgelerinde meydana gelen metilasyon bu genlerin susması ile sonuçlanır [17]. DNA metilasyon/demetilasyonu ve post-translasyonel histon modifikasyonları süreçleri (asetilasyon, fosforilasyon ve metilasyon) fonksiyonel olarak birbirleri ile ilişkilidir. Oldukça karmaşık olmasına rağmen, epigenetik olarak bir genin inaktifleşmesi işlemi üç kritik basamakta gerçekleşir; i. hedef genin regülasyon bölgesinde metilasyonun meydana gelmesi, ii. histon deasetilazlar tarafından histon3 ve/veya histon 4'ün deasetilasyonu ve iii. histon 3'te lizin 9'un metilasyonu (H3K9) [16].

Va, 1882 yılında kimyager Beverly S Burton tarafından sentezlenmiş bir küçük organik moleküldür. İlk başlarda sadece bir solvent olarak kullanılan Va daha sonra epilepsinin tedavisinde kullanılan bir ilaç olmuştur [259]. Va kısa dallı bir yağ asidi olmasına rağmen kimyasal yapısı hücrelere ve organizmalara kolaylıkla nüfuz etmesine olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda Va'nın kanser hücrelerinde çoğalmayı baskıladığı, hücre farklılaşmasını, hücre apoptozunu ve kanser hücrelerinin immünojenitesini indüklediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Va'nın bir histon deasetilasyon inhibitörü (HDAC) olarak işlev gördüğü de bildirilmiştir [260]. HDAC'ler yüksek düzeyde histon asetilasyonunu sağlayarak yeniden programlama sürecinde oldukça kritik olan pluripotensi ile ilintili genlerin aktifleşmesine neden olmaktadır. Bir HDAC olan Va fare embriyonik fibroblast hücrelerinin yeniden programlanmasında genomda çoklu histon asetilaz kompleksini olumlu yönde etkilediği bilinen c-Myc faktörü yerine kullanılmış ve böylece somatik hücrelerin kromatin yapısını açarak aktif bir forma soktuğu tespit edilmiştir [261].

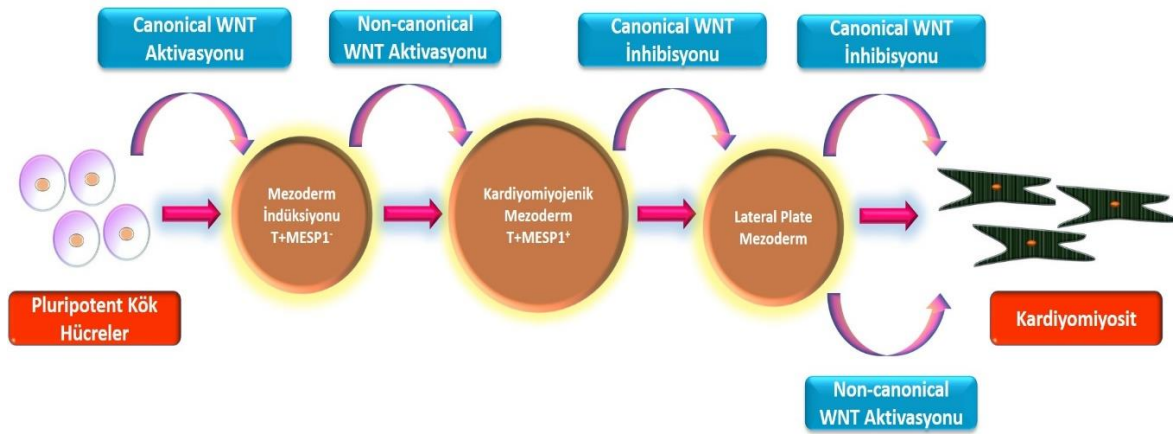
Va'nın MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasına yönelik kullanıma dair çalışma çok sınırlı sayıdadır. Hasani ve ark. çok yakın bir zamanda yayınladıkları çalışmada yağ doku kaynaklı MKH'leri önce 24 sa. boyunca 5-Aza (10 μ M) ve Va (500 nM), daha sonra ise

FGF ve BMP-4 ile muamele etmiş ve kültür süresi sonunda kardiyomiyojenik farklılaşma çeşitli analizler ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, 5-Aza ve Va uygulamasının kontrol grubuna göre kök hücrelerde *OCT4A*, *SOX2* ve *NANOG* gibi pluripotensi genlerinin ifadesinde yukarı yönlü bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca 5-Aza ve Va uygulamasının *Brachyury/T* (mesodermal indükleme belirteci) ve *GATA-4* ifadelerinde anlamlı düzeyde artışa neden olurken, *MEF2C* ve *TBX5* genlerinde anlamlı düzeyde artışa neden olmamıştır [262]. Başka bir çalışmada ise kardiyomiyositlerle aynı embriyonik katmandan (mezoderm) farklılaşan endodermal öncül hücrelerinin kardiyomiyojenik farklılaşması amacıyla epigenetik yeniden farklılaşma ajanı olarak Va ve 5-Aza beraber kullanılmış ve elde edilen veriler öncül hücrelerin sırasıyla 24 sa. boyunca Va ve 5-Aza uygulamasının kardiyomiyojenik farklılaşmayı anlamlı düzeyde artırdığını göstermiştir. Va ve 5-Aza uygulaması sonunda kardiyak spesifik genlerin (cTroT, aktivin 2 ve ryanodin reseptörü) promoter bölgelerinde asetilasyonun artışı rapor edilmiştir [16].

Kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında kullanılan diğer bir strateji ise büyüme faktörlerinin kullanılmasıdır. Kardiyomiyosit farklılaşmasında TGF- β süper ailesi üyelerinden TGF- β 1, BMP-2 ve BMP-4 faktörlerinin etkili olduğu bilinmektedir [263]. TGF- β 1 ve 5-Aza'nın kardiyomiyosit farklılaşmasına olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmada TGF- β 1'in tek başına kullanıldığı deney grubunda kardiyomiyosit farklılaşma belirteçlerinden *GATA-4*, cTnT, konneksin 43, kardiyak aktin ve MLC-2a'nın ifadesinin 5-Aza grubu ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir [264]. Ayrıca başka bir çalışmada, BMP-2, FGF-2 ve IGF-1 büyüme faktörlerini içeren serumsuz hücre kültürü ortamı kullanılmış ve *in vitro* da sıçan kemik iliği MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması noktasında başarılı sonuçlar alındığı ifade edilmiştir [265].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda WNT sinyal yolağının kardiyomiyojenezde kilit rol oynadığını bildirilmiştir. Kalp gelişimini geçici olarak 2 fazlı bir şekilde düzenleyen WNT/ β -katenin sinyal yolağı, embriyogenezin erken döneminde aktifleşerek kardiyak spesifikasyonuna neden olurken, geç dönemde inaktifleşerek kardiyak farklılaşması ve kardiyak olgunlaşmasında kritik rol oynar [261] (Şekil 2.5). Kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşması konusunda çalışmalar yürüten araştırmacılar bu durumu *in vitro* ortama taşıyarak pluripotent kök hücrelerden kardiyomiyosit elde etmişlerdir [132]. Nemade ve arkadaşları IWP-2'nin de içinde bulunduğu 10 farklı WNT yolağını

inhibe eden küçük molekülleri CHIR99021 (GSK3 inhibitörü, mezoderm farklılaşmasını sağlar) ile birlikte kullanarak insan kanyaklı pluripotent kök hücreleri kardiyomiyositlere farklılaştırmaya çalışmış ve elde ettikleri sonuçlar küçük moleküler ile WNT yolağının inhibisyonunun iPKH-KM'lerin elde edilmesinde kullanılabilecek başarılı bir yöntem olduğunu göstermiştir [266]. Bununla birlikte *in vivo* çalışmalar, WNT inhibitörlerinin MI semptomlarını ve patolojisini hafiflettiğini de göstermiştir [267, 268]. WNT sinyal yolağının kardiyomiyojenik farklılaşmada nasıl bir etki mekanizması ile işlev gördüğüne dair Mazzotta ve ark. yaptıkları çalışmalar, pluripotent kök hücrelerde mezoderm ve sonrasında kardiyak mezoderm indüksiyonu için “*canonical*” WNT sinyal yolağının aktif olduğu, kardiyomiyojenik mezodermden kardimiyositlerin farklılaşması için ise “*canonical*” WNT yolağının inhibe olduğu, “*non-canonical*” WNT yolağını ise aktif olduğunu göstermiştir. Bu çalışma pluripotent kök hücrelerde kardiyak farklılaşması için öncelikle WNT yolağının aktifleşmesi ile mezoderm farklılaşmasının indüklenmesi, daha sonra kardiyomiyojenik farklılaşması için ise WNT yolağının inhibe edilmesi gerektiğini göstermiştir [19]. Bu çalışmada belirli bir miktarda mezoderm belirteci ifade ettiği gösterilen MKH'ler kullanılacaktır. Bu nedenle CHIR99021 gibi WNT yolağını aktive eden küçük molekül kullanılmadan mezoderm indüklenmesi basamağı atlanarak WNT yolağının inhibisyonunu gerçekleştirilmiştir [269]. WNT yolağının aktivasyonu ve inhibisyonu stratejisi pluripotent kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak MKH'ler ile yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Connell ve ark. amniyotik sıvısından izole edilen kök hücreleri önce CHIR99021 ile sonra da IWP-2 ile muamele ederek kardiyomiyojenik farklılaşmalarını sağlamaya çalışmışlardır. Analiz sonuçları, kültür süresi sonunda kök hücrelerin bir kısmının kardiyak spesifik proteinleri (TnT, SMA ve MLC2) ifade ettiğini, ancak büyük bir kısmının bu proteinleri ifade edemediklerini göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar, hücrelerin sarkomer proteinlerini (TnT, MLC2) ifade edebildiklerini ancak kardiyomiyositlerin kasılabilirliği için kritik öneme sahip olan organize sarkomer yapısını gözlemleyemediklerini raporlamışlardır. Son olarak MKH kaynaklı kardiyak fenotipine sahip hücreler elde edilmesine rağmen bu hücrelerin olgunlaşmamış ve kasılabilir olmadıkları araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [269].



Şekil 2.5. Kardiomyogenezde WNT sinyal yolağının etkisi

WNT yolağının yanında kardiomyogenezde etkisi bilinen diğer bir sinyal yolağı TGF β 'dir [20]. Embriyonik kök hücreler kullanılarak yapılan çalışmada, TGF β inhibitörünün kültürün 3-5 günlerinde uygulanması, bu hücrelerin kardiomyojenik farklılaşmasını sağladığını göstermiştir [270]. Bununla birlikte TGF β yolağında yer alan ALK5 reseptörünün (*TGF- β type 1 receptor* (TGF β RI)) kardiomyogenez ile ilintili olabileceği raporlanmıştır [271]. Zhong ve ark. ise seçici ALK5 inhibitörü olan RepSox'un da içinde bulunduğu çeşitli küçük molekülleri kullanarak pluripotent kök hücreleri kardiomyojenik farklılaştırmaya çalışmıştır. Elde ettikleri veriler ALK5'in seçici olarak inhibisyonu, bu hücrelerin kardiomyojenik farklılaşmasına neden olduğunu ve bu süreçte TGF β sinyal yolağının önemli olduğunu göstermiştir [272].

2.4.2. Biyofiziksel Uyarımlar ile Kök Hücrelerin Kardiomyositlere Farklılaştırılması

Doğal kalp dokusu *in vivo* koşullarda elektrik ve mekanik uyarımların etkisi altındadır. Türe bağlı olarak kalp, 1 Hz'den (insan) 10 Hz'e (fare) kadar hücre, doku ve organ düzeyinde döngüsel olarak kasılma ve gevşeme davranışı gösterir. Hücresel mikro çevrenin mekaniksel özellikleri kalp kasının fonksiyonu ve farklılaşmasında kilit rol oynamaktadır. Bununla beraber, mekanik uyarımlar (germe) hücre çoğalması, hipertrofisi, apoptozu, metabolik hızları ve gen ifade paterni gibi önemli biyolojik süreçlere çeşitli biyokimyasal sinyalleri kontrol ederek etki ederler [21, 22]. Bu nedenle mekanik uyarımlar kök hücrelerin kardiyak hücrelere olgunlaşmasına etki eden önemli parametrelerin başında gelmektedir. 2B kültür sistemlerinde hücreler, üzerinde kültüre edildiği yüzeye germe uygulanarak mekanik uyarımlara (statik ve dinamik gerilim) maruz bırakılırlar. Hücrelerin gerinime maruz bırakılmasında, sarkomer organizasyonu,

kardiyomiyosit fenotipi ve fonksiyonu ile ilişkili gen ve protein ifadesini ve kardiyomiyositlerin kalsiyum döngüsü/kasılma özelliklerini *in vivo* benzeri bir seviyeye getirmek amaçlanmaktadır [22]. Yapılan araştırmalarda, uygulanan mekanik uyarımın uygun kasılma-gevşeme çifti, iyon kanalların aktivasyonunu ve total gen ifadeleri için hayati önem taşıdığı tespit edilmiştir [21, 22]. Vanderburgh ve ark. yaptıkları çalışmada, neonetal kardiyomiyositlere uygulanan mekanik uyarımın; kardiyomiyositlerin olgunlaştığının birer göstergesi niteliğinde olan kardiyomiyosit dizilmesinin, total miyozin ağır zinciri miktarının, çekirdek sayısının ve hücrenin büyümesinin artırdığını göstermişlerdir [273]. Bir çalışmada neonetal kardiyomiyositler 24 sa. boyunca %10 gerilim altında kültüre edilmiş ve yapılan analizler gap bağlantılarının ifade olmasında ve hücrel organizasyonda artış meydana geldiğini gösterilmiştir [274]. Diğer bir çalışmada ise uygulanan gerilimin *in vitro* koşullarda kardiyomiyositlerin büyümesini ve tutunmasından sorumlu olan fokal adezyon kinazın aktivasyonunu sağladığı tespit edilmiştir [275]. Kalbin gelişimi ve fonksiyonunu göstermesi için uyarılma-kasılma çifti oldukça kritiktir ve elektriksel uyarım, kalp kasının sekronize bir biçimde kasılması için önemli bir faktördür. Makro boyutta yapılan çalışmalar mekanik uyarım ve akış dinamiklerinin kardiyak farklılaşmayı arttırdığı bilinse de bu etkilerin kardiyomiyogenez üzerine etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır [276, 277].

MKH'ler ile yapılan çalışmalarda mekaniksel uyarımın sıçan kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin canlılığını [278], anjiyojenik kapasitesini ve anti-apoptik etkilerini artırdığı [279] tespit edilmiştir. Bununla birlikte mekaniksel uyarımın insan kaynaklı MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında da etkili bir biyofiziksel uyarım olduğu bulgularla tespit edilmiştir [23]. Başka bir çalışmada Rezaee ve ark. sıçan kaynaklı yağ doku MKH'lerinin 5-Aza (10 μ M) ve mekaniksel uyarımın (%10) sinerjik etkisi altında kardiyomiyojenik farklılaştırılmasını amaçlamış ve elde edilen sonuçlar uyarımların sinerjik etkisi altında kardiyak spesifik genlerin (*GATA-4*, *NKX2.5*, *β MHC* ve *α -kardiyak aktin*) ifadesinde anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir [24]. Öte yandan Zimmermann ve ark. yeni doğan sıçan kardiyomiyositlerini kollajen ve matrijelden oluşan hidrojellere enkapsüle etmiş ve mekaniksel gerilim (%10, 2 Hz) uygulamışlardır. Bu koşullarda, geliştirilen yapıdaki hücreler normal fonksiyonel miyokardiyumda gözlemlenen kasılma ve elektrofizyolojik özelliklere yüksek oranda benzeyen karakter sergilemişlerdir [280]. Bu yapıların sağlıklı sıçanlara implantasyonuna dair sonuçlar bu doku greflerinde damarlanmanın meydana geldiğini ve hücrelerin yüksek canlılığına sahip olduğunu [280],

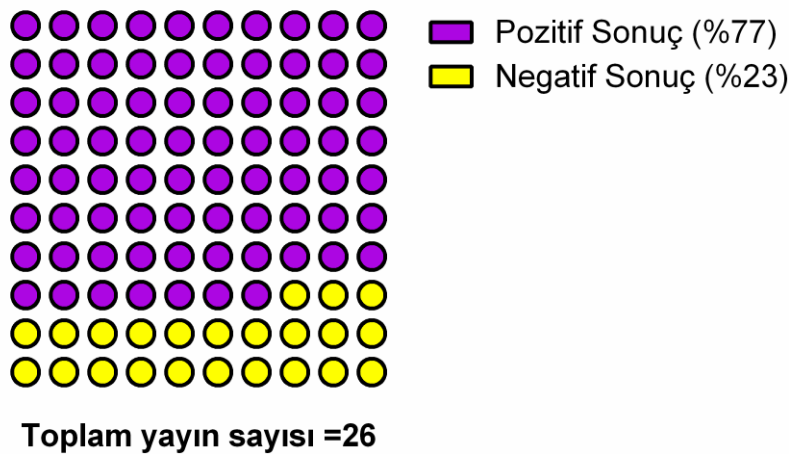
MI modeli geliştirilen sıçanlara implante edildiklerinde ise sonuçlar kardiyak fonksiyonların arttığını göstermiştir [281]. Başka bir çalışmada Zhang ve ark. EKH kaynaklı kardiyomiyositlerin olgunlaştırılması amacıyla bu hücreleri MKH ile birlikte 3B kollajen doku iskelesine enkapsüle etmiş ve döngüsel mekaniksel uyarım uygulamışlardır. Yapılan analizler mekaniksel uyarıma maruz bırakılan yapılarda kardiyomiyositlerin sarkomer uzunluğu, elastik modül ve moleküler belirteçler açısından olgunlaştıkları gösterilmiştir [282]. Elastik PU nanofiber ve insan kaynaklı MKH'ler birlikte elektrospreylenerek geliştirilen yapılar mekaniksel uyarıma maruz bırakılarak MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmaları indüklenmiştir. Elde edilen sonuçlar mekaniksel uyarım miktarının artması ile (%25'ten %75'e) *GATA4*, *NKX2.5*, *MEF2C* ve *CACNA1C* ifadelerinde anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini, dolayısıyla kök hücrelerin başarılı bir biçimde kardiyomiyojenik farklılaşmasının sağlandığını göstermiştir [283]. Yine başka bir çalışmada PCL filmler üzerinde kültüre edilen insan kaynaklı MKH'lerin miyojenik farklılaşması araştırılmış ve elde edilen sonuçlar MKH'lerin uyarıma bağlı olarak uzadıkları, mekaniksel uyarım yönüne doğru dizildikleri ve kardiyak spesifik gen (*GATA-4*, *MyoD-1*, β -*MHC*, *Troponin T* ve *Troponin I*) ve proteinleri (kardiyak Miyozin Ağır Zinciri) ifade ettiklerini göstermiştir [284]. Tüm bu veriler, mekaniksel uyarımın kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşması ve olgunlaşmamış kardiyak hücrelerin yapısal ve fonksiyonel olarak olgunlaşması için kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir.

Kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaştırılmasında kullanılan diğer bir fiziksel faktör de elektriksel uyarıdır. Çünkü, mekaniksel uyarımla birlikte elektriksel uyarım, embriyonik dönemde kardiyomiyosit büyümesi ve olgunlaşmasında majör etkenlerden bir tanesidir [285]. Elektriksel uyarım hem 2B hem de 3B sistemlerde kültüre edilen kardiyomiyositlerin büyümesi ve uyarım yönünde uzamasının sağlanması için kullanılabilir. Ancak uyarım süresi, frekansı, dalga tipi ve genlik gibi elektriksel uyarım parametreleri kardiyomiyositlerin kasılma davranışlarının manipüle edilmesinde ve arzu edilen düzeyde başarı sağlanmasında kritik öneme sahiptir. Hücre olgunlaşmasının sağlanması yanında elektriksel uyarım aynı zamanda hücre-hücre etkileşiminin artırılması, uyarı iletim hızının artması ve ultrayapısal organizasyonun iyileştirilmesi bakımından da etkili olmaktadır [286]. Bununla birlikte, elektriksel uyarım, kardiyomiyositlerde, aksiyon potansiyelinin hızı, süresi ve sayısını etkilemektedir. Miyozin ağır zinciri, troponin ve konneksin gibi olgunlaşma göstergesi

olan biyobelirteçlerin ifadesi mekaniksel uyarımın yanında elektriksel stimulasyonla kontrol edilmektedir [21, 22]. Yapılan çalışmalarda, kardiyomiyositler kültüre edildikten sonra 6 gün boyunca 10 Hz, 1 V ve 5 ms elektriksel uyarıma maruz bırakılmış ve yapılan gözlemler kardiyomiyositlerin büyüdüğünü ve konneksin 43 ifadesinin arttığını göstermiştir. Ayrıca elektrik stimulasyonuna maruz bırakılan hücrelerde voltaj kapılı potasyum kanallarının da ifadesinin arttığı gözlenmiştir [287]. Kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında elektriksel uyarımın etkisinin tespit edilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Elektriksel uyarım altında fare [288] ve insan [289] EKH'lerin başarılı bir şekilde kardiyomiyojenik farklılaşmalarının indüklendiği ve bu hücrelerden oluşturulan embriyoid cisimciklerde kasılan alanların anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda elektrisel uyarımın kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını hücre içi reaktif oksijen türlerinin üretilmesi mekanizması üzerinden sağladığı tespit edilmiştir. Yakın zamanda He ve ark. kemik iliği kaynaklı MKH'leri elektriksel uyarım altında kültüre etmiş ve bu hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını araştırmıştır. Elde edilen veriler elektriksel uyarımın kardiyomiyojenik farklılaşmada 5-Aza'dan daha etkili olduğu ve hem gen hem de protein düzeyinde kardiyak spesifik belirteçlerin ifadesinin anlamlı düzeyde arttığını göstermiştir. Tüm bunların yanında elektriksel uyarımın kardiyomiyojenik etkisini TGF- β 1 üzerinden gösterdiği sonucuna da varılmıştır [25]. Yine başka bir çalışmada araştırmacılar kardiyomiyojenik farklılaşma açısından MKH, iPKH ve EKH'lerden daha etkili olduklarını ifade ettikleri insan kaynaklı kardiyosfer kaynaklı hücrelerin elektriksel uyarım altında kardiyomiyojenik farklılaşması araştırmış ve elde edilen veriler hücrelerin uyarım altında kardiyak spesifik belirteçleri ifade ederek kardiyomiyositlere farklılaştıklarını göstermiştir. Akış sitometrisi sonuçları elektriksel uyarımın elde edilen kardiyomiyosit oranını kontrol grubuna göre %30 oranında artırdığı gösterilmiş olup, immünfloresan boyama sonuçları da hücrelerin yüksek düzeyde troponin T ifade ettiklerini göstermiştir [290]. Tüm bu sonuçlar elektriksel uyarımın kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında ve kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin olgunlaşmasında kritik öneme sahip olan bir biyofiziksel uyarım olduğunu açık bir biçimde göstermektedir. Dolayısıyla kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında *in vivo* kalp yapısını yüksek düzeyde taklit edecek yapıların geliştirilmesinde mekaniksel uyarımın yanında elektriksel uyarımın da değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

2.5. Kardiyak Doku Mühendisliğinde Karşılaşılan Problemler

Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılacak olan hücre tipi gerek *in vitro* gerekse de *in vivo* koşullarda elde edilecek başarıyı direkt olarak etkileyecek bir unsurdur. Hücre biyolojisi konusunda yaşanan gelişmeler sonucunda iPKH'ler geliştirilmiş ve kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecek çok değerli bir hücre kaynağı elde edilmiştir. Ancak her iPKH hücre hattından aynı verimlilikte kardiyomiyositlerin elde edilmesi için kullanılabilecek genel bir farklılaştırma prosedürü geliştirilememiştir [291]. Bununla birlikte elde edilen kardiyomiyositlerin fetal dönem özelliklerini göstermesi de önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır [292]. Gerek *in vitro* gerek pre-klinik gerekse de klinik çalışmalarda sıkça kullanılan diğer bir hücre kaynağı yetişkin dokulardan izole edilen ve kardiyomiyositlere farklılaşma yeteneğinde olan MKH'lerdir. Ancak bu hücrelerin *in vitro* koşullarda kardiyomiyositlere farklılaştırılması noktasında çelişkili sonuçlar vardır. Bu çalışma kapsamında yapılan literatür taramasında MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını konu olarak belirlemiş 26 farklı çalışma incelenmiş ve bu 26 farklı çalışmanın %77'sinde MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarının sağlandığı, %23'ünde ise sağlanamadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 2. 3). Bu durum kardiyak doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak kullanılacak MKH'lerin yüksek düzeyde kardiyomiyojenik farklılaşmasını sağlayacak yeni yöntemlerin geliştirilerek kültür koşullarının optimize edilmesini gerekli kılmaktadır.



Şekil 2.6. MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını konu edinmiş çalışmalarda kardiyomiyojenik farklılaşma açısından elde edilen pozitif ve negatif sonuçların oranı

Kardiyak doku mühendisliğin çalışma konularından olan hücre ve doku terapisi yaklaşımları umut vaad etse de insan kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı primat deneylerinde aritmilerin olduğu gözlemlenmiştir. Aritmilere kaynaklık eden temel neden implante edilen yapıların fonksiyonel olmaması ve kullanılan hücrelerin olgunlaşmamış olmasıdır. Dolayısıyla bu yapılar doğal doku ile birlikte kasılma-gevşeme davranışı gösterememekte ve aritmiler oluşmaktadır [293]. Bu sorunun çözümünün yapısal, metabolik, moleküler ve elektrofizyolojik olarak olgun ve kasılabilir kardiyomiyosit hücrelerin *in vivo* kECM yapısını, kompozisyonunu ve mekanik özelliklerini en iyi şekilde taklit eden doku iskelelerine ekilerek miyokardiyumların geliştirilmesi gerekmektedir.

Kardiyak dokularının geliştirilmesinde gerek temel bilim gerekse de uygulamalı bilimlerde umut vadeden birçok gelişme yaşanmış olup halen çalışmalar devam etmektedir. Bu bağlamda birçok biyomalzeme geliştirilmiştir, ancak bu malzemelerin ya yüksek yapısal bütünlükleri sağlanırken biyouyumluluk gereksimi gözardı edilebilmekte, ya da biyouyumlulukları sağlanırken yapısal bütünlükleri dikkate alınmamaktadır. Bununla birlikte *in vitro* koşullarda fonksiyonel bir miyokardiyum yapısının geliştirilmesinde önemli gelişmeleri sağlayacak olan hücrelerin ihtiyaç duyduğu ideal fizikokimyasal uyarımlar konusu hala çözüm bekleyen bir problem olarak durmaktadır [294]. Bu fizikokimyasal uyarımlardan olan elektriksel, mekaniksel ve akış gibi biyofiziksel uyarımları sağlayan biyomimetik biyoreaktör sistemleri geliştirilmiş olsa da henüz ideal koşulları sağlayan bir sistem geliştirilememiştir. Bununla birlikte geliştirilen kardiyak yapıların olgunlaştırılmasında kritik yol alacak olan biyofiziksel uyarım parametreleri de henüz optimize edilmemiştir [295]. Dolayısıyla kalp dokusu hücrelerinin *in vivo* koşullardaki davranışlarını ve bu davranışlara neden olan biyofizikokimyasal parametrelerin detaylı olarak araştırılması ve elde edilen veriler ışığında yeni kültür koşullarının ve biyomimetik biyoreaktörlerin geliştirilmesinin kritik öneme sahip olacağı düşünülmektedir.

Kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında gerek kök hücrelerin farklılaşması gerekse de damarlanmanın indüklenmesi için çeşitli biyoaktif moleküller başarıyla kullanılmıştır. Ancak biyoaktif moleküllerin hücre farklılaşmasını geçici bir şekilde sağladığı göz önünde bulundurulduğunda bu problemin çözümü için yeni fikirlerin ortaya atılması gerektiği açık bir biçimde ortaya çıkmaktadır [296]. Bu bağlamda değerlendirildiğinde biyoaktif moleküller olarak eksozomların kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında

Çözünebilir faktörler yerine kullanılabilecek değerli araçlar olduğu vurgulanmalıdır [15]. Ancak eksozomların bu alandaki potansiyellerinin ortaya çıkarılması için daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünölmektedir.

Kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, geliştirilen ürünün kalp onarımına ve kalp fonksiyonlarının geliştirilmesine olan etkisinin test edilmesi için kullanılan hayvan modelleri, malzemelerin implantasyon şekli ve süresi ve bu süre sonunda analiz edilen parametrelerin ne olacağı konusunda kabul edilmiş genel bir konsensusun olmaması bu alanda karşılaşılan diğer önemli bir problemidir [155]. Bahsedilen bu parametler açısından sağlanacak bir konsensüs, hiç şüphesiz yeni geliştirilmiş bir malzemenin hızlı bir şekilde klinikte uygulama alanı bulmasına önemli derecede katkıda bulunacaktır. Geliştirilen 3B kardiyak mühendisliği uygulamalarında kullanılan hücrelerin canlılıkları, farklılaşmaları ve kaderlerinin gerçek zamanlı ve uzun dönemde görüntölenebilmesi önemli bir unsurdur. Ancak 3B költür sistemlerinde hücrelerin hareketi, canlılığı ve farklılaşmasını takip etmek ve yüksek doğrulukta veriler elde etmemizi sağlayacak yöntemlere olan ihtiyaç hala devam etmektedir. Bu anlamda moleküler görüntöleme teknikleri etkili olabilecek yöntemler arasındadır [48].

Zarar görmüş kalp dokusunu onararak kalp fonksiyonlarının iyileştirilmesi sağlayacak olan greftin uygun boyut ve kalınlıkta geliştirilmesi önemli sorun olarak görölmektedir. Biyolojik difüzyon kapasitesinin 50-200 µm olması, difüzyon ile beslenen daha kalın greflerin geliştirilmesi önünde önemli bir engel olarak düşünölmekte ve bu kısıtın giderilmesi için geliştirilen kardiyak doku mühendisliği ürününün beslenmesini sağlayacak damar ağının oluşturulmasında kullanılacak yeni nesil teknik ve teknolojilere ihtiyaç olduğu vurgulanmalıdır [291]. Klinikte kullanılabilecek kalp dokusu greftininin kalınlığının yaklaşık 10 mm olması gerekliliği bu problemin ciddiyetini ortaya koymakta ve greftin kendi kendisini besleyecek damar ağına sahip olmasının önemini bir kere daha göstermektedir [155] .

Tüm bu problemler dikkate alındığında kardiyak doku mühendisliği alanında daha birçok çalışmanın yapılması gerektiği açık bir şekilde anlaşılmaktadır. Bu alanda geliştirilecek ürünlerin klinik uygulamalarda kullanılabilmesi ve istenilen başarıların elde edilmesi için multidisipliner bir alan olan kardiyak doku mühendisliğinin diğer bilim dallarından daha fazla beslenmesi gerektiği düşünölmektedir. Bu anlamda kalp kasının yapısında yer alan her hücre tipinin ayrı ayrı ve diğer hücrelerle birlikte maruz kaldığı biyolojik, kimyasal

ve fiziksel uyarımların gen, protein ve metabolizma düzeyinde anlaşılması ve bu alanda kullanılacak en doğru hücre ya da hücrelerin tespit edilmesi için omik teknolojilerden faydalanması gerekmektedir. Omik teknolojiler (transkriptomiks, proteomiks, epigenomiks, metabolomiks vb) hücrelerin maruz kaldığı çevrenin hücre üzerinde moleküler, yapısal ve metabolik düzeyde meydana getirdiği değişimleri gösteren yüksek hacimli veriler elde edilmesinde oldukça etkin araçlardır [297]. Bu verilerin doğru işlenmesi ve ilişkilendirilmesi ile optimum kültür koşullarının sağlanabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda birçok alanda dikkate değer gelişmelerin yaşanmasını sağlayan genetik mühendisliği teknolojilerinin (örneğin: CRISPR/Cas9) kardiyak doku mühendisliği uygulamalarına entegre edilmesi moleküler, yapısal, metabolik ve elektrofizyolojik olarak tamamen olgun kardiyomiyosit özelliklerine sahip hücreler geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı inancındayız [298]. Son olarak geleceğimizi şekillenmesinde oldukça önemli olacağı şimdiden belirgin bir şekilde ortaya çıkan yapay zekâ teknolojisinin de bu alana entegre edilmesi için çalışmalar yürütülmesi gerektiği vurgulanmalıdır. Yukarıda da bahsedildiği üzere kECM yapısı birçok etmenin bir arada bulunduğu oldukça kompleks ve heterojen bir yapıya sahiptir. Ve bu yapının taklit edilme düzeyi kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin başarısını doğrudan etkilemektedir [299]. Araştırmacılar geliştirdikleri doku iskelelerini kECM'e benzetmek için geleneksel yöntemler kullanmaktadır. Bu yöntemler, mevcut bilgi birikimine dayanarak farklı türdeki bileşenleri, örneğin; polimerleri, farklı şekilde ve kompozisyonda bir araya getirme esasına dayanmaktadır. Ancak bu yöntemlerle henüz ideal bir biyomalzeme geliştirilememiştir. İşte bu noktada yapay zekâ ürünü algoritmaların, kECM yapısını, mekanik özelliklerini ve kompozisyonunu sağlayacak ideal bileşimi tespit etmede yardımcı araçlar olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

BÖLÜM I

3.1. Mezenkimal Kök Hücreleri İçeren Aselüler Perikard Bazlı Kardiyak Yamaların Geliştirilmesi

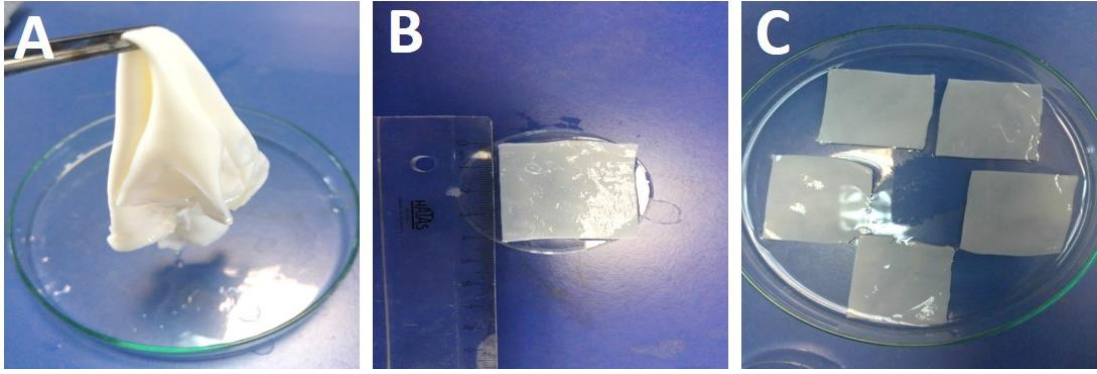
3.1.1. Sığır Perikardiyumundan 3-Boyutlu Aselüler Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu

3.1.1.1. Kimyasal Malzemeler

Fizyolojik salin, SDS, Triton-X100, Trichrome Stain (Masson) Kit, Elastic Stain Kit, asetik asit, kollajenaz ve ninhidrin Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Bununla birlikte perikardiyal dokuların aselüler hale getirilmesi için kullanılan fenilmetil-sülfonil florit (PMSF), tris, DNaz, RNaz, ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) Biomatik (ABD) firmasından temin edilmiştir. Yıkama işlemlerinde kullanılan fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) Biochrom (Almanya), aselüler dokuların fiksasyonu için kullanılan genipin ise Santa-Cruz Biotechnology (ABD) firmasından satın alınarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm kimsayal ve kitler üreticinin belirlediği saklama koşullarında muhafaza edilerek kullanılmıştır.

3.1.1.2. Sığır Perikardiyumunun Alınması

Perikardiyal dokular, Entegre Girişim Et Tesislerinden (Çubuk, Ankara, Türkiye) 24-36 aylık yaş aralığındaki sığırlardan elde edilmiştir (Şekil 3.1). Bu amaçla sığır kalbinin ventral yüzeyindeki perikardiyal keseden numuneler alınarak 4 °C'deki fizyolojik salin içerisinde laboratuvara getirilmiştir [300]. Laboratuvarda doku üzerindeki yağlar dikkatlice perikardiyum yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra 4x4 cm boyutlarında kesilerek PBS içerisine alınarak uygulamanın yapılacağı zamana kadar -86 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. İşlem görmemiş sıgır perikardiyumu. A) Bütün olarak çıkarılan perikardiyum, B ve C) Deselülerizasyon işlemi için hazırlanan 4x4 cm boyutlarındaki perikardiyum örnekleri.

3.1.1.3. 3B Aselüler Doku İskelelerinin Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

3B aselüler doku iskelelerinin hazırlanması için uygun protokolün geliştirilmesi amacıyla detayları aşağıda verilen SDS ve Triton-X100 temelli protokoller kullanılmıştır. Deterjan uygulamasından önce yağlarından arındırılmış örneklerde hücrelerin patlamasını kolaylaştırmak amacıyla dokular 3 defa dondur-çözdür işlemine maruz bırakılmıştır [301]. Bu aşamada dokular 4 sa. -86 °C’de dondurulduktan sonra 30 dak. 37 °C’de çözdürülmüş ve her bir dondurma çözdürme işleminden sonra örnekler PBS ile yıkanmıştır. Bu aşamayı takiben dokular 24 sa. veya 48 sa. boyunca, 4 °C’de sürekli karıştırma altında proteaz inhibitörü (PMSF 0,35 mg/L) [302] içeren hipotonik tris tamponda (10 mM) inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular %1 Triton-X100, %0,5 SDS veya ikisinin karışımını (%1 Triton-X100/%0,5 SDS) içeren proteaz inhibitörlü hipotonik tris tamponu çözeltiğinde 24 sa. süresince 4 °C de sürekli karıştırma altında inkübe edilmiştir [303]. Örnekler, 24 sa. sonunda 48 sa. boyunca PBS ile yıkanmış ve hücre çekirdeği kalıntılarının temizlenmesi amacıyla 37 °C de 1 sa. boyunca DNaz (0,2 mg/mL) ve RNaz (150 µg/mL) enzimlerine maruz bırakılmıştır [302]. Son aşama olarak örnekler tekrar deterjan çözeltilerine bir kere daha maruz bırakılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Aselüler Doku İskelelerinin Histolojik İncelenmesi: Perikardiyal dokuların hücrelerinden arındırılıp arındırılmadığının tespit edilmesi ve uygulanan prosedürlerin dokuların yapısına olan etkilerinin incelenmesi amacıyla fiziksel ve kimyasal yöntemlerle muamele edilmiş örneklerde histolojik inceleme yapıldı. Bu amaçla örnekler %10’luk tamponlu formaldehit içinde oda sıcaklığında 72 sa. tespit edilmiş ve tespit edilen doku

örnekleri Leica TP 1020 ışık mikroskobu takip cihazına alınmıştır. Doku örnekleri takip cihazında dehidratasyonu sağlamak amacıyla sırayla %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkol çözeltilerinden geçirilmiştir. Örnekler, şeffaflandırma için 1'er saaten 2 kere ksilolden geçirildikten sonra 2,5 sa. saf parafinde bekletilmiştir. Doku takip cihazından alınan örnekler Leica Eg1150H parafin istasyonunda saf parafine gömülerek parafin bloklar elde edilmiştir. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Deparafinizasyon sonrası kesitler aşağıda detayları verilen Hematoksilen-Eozin (H&E), Verhoeff Van Gieson (VG) ve Masson'un Trikromu (MT) ile boyanmış ve uygulanan prosedürlerin etkinliği Leica 6000B ışık mikroskobu ile inceleme yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen görüntüler Leica DC490 (Wetzlar-Germany) dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarılarak raporlanmıştır.

Hematoksilen-Eozin ile boyama için hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler bir gece 60 °C etüvde bırakıldıktan sonra 45 dak. ksilolde tutularak deparafinize edilmiştir ve dereceli alkol serilerinden (%100, % 96, %80) geçirilerek rehidrate edilmiştir. H&E ile boyandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilen örnekler ksilolde şeffaflandırılmış ve kanada balsamı ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Masson'un Trikrom boyası için *Trichrome Stain (Masson) Kit* üreticinin direktifleri dikkate alınarak kullanılmıştır. Kısaca, hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler bir gece 60 °C'de etüvde bekletildikten sonra 45 dak. ksilolde tutularak deparafinize edilmiştir. Örnekler dereceli alkol serilerinden (%100, %96, %80) geçirilerek rehidrate edilmiş ve ardından *bouin* solüsyonunda 56 °C'de 30 dak. bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkanmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması amacıyla Weigert'in demirli hematoksileninde 5 dak. inkübasyondan sonra sırasıyla önce çeşme sonra da distile su ile yıkama yapılmış ve bunu takiben 5 dak. boyunca Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin solüsyonunda bekletilmiştir. Ardından örnekler fosfotungstik-fosfomolibdik asit karışımında differensiye edildikten sonra anilin mavisi ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar seri alkollerden geçirilip kurutulduktan sonra ksilolde 15 dak. bekletildikten sonra kapatma medyumunu ile kapatılmış ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Verhoeff Van Gieson boyama için aselülerizasyon prosedürleri uygulanmış örneklerde elastik fiber yapılarının gösterilmesi amacıyla VG boyaması *Elastic Stain Kit* kullanılarak

yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler bir gece boyunca 60 °C etüvde bırakıldıktan sonra 45 dak. ksilolde tutularak deparafinize edilmiştir. Bunu takiben, dereceli alkol serilerinden (%100, %96, %80) geçirilerek rehidrate edilen kesitler, Verhoeff'un hemtoksileninde 30 dak. bekletilmiştir. %2'lik ferrik klorür solüsyonunda differansiye edilen örnekler Van Gieson ile 5 dak. boyanmış ve seri alkollerden geçirilerek dehidrate edildikten sonra kurutulmuştur. Hazırlanan preparatlar, ışık mikroskobu altında inceleme yapılmadan önce 20 dak. boyunca ksilolde bekletilmiş ve daha sonra kapatma medyumu ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

Aselüler Doku İskelelerinde Morfoloji Kontrolü: Hücrelerin doku iskelelerinde çoğalabilmeleri için por çapı büyüklüğünün önemli olduğu ve aselüler sığır perikardların por çapının artırılmasında asetik asit muamelesinin önemli olabileceği raporlanmıştır [207]. Bu nedenle aselüler hale getirilen dokular asetik asit ve kollajenaza maruz bırakılmıştır. Bu amaçla öncelikle yapılar 1 M asetik asit çözeltisinde 3 sa. bekletilmiş ve ardından pH değeri nötral olana kadar PBS ile yıkanmıştır. Bunu takiben asetik asit ile muamele edilmiş yapılar 0,5 U/mL kollajenaz çözeltisi içerisinde (pH: 7,5) 3 sa. boyunca enzimatik parçalanmaya uğratılmıştır. 3 sa. sonunda enzimatik aktivitenin durdurulması için yapılar 10 mM EDTA çözeltisi içerisinde 30 dak. tutulduktan sonra PBS ile yıkanmıştır. Gözenek çaplarının karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanıldı. Örnekler SEM'de görüntülenmeden önce 24 sa. boyunca liyofilizatörde kurutulmuştur. Örneklerin morfolojileri altın/platin kaplamasından sonra görüntülenmiş ve gözenek çapları ImageJ programıyla ölçüldükten sonra her bir örnek için ortalama gözenek çapı hesaplanmıştır. Bununla birlikte asetik asit ve kollajenaz uygulamasının aselüler dokuların kollajen ve elastik fiber yapısı üzerine etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla yukarıda detayları verilen VG boyaması yapılmıştır. Kontrol grubu olarak asetik asit ve kollajenaza maruz bırakılmayan aselüler dokular kullanılmıştır.

Aselüler Doku İskelelerin Genipin ile Fiksasyonu: Doku iskelesi olarak kullanılacak olan aselüler yapıların hücre kültür ortamında zamanla enzimatik degradasyona uğradığı ve yapıdaki serbest amino gruplarının antijenik özellik gösterdikleri bilinmektedir [304]. Bununla birlikte *in vivo* implantasyonu yapılan yapıların kalsifikasyona neden olmaması için uygun bir fiksatif ajan ile fikse edilmesi gerektiği rapor edilmiştir [305]. Bu nedenle bu yapıların hücre kültür ortamında bütünlüğünün korunması (dayanımının artırılması), serbest amino asitlerinin bloke edilmesi ve kalsifikasyonun engellenmesi için genipin ile

fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Asetik asit uygulaması ile gözenek boyutu artırılan yapılar, uygun genipin konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla iki farklı (%0,05 ve 0,5'lik, w/v) genipin çözeltisinde 3 gün boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir [206]. %0,05 ve %0,5 genipin konsantrasyonlarında fikse edilen örnekler enzimatik degradasyona tabi tutularak yapıdaki antijenik özellik potansiyeline sahip olan serbest amino grupların miktarı tayin edilmiştir. Degradasyon işlemi sırasında, yapının özgül proteazı olan kollajenazın tropokollajen moleküllerinin (Pro-X-Gly-Pro-Y sekanslı) X ve Gly arasındaki bağları parçaladığı bilindiğinden, kollajenaz enzimi kullanılmıştır. Bu amaçla örnekler 20 U/mL kollajenaz çözeltisinde 37 °C ve pH 7,5'de 24 sa. inkübe edilmiştir. Daha sonra EDTA (10 mM) çözeltisi ilave edilip degradasyon durdurularak serbest amino gruplarındaki artış dokunun degradasyon derecesi olarak ninhidrin (NHN) analiziyle belirlenmiştir [306]. NHN analizi kimyasal fiksasyondan sonra biyolojik doku içerisinde kalan serbest amino gruplarının miktarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu amaçla 24 sa. liyofilize edilen örnekler tartıldıktan sonra 5 mL NHN çözeltisi (%0,35 w/v) örneklerle eklenmiştir (ağırlığı ve yüzey alanı eş örnekler). Liyofilize yapıların 20 dak. boyunca NHN çözeltisi ile kaynar su banyosunda ısıtılmalarının ardından, çözelti mavi-menekşe rengine dönmektedir. Çözeltilerin optik absorbansı spektrofotometrede (VERSAmax, ABD) 570 nm de ölçüm yapılarak tayin edilmiştir. % fiksasyon endeksi (FE) NHN deneyi ile elde edilen optik absorbanslar üzerinden aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak fikse edilmeyen dokular kullanılmıştır.

$$FE = \frac{(NHN \text{ reaktif amin})_{kontrol} - (NHN \text{ reaktif amin})_{fikse}}{(NHN \text{ reaktif amin})_{kontrol}} \times 100$$

3.1.2. Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.1.2.1. Kimyasal Malzemeler

Hücre kültürü sarf malzemeleri Griener Bio-One (Almanya), hücre kültürü vasatı ve bileşenleri Merck Biochrom (Almanya) veya Capricorn Scientific GmbH (Almanya), hücre yüzey antijenlerinin tespit edilmesi için kullanılan antikorlar BD Pharmingen (ABD), hücrelerin osteojenik ve adipojenik farklılaşmalarının tespit edilmesi amacıyla kullanılan Stempro Osteogenesis ve Adipogenesis Differentiation Kitleri Invitrogen (ABD), osteojenik farklılaşmanın gösterilmesi için kullanılan Alizarin Kırmızısı S ve

adipojenik farklılaşmayı göstermek için kullanılan Oil Kırmızısı O Sigma-Aldrich (ABD) firmalarından temin edilerek kullanılmıştır.

3.1.2.2. Sıçan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Kırıkkale Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun 16.12.2013 tarihli ve 13/02 sayılı ve 13/16 karar numaralı izni ile Wistar cinsi 9 aylık erkek sıçandan kemik iliği çıkarılıp Mezenkimal Kök Hücreleri (rt-MKH) izole edilmiştir. Bu amaçla, deney hayvanları %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilerek yüksek doz anestezik ile uyutulup steril kanül ile femurlara girilerek kemik iliği toplanmıştır. Toplanan kemik iliği, kemik parçaları ve hücre agregatlarının uzaklaştırılması için filtreden geçirilerek temizlenmiştir. Temizlenen kemik iliği, %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 2 mM l-glutamin ve 100 U/mL penisilin-streptomisin içeriğine sahip alpha-Minimum Essential Mediuma (α -MEM)' alınarak santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti 25 cm² yüzey alanına sahip hücre kültürü kabına alınarak standart hücre kültürü koşullarında (37 °C'de, %5 CO₂ ve %90 nemli ortam) kültür edilmiştir. 48 sa. sonra tutunamayan ilik kaynaklı kan hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla hücre kültürü vasatı değiştirilerek tutunan hücrelerin kültürüne devam edilmiştir. Takip eden zaman periyotunda tutunan hücrelerin morfolojileri ve hücre tutunma davranışları terz faz ışık mikroskobu (Leica, Almanya) ile gözlenmiştir.

3.1.2.3. MKH'lerin Karakterizasyonu

İzolasyonu yapılan kök hücrelerin köklük özelliklerinin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi (FACS) tekniği ile belirteç ekspresyonuna ve farklı hücre gruplarına farklılaşma kabiliyetine bakıldı [105]. Uygulanan yöntemlerin detayları aşağıda verilmiştir.

Yüzey Antijenlerin Belirlenmesi: Sıçan kemik iliğinden izole primer hücrelerinin kök hücre karakteri gösterip göstermediğinin tespit edilmesi amacıyla MKH belirteci olarak CD29 ve CD90, hematopoetik belirteci olarak ise CD45 ve CD11a ifadelerine FACS tekniği kullanılarak bakılmıştır. Bu amaç doğrultusunda hücreler tripsine maruz bırakılıp yüzeyden kaldırılmıştır. Kaldırılan hücrelerin sayısı hemasitometre ile belirlendikten sonra FACS tüplerine alınarak PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından hücreler %4'lük paraformaldehit çözeltisinde 4 °C de 20 dak. boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra hücreler yıkanarak CD11a (PE işaretli), CD45 (PE-Cy5 işaretli), CD29 (FITC işaretli) ve CD90 (FITC işaretli) belirteçlerine spesifik anti-rat antikorlar ile 1 sa. 4 °C de inkübe edilerek işaretleme yapılmıştır. İşaretlenen hücrelerin analizi

FACSCalibur (Becton Dickinson, ABD) cihazı ile gerçekleştirilerek hücre karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Cell Quest yazılımı (Becton Dickinson, ABD) ile işlenerek raporlanmıştır [307].

Farklı Hücre Tiplerine Farklılaşma Potansiyellerinin Belirlenmesi: Bu kapsamda kullanılan rt-MKH'lerinin osteojenik ve adipojenik hücre tiplerine farklılaşma özelliğinde olup olmadıkları incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda aşağıda tanımlanan yöntemler kullanılarak rt-MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri tespit edilmiştir [308].

MKH'lerin Osteojenik farklılaşma yetilerini tespit etmek için *Stempro Osteogenesis Differentiation Kit* kullanılmıştır. Kemik iliği rt-MKH'ler (P/3) uygun oranda çoğaltıldıktan sonra tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılarak sayılmış ve cm^2 başına 5.10^3 hücre gelecek şekilde 24 gözlü kültür kabına ekilmişlerdir. 24 sa. sonra hücrelerin ortamı osteojenik farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak normal büyüme ortamında (%10 FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/mL Penisilin-streptomisin içeren α -MEM) kültüre edilen MKH'ler kullanılmıştır. 2-3 günde bir hücrelerin ortamı taze besi ortamı ile değiştirilmiştir. 21 gün süren çalışmanın sonunda osteojenik farklılaşmanın tespit edilmesi amacıyla Alizarin Kırmızısı S boyaması yapılmıştır. Bu amaçla PBS ile yıkanan hücreler %4 paraformaldehit solüsyonu ile 30 dak. bekletilerek fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler tekrar PBS ile yıkanarak %2'lik (w/v) Alizarin kırmızısı ile 10 dak. karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Distile su ile 5 kez daha yıkama yapıldıktan sonra ters faz ışık mikroskobu (Leica, Almanya) altında, mineralize kalsiyum nodül oluşumu gözlemlenerek osteojenik farklılaşma değerlendirilmiştir.

Adipojenik farklılaşma için Stempro Adipogenesis Differentiation Kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. rt-MKH'ler (P/3) hücre kültür kabına cm^2 başına 5.10^3 hücre gelecek şekilde dağıtılmış ve 24 sa. boyunca normal kültür ortamı kullanılarak kültürleri yapılmıştır. 24 sa. sonunda hücrelerin ortamı adipojenik ortam ile değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak normal büyüme ortamında kültüre edilen rt-MKH'ler kullanılmıştır. 21 günlük kültür süresi sonunda adipojenik farklılaşma Oil Kırmızısı O boyaması yapılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla PBS ile yıkanan hücreler %4'lük paraformaldehit solüsyonu kullanılarak 30 dak. boyunca fikse edilmiştir. Daha sonra fikse edilen hücreler %2'lik Oil Kırmızısı O çözeltisinde 10 dak. boyunca inkübe edilerek hücre farklılaşması tespit

edilmiştir. 10 dak. sonunda PBS ile yıkanan hücreler ters faz ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.1.3. 3B Aselüler Doku İskelelerinin Biyouyumluluklarının Tespit Edilmesi

3B aselüler doku iskelelerinin hücre kültürü işlemlerinden önce sterilizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla doku iskeleleri uygun boyutta kesildikten sonra 1 sa. boyunca %70'lik etil alkol çözeltisinde inkübe edilmiş ve daha sonra PBS ile yıkandıktan sonra 30 dak. boyunca ultraviyole ışığına maruz bırakılmıştır. Laminar akışlı kabinde sterilizasyonları yapılan doku iskeleleri aşağıda detayları verilen analizlerde kullanılmıştır. Aselüler doku iskelelerin biyouyumluluklarının ve aselüler yapılarda kültürü yapılan rt-MKH'lerin canlılık ve tutunma özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla sırasıyla indirekt sitotoksite ve canlı&ölü analizleri yapılmıştır. Bu amaçla uygulanan yöntemlere ait detaylar aşağıda verilmiştir.

3.1.3.1. İndirekt Sitotoksite Analizi

Aselüler yapıların canlı hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi ISO10993-5 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi–Bölüm 5: *in vitro* sitotoksite testleri” standartının “Endirekt MTT sitotoksite testine” uygun olarak gerçekleştirilmiş ve hücre hattı olarak L929 fare fibroblast hücreleri (ATCC NCTC clone 929:CCL 1) kullanılmıştır. Normal kültür ortamı olarak bileşiminde %10 FBS, 2 mM l-glutamin (Biochrom, Almanya) ve 100 U/mL penicilin/streptomycin bulunan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. L929 hücreleri uygun sayıya getirildikten sonra kültür kabı yüzeyinden kaldırılmış ve 96 gözlü kültür kabına göz başına 1.10^3 hücre gelecek şekilde dağıtılarak 24 sa. boyunca inkübe edilmiştir. 24 sa. sonunda test edilen örneklerin (doğal pericard, aselüler edilmiş perikard, asetik asit ile muamele edilmiş aselüler perikard, asetik asit ile muamele edilip genipin ile fikse edilmiş aselüler perikard) 72 sa. boyunca 37 °C de normal kültür ortamında bekletilerek elde edilen ekstraktlar hücrelere uygulanmıştır (n=6). 24 sa. sonunda hücre canlılığı 4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ile tespit edilmiştir. Bu amaçla hücrelerin üzerindeki ortam %10 MTT (5 mg/mL) ajanı bulunan serumsuz DMEM ile değiştirilmiş ve 37 °C de 4 sa. boyunca inkübe edilmiştir. 4 sa. sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözdürülerek 570-690 nm de spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol grubundan (normal ortamda kültüre edilen

L929 hücreleri) elde edilen absorbans değerleri baz alınarak % hücre canlılığı hesaplanıp grafiğe geçirilmiştir.

3.1.3.2. Canlı&Ölü Hücre Analizi

İndirekt sitotoksosite testinin yanında 3B aselüler doku iskelerinin üzerinde kültüre edilen kemik iliği rt-MKH'lerin canlılığı ve tutunmasının değerlendirilmesi için *LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit* kullanılmıştır. Bu analizde canlı hücreler, hücre içi esteraz aktivitesinin varlığı sayesinde floresan olmayan ve hücre içerisine geçebilen Kalsein-AM'nin, yoğun floresan kalseine enzimatik dönüşümü sonucu ayırt edilir. Polianyonik boya olan kalsein AM canlı hücreler içerisinde muhafaza edilerek yoğun yeşil floresan ışığa yaptığı bilinmektedir. Etidyum bromid homodimeri (EthD-1) ise hasarlı membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere girerek nükleik asitlere bağlanma suretiyle floresan ışımalarını artırır, böylece ölü hücreler parlak kırmızı floresan ışığa verir. Bu kapsamda aselüler doku iskelelerinin altından ve üstünden mikrotom ile kesitler alınarak porları açılmış ve sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 24 sa., 37 °C'de hücre büyüme ortamında inkübe edilerek şartlandırma yapıldı. Bu işlemi takiben aselüler yapılara hücre ekimi yapıldıktan sonra (1.10^6 hücre/mL) 7 günlük kültür süreci başlatıldı. 2 günde bir hücrelerin ortamı bileşiminde %10 FBS (Biochrom, Almanya) 2 mM l-glutamin (Biochrom, Almanya) ve 100 U/mL Penisilin-Streptomisin (Biochrom, Almanya) bulunan α -MEM (Biochrom, Almaya)) ile değiştirildi. 1 haftalık kültür süresinden sonra hücre ekimi gerçekleştirilen aselüler perikardlar alınarak üreticinin önerdiği protokole göre canlı&ölü testi yapılmıştır.

3.1.4. rt-MKH'lerin 3B Aselüler Doku İskelesi Üzerindeki Morfolojileri ve İnfiltrasyonu

İzole edilen ve karakterizasyonları gerçekleştirilen rt-MKH'lerin 3B aselüler doku iskeleleri üzerindeki morfolojilerinin ve statik koşullarda zamana bağlı olarak doku iskelesi içindeki göçlerinin tespit edilmesi amacıyla aşağıda detayları verilen çalışmalar yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

3.1.4.1. 3B Aselüler Doku İskelesi Üzerindeki rt-MKH'lerin Morfolojisinin Tespit Edilmesi

rt-MKH'lerin ekimi yapılmadan önce iskelenin altından ve üstünden mikrotom ile kesitler alınarak porlarının açılması sağlandı ve ardından yukarıda ifade edildiği üzere iskelelerin sterilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra 24 sa., 37 °C'de hücre büyüme

ortamında inkübe edilerek şartlandırma yapıldı. Ardından MKH'ler iskeleler üzerine 1.10^6 hücre/mL olacak şekilde kültüre edildi ve 7 günlük kültür süresi başlatıldı. 7 günlük kültür süresi sonunda aselüler yapılar %2,5 gluteraldehit (Fluka, ABD) çözeltisi ile fikse edildikten sonra 3 defa PBS ile yıkandı, daha sonra alkol serilerinden (%25, 50, 70, 75, 90, 95 ve 100) geçirildi. İkinci fiksasyon için hekzametildisilezana (Sigma, ABD) maruz bırakılan yapılar kurutulup görüntülenmenin yapılacağı zamana kadar 4 °C'de muhafaza edildi. Hücre morfolojisi SEM (QUANTA 400F Field Emission SEM) ile gözlem yapılarak belirlendi.

3.1.4.2. rt-MKH'lerin 3B Aselüler Doku İskelesine İnfiltrasyonu

Statik koşullarda hücre infiltrasyonunun belirlenmesi için por yapısı açılan aselüler doku iskeleleri sterilize edildi. Daha sonra 24 sa., 37 °C'de hücre büyüme ortamında inkübe edilerek şartlandırma yapıldı. Bu işlemten sonra doku iskelelerine 5.10^4 hücre/cm² olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Kültürün 3., 5., 7., 10., 14. ve 21. günlerinde örnekler alınarak histolojik inceleme ile hücre infiltrasyonu incelendi. Bu amaçla örnekler parafine gömülerek 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Doku iskelesinin üstünden, ortasından ve altından alınan kesitlerde H&E boyaması ile hücre varlığı incelendi. Hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler bir gece 60 °C etüvde bırakıldıktan sonra 45 dak. ksilolde tutularak deparafinize edildi. Örnekler dereceli alkol serilerinden (%100, %96, %80) geçirilerek rehidrate edildi. H&E ile boyandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde şeffaflandırıldı ve kanada balsamı ile kapatılarak mikroskop altında incelendi.

3.1.5. Biyomimetik Biyoreaktör Sisteminde rt-MKH'lerin Aselüler Doku İskeleleri Üzerinde Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

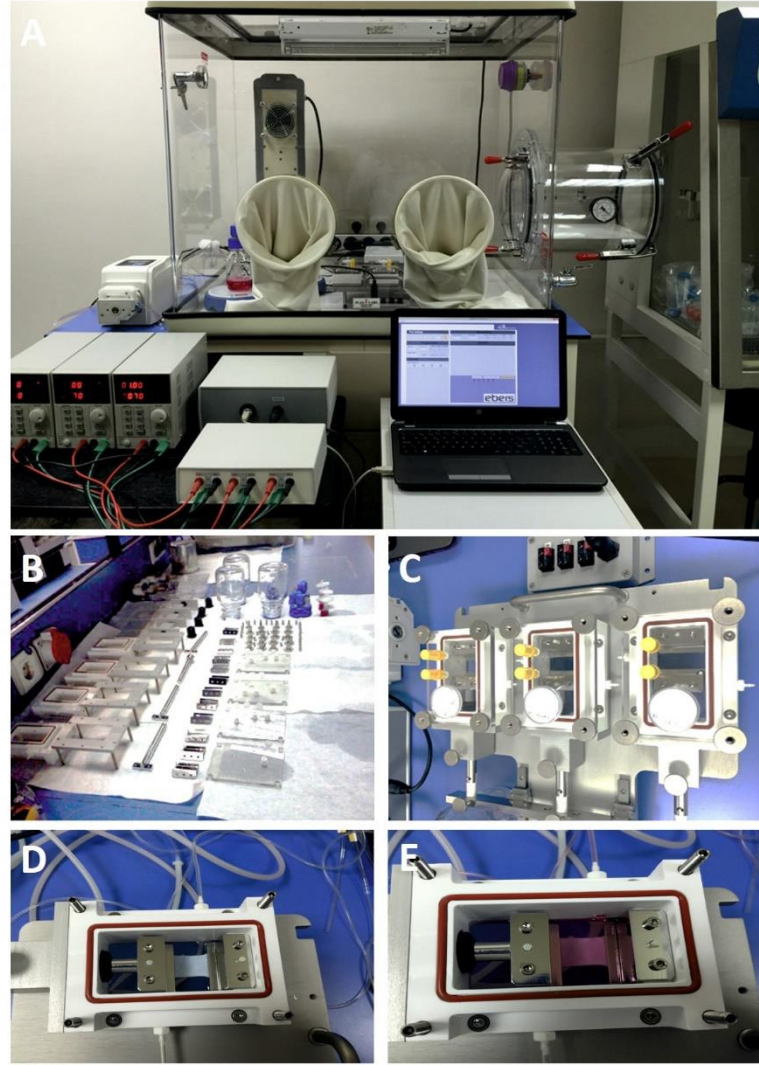
3.1.5.1. Kimyasal Malzemeler

Bu kısımda kardiyak yamaların elektromekaniksel uyarımlara maruz bırakılması için *in vivo* kalp fizyolojisini taklit eden biyomimetik biyoreaktör sistemi EBERS MEDiKAL firmasından temin edilerek kullanılmıştır. rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması için kullanılan 5-Aza Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. qPCR analizi için hücrelerden mRNA'nın izole edilmesi için kullanılan kit (GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit) EURx firmasından (Polonya), qPCR'ın yapılması için kullanılan "HOT FIREPol® EVaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)" karışımı Solis Biodyne (Estonya) firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Bu kısımda

gerçekleştirilen qPCR analizi ve analizde kullanılan primerlerin tasarım ve üretimi hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.2. Biyomimetik Biyoreaktör Sistemi ve Kurulması

Kardiyak doku mühendisliğinde doku yapısının geliştirilmesinde iki tip fiziksel uyarımın; mekanik gerilme ve elektrik akımı uyarımı önemli olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kalbin mekanik gerilmesini ve elektriksel uyarımlarını koordineli olarak taklit eden ve hücre besi ortamının akışını sağlayan bir biyoreaktör sistemi (EBERS MEDİKAL, İspanya) kullanılmıştır (Şekil 3.2). Biyoreaktörler gövde, çeneler ve kapaktan oluşmaktadır (Şekil 3.2B). Biyoreaktör sisteminde farklı frekanslarda mekanik gerilme uygulayabilen bir ana motor yer almaktadır. Bu ana motor aynı anda 3 adet biyoreaktöre 400 N kadar mekanik gerilme uygulayabilmektedir (Şekil 3.2C). Ayrıca elektriksel uyarımı sağlayabilmek için birbirinden bağımsız olarak çalışan 3 tane güç kaynağı mevcuttur. Bu güç kaynakları 0,01-30 V ve 3-1.000 ms aralığında bir uyarım sağlayabilmektedir (Şekil 3.2A). Elektriksel uyarımlar iridyum ve platin karışımından oluşan tel elektrotlar aracılığıyla kapak kısmında yer alan elektriksel uyarım portlarından dokulara verilmektedir. Kalbin doğal mekanik ve elektrik uyarımlarını taklit etmek amacıyla güç kaynakları ve motor sistemi kontrol kutusu aracılığıyla bilgisayar programı üzerinden senkronize bir şekilde çalıştırılmaktadır. Reaktör sisteminde bulunan odacıklara kardiyak yamalar Şekil 3.2D’de gösterildiği gibi vidalı dişli aparatlar yardımıyla sabitlenerek mekaniksel uyarımın uygulanması için ana motora bağlanmaktadır.



Şekil 3.2. A) Biyomimetik biyoreaktör sisteminin genel görünümü. B) Demonte edilmiş biyoreaktörün parçaları. C) Kardiyak yamaların fiziksel uyarımlara maruz bırakılacağı odacıkların ana motor sistemine yerleştirilmesi. D ve E) Uyarımlardan önce odacıklara kardiyak yamaların yerleştirilmesi ve yamalar üzerine hücre büyütme ortamının eklenmesi.

3.1.5.3. Optimum 5-Azasitidin Konsantrasyonunun Tespit Edilmesi

Kemik iliği rt-MKH'lerinin kardiyomiyojenik farklılaşmasının sağlanması amacıyla kimyasal stimülatör olarak 5-Aza (Sigma, ABD) kullanıldı. Literatür verileri incelendiğinde farklı konsantrasyonda 5-Aza'nın kullanıldığı görülmektedir [17, 250]. Bu nedenle farklı konsantrasyonlarda (0, 3, 5, 10, 15 ve 20 μM) 5-Aza denenerek uygun konsantrasyonunun tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda 12 gözlü kültür kaplarına (Greiner, Almanya) $1,5 \cdot 10^4$ hücre/mL hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin yüzeyi

%55-60 oranında kaplamasının ardından içinde 5-Aza bulunan taze ortamla ortam yenilenmesi gerçekleştirildi. 24 sa. süren kimyasal muameleden sonra hücreler steril PBS ile yıkandı. Kültür, normal büyüme ortamı konularak 21 gün sürdürüldü. Işık mikroskobu ile 7. 13. ve 21. günde fotoğraf çekimi yapılarak meydana gelen morfolojik değişim görüntüledi.

3.1.5.4. Aselüler Yapılarda Mekaniksel Uyarım ile rt-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Elektromekaniksel uyarımların uygulanacağı çalışmalarda kullanılacak gerinim miktarını tespit etmek ve sadece mekaniksel uyarımının MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasına etkisini uygulanan gerinim miktarına bağlı olarak değişimini araştırmak amacıyla rt-MKH'ler (1.10^6 hücre/mL) steril 3B aselüler yapılara (final boyutlar: 2 cm uzunluk x 2 cm genişlik x 0,8 mm kalınlık) üzerine ekilerek 6 gün statik koşullarda kültüre edildi. Ardından ortama kimyasal farklılaşma ajanı olan 5-Aza ($10 \mu\text{M}$) eklenerek kültüre 24 sa. daha devam edildi. 24 sa. sonra yapılar PBS ile yıkama yapılarak biyomimetik biyoreaktör sistemine yerleştirildi. Uygulanan gerinim miktarının hücre canlılığına, hücre oryantasyonuna ve kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadesine olan etkisinin araştırılması için 1 Hz ve sinüzoidal formunda reaktörlere ayrı ayrı %5, %10 ve %20 olmak üzere 3 farklı gerinim uygulandı ($n=3$). Statik koşullarda kültüre edilen ve 5-Aza uygulaması yapılan örnekler kontrol grubu olarak kullanıldı. Dinamik koşullar altında 7 gün süren kültür sonunda örnekler reaktörlerden çıkarılarak aşağıda detayları verilen analizler yapılarak hücre canlılığı, hücre oryantasyonu ve kardiyak spesifik transkripsiyon faktörleri ilişkili genlerin ifade düzeyi tespit edildi.

Hücre Canlılığının ve Hücre Morfolojisinin Tespit Edilmesi: 7 günlük mekaniksel uyarımdan sonra hücre canlılığı, hücre morfoljisi ve oryantasyonunun tespit edilmesi amacıyla canlı&ölü hücre analizi yapıldı. Bu amaçla daha önce detayları verilen yöntem kullanılmıştır (Bkz: Bölüm 3.1.3.2). Mekaniksel uyarımın hücre dizilimine etkisinin tespit edilmesi için daha önce detayları verilen yöntem kullanılarak SEM analizi yapılmıştır (Bkz: Bölüm 3.1.4.1).

Kardiyak Spesifik Belirteçlerin qPCR Analizi ile Tespit Edilmesi: 7. günlük dinamik kültür sonunda kardiyak spesifik transkripsiyon faktörü (GATA-4, MEF2C, NKX2.5 ve CACNA1C) ilişkili genlerde meydana gelen değişimin tespit edilmesi amacıyla qPCR analizi yapıldı. qPCR analizi için örneklerden RNA izolasyonu "GeneMATRIX

Universal RNA Purification Kit ”i kullanılarak yapıldı. Kısaca, reaktörden alınan örnekler 1 defa Ca^{+} , Mg^{+} , içermeyen fosfat tuzu tamponu (PBS, Biochrom) ile yıkandıktan sonra trizol varlığında homojenizatörde parçalandı. Homojenizasyonu takiben trizole maruz kalan hücreler tüplere aktarıldıktan sonra 200 μL kloroform eklenerek 15 saniye boyunca vortekslendi ve 12.000 g’de 15 dk. santrifüj yapıldı. Daha sonra RNA içeren üst sulu faz temiz bir tüpe aktarılıp, RNA’nın çökmesi için %100 etanol eklendi. İçerisinde RNA bulunan faz RNA tutucu kolona konularak kit içeriğindeki tamponlar ile yıkandı. Ayrıca DNA kontaminasyonunun önlenmesi için DNase kullanılarak santrifüj yapıldı. Ortamdaki DNase uzaklaştırıldıktan sonra kolonda yine kit içeriğinde bulunan çeşitli tamponlar kullanılarak yıkama yapıldı. Yıkamalar gerçekleştirildikten sonra kolonda asılı kalan RNA’nın elde edilmesi için her kolona 60 μL RNase içermeyen distile su eklenerek santrifüj yapıldı. Santrifüj ile kolondan elde edilen RNA sıvı faza geçirilip kalite ölçümü yapıldı. Elde edilen RNA’ların kalitesi ve miktarının belirlenmesi için NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm’de optik yoğunluk ölçümleri yapıldı.

İzole edilen nükleik asitlerin kalite ve miktarları belirlendikten sonra cDNA sentezi yapıldı. Bu amaçla steril bir tüpe RNA ve primerler eklenerek 10 dak. 70 °C’de ısıtma işlemi yapıldı. Isıtma işleminden sonra yapılan soğutma işlemini takiben dNTPs, DTT, MgCl_2 , RNaz inhibitörü ve “M-MLV Reverse Transcriptase RNase H” sırasıyla eklenip karıştırıldı. 80 dak. 37 °C yapılan inkübasyon sonucunda cDNA izolasyonu gerçekleştirildi.

İzole edilen cDNA kullanılarak qPCR işlemi yapıldı. Bu amaçla “HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)” (Solis Biodyne, Estonya) hazır karışımı kullanıldı. Bu karışıma tablo 3.1’de verilen dizilere sahip primerler ve DNA kalıbı eklenerek 96 gözlü kültür kabına dağıtıldı ve qPCR cihazı (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ABD) çalıştırıldı. qPCR analizi yapılırken tablo 3.2’de verilen parametreler kullanıldı.

Tablo 3.1. rt-MKH'ler için yapılan qPCR analizinde kullanılan primer dizileri

Gen Adı	İleri Primer Sekansı	Geri Primer Sekansı
NKX2.5	CTCTCCTGCTTTCCCAACCG	CACAGCTCTTTCTTATCCGCC
GATA-4	CCGGGCTGTCATCTCACTAT	GAGAGCTTCAGAGCCGACAG
MEF2C	TGCAGGTAACACAGGTGGTC	GGTTGCCGTATCCATTCCCT
CACNA1C	TGTTGTGGGTAGCATTGTTGA	CTGCACTCATAGAGGGAGAGC
TBX5	CACCATGGCCGACGCAG	GGAACTTCAGCCACAGTT
ACTB	CGCGAGTACAACCTTCTTGC	CGTCATCCATGGCGAACTGG

Tablo 3.2. rt-MKH'ler için yapılan qPCR analizinde kullanılan zaman ve sıcaklık parametreleri

Döngü Adımı	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	15	1
Bağlanma	60 - 65	20	40
Uzama	72	20	

3.1.5.5. Aselüler Yapılarda Elektriksel Uyarım ile rt-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Mekaniksel uyarımda olduğu gibi elektriksel uyarımda da elektromekaniksel uyarımın uygulanacağı çalışmalarda uygun gerilim miktarını tespit etmek ve sadece elektriksel uyarımın rt-MKH'lerin farklılaşmasına olan etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu nedenle steril 3B aselüler doku iskelelerine rt-MKH'ler ekilerek 6 günlük statik kültür başlatıldı. 6 günden sonra 24 sa. boyunca hücreler bileşiminde 10 μ M 5-Aza bulunan büyüme ortamı içinde kültüre edildi. Kimyasal stimülasyona bırakılan yapılar elektriksel uyarımın uygulanması amacıyla reaktöre yerleştirildi ve uyarım başlatıldı (n=3). Uygulanan voltaj miktarının hücre canlılığına ve kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadesine olan etkisinin araştırılması için 3 milisaniye (ms), 1 Hz ve kare formunda reaktörlere ayrı ayrı 1 V/cm, 3 V/cm ve 5 V/cm olacak şekilde 3 farklı voltaj uygulandı. 5-Aza uygulanan ancak elektriksel uyarım uygulanmayan doku iskeleleri kontrol grubu olarak kullanıldı. 7 gün süren kültür sonunda örnekler reaktörlerden çıkarılarak daha önce detayları verilen

analizler kullanılarak hücre canlılığı canlı&ölü analizi (Bkz: Kısım 3.1.3.2) ve kardiyak spesifik transkripsiyon faktörleri ile ilişkili gen (*GATA-4*, *MEF2C*, *NKX2.5* ve *CACNA1C*) ifade düzeyi qPCR (Bkz: 3.1.5.4) kullanılarak değerlendirildi.

3.1.5.6. Aselüler Yapılarda Elektromekaniksel Uyarım ile MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

MKH'lerin elektriksel ve mekaniksel uyarımın birlikte kullanılmasıyla kardiyomiyositlere farklılaştırılması ve uygulanan uyarımın süresinin farklılaşmaya olan etkisinin tespit edilmesi amacıyla kök hücreler daha önce ifade edildiği gibi steril 3B aselüler doku iskelelerine ekilmiş ve 6 gün statik koşullarda kültüre edilmiştir. 5-Aza uygulamasından sonra reaktöre yerleştirilen kardiyak yamalara mekaniksel uyarım, elektriksel uyarım ve elektromekaniksel uyarım uygulanmıştır (n=3). Bu çalışmada kullanılan mekaniksel ve elektriksel uyarım parametreleri sadece mekaniksel ve sadece elektriksel uyarım çalışmalarında en yüksek hücre canlılığı ve kardiyak spesifik gen ifadesi sağlayan gruplar dikkate alınarak belirlenmiştir. Elektromekaniksel uyarımın zamana bağlı olarak oluşturacağı etkinin tespit edilmesi amacıyla 2 ve 4 günlük kültür süreleri denenmiştir. Mekaniksel uyarım 1 Hz, sinüzoidal formunda %5 ve elektriksel uyarım ise 1 Hz kare formunda 3 ms 5 V/cm olarak uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak 5-Aza ile muamele edilmiş statik kültür koşullarında kültürü yapılan yamalar kullanılmıştır. Kültür süreleri sonunda örnekler reaktörlerden çıkarılarak transkripsiyon faktörlerin ifade düzeyi daha önce detayları verilen qPCR analizi (Bkz: 3.1.5.4) ile tespit edilmiştir.

3.1.6. Sıçan Miyokardiyal Enfarktüs Modelinin Oluşturulması ve Elektromekaniksel Olarak Uyarılmış Kardiyak Yamaların Değerlendirilmesi

Kalp fizyolojisini fiziksel uyarımlar bağlamında taklit edilmesini sağlayan biyomimetik biyoreaktör sisteminde elektromekaniksel uyarıma maruz bırakılmış kardiyak yamaların performanslarının değerlendirilmesi amacıyla sıçan MI modeli geliştirilerek kardiyak yamalar yara bölgesine implante edilmiştir. MI modelinin geliştirilmesi, elektromekaniksel olarak uyarılmış yamaların hazırlanması, yara bölgesine implantasyonu ve 3 haftalık zaman diliminden sonra yapılan analizlerin detayları aşağıda verilmiştir. Bu çalışmada hayvan deneyleri Kırıkkale Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun 16.12.2013 tarihli ve 13/02 sayılı ve 13/16 karar numaralı etik kurul izni ile yapılmıştır. Bu çalışmalarda rat (sıçan) hayvan modeli olarak seçilmiştir. Çünkü

referans çalışmalar incelendiğinde geliştirilen kardiyak yamaların çeşitli küçük (sıçan) ve bk hayvan modellerinde (koyun ve domuz) MI hasar modeli oluşturularak, denendiği görülmektedir.

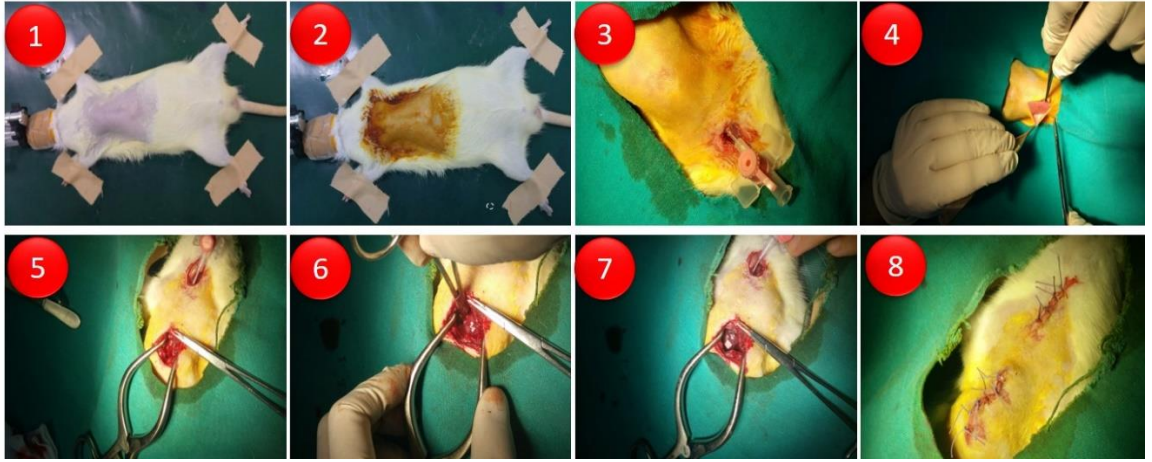
3.1.6.1. Kardiyak Yamaların Hazırlanması ve Elektromekaniksel Uyarımın Uygulanması

in vivo deneylerde kullanılmak üzere kardiyak yamaların hazırlanması için ilk olarak por yapısının açılması için mikrotom kullanılarak aselüler doku iskelelerinin altından ve üstünde kesitler alındı (final boyutlar: 2 cm uzunluk x 2 cm genişlik x 0,8 mm kalınlık). Ardından bu yapılar asetik asit ve kollajenaz ile muamele edilerek por çapları hücre kültürüne uygun hale getirildi. Son olarak yapılar, kalsifikasyonun önlenmesi ve yapıdaki amino grup kaynaklı inflasmasyonun azaltılması amacıyla genipin (%0,5) ile fikse edildi. Bu amaçla aselüler perikartlar %0,5 genipin içeren solüsyon içerisinde 3 gün boyunca 37 C’de inkübe edildi. Fiksasyon işlemine takiben yıkamaları yapılan aselüler yapıların sterilizasyonu ve şartlandırılması işlemi gerçekleştirildi. Kardiyak yamalardan konak dokuya hücre migrasyonunun tespit edilebilmesi amacıyla, rt-MKH’ler doku iskeleleri üzerine ekilmeden önce “5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU)” ile işaretlendi. rt-MKH’lerin BrdU ile işaretlenmesi amacıyla kültür kabında çoğaltılan hücreler %2,5 “*BrdU Labeling Reagent*” içeren büyütme ortamında 37 C’de 24 sa. boyunca inkübe edildi [309]. 24 sa. sonra hücreler tripsinize edilerek kültür kabından kaldırılıp asler doku iskeleleri üzerine ekildi ve 6 gün statik kültür koşullarında inkübe edildi. 6 gün sonra yamalar bileşiminde 10 M 5-Aza içeren kültür ortamı ile 24 sa. kltive edilerek elektromekaniksel uyarım amacıyla biyoreaktöre taşındı. Bu çalışmada elektromekanik uyarım parametreleri olarak 1 Hz, 5 V/cm (3 ms) gerilim ve %5 gerinim kullanılmıştır. Kültür süresi ise gerek bu çalışma kapsamında yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar ve gerekse de literatür verileri göz önünde bulundurularak 7 gün olarak belirlenmiştir. 7 günlük elektromekaniksel uyarımdan sonra yamalar 0,5 mm x 0,5 mm boyutunda kesilerek implantasyona hazır hale getirilmiştir.

3.1.6.2. Sıçan MI Modelinin Oluşturulması ve Kardiyak Yamaların İmplantasyonu

Elektromekaniksel olarak uyarılmış kardiyak yamaların performanslarının test edilmesi amacıyla aşağıda detayları verilen yöntem kullanılarak MI modeli oluşturuldu ve elektromekaniksel uyarıma maruz kalmış kardiyak yamalar, statik koşullarda kültürü yapılmış yamalar ve kontrol grubu olarak hücresiz aselüler yamalar implante edildi. MI modelinin oluşturulması için Sprague-Dawley cinsi erkek yetişkin sıçanlar (5 aylık)

kullanıldı. Denekler bileşiminde %25 ksilazin (Alfazyne 20 mg/ml Egevet, İzmir, Türkiye), %45 ketamin (Alfamine 100 mg/ml Egevet, İzmir, Türkiye) ve %30 salin bulunan genel anestezi solüsyonunun intraperitoneal enjeksiyonu (0,1 mL/100 g canlı ağırlık) ile uyutuldu. Uyutulan hayvanların göğüs ve boğaz kısmı sırasıyla klorheksidin glukonat (Savlex, Drogan, Ankara/Türkiye), povidon iyodür (Biokadin, Biokan, İstanbul/Türkiye), ve alkol ile silinerek aseptik koşullar sağlandı. Yüzeysel dezenfeksiyon işleminden sonra pozitif basınçlı ventilasyonun sağlanması için 20G1½ (Microlance™ 0.9X40 Nr.1 TW PM) damar kanülü trakeotomi ile soluk borusuna yerleştirilerek entübasyon işlemi yapıldı. Pozitif basınçlı ventilasyon işlemi normal havalandırma koşullarında dakikada 60 döngü ve 2 mL tidal hacim olacak şekilde uygulandı. Ventilasyon işlemi yapılan deneklere genel anestezi altında torakotomi uygulanarak kalbe ulaşıldı. MI modeli “*cryoinjury*” metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla sıvı azot ile soğutulmuş metal prob 2 defa olmak üzere 10 saniye boyunca kalbin sol ventrikül duvarına temas ettirildi. MI oluşturulan bölgeye hazırlanan yamalar fibrin doku yapıştırıcısı ile yapıştırıldıktan sonra denekler kapatıldı (Şekil 3.3). Deri altına serum fizyolojik enjekte edildikten sonra oksijenizasyon işlemi yapılan denekler uygun barındırma koşullarına alınarak 3 hafta boyunca gözlemlendi. 3 hafta sonra denekler yüksek doz tiyopental sodyum (Pental 1 g, İ.E Ulagay, İstanbul) kullanılarak sakrifiye edilip dokular alındı ve aşağıda detayları verilen analizler gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Akut MI modelinin oluşturulması ve kardiyak yamaların yara bölgesine implantasyonu işleminin basamakları. MI modelinin oluşturulması için uygulanan tüm prosedürler anestezi altında etik kurulu onayına göre yapılmıştır. 1 ve 2) Ameliyat bölgesinin tıraşlanarak temizlenmesi ve aseptik koşulların sağlanması 3) Pozitif basınçlı ventilasyon işlemi için kânülün trakeotomi ile soluk borusuna yerleştirilmesi 4 ve 5)

Kalbe ulaşılması amacıyla göğüs derisinin kesilmesi ve torakotomi ile göğüs kafesinin açılması 6) “*Cryoinjury*” yöntemi ile MI modelinin oluşturulması (parlak, gri bölge) 7) Kardiyak yamanın MI bölgesine implantasyonu ve 8) İşlemin bitmesi ve hayvanın göğsünün kapatılması.

3.1.6.3. Histolojik Analizler

3 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerden kalpleri alınarak MI modelinin oluşturulup oluşturulmadığı, MI bölgesinde kardiyak yama kaynaklı kalsifikasyonun olup olmadığı ve son olarak kardiyak yama kaynaklı hücrelerin MI bölgesine göç edip etmedikleri aşağıda detayları verilen histolojik analizler ile tespit edilmiştir.

Hematoksilen Eozin Analizi ile MI Modelinin Değerlendirilmesi: “*Cryoinjury*” yöntemi ile miyokardiyal enfarktüsün başarılı bir biçimde indüklenip indüklenmediğinin anlaşılması için 3 haftalık implantasyon sonunda denekler sakrifiye edilerek kalp dokuları alınmış ve rutin takibe alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Ardından H&E boyaması yapılarak yara bölgeleri incelenmiştir. H&E, daha önce detayları verilen yöntem kullanılarak yapılmıştır (Bkz: Kısım 3.1.1.3).

MI Bölgesine Göç Eden Kardiyak Yama Kaynaklı Hücrelerin Tespit Edilmesi: Daha önce de ifade edildiği üzere MI bölgesinde kardiyak yama kaynaklı hücrelerinin belirlenebilmesi için rt-MKH’ler BrdU ile işaretlendikten sonra aselüler doku iskelelerine ekilmişti. 3 haftalık implantasyondan sonra yamalardan MI bölgesine göç eden hücrelerin tespit edilmesi için yara bölgesinden dokular alınarak parafin içine gömüldü. Parafine gömülü örneklerden alınan kesitler deparafinize edildikten sonra seri olarak %100, %96 ve %70’lik etanol ile rehidrate edildi. Hazırlanan preparatlarda BrdU boyaması “*BrdU Staining Kit*” (Invitrogen, ABD) kullanılarak üreticinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Özetle, ilk olarak örneklerdeki endojen peroksidaz aktivitesi, 10 dak. süreyle %3 hidrojen peroksit (metanolde) kullanarak inhibe edildi. İnkübasyonun ardından PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Formalin ile fikse edilmiş preparatlar tripsin ile 37 °C’ de 10 dak. boyunca inkübe edildi. Ardından kesitler kitinin içeriğindeki denatüre edici solüsyon ile 30 dak. muamele edilerek PBS ile yıkama yapıldı. Bu basamağı takiben kesitler bloke edici solüsyon ile oda sıcaklığında 10 dak. inkübe edildi ve inkübasyon süresinin sonunda solüsyon durulanmadan uzaklaştırıldı. Biotinlenmiş Fare-Anti BrdU solüsyonu kesitlere eklenerek oda sıcaklığında 1 sa. inkübasyon yapıldı. PBS ile durulamanın ardından streptavidin peroksidaz solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dak. inkübasyon

gerçekleştirildi. Distile su içerisindeki substrat tampon, DAB ve hidrojen peroksidad ajanlarını içeren karışım kesitlere eklenip 5 dak. beklendikten sonra distile suyla yıkama işlemi yapıldı. Son olarak slaytlar hematoksilen ile boyanmalarının ardından dereceli alkol serisi ile dehidrate edilerek ışık mikroskobu altında incelendi.

Kalsifikasyonun Tespit Edilmesi: MI bölgesinde yama kaynaklı kalsifikasyonun tespit edilmesi amacıyla von Kossa (Calcium Stain) kit (Abcam, İngiltere) kullanıldı. Boyama üreticinin direktifleri dikkate alınarak yapıldı. Özetle hazırlanan preparatlar ultraviyole altında 1 sa. boyunca %5'lik gümüş sülfat solüsyonu içinde inkübe edildi. 1 sa. sonunda preparatlar yıkanıp 3 dak. boyunca %5'lik sodyum tiyosülfat ile muamele edildi. Son adım olarak kesitler 5 dak. boyunca “*nuclear fast red*” ile maruz bırakılıp saf alkol ile yıkandı ve ışık mikroskobu altında incelendi.

MI Bölgesinde Kardiyak Spesifik Proteinlerin İmmünohistokimyasal Analiz ile Tespit Edilmesi: Implantasyon bölgesinden alınan kardiyak yama ve yara bölgesinden alınan dokulardan hazırlanan kesitler sarkomer yapısı ile ilişkili proteinlerin ifadesi ve inflamasyon açısından incelendi. Bu amaçla alınan dokular -196 °C de donduruldu. Dondurulmuş doku örneklerinden kriyomikrotom ile 7 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler bir gece nemden arındırılmış kutularda oda ısısında bekletildi. Ertesi gün kesitler 4 °C'de soğuk aseton ile 10 dak. tespit edildi. Tespit edilen kesitler 30 dak. kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri dakopen ile sınırlandırıldı. Spesifik olmayan bağlanmaları bloklamak için kesitler %2,5 BSA içeren PBS'de 1/200 dilusyonda hazırlanmış keçi serumu veya maymun serum ile 30 dak. inkübe edildikten sonra kardiyak kontraktıl proteinleri göstermek amacıyla sarkomerik α -aktinin (SAC), miyozin ağır zincir (MHC), cTroT ile bağlantı birimlerini göstermek amacıyla nCAD (mekanik bağlantı) primer antikorları ile, makrofajların görülmesi amacıyla CD68 monoklonal antikor ile 1 sa. süreyle oda ısısında üzeri cam kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet içinde inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5 dak. süre ile yıkandıktan sonra kesitler anti-mouse IgG (HRP) ve anti-rabbit (Alkaline phosphatase) sekonder (anti-mouse IgG (HRP) (Tablo 3.3) antikor ile oda ısısında 30 dak. süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 kere 5 dak. yıkandıktan sonra ışık mikroskobu altında inceleme yapıldı.

Tablo 3.3. İmmünohistokimyasal analiz için kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile çalışılan dilüsyon oranları

Antikor	Klon	İzotip	Kat. No	Marka	Dilüsyon Oranı
Sarkomerik Alpha Aktin	EA-53	Fare IgG1	Ab9465	Abcam	1:25
Miyozin Ağır Zinciri	BA-G5	Fare IgG2b	Ab50967	Abcam	1:100
Kardiyac Troponin T	1C11	Fare IgG1	Ab8295	Abcam	1:100
N-Kaderin	5D5	Fare IgG1	Ab98952	Abcam	1:100
CD68	ED1	Fare IgG1	Ab31630	Abcam	1:100
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	-	IgG	Ab6789	Abcam	1:200

3.1.7. İstatistiksel Analiz

Bütün denemeler üç tekrarlı (n=3) olarak tasarlanmıştır. Deneyler sonunda elde edilen sayısal verilerin ortalama ve standart sapmaları tespit edilmiştir. qPCR analizi sonuçlarının istatistiksel analizi tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. MTT sonuçlarının analizi Mann-Whitney testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar Tukey's testi kullanılarak yapılmıştır. Tüm analizler GraphPad Prism versiyon 6.01 kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM II

3.2. Küçük Moleküllerin Mezankimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasına Etkisi

3.2.1. Sıçan Kaynaklı Kemik İliği Mezankimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaşmasında Kimyasal ve Biyolojik Stimülatörlerin Sinerjik Etkisi

Literatürde gerek embriyonik gerekse MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşma yetisinde oldukları gösterilmiştir. Bu hücre tiplerinin uygun indükleyiciler varlığında farklılaştıkları ve *in vivo* kardiyomiyosit özelliklerini hem transkripsiyon hem de protein seviyesinde gösterdikleri bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ya sadece kimyasal indükleyici ajanlar ya da büyüme faktörleri kullanılarak kök hücreler kardiyomiyositlere farklılaştırılmıştır. Ancak fonksiyonel kardiyomiyositlerin elde edilmesinde bahsi geçen faktörlerin sinerjik etkileri araştırılmamıştır. Bu çalışmada *in vitro* koşullarda daha önce karakterize edilen sıçan kaynaklı kemik iliği rt-MKH kardiyomiyositlere farklılaştırılması amacıyla 5-Aza, DMSO ve çeşitli büyüme faktörleri (TGF- β 1, FGF-2

ve BMP-2) ayrı ayrı ve beraber kullanılarak, farklılaşmada sinerjik etkileri aşağıda detayları verilen yöntemler kullanılarak gen ve protein düzeyinde incelenmiştir.

3.2.1.1. Kök Hücrelerin Kimyasal ve Biyolojik Stimülatörlerin Sinerjik Etkisi ile Farklılaştırılması

rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması amacıyla hücreler uygun sayıya getirildikten sonra kültür kabı yüzeyinden tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak cm^2 başına $1,5 \times 10^4$ hücre gelecek şekilde 6 gözlü kültür kaplarına ekildi. Kimyasal ve biyolojik sitümölatörlerin etkisinin tespit edilmesi amacıyla 5-Aza, DMSO ve çeşitli büyüme faktörlerini içeren farklılaşma ortamının etkileri ayrı ayrı ve bunların birlikte kullanılarak sinerjik etkileri 7 ve 14 günlük kültür süresinde incelendi. Kültüre alma işlemi ve çalışmada kullanılan deneysel gruplar tablo-3.4'de özetlenmiştir.

Tablo 3.4. rt-MKH'lerin kimyasal ve biyolojik stimülatörlerin sinerjik etkisi altında farklılaştırma için kullanılan kombinasyonlar

Farklılaşma Ajanları	Açıklama
Kontrol	-
5-Aza	10 μM 5-Aza ile 24 sa. kültür
DMSO	%1 DMSO ile 7 veya 14 gün inkubasyon
Farklılaştırma Ortamı (DM)	TGF- β 1 (10 ng/mL), BMP-2 (10 ng/mL), FGF-2 (50 ng/mL) içeren ortamda 7 veya 14 gün boyunca inkübasyon
5-Aza + DM	10 μM 5-Aza ile 24 sa. kültür + 6 veya 13 gün boyunca DM ile kültür
DMSO + DM	%1 DMSO ile 24 sa. kültür + 6 veya 13 gün boyunca DM ile kültür
5-Aza+ DMSO	10 μM 5-Aza ile 24 sa. kültür + %1 DMSO ile 6 veya 13 gün boyunca kültür

Morfolojik Gözlem: rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmasının değerlendirilmesi için tablo 3.4'de yer alan deneysel gruplar oluşturulmuş ve 5. ile 12. günde hücre morfolojisinde meydana gelen değişimler ters faz ışık mikroskobu (Leica, Almanya) ile incelenerek fotoğraflama işlemi yapılmıştır.

qPCR Analizi: Farklı koşullarda kültüre edilen rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmalarının transkripsiyon düzeyinde değerlendirilmesi için 7. ve 14. günde qPCR

yapılarak *GATA-4*, *NKX2.5*, *MEF2C* ve *CACNA1C* ifadeleri belirlendi. Bu amaçla 3.1.5.4 başlığı altında verilen yöntem kullanılmıştır.

İmmünofloresasn Boyama ile Kardiyak Spesifik Proteinlerin Analizi: qPCR analizi sonuçlara göre en iyi sonucu veren grup olan 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta translasyon düzeyindeki etkinin tespit edilmesi amacıyla cTroT, SAC, konneksin 43 (Cnx43) ve alfa düz kas aktini (α -SMA) ifadelerine immünofloresans boyama yapılarak bakılmıştır. Bu amaçla rt-MKH'ler 5-Aza ve DMSO maruz bırakılmış ve 14 gün sonunda analiz yapılmıştır. Kültür süresi sonunda hücreler 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 30 dak. fikse edildi. Fiksasyondan sonra tekrar PBS ile yıkanan hücreler %0,5 Triton-X100 (PBS içinde) solüsyonunda 15 dak. inkübe edilmiştir. Triton-X100'i takiben PBS ile yıkanan hücreler keçi ve eşek serumu içeren bloklama serumu ile 30 dak. inkübe edildi. Bloklama işlemi sonunda örnekler cTroT, SAC, Cnx43 ve α -SMA spesifik primer antikorlar (Abcam, Birleşik Krallık) ile 1,5 sa. boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. 1,5 sa. sonunda yıkanan örnekler sekonder antikorlar (Alexa Fluor® 488 ve Alexa Fluor® 594 konjuge, abcam, Birleşik Krallık) ile oda sıcaklığında 45 dak. boyunca inkübe edilerek işaretlendi. PBS ile 3 defa yıkanan örnekler, hücre çekirdeğinin boyanması amacıyla 10 μ M 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) solüsyonu ile muamele edilip floresans mikroskop (Olympus, Japonya) altında görüntülendi.

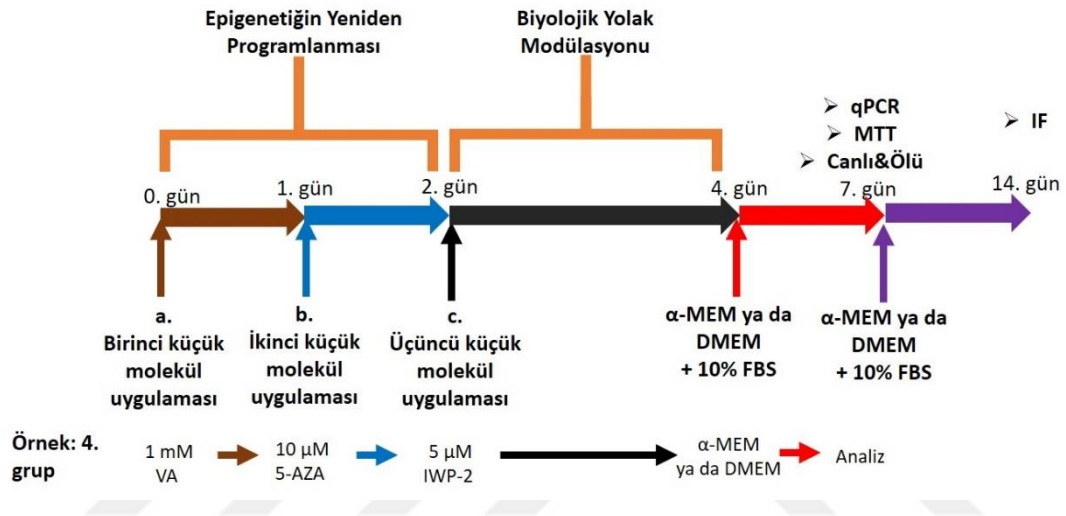
3.2.1.2. İstatistiksel Analiz

Bütün denemeler üç tekrarlı (n=3) olarak tasarlanmıştır. Deneyler sonunda elde edilen sayısal verilerin ortalama ve standart sapmaları tespit edilmiştir. qPCR analizi sonuçlarının istatistiksel analizi iki yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar Tukey's testi kullanılarak yapılmıştır. Analizler GraphPad Prism versiyon 6.01 kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2. Epigenetik Yeniden Programlama ve Biyolojik Yolak Manipülasyonu ile Kök Hücrelerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Bu kısımda MKH'lerin (İnsan Kaynaklı Kemik İliği (h-MKH) ve rt-MKH) daha etkin ve yüksek oranda kardiyomiyositlere farklılaştırılması için kök hücrelerin epigenetik profilinin yeniden programlanması ("*epigenetic reprogramming*") ve biyolojik yolakların inhibisyonu bir arada kullanılmıştır. Bu amaçla farklı kaynaklardan izole edilen MKH'nin kullanılarak aynı zamanda kök hücre kaynağının kardiyomiyojenik farklılaşmada etkisi

araştırılmıştır. Farklılaştırma prosedüründe ilk olarak epigenetik yeniden programlama yapılmış daha sonra yolak modülasyonu gerçekleştirilerek kök hücre farklılaşması gerçekleştirilmiştir (Şekil.3.4). Bu amaçla DNA metilasyonun inhibisyonu ve histon asetilasyonunun aktivasyonun sağlanması için sırasıyla 5-Aza ve Va kullanılarak epigenetik profil modülasyonu yapılmış, daha sonra yukarıda detayları verilen çalışmalarla etkinliği tespit edilen DMSO’da farklılaştırma prosedürüne eklenmiştir. Öte yandan WNT ve TGFβ yolaklarının inhibisyonu amacıyla sırasıyla IWP-2 ve RepSox kullanılmıştır.



Şekil 3.4. MKH’lerin epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonlarının bir arada kullanılmasıyla kardiyomiyositlere farklılaştırılmasında uygulanan yöntemin akış şeması.

3.2.2.1. Kimyasal Malzemeler

5-Aza, Va ve RepSox küçük molekülleri Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. IWP-2 ise Tocris Bioscience (Birleşik Krallık) firmasından temin edilmiştir. İmmünfloresans boyamada kullanılan primer ve sekonder antikorlar, keçi ve eşek serumları Abcam (Birleşik Krallık) firmasından, qPCR analizinde kullanılan *tripure isolation reagent* Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD), cDNA izolasyon kiti ve qPCR master karışımı Roche firmasından (İsviçre) temin edilerek kullanıldı.

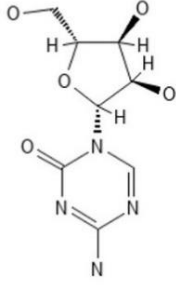
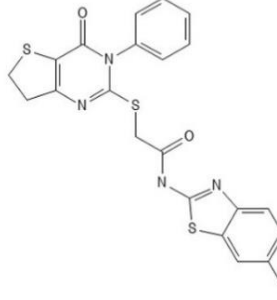
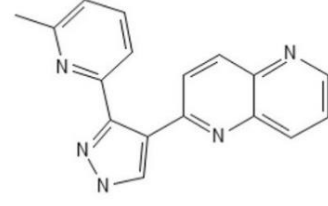
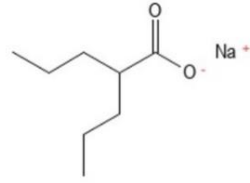
3.2.2.2. MKH’lerin Kültürü

Bu çalışmada kök hücre kaynağının kardiyomiyosit farklılaşması açısından bir etkisinin olup olmadığının ve test edilecek yöntemin etkisinin kök hücre kaynağına bağlı olarak

bir fark yaratıp yaratmadığını tespit edilmesi için h-MKH (ATCC, PCS-500-012™ , ABD) ve rt-MKH'ler kullanıldı. h-MKH'lerin kültürü, bileşiminde %10 FBS, %1 l-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin bulunan düşük glikoz içeriğine sahip DMEM (Cegrogen, Almanya) kullanılarak yapıldı. rt-MKH'lerin kültürü ise bileşiminde %10 FBS, %1 l-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin bulunan α -MEM (Cegrogen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneylerde pasaj numarası 4 ile 6 arasında olan hücreler kullanıldı.

3.2.2.3. Küçük Moleküller ile Epigenetik Yeniden Programlama ve Biyolojik Yolak Manipülasyonu

MKH'lerin epigenetik yeniden programlanması ve biyolojik yolak manipülasyonu amacıyla kullanılan küçük moleküllerin konsantrasyonu ve uygulama süresi yukarıda detayları verilen çalışmalar ve literatür verileri dikkate alınarak tespit edilmiştir. Bu kapsamda epigenetik yeniden programlama stratejinde test edilen 5-Aza ve Va sırasıyla 24 sa. boyunca 10 μ M ve 1 mM [16] olarak uygulandı. Yukarıda detayları verilen çalışmalarla 10 μ M konsantrasyonu 5-Aza için uygun doz olarak tespit edilmiştir. WNT yolağının inhibisyonu için kullanılacak olan IWP-2 48 sa. boyunca 5 μ M [310], TGF- β yolağının inhibisyonu için kullanılacak olan RepSox ise yine 48 sa. boyunca 5 μ M [311] olarak kullanıldı. Yukarıda ifade edilen çalışmalarda qPCR analizleri, 5-Aza (10 μ M, 24 sa.) ve DMSO (%1, kültür süresi boyunca) beraber kullanıldığı durumda 7 günlük kültür süresi sonunda kardiyak spesik transkripsiyon faktörlerinin gen düzeyindeki ifadelerinin 5-Aza'ya göre anlamlı düzeyde arttığını göstermiştir. Bu nedenle bu çalışmada da DMSO konsantrasyonu %1 olarak belirlenmiştir.

5-Azasitidin**IWP-2****RepSox****Dimetilsülfoksit****Valproik Asit**

Şekil 3.5. Epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonu amacıyla kullanılan küçük moleküllerin kimyasal yapıları

Tablo 3.5. Küçük moleküllerin uygulama koşulları ve test edilen kombinasyonlar

Grup No	Grup Adı	Uygulama Biçimi
1	Kontrol	Normal koşullarda kültürü yapılan MKH'ler
2	5-Aza+DMSO+IWP-2	^a 5-Aza: 24 sa. boyunca 10 µM 5-Aza ile kültür ^b DMSO + IWP-2: 5-Aza'dan sonra 48 sa. boyunca 5 µM IWP-2 ve %1 DMSO içeren ortamda kültür ^c Sadece DMSO: 4 gün boyunca %1 DMSO ile kültür
3	5-Aza+DMSO+RepSox	^a 5-Aza: 24 sa. boyunca 10 µM 5-Aza ile kültür ^b DMSO + RepSox: 5-Aza'dan sonra 48 sa. boyunca 5 µM RepSox ve %1 DMSO içeren ortam ile kültür ^c Sadece DMSO: 4 gün boyunca %1 DMSO ile kültür
4	Va+5-Aza+IWP-2	^a Va: 24 sa. boyunca 1 mM Va ile kültür ^b 5-Aza: Va'dan sonra 24 sa. boyunca 10 µM 5-Aza ile kültür ^c IWP-2: 5-Aza'dan sonra 48 sa. boyunca 5 µM IWP-2 ile kültür
5	Va+5-Aza+RepSox	^a Va: 24 sa. boyunca 1 mM Va ile kültür ^b 5-Aza: Va'dan sonra 24 sa. boyunca 10 µM 5-Aza ile kültür ^c RepSox: 5-Aza'dan sonra 48 sa. boyunca 5 µM RepSox ile kültür
6	Va+DMSO+IWP-2	^a Va: 24 sa. boyunca 1 mM Va ile kültür ^b DMSO + IWP-2: Va'dan sonra 48 sa. boyunca 5 µM IWP-2 ve %1 DMSO içeren ortam ile kültür ^c Sadece DMSO: 4 gün boyunca %1 DMSO ile kültür
7	Va+DMSO+RepSox	^a Va: 24 sa. boyunca 1 mM Va ile kültür ^b DMSO + RepSox: Va'dan sonra 48 sa. boyunca 5 µM RepSox ve %1 DMSO içeren ortam ile kültür ^c Sadece DMSO: 4 gün boyunca %1 DMSO ile kültür
8	Va+5-Aza+DMSO+RepSox-2+IWP-2	^a Va: 24 sa. boyunca 1 mM Va ile kültür ^b 5-Aza: Va'dan sonra 24 sa. boyunca 10 µM 5-Aza ile kültür ^c DMSO+RepSox+IWP-2: 5-Aza'da sonra 48 sa. boyunca 5 µM RepSox, 5 µM IWP-2 ve %1 DMSO içeren ortam ile kültür. ^d Sadece DMSO: 3 gün boyunca %1 DMSO ile kültür

Not: ^a: ilk sırada uygulanacak küçük molekül; ^b: ikinci sırada uygulanacak küçük molekül, ^c: Üçüncü sırada uygulanacak küçük molekül, ^d: Dördüncü sırada uygulanacak küçük molekül.

Hücre Morfolojisi ve Canlılığının Tespit Edilmesi: Tablo 3.5’de verilen kombinasyonların hücre canlılığı üzerinde etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla MTT analizi yapıldı. Bu amaçla h-MKH’ler ve rt-MKH’ler 48 gözlü kültür kabına göz başına 1.10^4 hücre olacak şekilde ekilerek hücrelerin yüzeyi kaplaması beklendi. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra tablo-3.5’de yer alan gruplar için uygulama yapıldı ve 7 gün sonrasında MTT ile hücre canlılığı tespit edildi. Bu amaçla 7 gün sonunda hücrelerin üzerindeki ortam, bileşiminde %10 MTT (5 mg/mL) bulunan serumsuz ortam ile değiştirildi ve 4 sa. normal kültür koşullarında inkübasyon yapıldı. 4 sa. sonra oluşan formazan kristalleri çözündürülerek spektrofotometrede (Molecular Devices, ABD) absorbans ölçümü yapıldı (n=6). Deneysel gruplardaki % hücre canlılığı kontrol grubu %100 olarak kabul edilerek belirlendi.

MTT sonuçlarının desteklenmesi ve hücre morfolojilerinin tespit edilmesi için *LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit* (Invitrogen, UK) kullanıldı. Özetle, 7 gün boyunca epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonu için Tablo 3.5’de verilen küçük moleküllere maruz bırakılan MKH’lerin üzerindeki besi ortamı bileşiminde 4 mM calcein AM (canlı hücreleri yeşil ile boyar) ve 2 mM EthD-1 (ölü hücreleri kırmızı ile boyar) bulan PBS ile değiştirilerek 37 °C’de 1 sa. boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. 1 sa. sonunda hücreler PBS ile yıkayıp floresans mikroskop (Leica, Almanya) altında gözlenmiştir.

qPCR Analizi: Tablo 3.5’de verilen koşullarda kültüre edilen h-MKH ve rt-MKH’lerin kardiyomiyositlere farklılaşmalarının değerlendirilmesi için 7 günlük kültür sonrasında qPCR yapılarak *GATA-4*, *NKX2.5*, *MEF2C* ve *TBX5* ifadeleri belirlendi. Kültüre edilmiş hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Yıkanan hücrelere 1 mL TRIzol eklenerek üretici talimatlarına göre total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA’ların kalite kontrolü ve konsantrasyon ölçümleri spektrofotometrik olarak NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher Scientific, ABD) cihazında yapıldı. Yapılan ölçümlerde tüm RNA’ların 260/280 oranı 1,84-1,95 arasında, 260/230 oranları ise 1,58 ile 1,81 arasında okundu. Kalite kontrolden geçen RNA’lardan *Transcriptor First Strand cDNA Kit* ile 250 ng cDNA sentezlendi. qPCR LightCycler® 480 (Roche, İsviçre) cihazında *SYBR-Green Master Mix*, tablo 3.6’da verilen ileri ve geri primer dizileri ve uygun miktarda cDNA kullanılarak yapıldı. Analizde kullanılan sıcaklık, zaman ve döngü sayısı tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.6. h-MKH'lerin qPCR analizinde kullanılan primer dizileri

Gen Adı	İleri Primer Sekansı	Geri Primer Sekansı
NKX2.5	CTTCTATCCACGTGCCTACAG	TCTGTCTTCTCCAGCTCCA
GATA-4	TGTCATCTCACTACGGGCA	AGGCTGTTCCAAGAGTCCT
MEF2C	CCAGGCAGCAAGAATACGA	ATCCTCCCATTCTTGTCTT
TBX5	GGGCAGTGATGACATGGAG	GAAAGGACTGTGGTTGGAGG
ACTB	CGCGAGTACAACCTTCTTGC	CGTCATCCATGGCGAACTGG

Tablo 3.7. h-MKH'lerin qPCR analizinde kullanılan sıcaklık ve zaman parametreleri

Döngü Adımı	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	2 dak.	1
Bağlanma	94	5 sn.	45
Uzama	59	20 sn.	

İmmünfloresans Boyama ile Analizi: Tablo 3.5’de verilen koşullarda kültüre edilen h-MKH ve rt-MKH’lerin kardiyomiyositlere farklılaşmalarının değerlendirilmesi için 14 günlük kültür sonrasında immünfloresans boyama yapılarak cTroT, SAC, Cnx43 ve α -SMA ifadeleri belirlendi. Bu amaçla 3.2.1.1 başlığı altında verilen yöntem kullanılmıştır.

3.2.2.4. İstatiksel Analiz

Bütün denemeler üç tekrarlı (n=3) olarak tasarlanmıştır. Deneyler sonunda elde edilen sayısal verilerin ortalama ve standart sapmaları tespit edilmiştir. MTT ve qPCR sonuçlarının istatistiksel analizi için tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar Bonferroni testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism versiyon 6.01 kullanılarak yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

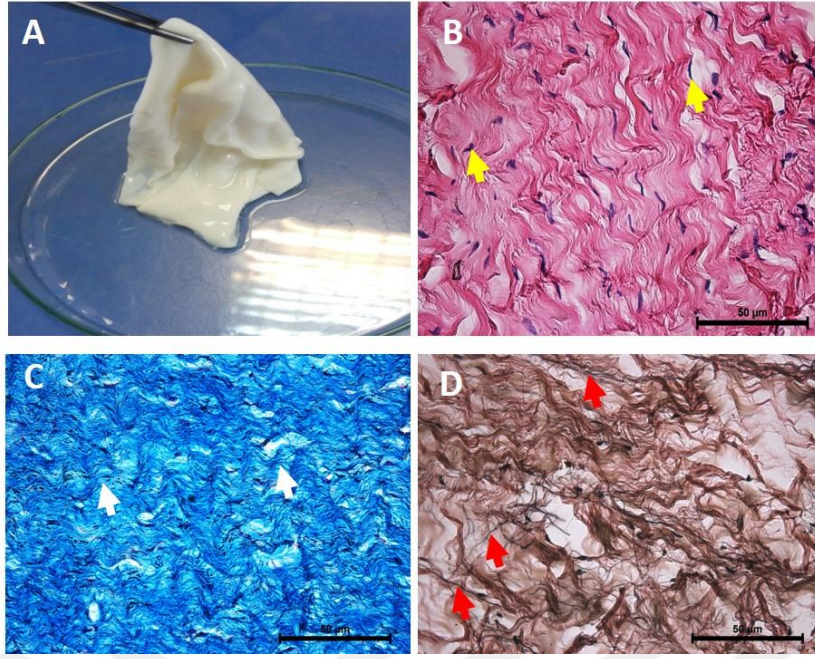
Sunulan tez çalışmasının 1. bölümünde doku mühendisliği yöntemi ile kardiyak yama geliştirilmiştir. Bu kapsamda; i. sığır perikardiyumu temin edilerek fiziksel ve kimyasal yöntemlerle aselüler hale getirilerek, doku iskelesi olarak kullanılabilirliği test edilmiş, ii) rt-MKH'ler izole edilerek, karakterize edilmiş, iii. rt-MKH'ler aselüler doku iskelelerinde 5-Aza ve biyofiziksel uyarımların (mekanik, elektrik ve elektromekanik) etkisi ile kültür edilerek kardiyomiyojenik farklılaşmaları incelenmiş, elektromekaniksel uyarımların etkisi ile kardiyak yamalar geliştirilmiş ve performansları sıçan Miyokardiyal Enfarktüs (MI) modelinde değerlendirilmiştir.

Çalışmanın 2. bölümünde ise i. kemik iliği rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında kimyasal ve biyolojik stimülatörlerin sinerjik etkisi kardiyak spesifik gen ve proteinlerin ifadeleri ile incelenmiş, ii) epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonu stratejilerinin birlikte kullanımı ile kök hücrelerin (h-MKH ve rt-MKH) kardiyomiyositlere farklılaşmasındaki etkileri kardiyak spesifik gen ve proteinlerin ifadelerine bakılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.1. Mezenkimal Kök Hücreler İçeren Aselüler Perikard Bazlı Kardiyak Yamalar

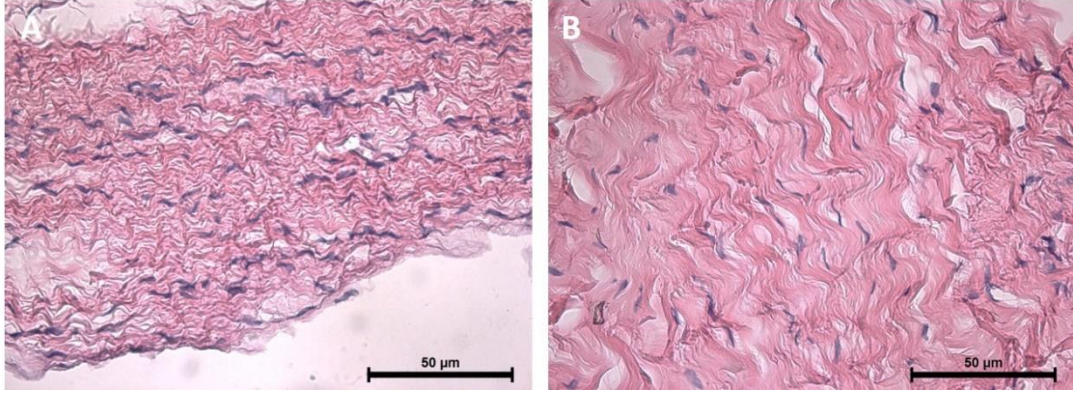
4.1.1. 3-Boyutlu Aselüler Doku İskelelerinin Histolojik ve Morfolojik Özellikleri

Aselüler doku iskelesi elde etmek için çalışmamızda sığır kalbi ventral yüzeyindeki perikardiyal kese pariyetal yaprağa ait perikardiyal doku örnekleri kullanılmıştır [300]. Aselülarizasyon işleminden önce doğal perikard dokusu histolojik olarak incelenmiştir. Perikardiyum tek katlı yassı epitel ve bağ dokudan oluşmaktadır. Çeşitli bağ dokusu hücre tipleri, kollajen tip 1, glikoproteinler ve GAG içeriğine sahiptir. Perikard yapısındaki kollajen fibril, fiber veya fiber demetleri halinde bulunmaktadır. [312]. Yapılan histolojik incelemede pariyetal perikard yaprağının iç yüzeyinde tek sıra mezotel hücreleri izlenmiştir. Epitel hücrelerinin altında kompakt sıkı kollajen fibriller ve yer yer ince elastik fibriller gözlenmiştir [204]. Dalgalı kollajen fibriller arasında uzun çekirdekleri ile fibroblast hücreleri ve bağ dokusu içinde yer yer damar yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Doğal perikardiyum dokusu. A) Aselülerizasyon işlemi için temin edilen ve yağlarından temizlenen doğal perikardiyum. B) Doğal perikardiyum H&E boyaması. Sarı ok bağ doku içerisinde uzamış fibroblastları göstermektedir. C) Doğal perikardiyumun MT boyaması. Beyaz ok kollajen fibrilleri göstermektedir. D) Doğal dokunun VG boyaması. Kırmızı ok elastin fiber yapısını göstermektedir. H&E: Hematoksilen eozin boyama (kollajen fiberler pembe ile boyanmıştır.), MT: Masson's Trikrom (kollajen fibriller mavi renk ile boyanmıştır), VG: Verhoeff Van Gieson (Elastik fiberler siyah ile, kollajen fibriller kahverengi ile boyanmıştır.). Ölçek çizgisi: 50 µm.

Çalışmamızda aselüler perikardların elde edilmesi için ilk olarak sadece fiziksel yöntem (dondurma-çözdürme) ve kimyasal yöntem (Triton-X100) ayrı ayrı kullanılarak aselülerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan histolojik incelemede hem dondurma-çözdürme hem de Triton-X100 ile yapılan aselülerizasyon işleminde perikardların hücrelerden temizlenemediği, kollajen fibriller arasında iğsi yapıda hücrelerin olduğu ancak kollajen fibrillerin dalgalı yapılarını korudukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Dolayısıyla fiziksel ya da kimyasal yöntemin tek başına yeterli olmadığı, aselülerizasyon prosedürünün genişletilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu amaçla aselülerizasyon protokolü dondur-çözdür, hipotonik tris tamponu ve çeşitli deterjanların eklenmesi ile genişletilmiştir.

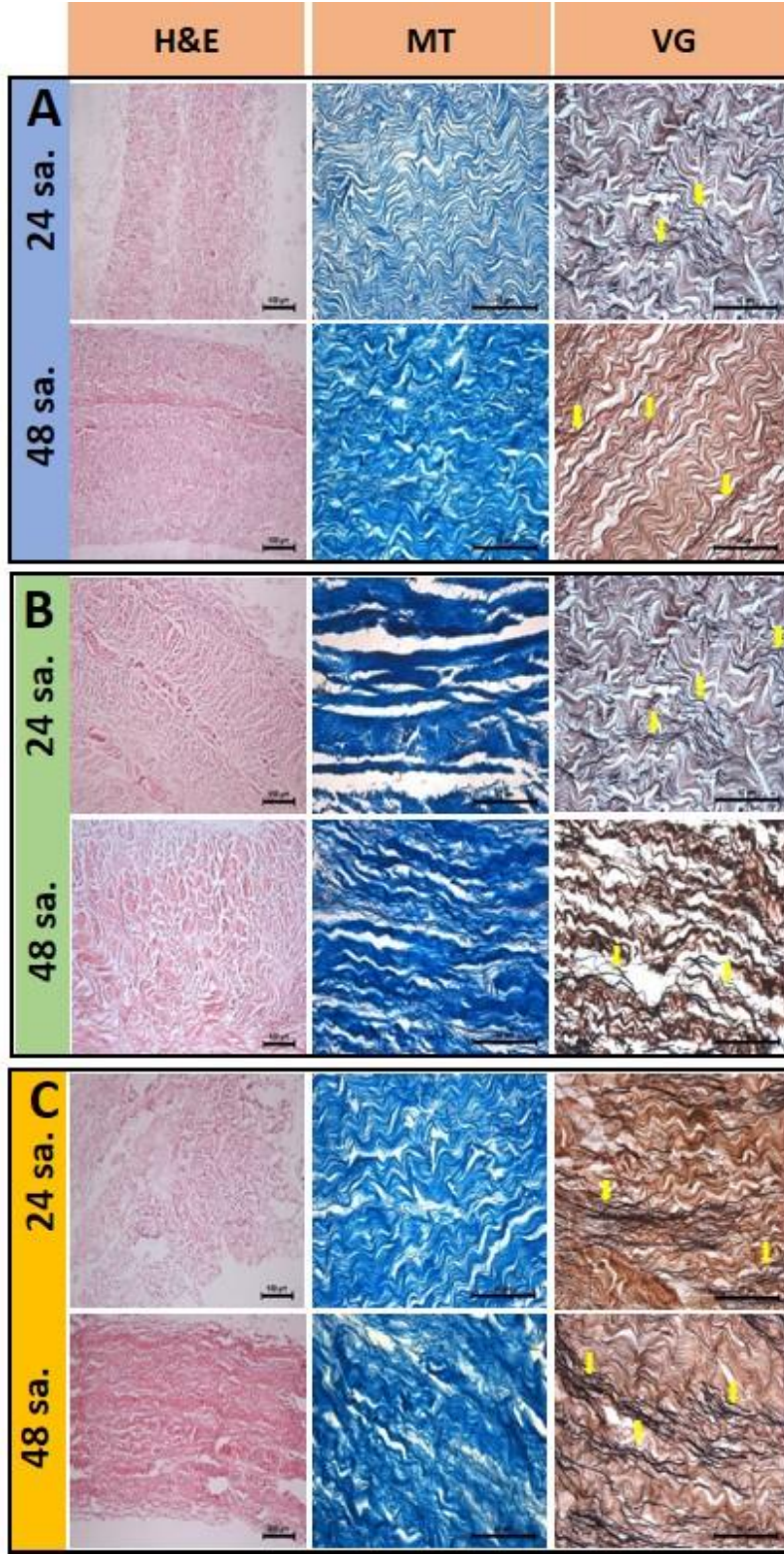


Şekil 4.2. Perikard dokularının histolojik görünimleri: A) Dondur-çözdür uygulanmış, B) Triton-X100 uygulanmış. Hücre çekirdekleri (mor ile boyanmış) kollajen fiberler arasında belirgin bir biçimde görülmektedir. Ölçek çizgisi: 50 µm.

Daha etkin bir deselülarizasyon işlemi için dondur-çözdür işleminden sonra hipotonik tris tamponu ile işlem yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda dokuların hücrelerinden arındırılması işleminde hücrelerde ozmotik dengenin bozulmasına ve çok fazla su alma sonucunda patlamasına neden olacak hipotonik tris tamponun kullanılması gerektiği ifade edilmiştir [195, 303]. Bununla birlikte parçalanmış hücrelerin kaynaklık ettiği proteaz aktivitesinin inhibe edilmesi bakımından aselülerizasyon prosedüründe PMSF gibi proteaz inhibitörlerinin eklenmesi önerilmektedir [313]. Bu bilgiler dikkate alınarak tasarlanan deselülarizasyon prosedürüne hipotonik tris tamponu ve PMSF eklenmiştir. Bunun yanı sıra doğal dokudaki hücrelerin parçalanması, parçalanmış hücre artıklarının (genetik ve/veya stoplazmik) temizlenmesinde iyonik ve iyonik olmayan deterjanların ve bunların uygulama sürelerinin kritik öneme sahip oldukları bilinmektedir [180, 195]. Bu aşamada hipotonik tris tamponu ile birlikte Triton-X100 ve SDS gibi deterjanların deselülarizasyon etkinliğinin zamana bağlı olarak test edilmesi amacıyla 24 ve 48 saat uygulama süreleri test edilmiş ve histolojik analizler yapılmıştır. Elde edilen veriler her iki zaman diliminde uygulanan prosedürler ile sıgır perikardlarının başarılı bir biçimde hücrelerinden arındırıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bağ dokusu lifleri arasında hücre çekirdekleri gözlenmemiştir. Ancak kollajen fibril ve özellikle elastik fiber yapısı açısından kullanılan deterjana göre farklılıkların ortaya çıktığı görülmüştür. Triton-X100 ve SDS uygulamalarının kollajen yapısına zarar vermediği, kollajen fibrillerin dalgali yapılarını korudukları görülmüştür. SDS grubunda kollajen fibriller daha kalın demetler halinde gözlenmiştir. Triton-X100 grubunda elastik fiber yapısının zarar görmediği (Şekil

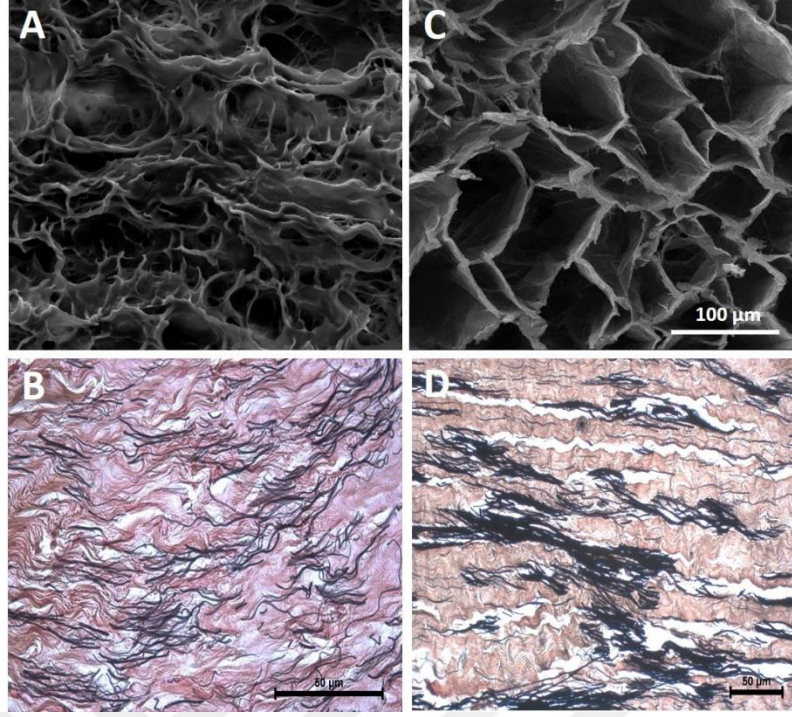
4.3-Panel A), ancak yüksek düzeyde deselülarizasyon etkisine sahip olmasına rağmen SDS, sığır perikardında elastik fiberlerin kırılarak küçük fragmentlere ayrılmasına ve yapısal bütünlüğünü/organizasyonunu yitirmesine neden olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.3-Panel B) [204, 314]. Literatürde de rapor edildiği üzere, SDS yapılar da geri dönüşümsüz bozulma, şişme ve çekme direncinin azalmasına neden olmaktadır [300, 303, 315]. Elde edilen sonuçlar ve literatür verilerinden yola çıkılarak ilerleyen deneylerde Triton-X100'in kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca daha etkin bir deselülarizasyon işleminin yapılabilmesi için de 48 saat boyunca hipotonik tris tamponu uygulamasının yapılması uygun bulunmuştur [316].

Doku iskelelerinde gözenek büyüklüğü hücrelerin yapıya tutunması, çoğalması, migrasyonu, farklılaşması ve metabolit ile besinlerin sirkülasyonu için önemli bir faktördür [317, 318]. Bu nedenle aselüler yapılar asetik asit ve kollajenaz ile muamele edilerek por çaplarının hücre çoğalması, migrasyonu ve farklılaşması için uygun boyuta getirilmeye çalışılmıştır. Aselüler dokular asetik asit ve kollajenaz uygulamasından sonra SEM ile incelemiş ve ImageJ programı kullanılarak gözenek çapı analizi yapılmıştır. Yapılan ölçümler aselüler yapıların ortalama gözenek çapının $14,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4A). Ancak bu por çapının hücrelerin yapı içine penetre olup hücre-hücre kontağı sağlaması için yeterli olmadığı düşünülmüştür. Çünkü aselüler bir doku iskelesinin ortalama gözenek büyüklüğünün $19,5 \pm 17,9 \mu\text{m}$ olmasının kardiyomiyosit boyutuyla örtüştüğünü [319] ve genellikle doku iskelelerinde gözenek büyüklüğünün hücre boyutunun en az 2-3 katı olması istenmektedir. Bu amaçla aselüler yapılar da gözenek boyutunu artırmak için ilk olarak asetik asit ve daha sonra kollajenaz uygulaması yapılmıştır. Yapılan por ölçüm analizi, 1 M asetik asit ve 0,5 U/mL kollajenaz uygulamasından sonra por çapının $50,97 \pm 17,73 \mu\text{m}$ yükseldiğini göstermiştir (Şekil 4.4C). Asetik asitin kollajen fiberlerindeki serbest amino gruplarını protonladığını kollajenaz enziminin ise kollajen fibrilleri parçaladığını ve bu olayların aselüler sığır perikartlarının por çaplarını artması ile sonuçlandığı ifade edilmiştir [206]. Dolayısıyla yapılan çalışmada por çapının $14 \mu\text{m}$ 'den $51 \mu\text{m}$ 'ye yükselmesi beklenen bir sonuçtur. Öte yandan Dong ve ark. yaptıkları çalışmada aselüler sığır perikardını 0,2 M asetik asit ile muamele etmiş ve por çapını $162 \pm 24 \mu\text{m}$ olarak raporlamışlardır [207].



Şekil 4.3. Aseklüerizasyon işleminden sonra sıgır perikardiyum dokularında uygulanan protokole göre kollajen fibril ve elastik fiberlerin görünümü. Panel A) Triton-X100 uygulanan grup. Panel B) SDS uygulanan grup ve Panel C) Triton-X100 ve SDS'in beraber uygulandığı grup. H&E: Hematoksilin-eozin boyama (kollajen fiberler pembe ile boyanmıştır.), MT: Masson's Trikromu boyama (kollajen fibriller mavi renk ile boyanmıştır), VG: Verhoeff Van Gieson boyama (Elastik fiberler siyah ile, kollajen fibriller kahverengi ile boyanmıştır.). 24 ve 48 sa. hipotonik tris tamponunun uygulama süresini göstermektedir. Sarı oklar elastik fiberleri göstermektedir. H&E için ölçek çizgisi: 100 µm, MT ve VG için ölçek

Yine Wei ve ark. 0,2 M asetik asit ve 0,1 U/mL kollajenaz ile muamele ettikleri aselüler sığır perikardlarının por çapının x eksen yönünde $322,5 \pm 38,9$ ve y eksen yönünde ise $96,3 \pm 17,6$ μm olduğunu göstermiştir [206]. Bu çalışmada literatür verileri ile kıyaslandığında daha düşük por çapına sahip yapılar elde edilmesinin nedeni olarak perikardların cinsiyet ve yaş bakımından farklı olan sığırlardan temin edilerek kullanılmış olmasıdır. Asetik asit ve kollajenaz uygulamasının yapıların morfolojisi üzerine etkisinin yanında kollajen ve elastik fiber yapısı üzerine etkisinin olup olmadığı histolojik analiz ile test edildi. Yapılan analizde asetik asit ve kollajenaz uygulamasından sonra kollajen ve elastik fiber yapısının korunduğu, kollajen fibrillerin dalgalı yapısını koruyarak asetik asit ve kollajenaz uygulanmamış (Şekil 4.4B) grupla benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.4D). Elastik fiberlerin ise asetik asit ve kollajenaz uygulanmayan grup ile kıyaslandığında fiberlerin bütünlüklerini koruduğu ve üst üste geldiği ancak parçalanmadıkları görülmüştür (Şekil 4.4D). Yine Wei ve ark. yaptıkları çalışmada asetik asit ve kollajenaz uygulamasından sonra aselüler sığır perikardlarında kollajen yapısını doğal doku ile benzer olduğunu ancak elastik fiberlerin tespit edilemediğini raporlamışlardır [206]. Bu çalışmada ise yukarıda ifade edildiği üzere asetik asit ve kollajenaz uygulamasından sonra yapılarda aselüler dokulara benzer kollajen ve elastik fiber yapıları gözlenmiştir. Bu farkın nedeni olarak perikard kaynağı olarak kullanılan sığırların cinsiyet ve yaşlarının farklı olması düşünülmektedir. Yapıda kollajen ve elastik fiberlerin olması, ileride yapılacak olan elektromekaniksel uyarma çalışmalarında, aselüler dokunun özellikle mekanik uyarma altında kültür süresi boyunca bütünlüğünü koruması bakımından kritik öneme sahiptir. Çünkü literatürde hücre dışı matrikste bulunan kollajen ve elastin fiberlerin yapının çekme dayanımını sağlama bakımından kritik öneme sahip olduğu ifade edilmiştir [320]. Diğer taraftan kardiyovasküler yamalar inflamasyonun, kalsifikasyonun ve enzimatik parçalanmanın azaltılması için fiksasyon ajanları ile fiksasyon edilmelidir [305, 321]. Bu amaçla farklı fiksasyon ajanları kullanılmakta olup klinik uygulamalarda sıklıkla tercih edilen fiksasyon ajanı glutaraldehidir [322, 323]. Ancak, bu ajanın toksik olduğu ve uzun dönemde kalsifikasyona neden olduğu ifade edilmiştir [323-325]. Dolayısıyla, doğal bir fiksasyon ajanı olan genipin, amino grubu içeren biyomalzemelerin ve biyolojik malzemelerin fiksasyonunda kullanılmaya başlanmıştır [323, 326, 327].



Şekil 4.4. Aselüler perikardın morfolojik ve histolojik görüntüleri. A ve B) Aselüler perikardın SEM görüntüsü ve VG boyaması. C ve D) Asetik asit (1 M) ve kollajenaz (0.5 U/mL) uygulanmış aselüler perikardların SEM görüntüsü ve VG boyaması. VG boyamada kollajen fiberler kahverengi, elastik fiberler ise siyaha boyanmıştır. Ölçek çizgisi: SEM için 100 µm, VG boyama için 50 µm.

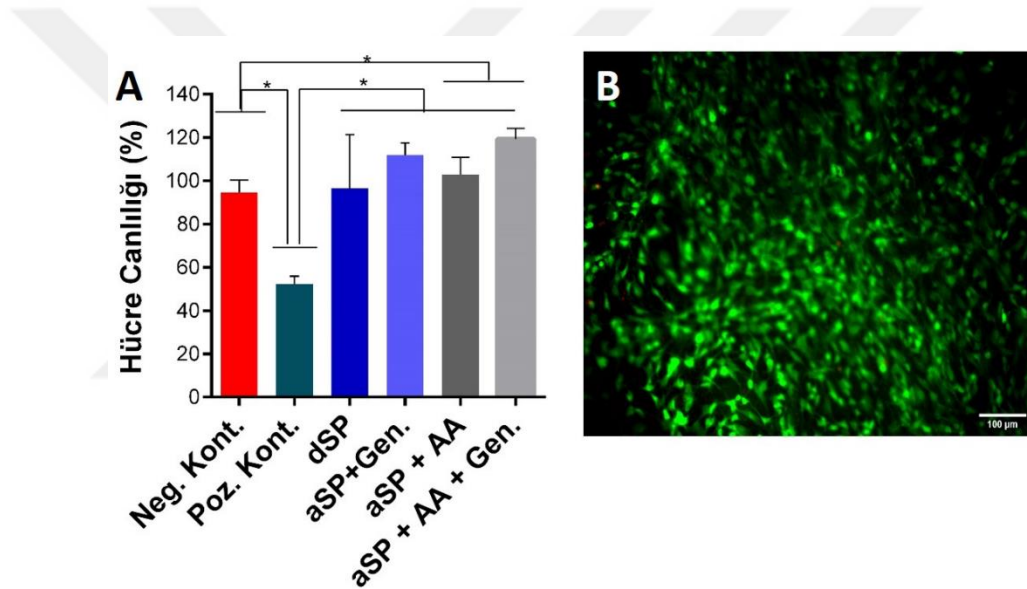
Gluteraldehit ile kıyaslandığında genipinin kalsifikasyonun önlenmesinde daha başarılı olduğu ve daha az toksit etki gösterdiği raporlanmıştır [305]. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada genipin fiksasyon ajanı olarak kullanılmıştır. Diğer yandan, literatür verileri incelendiğinde farklı konsantrasyonlarda genipin kullanıldığı görülmüştür [206, 328, 329]. Dolayısıyla uygun genipin konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla aselüler yapılar iki farklı (%0,05 ve %0,5) konsantrasyonda genipin çözeltileri ile fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Doğal doku ve 1 M asetik asit ile işlem görmüş aselüler yapılara ayrı ayrı fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Fiksasyonun etkinliği ninhidrin analizi ile elde edilen optik absorbans değerleri üzerinden % fiksasyon endeksi hesaplanarak belirlenmiştir. Bu amaçla önce yapıların 20 U/mL kollajenaz çözeltisi ile degradasyonu ile serbest amino gruplarının açılması sağlanmıştır. Daha sonra sarı renkli ninhidrin çözeltisi, aselüler yapı üzerindeki serbest amino grupları ile tepkimeye girerek mavi-mor renkli kompleks oluşturmuştur. Genipin fiksasyonuna maruz bırakılan örnek grupları, fiksasyon işlemi görmemiş örnek

grupları ile kendi içlerinde karşılaştırılarak fiksasyon endeksleri belirlenmiştir. Sırasıyla %0,05 genipin ve %0,5 genipin fiksasyonu sonrası doğal doku %1,3 ve %55,7 fiksasyon endeksine sahipken; 1 M asetik asit uygulanmış örneklerde %37,9 ve %51,1 fiksasyon endeksi değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar genipin konsantrasyonunun fiksasyon endeksini doğrudan etkilediğini ortaya koymaktadır. %0,05 genipin konsantrasyonuna oranla %0,5 genipin konsantrasyonu dokular üzerinde amino gruplarının bloklanmasını daha etkin biçimde sağlayarak fiksasyonu gerçekleştirdiği tespit edilmiştir [316]. Bu veriler ışığında ilerleyen deney gruplarına %0,5 genipin konsantrasyonu ile devam edilmesi uygun bulunmuştur.

Hazırlanan aselüler yapıların canlı hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisinin olup olmadığı MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla işlem görmemiş perikard (doğal doku), aselüler perikard ve 1 M asetik asit ve kollajenaz ile işlem görmüş aselüler dokular test edilmiştir. Ayrıca immünojenik yanıt oluşmasını engellemek için aselüler perikard ve asetik asite maruz bırakılmış gruba uygulanan genipin fiksasyonu sonrası elde edilen örnek grupları da sitotoksik etki açısından test edilmiştir. MTT testi öncesinde hücre kültürü kapları kalitatif olarak mikroskop ile incelenmiştir. Hücre kültürü kaplarında pozitif kontrol hariç tüm örnek gruplarına ait hücrelerin negatif kontrol grubu ile aynı yoğunlukta ürediği, iyi yayılım gösterdiği ve yüzeyi kaplamış oldukları belirlenmiştir. Hücre kültürü kaplarında nadiren ölü hücreler gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubuna ait olan tüm test kuyucuklarında ise yüzeydeki hücre morfolojisinin çoğunlukla küresel olduğu belirlenmiş ve yoğun ölü hücreler gözlemlenmiştir. ISO 10993-5 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi – Bölüm 5: *in vitro* sitotoksik testleri” standartının “Endirekt MTT sitotoksik testi” prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilen deney neticesinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.5A’da verilmiştir. Sonuç olarak, kalitatif gözlemler ile paralel olarak pozitif kontrol dışındaki tüm örnek gruplarında sitotoksik bir etki gözlenmemiştir. Genipin ile fikse edilen aselüler dokuların da toksik etki göstermediği ve bu sonucun literatür verileri ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır [330].

Aselüler yapıların üzerinde kültürü yapılan kemik iliği rt-MKH’lerin canlılığına etkisi canlı&ölü analizi yapılarak incelenmiştir. 7 günlük kültür süresi sonunda yapılan mikroskopik gözlem MKH’lerin asetik asit ve kollajenaza maruz bırakılmış aselüler doku iskelelerinin yüzeyine tutunduğunu ve 7 gün sonunda da canlılıklarını yüksek düzeyde koruduklarını ve ihmal edilebilecek oranda ölü hücrelerin olduğunu göstermiştir. (Şekil 4.5B). Vashi ve ark. yaptıkları çalışmada insan kaynaklı MKH’leri aselüler sığır

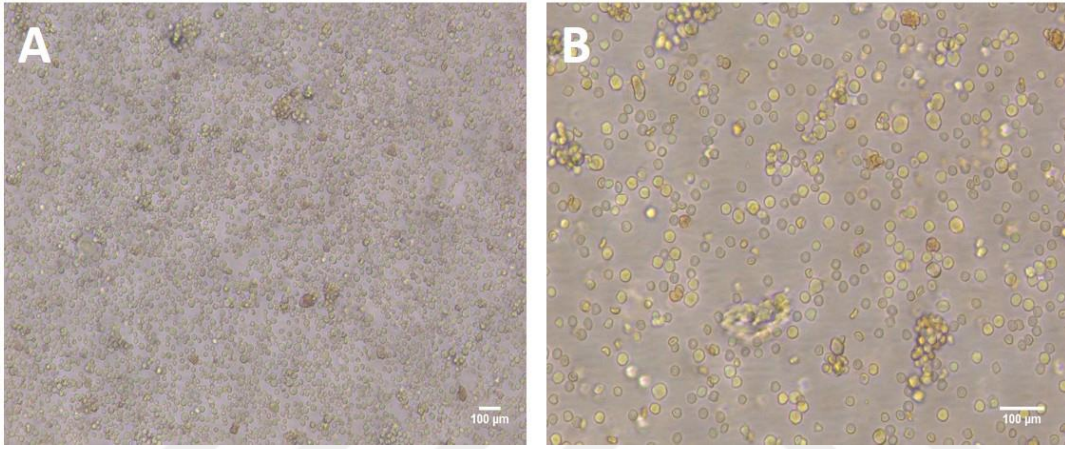
perikardiyum temelli CardioCel® üzerinde kültüre etmiş ve hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşmasını araştırmışlardır. Yapılan analizler MKH'lerin yapı üzerinde tutunduğu, kollajen fiberler içinde dağıldıkları ve yüksek canlılık ile birlikte farklılaşabildiklerini göstermiştir [331]. Bu çalışmada hücre canlılığı ve tutunması açısından literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş olup yukarıda da bahsedildiği üzere MTT ve canlı&ölü analiz sonuçları rt-MKH'lerin aselüler yapılar üzerinde yüksek düzeyde canlılık gösterdikleri ve iyi bir biçimde yapılara tutunduğunu göstermiştir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında geliştirilen 3B aselüler sıgır perikard doku iskelelerinin rt-MKH'lerin tutunması ve çoğalması için uygun bir mikroçevre oluşturabildiği sonucuna varılmıştır [332].



Şekil 4.5. A) MTT sonuçları. Test edilen tüm gruplarda sitotoksik etki görülmemiştir. B) Canlı&ölü hücre analizi sonuçları. Yapılan mikroskopik gözlem rt-MKH'lerin aselüler doku iskelelerinin yüzeyine tutundukları ve yüksek oranda canlılıklarını koruduklarını göstermiştir. dSP: doğal sıgır perikardı. aSP: aselüler sıgır perikardı, AA: asetik asit, Gen: Genipin. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı ile boyanmıştır. Ölçek çizgisi: 100 µm.

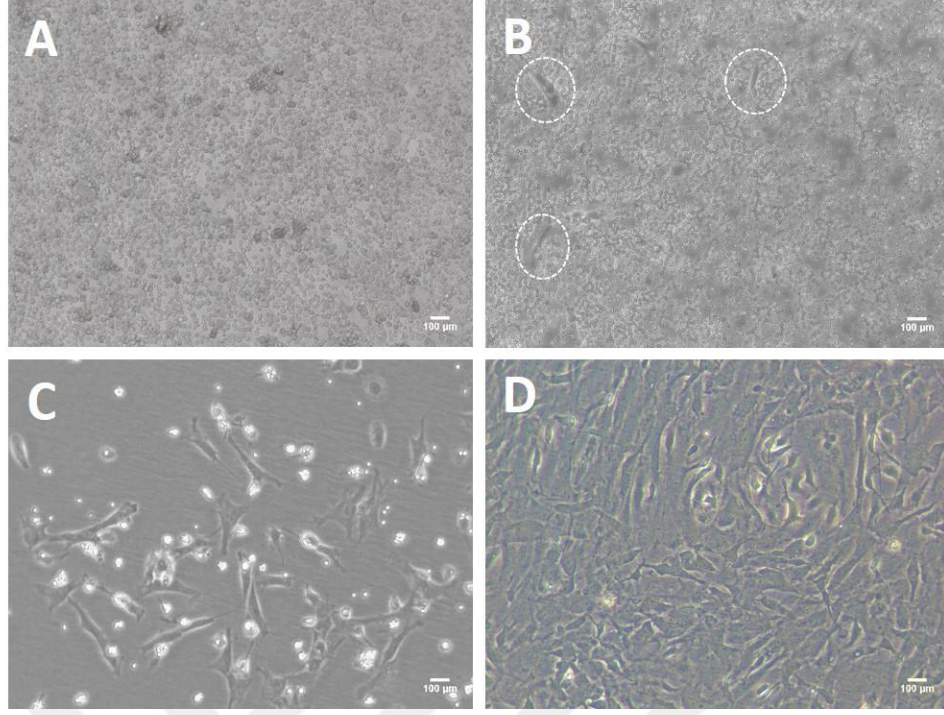
4.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojisi ve Köklük Özellikleri

Kemik iliği rt-MKH'leri Wistar cinsi sıçanlar kullanılarak izole edilmiştir. Sıçanların femurlarından alınan kemik iliği uygun süreçlerden geçirildikten sonra hücre kültürü kabına alınarak kültür başlatılmıştır. Kültürün başlarında yapılan mikroskopik gözlemler yuvarlak ve yüzeye tutunmayan hücre varlığının belirgin bir biçimde çok olduğu tutunan hücrenin olmadığını göstermiştir (Şekil 4.6). Kültürün 48. saatinde yapılan yıkama ile tutunmayan ve yuvarlak morfoloji gösteren kemik iliği kaynaklı kan hücreleri uzaklaştırılmıştır.



Şekil 4.6. Sıçan kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin izolasyondan sonraki görünümü. A) 10X ve B) 20X büyütme. Ölçek çizgisi 100 µm

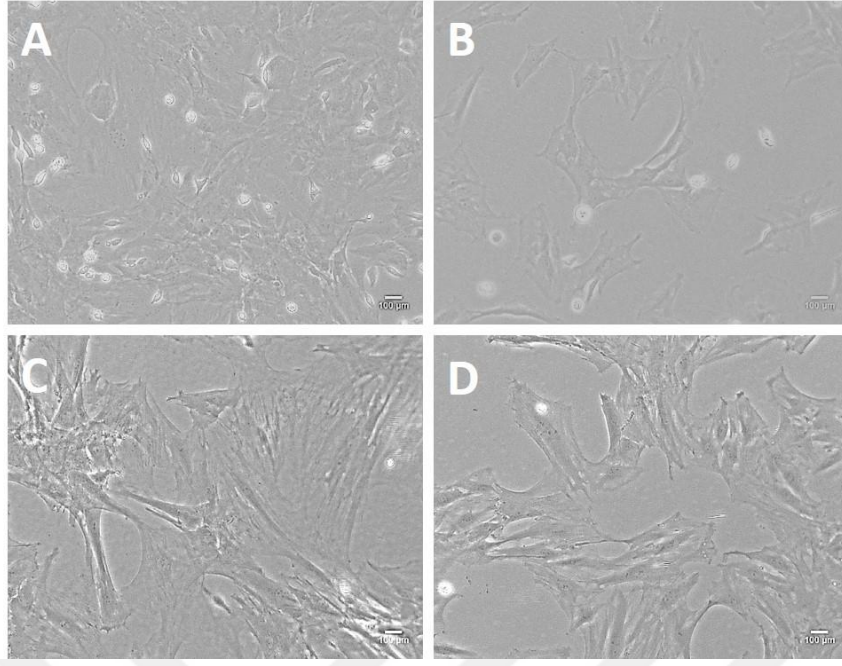
Yapılan mikroskopik gözlemler kültürün 2. gününde hücre tutunmasının yer yer başladığını göstermiştir. Tutunan hücrelerin morfolojik olarak yayıldığı ve multipolar bir yapı gösterdikleri gözlemlenmiştir. Kültürün 4. gününde tutunan hücrelerin çoğaldığı ve az yayılmış bir görünüm sergiledikleri tespit edilmiştir. 9 gün sonra multipolar hücrelerin kültür kabının yüzeyini tamamen kapladıkları, birbirileri ile temasa geçtiği ve daha çok yayılma gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca kültür kabında tutunan hücrelerin morfolojik açıdan homojen bir görünüm sergiledikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. P0 seviyesindeki kemik iliği rt-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. A) İzolasyon sonrası morfolojik görünüm, B) 2. gün C) 4. gün ve D) 9. gündeki hücre morfolojisinin görünümü. Ölçek çizgisi: 100 µm

Kültür süresi ve pasaj seviyesinin artması ile hücre morfolojisinde değişim meydana gelip gelmediğinin anlaşılması için primer kültürü yapılan hücrelere pasaj seviyesi 4 olana kadar alt kültürleme işlemi uygulanmıştır. Alt kültürleme işlemlerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyini %70-80 oranında kaplaması beklenmiştir. Ters faz ışık mikroskopi gözlemleri pasaj seviyesinin artması ile hücre morfolojisinde değişimler meydana geldiğini, hücrelerin boyutsal olarak daha büyüdüklerini ve iyice yüzeye tutunduklarını göstermiştir (Şekil 4.8).

Hücrelerin yüzeye tutunma seviyelerinin hücre morfolojisinde etkili bir parametre olduğu anlaşılmıştır. Şekil 4.8'de yer alan görüntülere dikkatli bir biçimde bakıldığında Pasaj 4 seviyesinde olan hücrelerin daha büyük, bipolar ve yüzeye tamamen tutundukları görülmektedir. Ancak pasaj 1 ve 2 seviyesindeki hücrelerin küçük, az tutunma ve multipolar bir yapı gösterdikleri anlaşılmaktadır.

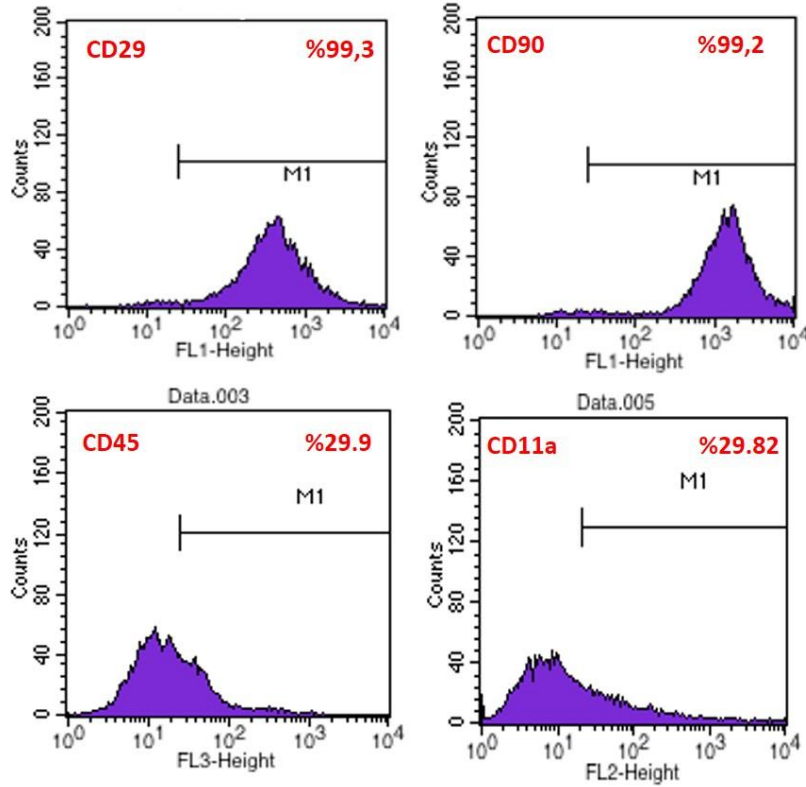


Şekil 4.8. Kemik iliği rt-MKH'lerin farklı pasaj seviyelerindeki morfolojik görünüşleri
A) Pasaj 1, B) Pasaj 2, C) Pasaj 3 ve D) Pasaj 4. Ölçek çizgisi:100 µm

Çalışmamızda kullanılmak üzere izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bir hücrenin kök hücre olup olmadığının anlaşılması amacıyla araştırmacılar tarafından belirlenen üç kıstas ön plana çıkmaktadır. Bunlar hücrenin standart kültür koşullarında plastik yüzeye tutunması, spesifik yüzey antijen ekspresyonu ve osteoblast, adiposit ve kondroblast hücrelerine farklılaşabilme potansiyeli [105]. Bu kapsamda yapılan çalışmada izole edilen primer hücrelerin hücre yüzey antijenlerinden CD11a, CD29, CD45 ve CD90 ifade edip etmediğine akış sitometrisi tekniği ile bakılmıştır. Ayrıca hücrelerin multipotent farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla *in vitro* koşullarda osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya bakılmıştır.

CD90 ve CD29 hücre yüzey belirteçlerinin kök hücreler için pozitif ifade gösterdiği belirtilmiştir [333, 334]. Yapılan analiz sonucu kök hücrelerin CD29 hücre yüzey belirtecini %99,3, CD90 belirtecini ise %99,2 oranında ifade ettikleri belirlenmiştir. CD45 ve CD11a hücre yüzey ifadesini ise sırasıyla %29,9 ve %29,82 oranında ifade ettikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Negatif belirteçlerin yüksek düzeyde ifade edilmesinin sebebi olarak kök hücrelerin izolasyonunda takip edilen prosedürün sıklıkla kullanılan prosedürden farklı olması olabileceği düşünülmektedir. Sıklıkla kullanılan

protokolde kemik iliği femur kemiğinin epifiz bölgesi kesildikten sonra diyafiz kısmından iğne yardımıyla akıtılması işlemi ile elde edilerek kök hücre izolasyonunda kullanılır. Bu prosedür kullanıldığında izole edilen kök hücrelerde CD45 ifadesi düşük düzeyde ($<3\%$) ifade etmektedir [335-337]. Öte yandan bazı insan kaynaklı MKH türlerinde (Spermatogonial ve Wharton's jelly kök hücreleri) CD45'in yaklaşık olarak %25 oranında ifade edildiği de gösterilmiştir [338].



Şekil 4.9. Kemik iliği rt-MKH'lerin akış sitometri analizi sonuçları

Spesifik indükleyici ajan varlığında kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin farklı multipotent hatlara farklılaştığı ifade edilmiştir [339, 340]. Yapılan çalışmada kemik iliği kaynaklı rt-MKH'lerin multipotent karakterde olup olmadığının araştırılması amacıyla pasaj 3 seviyesindeki hücreler 21 gün boyunca osteojenik ve adipojenik farklılaşma ortamında kültüre edilmişlerdir. Kültürün 21. gününde osteojenik farklılaşmanın tespit edilmesi amacıyla Alizarin Kırmızısı S ve adipojenik farklılaşmanın tespit edilmesi için Oil Kırmızısı O boyaması yapılmıştır.

Alizarin kırmızısı S boyama sonuçları kök hücrelerin kemik doku hücrelerine farklılaşabilme kapasitesine sahip olduklarını göstermiştir. Kontrol grubunda ise

minerilazyonu işaret eden alizarin boyanmasına rastlanmamıştır. Hücre morfolojileri bakımından kontrol grubu ile kıyaslandığında, farklılaşma ortamı ile inkübe edilen hücrelerin bir araya gelerek hücre agregatları oluşturdukları görülmüştür. Oluşan bu yapılarda kemik doku hücrelerine farklılaşmanın belirteci olan kalsiyum depolarının olduğu ve oluşan bu yapıların alizarin kırmızısı boyası ile reaksiyona girerek kırmızı boyandığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda kalsiyum depolarına rastlanmamıştır (Şekil 4.10). Öte yandan yine mikroskopik gözlemler, kontrol grubu ile kıyaslandığında deney gruplarında lipit vakuollerinin oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca kontrol ile kıyaslandığında çalışma gruplarında zamanla hücre farklılaşmasını takiben fibroblastik morfolojiden küresel morfolojiye sahip hücre sayısının arttığı ve bu morfolojiye sahip hücre grubunda hücre içi lipit damlacıklarının olduğu gözlemlenmiştir. Oluşan bu lipit vakuollerinin hücrenin stoplazmasına dağıldığı ve büyüklük bakımından heterojen bir yapıya sahip oldukları anlaşılmıştır. Yapılan Oil kırmızısı O boyaması ile hücre stoplazmasında oluşan yağ damlacıkları kırmızı renge boyanmıştır. Kontrol grubunda ise boyamanın gerçekleşmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

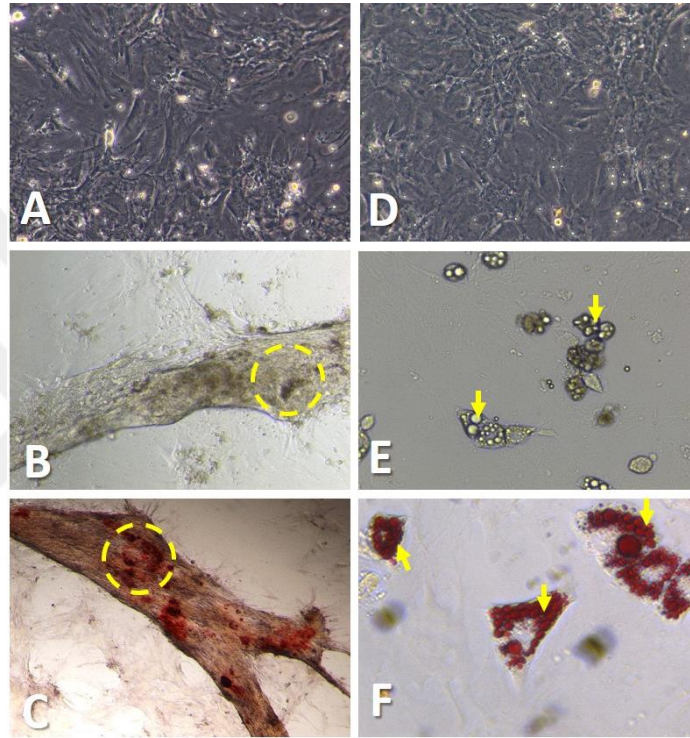
Hem akış sitometrisi hem de farklı hücre tiplerine farklılaşma yetileri sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, izole edilen hücrelerin kök hücre özelliğinde oldukları ve devam eden deneylerde kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

rt-MKH'lerin 3B Aselüler Doku İskelesinde Morfolojisi ve İnfiltrasyonu

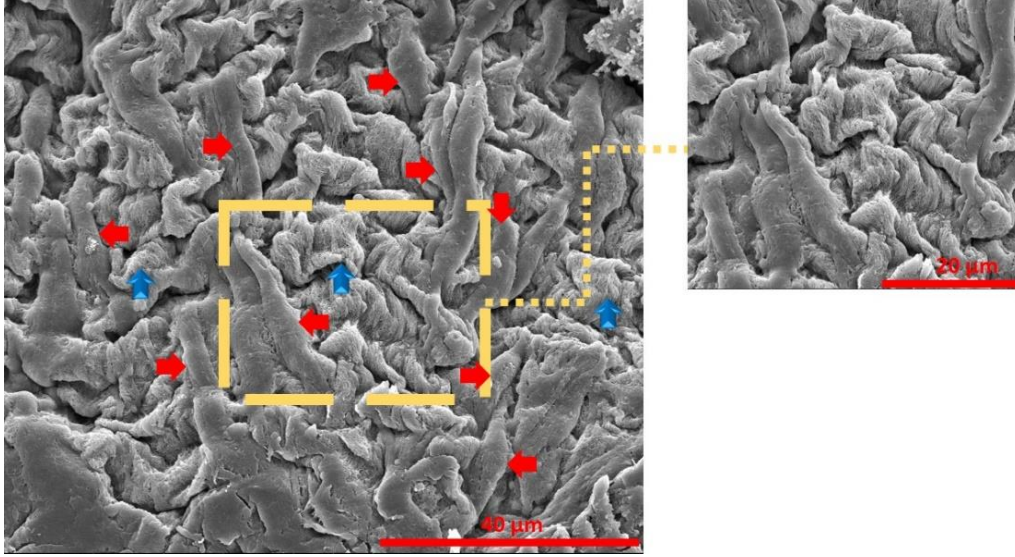
rt-MKH'lerin aselüler doku iskelesi üzerindeki davranışları ve doku iskelesine infiltrasyonları sırasıyla SEM ve H&E analizi ile incelenmiştir. SEM analiz sonuçlarına göre rt-MKH'lerin aselüler yapılara tutundukları, kültür kabındaki bipolar morfolojilerini kaybederek uzadıkları ve yer yer hücre-hücre etkileşimlerini gösterdiklerini göstermiştir (Şekil 4.11). Daha önce yapılan çalışmalar, hücre-matriks adezyonunun, bir diğer ifade ile hücrelerin matrikse tutunmasının, hücre morfolojisi, büyümesi, göçü, farklılaşması, doku organizasyonu ve matriksinin yeniden organize olması gibi kritik öneme sahip süreçlerde hayati önem taşıdığı gösterilmiştir [320, 341, 342]. Dolayısıyla bu bakımdan irdelendiğinde rt-MKH'lerin geliştirilen aselüler doku iskelelerine tutunması olumlu bir sonuç olarak düşünülmüştür.

3B aselüler yapılar üzerine ekilen hücrelerin yapının her tarafına homojen olarak dağılması diğer bir deyişle sadece yapı üzerinde değil aynı zamanda gözenekler içine

girerek çoğalması ve birbirleri ile hücre-hücre etkileşimlerini sağlaması dokulaşmanın gerçekleşmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada kullanılan aselüler matriksler yaklaşık olarak 800 mikron kalınlığındadır. rt-MKH'lerin infiltrasyonunu belirlemek için 3, 5, 7, 10, 14 ve 20. günlere ait örneklerden kesit alınarak H&E boyama ile inceleme yapılmış ve ekim yapılan yüzeyden içeri doğru en son görülen hücrenin yüzeye uzaklığı ölçülmüştür.



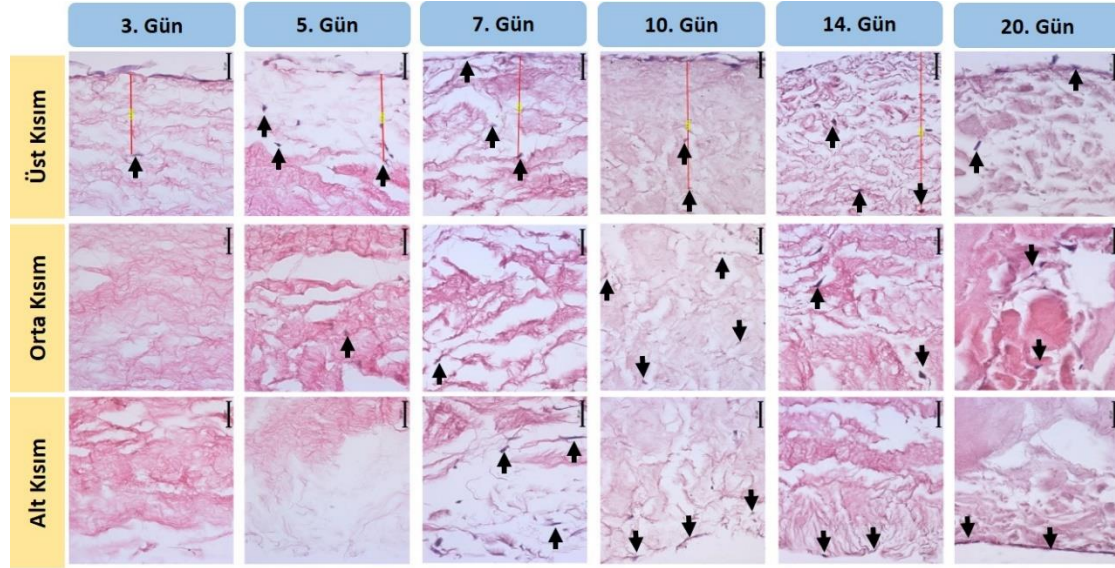
Şekil 4.10. Kemik iliği rt-MKH'lerin uygun indükleyici varlığında osteojenik (A-C) ve adipojenik (D-F) farklılaşmaları. A) Alizarin kırmızısı ile boyanan kontrol grubu hücreleri. B) Hücrelerin bir araya gelerek oluşturdukları agregatlarda oluşan kalsiyum depolarının görüntüsü. C) Alizarin kırmızısı ile kırmızıya boyanan kalsiyum depoları. D) Oil kırmızısı ile boyanan kontrol grubu hücreleri. E) Adipojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerde oluşan lipit vakuolleri. F) Lipit vakuollerinin Oil kırmızısı ile boyanma görüntüsü.



Şekil 4.11. 3B aselüler doku iskelelerinde rt-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. Kırmızı oklar rt-MKH'leri, mavi oklar doku iskelesindeki fiber yapısını göstermektedir. Ölçek çizgisi: 40 μm

Hücre infiltrasyonunu belirlemek amacıyla aselüler doku iskelesi içinde hücre varlığı üç alanda incelenmiştir; üst kısım, orta kısım ve alt kısım. Aselüler doku iskelelerinin (20.gün hariç) bir tarafında yer yer kesintiye uğrayan tek sıra halinde dizilmiş ve birbirine temas eden iğsi hücreler gözlenmiştir. Bu yüzey rt-MKH'lerin ekim yapıldığı yüzey olarak belirlenmiştir. rt-MKH'lerin doku iskelesinin ekim yapılan yüzeyine uzaklığı 3. günde 150,19, 5. günde 164,59, 7. günde 192,66, 10. günde 240,96, 14. günde 302 ve 20. günde 581,93 μm olarak saptanmıştır. rt-MKH'ler 3 ve 5. günde doku iskelesinin alt kısmında gözlenmezken 7. günden itibaren doku iskelesinin alt kısmında tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Doku iskelesinin orta kısmında hücreler 10, 14 ve 20 günde oldukça belirgin bir biçimde gözlenmiştir. Kültürün 20. gününde birbirine temas eden ve tek sıra şeklinde düzenlenmiş iğsi hücreler doku iskelesinin hem üst hem de alt yüzeyinde gözlenmiştir (Şekil 4.12). Bu sonuçlar dikkate alındığında rt-MKH'lerin statik koşullarda aselüler yapılarda zamana bağlı olarak yapı boyunca infiltre olabildiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak aselüler doku iskelelerinin por çapının yaklaşık 50 μm olmasının hücre göçü için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Yine infiltrasyon sonuçlarına dayanarak biyoreaktör sisteminde kültüre başlanmadan önce hücrelerin 3B aselüler yapının içinde filtre olabilmesi için statik koşullarda 7. günlük kültür yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Guo ve ark. kollajen içeriğine sahip aselüler insan amniyotik matriksi üzerinde kültüre ettikleri insan fibroblast hücrelerinin göç edebildiklerini göstermişlerdir [343]. Diğer taraftan aselüler sıgır perikardı ile yapılan *in*

vivo çalışmalar, konakçı hücrelerinin yapı içine göç etmeleri bakımından başarılı sonuçlar elde edildiğini raporlanmıştır [316, 344, 345]. Bu veriler çalışmada elde edilen kollajen içeriği bakımından zengin aselüler sıgır perikardların hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda hücrelerin migrasyonuna olanak sağlayacağını göstermiştir.



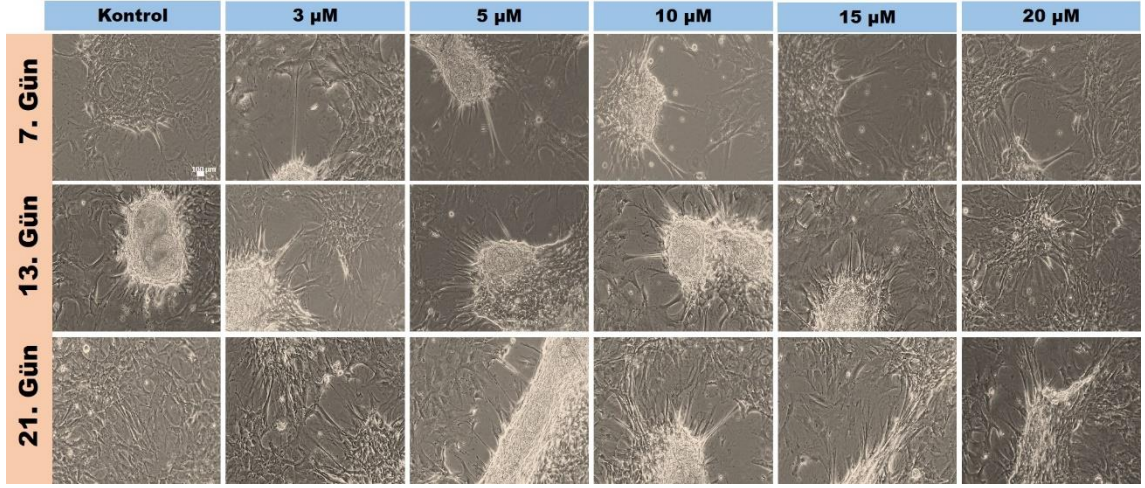
Şekil 4.12. Statik koşullarda zamana bağlı olarak rt-MKH'lerin 3B aselüler doku iskelelerindeki göçü. Siyah oklar yapı içine göç eden kök hücreleri göstermektedir. Ölçek çizgisi: 50 µm

4.1.3. Biyometetik Biyoreaktör Sisteminde rt-MKH'lerin Aselüler Doku İskeleleri Üzerinde Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

4.1.3.1. 5-Azasitidin Konsantrasyonunun Kardiyomiyosit Farklılaşması Üzerine Etkisi

Kimyasal, elektriksel ve mekaniksel uyarımların sinerjik etkisi altında kemik iliği rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılmasının ilk adımı olan kimyasal uyarım ile stimülasyon 5-Aza kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 5-Aza, yaygınlıkla DNA metilasyonunu önleyici olarak kullanılan sentetik bir kimyasaldır. EKH'lerin ve rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını indükleyici rol oynadığı bilinen bu kimyasal, sitosin analogu üyesidir [319, 346]. Kardiyomiyosit farklılaşmasında kullanılacak olan optimum 5-Aza konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla 2B kültür sisteminde morfolojik yapı değişimi esas alınarak 0, 3, 5, 10, 15 ve 20 µM olmak üzere 5

farklı 5-Aza konsantrasyonu denendi. Hücre kültür kabında kültüre edilen kemik iliği rt-MKH'ler 24 sa. 5-Aza'ya maruz bırakıldıktan sonra yıkama yapılarak mikroskopik gözlem yapıldı. Kimyasal ajan varlığında kardiyomiyosit farklılaşmasının işareti olarak tek başına yeterli olmasa da hücrelerde uzamalar meydana gelmesi ve miyotüp benzeri yapıların oluşması gerektiği çeşitli araştırma raporlarında vurgulanmıştır [334, 347, 348]. Yapılan gözlemler 5-Aza kullanılan tüm gruplarda hücrelerin bir araya gelerek komşu hücreler ile etkileşime girerek agregat oluşturdıklarını göstermiştir. Ayrıca hücrelerde 7 gün sonra uzama meydana geldiği ve takip eden zaman periyotunda bu uzamaların varlıklarını devam ettirdiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda değerlendirildiğinde gruplar arasında gözle görülebilir çok belirgin bir fark olmasa da 10 μ M 5-Aza kullanılan grupta hücre uzamalarının daha belirgin ve uzun olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında meydana gelen hücresel uzamaların hem 10 μ M hem de diğer deney gruplarında daha belirgin ve uzun oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Yapılan mikroskopik gözlemler oluşan yuvarlak hücre toplulukları arasında stoplazmik hücre uzantıları aracılığı ile hücresel etkileşim meydana geldiği konusunda önemli veriler sağlamıştır. 10 μ M kullanılan deney grubunda yuvarlak hücre agregatlarının oluşması, bu yapılar arasında hücresel uzantılar aracılığı ile hücresel iletişimin sağlandığı ve bu uzantıların daha çok ve uzun olması nedeni ile optimal 5-Aza konsantrasyonunun 10 μ M olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte literatür verileri incelendiğinde de araştırmacıların 5-Aza konsantrasyonu olarak daha çok 10 μ M kullandıkları tespit edilmiştir [244, 334, 349-351]. Hem bu çalışmada elde edilen morfolojik gözlem sonuçları hem de literatür verileri göz önünde bulundurulduğunda reaktör ortamında hücrelerin farklılaştırılması için 5-Aza konsantrasyonunun 10 μ M olarak kullanılması uygun bulunmuştur.



Şekil 4.13. Zamana ve 5-Aza konsantrasyonuna bağlı olarak rt-MKH'lerin morfolojilerinde meydana gelen değişim. Ölçek çizgisi: 100 µm.

4.1.3.2. Mekaniksel Uyarımın Kardiyomiyosit Farklılaşması Üzerine Etkisi

Literatür verileri incelendiğinde kök hücrelerin farklılaşmasında kullanılan mekaniksel uyarım miktarının önemli olduğu görülmektedir [349]. Ayrıca araştırmacılar elastik silikon membran [349, 352-354] ya da gerilebilir piezoelektrik substratlar [355] üzerinde rt-MKH'leri kültüre ederek mekaniksel uyarıma maruz bırakmış ve bu hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını incelemişlerdir. Bu çalışmada ise aselüler yapılar üzerinde dinamik koşullarda kültüre edilen rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında farklı gerinim değerlerinin etkisinin araştırılması ve elektromekaniksel uyarım çalışmasında kullanılabilecek uygun mekaniksel gerinim değerinin (%) belirlenmesi amacıyla %5, %10 ve %20 gerinim değerleri test edilmiştir. 7 gün boyunca sadece mekaniksel uyarıma maruz kalan örneklerde hücre canlılığı ve morfolojisi canlı&ölü ile SEM analizi ve kardiyak spesifik gen ifadesine qPCR analizi yapılarak bakılmıştır. Kontrol grubu olarak 5-Aza'ya maruz bırakılmış ve statik koşullarda kültürü yapılan örnekler kullanılmıştır.

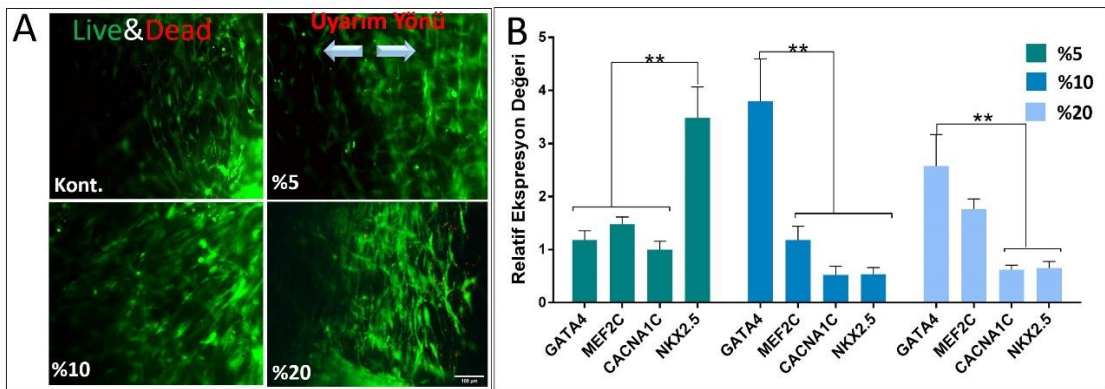
Canlı&ölü analizi tüm gruplarda hücrelerin canlılıklarını korudukları, çoğaldıkları ve hücre-hücre etkileşimleri geliştirdiklerini göstermiştir. Ölü hücre bakımından değerlendirildiğinde %20 gerinim uygulanan grupta ölü hücre miktarının diğer gruplara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Hücre yoğunluğu bakımından incelendiğinde ise tüm gruplarda benzer hücre yoğunluğu olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.14A). Bu da uygulanan döngüsel mekaniksel uyarımın miktarının hücre canlılığına ve çoğalmasına

olumsuz yönde etki etmediğini göstermiştir. Literatür verileri incelendiğinde, elastik silikon membran üzerinde kültüre edilen MKH'lere %5, 10, 15 ve 20 oranında uygulanan mekaniksel uyarımın hücre canlılığı üzerinde anlamlı düzeyde bir fark oluşturmadığı, tüm uyarım miktarlarında benzer hücre canlılığı elde edildiği görülmektedir [349]. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar, MKH'leri gerilebilir piezoelektrik substratlar üzerinde kültüre etmiş ve mekaniksel uyarım uygulamışlardır. Yapılan analizler %5 oranında mekaniksel uyarım altında dahi hücrelerin canlılıklarını yitirdiklerini göstermiştir [355]. Bu iki çalışmada elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, kök hücrelerin üzerinde kültüre edildiği substrat türünün mekaniksel uyarım altında canlılıklarını koruma yetisi bakımından önemli olduğu düşünülmüş olup, bu çalışmada literatürden farklı olarak özellikle %20 uyarım uygulanan grupta diğer gruplara göre daha fazla sayıda ölü hücrenin olması substrat olarak aselüler perikardların kullanılması ile ilişkilendirilmiştir. Canlı&ölü ve SEM analiz sonuçları mekaniksel uyarım altında hücrelerin yöneliminin değiştiği ve uygulanan gerinim miktarının yönelim miktarına etki ettiğini göstermiştir. Kontrol grubunda herhangi bir yönelim izlenmezken mekanik uyarım uygulanan gruplarda hücre yönelimi tespit edilmiştir. Bu yönelimin %20 gerinim uygulanan grupta en dik olduğu görülmüştür. Sonuç olarak gerinim miktarı artıkça hücre yönelimin mekaniksel uyarımın yönüne dik olacak şekilde değiştiği görülmüştür (Şekil 4.14A ve 4.15). Literatür verileri incelendiğinde hücrelerin yönelimin uygulanan mekaniksel uyarımın yönüne dik olduğu ve gerek kök hücrelerin [349, 356] gerekse de kardiyomiyositlerin [357] mekaniksel uyarım altında yönelimlerini değiştirdikleri görülmüştür.

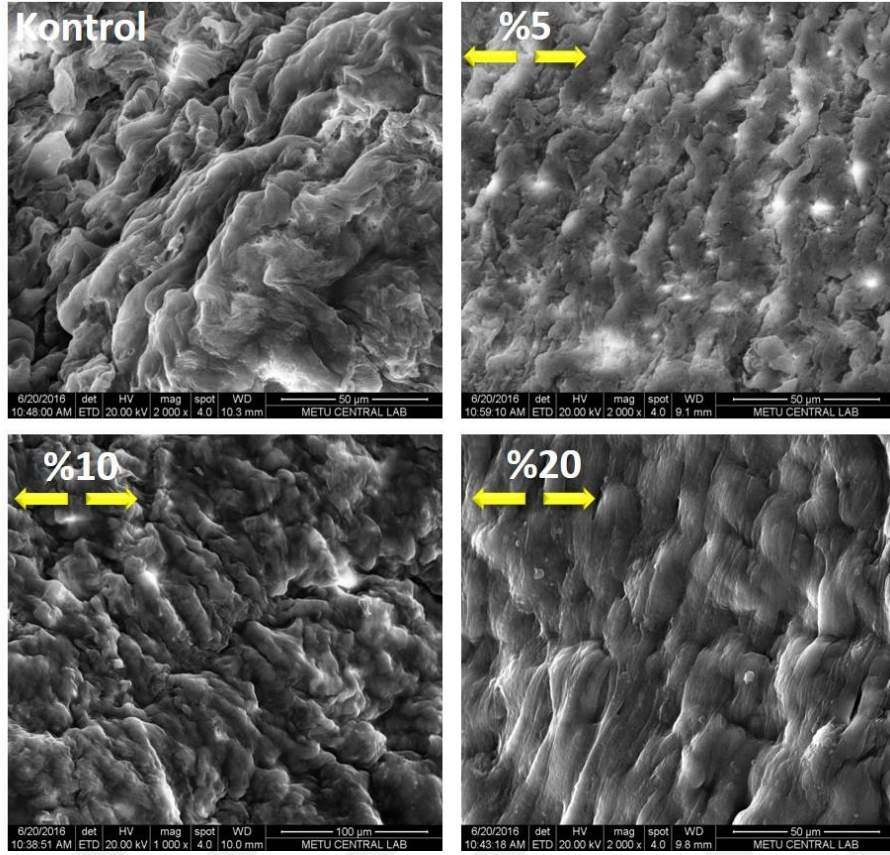
Uygulanan mekaniksel gerinim miktarının hücre genotipinde meydana getirdiği değişimi ve en uygun miktarın tespiti için qPCR analizi ile kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinden sorumlu genlerin ifadesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar β -Aktin referans geni olarak kullanılarak relatif ifade değerleri olarak grafiğe geçirilmiştir. qPCR sonuçları incelendiğinde, %5 grubunda tüm genler arasında *NKX2.5* ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ifade olduğu (3,5 kat), diğer gruplarda ise *GATA-4* ifadesinin anlamlı düzeyde yüksek bulunduğu (%10 için 3,8 kat ve %20 için 2,6 kat) anlaşılmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında test edilen tüm genlerin %5 grubunda daha fazla ifade oldukları görülmüştür (*GATA-4*, *MEF2C* ve *CACNA1C* için sırasıyla 1,2, 1,5 ve 1 kat olarak hesaplanmıştır). %10 ve %20 gruplarında ise *NKX2.5* ve *CACNA1C* genleri kontrol grubundan daha düşük düzeyde ifade olmuşlardır (Şekil

4.14B). Sonuç olarak literatürde de rapor edildiği gibi uygulanan döngüsel mekanik gerinim miktarına bağlı olarak ifade profilinin değiştiği [349] anlaşılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda araştırmacılar MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılması amacıyla %3 [353, 355] ya da %10 [349] gerinim uygulamışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar %5 gerinimde kontrol grubuna kıyasla test edilen tüm genlerin ifadesinin yüksek olduğu ve *NKX2.5* ve *CACNA1C* ifadesinin ise diğer gruplara göre daha yüksek olduğu anlaşılmış olup devam eden çalışmalarda bahsi geçen değer kullanılmıştır. Huang ve ark. yaptıkları çalışmada elastik silikon membran üzerinde kültüre ettikleri MKH'lere %10 gerinim uygulandığında *GATA-4*, *MEF2C* ve *NKX2.5* ifadesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise test edilen tüm genlerin ifadeleri %5 grubunda yüksek bulunmuştur. Bu farkın ortaya çıkmasının muhtemel nedeninin aselüler doku iskelesinin kullanımı olduğu düşünülmüştür.

Mekaniksel uyarıya bağlı olarak meydana gelen hücre oryantasyonu ve morfolojisinin qPCR sonuçlarına yansımadağı görülmektedir. Özetle en iyi oryantasyon ve kardiyomiyosit benzeri morfoloji %20 gerinim uygulanan grupta gözlemlenirken en yüksek kardiyak spesifik transkripsiyon faktörü ifadesi %5 uygulanan grupta görülmüştür. Bunun sebebi olarak gerinim miktarı artığında hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlayan aktin filametlerinin sentezinden sorumlu olan yolakların aktifleştigi hücre farklılaşmasından sorumlu yolakların ise inhibe olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezin doğruluğunun tespit edilmesi için daha detaylı incelemelerin yapılması gerekmektedir.



Şekil 4.14. A) Canlı&ölü analiz sonuçları: farklı gerinim altında aselüler sıgır perikardı üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin canlılık ve morfolojileri B) qPCR analiz sonuçları: uygulanan gerinime bağlı olarak kardiyak spesifik genlerde meydana gelen ifadeler. Ölçek çizgisi: 100 µm. $p < 0,01$ ** ile gösterilmiştir.



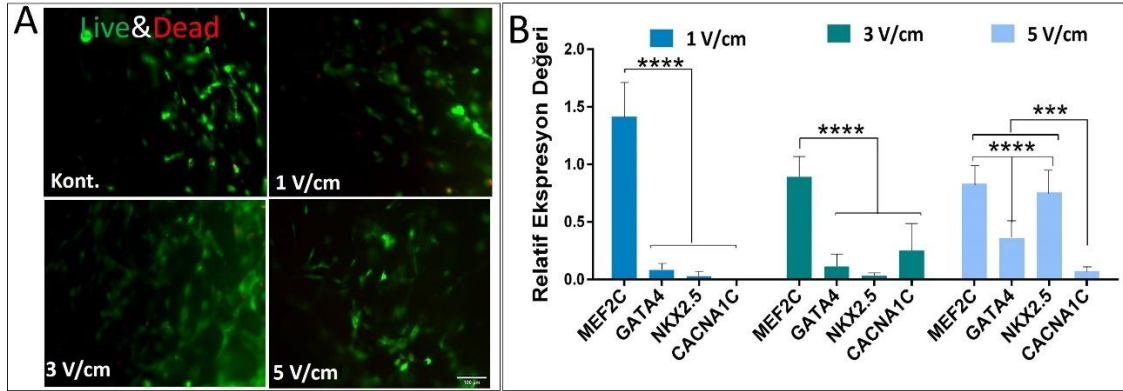
Şekil 4.15. Farklı mekaniksel gerinim uygulanan gruplarda gözlemlenen hücre dizilmesi. Ölçek çizgisi: 50 µm

4.1.3.3. Elektriksel Uyarımın Kardiyomiyosit Farklılaşması Üzerine Etkisi

Elektriksel uyarım miktarının etkisinin araştırılması ve elektromekaniksel uyarım çalışmasında kullanılacak uygun gerilim (V/cm) miktarının tespit edilmesi amacıyla üç farklı gerilim miktarı (1, 3 ve 5 V/cm, 3 ms, 1 Hz) test edilerek hücre canlılığı ve morfolojisine canlı&ölü analizi, kardiyak spesifik genlerin ifadesine ise qPCR analizi yapılarak bakılmıştır. Canlı&ölü analizi tüm gruplarda hücrelerin 3B aselüler yapıya düzensiz bir biçimde tutunduğunu ve canlı hücre sayısının yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca hem elektriksel uyarımın uygulandığı gruplarda hem de kontrol grubunda hücrelerin uzantılar geliştirerek birbirileri ile iletişime geçtiği de gözlemlenmiştir (Şekil 4.16A). Elektriksel uyarım altında kültüre edilen gruplarda hücrelerin spesifik bir yönelim göstermedikleri tespit edilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde bazı araştırmacıların kardiyomiyositlerin elektriksel uyarım altında yönelim gösterdiklerini

[358, 359], ancak bazı araştırmacıların ise hücrelerin yönelim göstermediğini [360] raporladıkları görülmüştür. Bu çalışmada elektriksel uyarım altında hücrelerin spesifik bir yönelim göstermemesinin muhtemel sebebinin aselüler perikardlarda gözlemlenen düzensiz elastik ve kollajen fiber yapısı olduğu düşünülmektedir [361, 362].

qPCR sonuçları *MEF2C* ifadesinin 1 ve 3 V/cm gruplarında *NKX2.5*, *GATA-4* ve *CACNA1C* genlerinden, 5 V/cm grubunda ise *GATA-4* ve *CACNA1C* genlerinden anlamlı düzeyde yüksek ifade olduğunu göstermiştir ($p<0,05$). Diğer gruplarla kıyaslandığında 5 V/cm grubunda *GATA-4* ve *NKX2.5* gen ifadelerinin yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.16B). Sonuç olarak kardiyak spesifik gen ifade profilinin uygulanan uyarıma bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve bu değişkenliğin muhtemel sebebinin uyarımlara bağlı olarak ortamda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) miktarının farklı olması düşünülmüştür [289]. Tandon ve ark. kollajen doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen kardiyomiyositler için en optimum elektriksel uyarım miktarının 3 Hz de 3 V/cm olduğunu ifade etmişlerdir [363]. Ancak bu çalışmada elde edilen hücre canlılığı ve kardiyak spesifik gen ifade sonuçları, fizyolojik koşullarda elektriksel uyarım değerlerinin 0,1-10 V/cm olduğu ve birçok araştırmada 5 V/cm değerinin kullanıldığı [358, 359, 364] göz önünde bulundurulduğunda devam eden çalışmalarda 5 V/cm kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

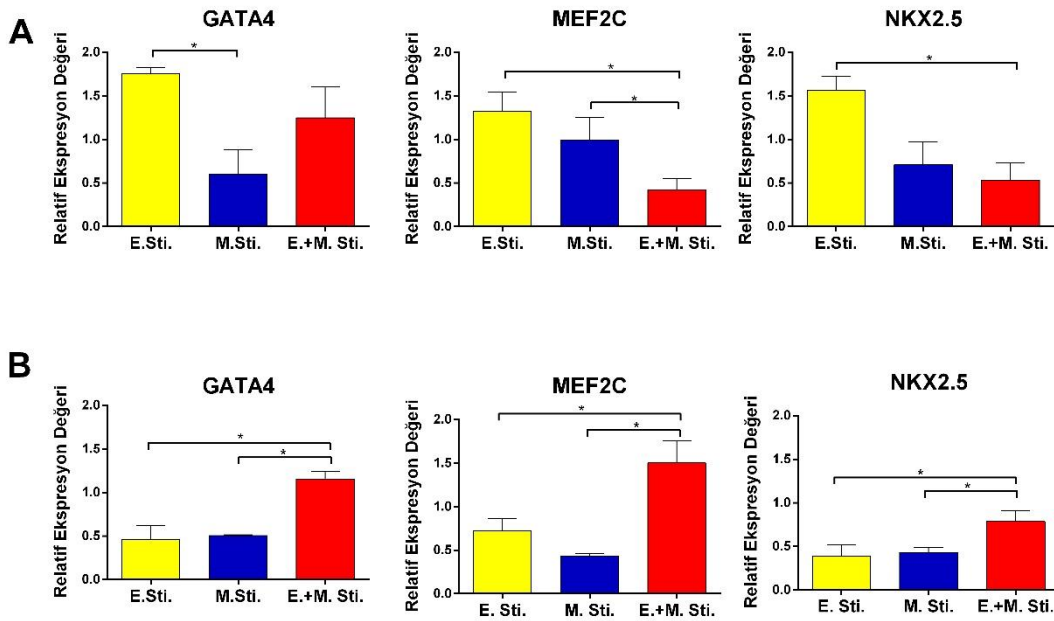


Şekil 4.16. A) Canlı&Ölü analiz sonuçları: farklı gerilim altında aselüler sığır perikardı üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin canlılık ve morfolojileri B) qPCR analiz sonuçları: uygulanan gerilime bağlı olarak kardiyak spesifik genlerde meydana gelen ifadeler. Ölçek çizgisi: 100 µm. $p<0,001$ *** ve $p<0,0001$ **** ile gösterilmiştir.

4.1.3.4. Elektromekaniksel Uyarımın Kardiyomiyosit Farklılaşması Üzerine Etkisi

rt-MKH'ler 3B aselüler doku iskeleleri üzerine ekilerek elektromekaniksel uyarıma maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada uyarım süresinin ve elektrik ile mekaniksel uyarımın birlikte uygulamasının kardiyak spesifik gen ifadesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Uyarımdan sonra kardiyak spesifik gen ifadesine qPCR analizi ile bakıldı. qPCR sonuçları 2 günlük kültür süresinin uygulandığı grupta, elektriksel uyarımın uygulandığı grupta hedef genlerin hem mekaniksel hem de elektromekaniksel stimülasyon grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.17A). *GATA-4*, *MEF2C* ve *NKX2.5* ifadelerinin elektromekaniksel stimülasyon grubu ile kıyaslanınca elektriksel uyarım grubunda sırasıyla 1,4 ($p>0,05$), 3 ve 2,9 ($p<0,05$) kat fazla olduğu hesaplanmıştır. Diğer taraftan *GATA-4*, *MEF2C* ve *NKX2.5* ifadelerinin mekaniksel stimülasyon grubu ile kıyaslandığında elektriksel uyarım grubunda sırasıyla 2,9 ($p<0,05$), 1,33 ve 2,2 ($p>0,05$) kat fazla olduğu tespit edilmiştir. *MEF2C* ifadesi elektromekaniksel uyarım grubunda anlamlı düzeyde düşük tespit edilmiştir ($p<0,05$). 4 günlük kültür süresinin uygulandığı grupta test edilen tüm genlerin elektromekaniksel uyarım grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 4.17B). Elektriksel uyarım grubu ile kıyaslandığında *GATA-4*, *MEF2C* ve *NKX2.5* ifadeleri elektromekaniksel uyarım grubunda sırasıyla 2,5, 2 ve 2 kat yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Mekaniksel uyarım ile kıyaslandığında ise elektromekaniksel uyarım grubunda bu genlerin ifadeleri sırasıyla 2,3, 3,5 ve 1,8 kat olarak hesaplanmıştır ($p<0,05$). Tüm bu sonuçlar bir arada düşünüldüğünde uyarım süresinin aselüler doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerde kardiyak spesifik genlerin ifadesini olumlu yönde etkileyen önemli bir parametre olduğu söylenebilir. Bununla birlikte rt-MKH'lerin farklılaşmasında elektromekaniksel uyarımın uzun dönemde daha fazla etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan kaynaklı rt-MKH'leri aselüler miyokard doku iskeleleri üzerinde kültüre ederek elektromekaniksel uyarım (%20 gerinim ve 1 Hz de 5 V gerilim) altında kardiyomiyojenik farklılaşmalarını incelemişlerdir. Elde edilen veriler, elektromekaniksel uyarımın kök hücrelerin farklılaşmasını sağladığı ve kasılma ile ilintili olan proteinlerin (α -aktin, miyozin ağır zinciri ve konneksin 43) ifade edildiğini göstermiştir [360]. Yukarıda da bahsedildiği üzere 3B aselüler perikard doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen rt-MKH'ler elektromekaniksel uyarıma maruz kaldıklarında kardiyak spesifik gen ifadelerinde kontrole göre yüksek olmasa da bir artış meydana gelmiştir. Ancak bu artışın kasılabilir kardiyomiyosit elde etmek için yeterli olmadığı aşıkardır. mRNA düzeyinde yüksek

düzeyde kardiyak spesifik genlerin ifadesinin elde edilememesinin muhtemel sebebi olarak bu çalışmada kullanılan kök hücrelerde CD90 ve CD29 ile birlikte CD45 ve CD11a ifadelerinin yüksek olması olabileceği düşünülmektedir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması için detaylı çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmalıdır. Ayrıca fonksiyonel ya da morfolojik olarak *in vivo* kardiyomiyositlere benzer kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin elde edilebilmesi için kültür koşulların iyileştirilmesi, kimyasal stimülatör olarak kullanılan 5-Aza'ya alternatif bir veya birden fazla kimyasal molekülün tespit edilmesi ve yüksek düzeyde kardiyomiyojenik farklılaşma yetisine sahip yeni bir MKH kaynağının araştırılmasının kritik öneme sahip olacağı da düşünülmektedir.



Şekil 4.17. Aselüler perikardlar üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin A) 2 gün ve B) 4 gün boyunca elektromekaniksel uyarıma maruz bırakıldığında elde edilen kardiyak spesifik gen ifadeleri. $P < 0,05$ için * kullanılmıştır. E.Sti: Sadece elektriksel stimülasyon, M.Sti: Sadece mekaniksel stimülasyon ve E.+M. Sti: Elektromekaniksel stimülasyon.

Sonuç olarak yapılan çalışmalar, elektriksel ve mekaniksel uyarımların 3B aselüler doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını sağladığını, kardiyak spesifik belirteçlerin ifade düzeyinin gerilim ve gerinim parametreleri ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca hücre canlılığı ve kardiyak spesifik belirteçlerin ifadesi bakımından en iyi sonuç veren elektriksel gerilim değerinin 5 V/cm, mekaniksel gerinim değerinin ise %5 olduğu tespit edilmiştir. Tespit

edilen bu değerler rt-MKH'lerin elektromekaniksel uyarım ile kardiyomiyojenik farklılaşmasında kullanılmış ve qPCR sonuçları rt-MKH'lerin kardiyak spesifik belirteçleri ifade ederek kardiyomiyositlere farklılaştığını göstermiştir. Ayrıca, rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında 2 günlük uyarım sonunda elektriksel uyarımın, 4 günlük uyarım sonunda ise elektromekaniksel uyarımın daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar elektromekaniksel uyarımın uzun süreli kültürde daha etkili olduğunu göstermiş ve *in vivo* çalışmalarda test edilecek kardiyak yamaların hazırlanması için gerilim, gerinim ve zaman parametreleri olarak sırasıyla 5 V/cm (1 Hz, 3 ms), %5 (1 Hz) ve 7 gün seçilmiştir [365]. Bu parametreler kullanılarak hazırlanan kardiyak yamalar sıçan MI modelinde değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1.4. Elektromekaniksel Olarak Uyarılmış Kardiyak Yamaların Sıçan Miyokardiyal Enfarktüs Modelinde *in vivo* Performansları

4.1.4.1. MI oluşumu, Hücre Göçü ve Kalsifikasyonun Değerlendirilmesi

Sıçan kalbinde hasar (MI modeli) oluşturulduktan sonra elektromekaniksel uyarıma maruz bırakılan hücreleri ihtiva eden kardiyak yamalar ve hücresiz yamalar yara bölgesine implante edildikten 21 gün sonra denekler sakrifiye edilerek kalp dokuları çıkarılmıştır. Çıkarılan kalp dokuları ışık mikroskobunda incelemek için takip edilip, kesitler alındıktan sonra H&E boyaması yapılmıştır. Ayrıca yara bölgesinde yama kaynaklı hücrelerin tespit edilmesi için BrdU ve yine yama kaynaklı yara bölgesinde kalsifikasyon olup olmadığının gösterilmesi için von Kossa boyaması yapılmıştır (Şekil 4.18).

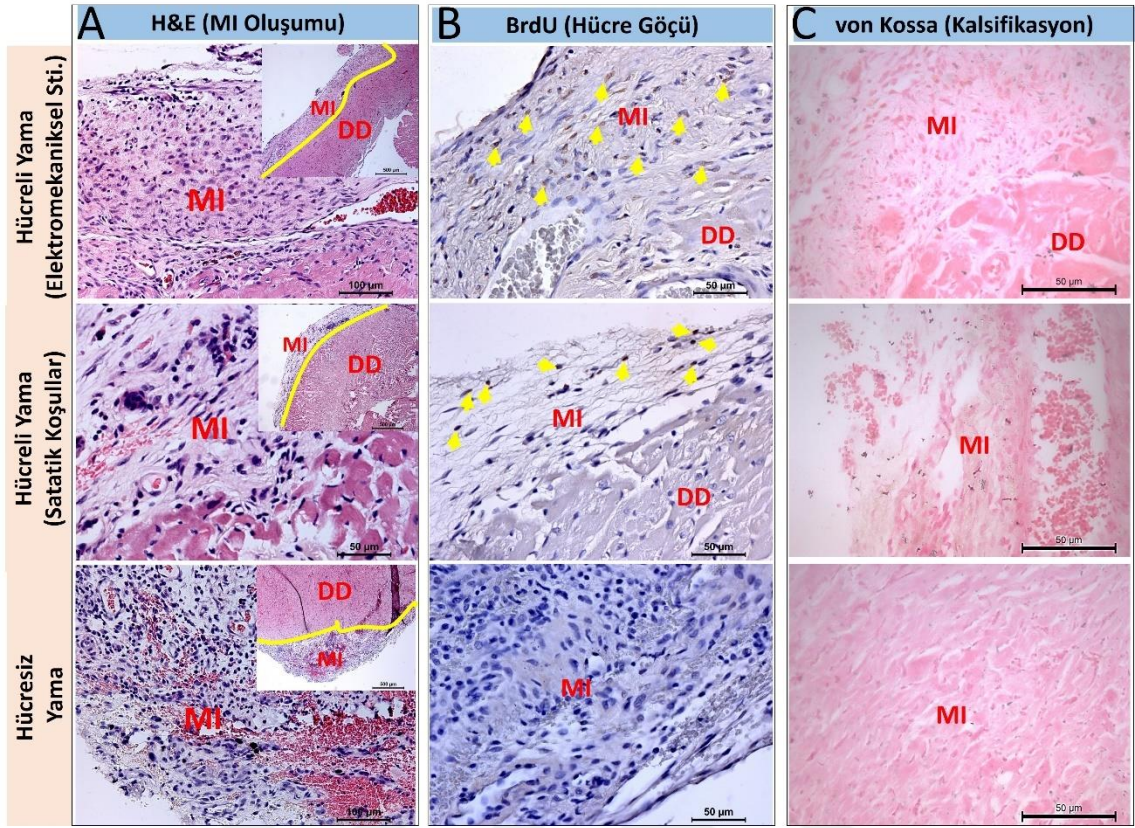
Literatür verileri incelendiğinde kalp yamalarının MI modelinde *in vivo* performanslarının test edilmesi için sıçan, domuz ve koyun gibi hayvanların kullanıldığı görülmektedir [366, 367]. Bu çalışmada rt-MKH'leri içeren ve elektromekaniksel uyarımlara maruz bırakılan yamaların kalp kası özelliklerine etkisinin test edilmesi için sıçan MI modeli kullanılmıştır. MI modelinin geliştirilmesinde sıklıkla tercih edilen yöntem kalbin sol önünden inen koroner arterin ligasyonudur. Ancak bu yöntemin sahip olduğu teknik zorluklardan dolayı farklı sonuçlar elde edilebildiği ifade edilmiştir [368]. Öte yandan soğutulmuş metal probun kalp dokusuna belirli bir süre temas edilerek MI modelinin geliştirilmesi ("*cryoinjury*") işlemi hem sıçanlarda hem de farelerde başarılı bir biçimde uygulanmıştır [368-371]. Dolayısıyla bu çalışmada MI, *cryoinjury* metodu kullanılarak geliştirilmiştir. Yapılan mikroskobik analiz tüm gruplarda başarılı bir biçimde miyokardiyal enfarktüsün tetiklendiğini göstermiştir. Elektromekaniksel

stimülasyon uygulanan yamanın uygulandığı gruba ait doku ışık mikroskobu altında incelendiğinde hasar alanında kalp duvarının kollajen fibriller bakımından zengin olduğu ve kollajen fibrillerin aralarında birbirine paralel düzenlenmiş iğsi hücrelerin ve aralarda yer yer kan damarlarından oluşan fibröz bağ dokusunun olduğu gözlenmiştir. Statik şartlarda kültürü yapılan hücreli yamanın uygulandığı grupta da hasar alanında kollajen fibrillerden zengin, iğsi hücrelerin bulunduğu ve yer yer kapillerlerin izlendiği fibrozis tespit edilmiştir. Kalp dokusuna yakın daha sıkı bir bağ dokusu izlenirken kalp dokusunun dış kenarına doğru daha gevşek bağ dokusu tespit edilmiştir. Son olarak hücre içermeyen yama (kontrol grubu) implante edilen kalp dokusunda hasar alanının ventrikül duvarının kenarından ventrikül alt ucuna kadar ilerlediği görülmüştür. Ventrikül apeksinde hemoraji, hücreden zengin granülasyon dokusu izlenirken yan duvarda fibrozis gözlenmiştir. Ayrıca kollajen fibriller, dejenere kardiyomiyositler ve damarlar izlenmiştir (Şekil 4.18). H&E analizi ve DAPI boyama sonuçları yara bölgesinden çıkarılan yamada hücrelerin yamanın her iki kenarında yoğun olarak bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca yama kalınlığı boyunca da kollajen fibriller arasında yan yana dizilmiş iğsi çekirdekli uzun hücrelerin varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.19A ve C). 21 gün boyunca *in vivo* koşullara maruz kalan yamada yoğun hücre varlığı ve izlenen hücrelerin kardiyomiyosit benzeri morfoloji göstermesi, çalışmada geliştirilen yamada dokulaşmanın başladığını düşündürmüştür. Ancak tam bir doku yapısının izlenmesi ve yamaya ekimi yapılan kök hücrelerin fonksiyonel kardiyomiyositlere farklılaşması ile hasarlı bölgenin onarılmasında başarılı olunması için *in vitro* kültür koşullarının iyileştirilmeye devam edilmesi ve *in vivo* implantasyon süresinin artırılması gerektiği düşünülmektedir.

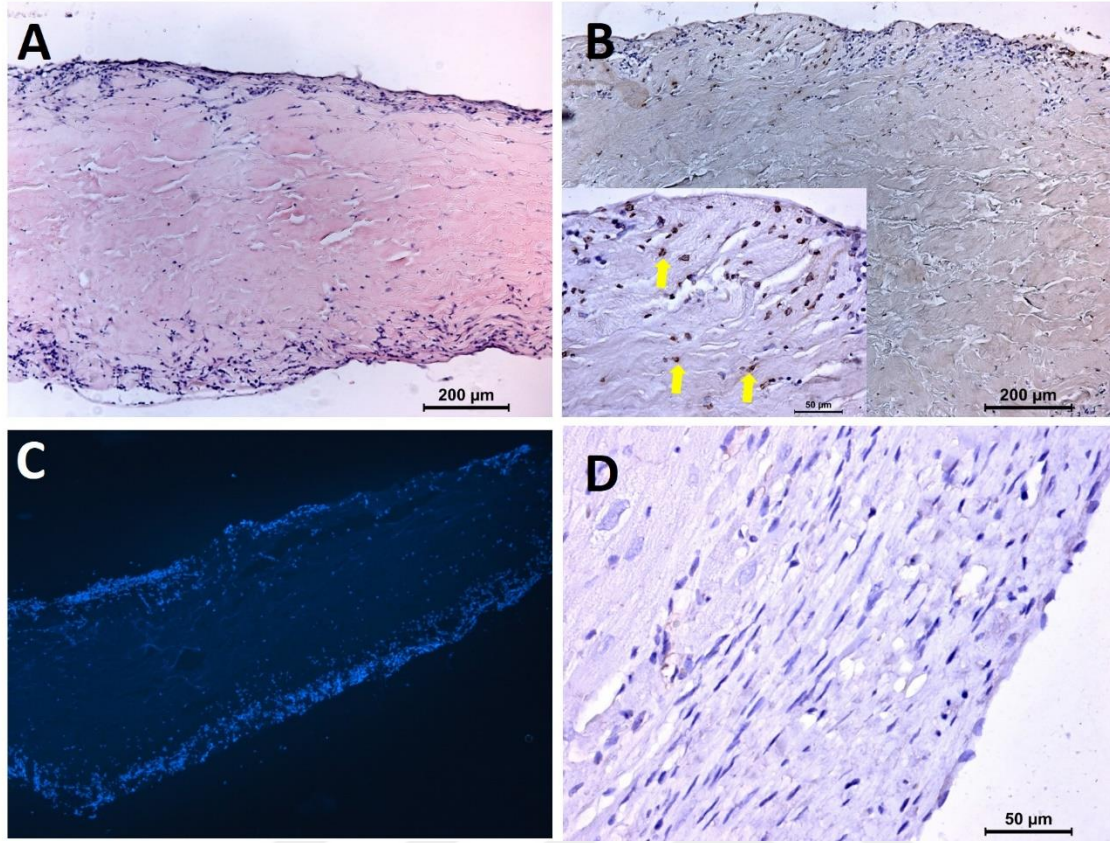
Yara bölgesinde yama kaynaklı hücrelerin tespit edilmesi için BrdU işaretlemesi yapılmıştır. Elektromekaniksel uyarımın uygulandığı ve uygulanmadığı hücreli yamanın uygulandığı gruplara ait yara bölgesi örneklerinde BrdU ile işaretli kahverengi boyanmış hücreler gözlemlenmiştir. Kahverengi boyanmış hücre miktarının elektromekaniksel uyarım grubunda daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Her iki grupta yer yer yüzeye yakın BrdU pozitif hücreler izlenirken yer yer hasar alanında gelişen fibrozis bölgesinin ortasında ve altında kardiyomiyositlere yakın BrdU ile pozitif işaretli kahverengi hücreler görülmüştür. Hücre içermeyen yama uygulanan grupta beklendiği üzere hasar alanında BrdU işaretli hücre gözlenmemiştir (Şekil 4.18). Llucia-Valldeperas ve ark. yaptıkları çalışmada, kalp dokusu yağında izole ettikleri yetişkin öncül hücreleri elektromekaniksel uyarıma maruz bırakıp fibrin jele enkapsüle ederek fare MI modelinde

değerlendirmişlerdir. Yapılan analizler yara bölgesinde sınırlı miktarda fibrin jelden göz eden hücreler olduğunu göstermiştir [365]. Bizim çalışmamızda ise yara bölgesinde yüksek miktarda hücre gözlenmiştir. Bu sonucun muhtemel sebebi olarak rt-MKH'lerin 3B aselüler kollajen ve elastik fiberlerden oluşan sıgır perikardlarında kültüre edilerek elektromekaniksel uyarıma maruz bırakılması olarak düşünülmüştür. Çünkü hücrelerin çevrelerini algıladıkları ve çevresel faktörlerin hücrelerin çoğalması ve göçü gibi davranışları etkiledikleri bilinmektedir [372]. Yara bölgesinden çıkarılan yamada da BrdU pozitif hücreler yamanın hem yüzeyi ve hem de içinde izlenmiştir (Şekil 4.19B). Elektromekaniksel uyarım uygulanan ve uygulanmayan grup ile yara bölgesinden çıkarılan yamada yüksek sayıda BrdU işaretli hücrelerin varlığı, kök hücrelerin *in vitro* da başarılı bir şekilde işaretlendiğini ve yamanın kök hücre barındırdığı kanıtlar niteliktedir. Ancak yamada BrdU ile işaretleme hücrelerin varlığı, doğal dokudan yamaya hücre göçünün olduğunu düşündürmüştür. Yine elektromekaniksel uyarımın uygulandığı ve uygulanmadığı gruplarda hasarlı bölgede BrdU işaretli hücrelerin varlığı yama ile doğal dokunun zamanla bütünleşmeye başladığını ifade etmek için bir gösterge olduğunu söylemek mümkündür. Yanı sıra, kök hücrelerin hasarlı alana doğru göç ettiğini ve burada mikroçevre oluşturmaya başladığını söylemek de mümkündür.

Kalp dokusunda oluşturulan hasarlı bölgede yamaların implantasyonu nedeniyle kalsifikasyonun olup olmadığının tespiti amacıyla von Kossa boyaması yapılmış ve elde edilen sonuçlar hiçbir grupta kalsiyum birikimin olmadığını göstermiştir (Şekil 4.18). Bu da yamaların hazırlanması basamağında uygulanan genipin fiksasyonunun dokuda kalsifikasyonun engellenmesi bakımından önemli ve yeterli olduğunu ve kullanılan biyoyamaların kalsiyum birikmesine neden olmadığını göstermiş olup bu sonucun literatür verileri ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Liang ve ark. yaptıkları çalışmada farklı genipin konsantrasyonlarını (0,00625%, 0,05% ve 0,625%) kullanılarak aselüler sıgır perikartlarını fikse etmiş ve *in vivo* çalışmalar yürütmüşlerdir. Yapılan analizler test edilen zaman dilimlerinde (3 gün, 1, 3, 6 hafta ve 1 yıl) değerlendirilen tüm gruplarda *in vivo* koşullarda kayda değer düzeyde kalsiyum oluşumunun meydana gelmediğini göstermiştir [316].



Şekil 4.18. 21 günlük *in vivo* implantasyon süresi sonunda elektromekaniksel uyarıma maruz bırakılmış ve bırakılmamış yamaların implante edildiği yara bölgesinin histolojik incelenmesi. A) H&E boyaması gruplara göre yara bölgesinin histolojik görünümünü, B) BrdU boyama yamadan yara bölgesine göç eden hücrelerin gösterilmesi ve C) von Kossa boyama ise yara bölgesinde kalsifikasyonun oluşup oluşmadığının gösterilmesi için yapılmıştır. MI: Miyokardiyal Enfarktüs bölgesi, DD: Doğal Doku bölgesi.



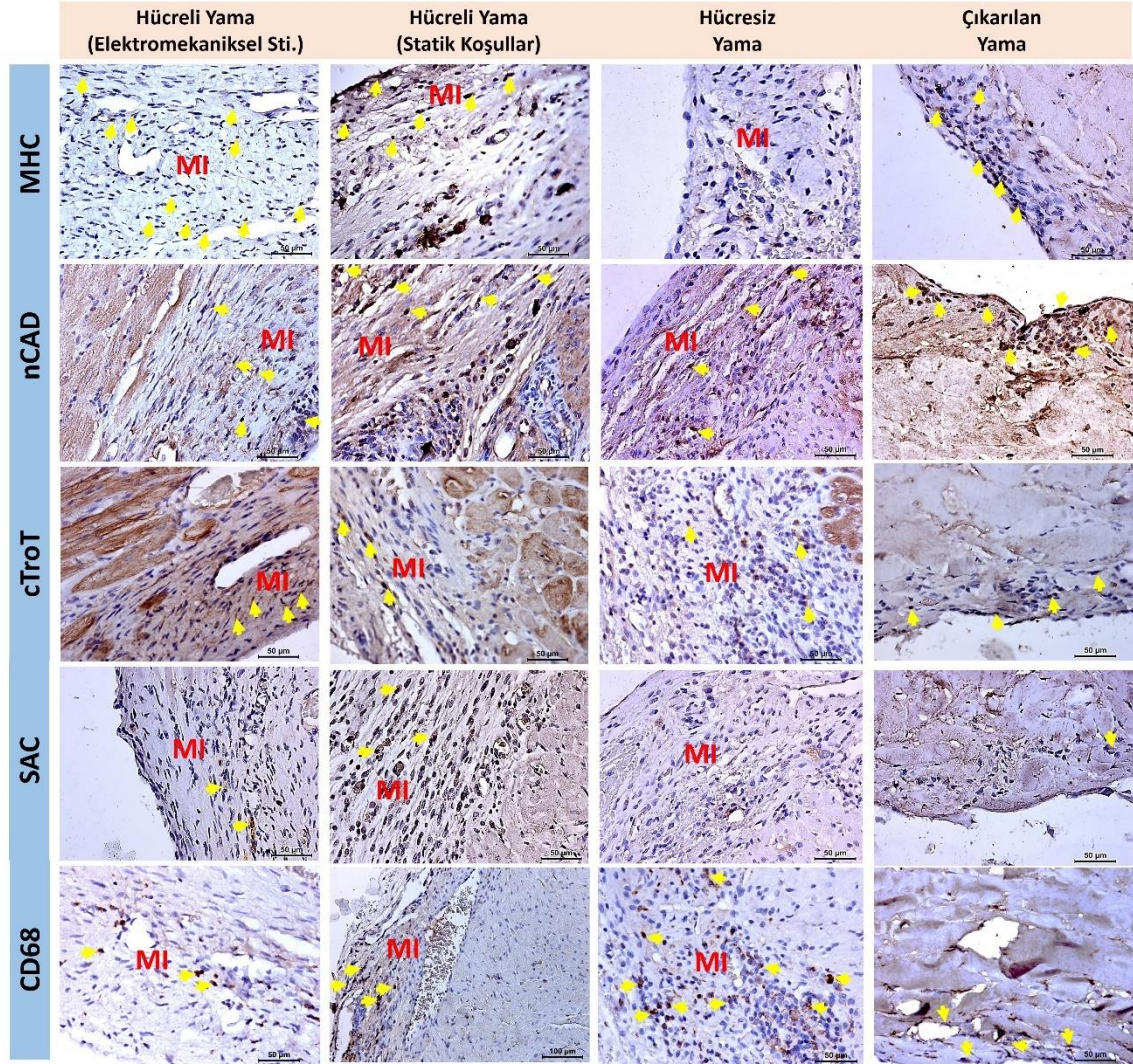
Şekil 4.19. 21 günlük *in vivo* implantasyon süresi sonunda yara bölgesinden çıkarılan implanta edilmiş yamanın histolojik boyaması. A) Yamanın H&E boyaması, B) Yamanın BrdU boyaması. Sarı oklar BrdU pozitif hücreleri göstermektedir. C) Yamanın DAPI boyaması. Mavi renk hücre çekirdeğini göstermektedir. D) İmmünohistokimyasal analizin negatif kontrol boyaması.

4.1.4.2.Yara Bölgesinde Kardiyak Spesifik Proteinlerin İfadeleri

Elektromekanik olarak uyarılan ve uyarılmayan ile kontrol grubu olarak kullanılan hücresiz yamanın implante edildiği yara bölgesinden alınan örneklerde kalp kası özellikleri ve inflamasyon açısından değerlendirme yapılmıştır. Kalp kası özelliklerinin gösterilmesi için MHC'ye karşı monoklonal antikor, SAC monoklonal antikor SAC, cTroT monoklonal antikor ile; bağlantı birimlerinin gösterilmesi için nCAD monoklonal antikor ile; makrofajların gösterilmesi için ise CD68 monoklonal antikor ile işaretleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunlarla birlikte yara bölgesinden çıkarılan yamada da yukarıda bahsedilen protein ifadelerine bakılmıştır.

Kalp kası özellikleri için MHC'ye karşı monoklonal antikor, SAC monoklonal antikor ve cTroT monoklonal antikor ile yapılan immunohistokimyasal işaretleme sonucunda her üç grupta da hasarlı alanda bu antikorlar ile pozitif boyalı hücreler tespit edilmiştir.

MHC'ye karşı antikor ile işaretlemede hasarlı alanda iğsi hücrelerin kenarında pozitif reaksiyon yanı sıra dokuda daha büyük çekirdekli sitoplazmasında granüller bulunan mast hücrelerinin de bu antikor ile pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür (Şekil 4.20). Elektromekanik uyarı ile hazırlanan biyoyama uygulanan grupta hasar alanında diğer gruplara göre daha çok hücrede ve daha yoğun (güçlü) cTroT immunoreaktivitesi gözlenmiştir. nCAD monoklonal antikorları ile yapılan immunohistokimyasal işaretleme her üç grupta da hasarlı alanda güçlü pozitif reaksiyon veren hücreler tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. 21 günlük *in vivo* implantasyondan sonra yara bölgesinden alınan örneklerde kardiyak spesifik proteinlerin boyanması. Sarı oklar pozitif boyamaları göstermektedir. MI : Miyordiyal Enfarktüs bölgesi. cTroT: Kardiyak Troponin T; MHC: Miyozin Ağır Zincir; nCAD: N-kaderin; SAC: Sarkomerik Alfa Aktinin.

Makrofajların gösterilmesi amacıyla CD68 monoklonal antikor ile yapılan işaretlemede hasar alanında elektromekanik uyarı ile hazırlanan biyoyamanın uygulandığı grupta diğer

gruplara göre daha az sayıda makrofaj tespit edilmiştir (Şekil 4.20). Kontrol grubunda ise hem elektromekaniksel hem de statik grubuna göre daha fazla sayıda CD68 pozitif hücre görülmüştür. MKH'lerin immünmodülatör özelliklerinin olduğu bilinmektedir [373]. Dolayısıyla, test gruplarında daha az sayıda CD68 pozitif hücrelerin görülmesinin muhtemel sebebinin MKH'lerin immünmodülatör özellikleri olduğu düşünülmüştür.

İmmünreaktivite sonuçları cTroT ve CD68 açısından elektromekaniksel uyarım uygulanan grupta olumlu sonuçlar elde edildiğini düşündürmüştür. Bu grupta cTroT bakımından yoğun bir ifade görülürken CD68 ifade eden hücre bakımından ise düşük ifade tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, kalp kası özelliklerinin sağlanması ve düşük inflamasyon açısından değerlendirildiğinde bu grupta diğer gruplara göre daha başarılı olduğunu göstermiştir. Sağlanan bu başarının muhtemel sebebinin, yamaya implantasyon öncesinde *in vitro* koşullarda uygulanan elektromekaniksel uyarım ile kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması olduğu düşünülmektedir. cTroT ifadesinin yanında yara bölgesinde MHC ve SAC ifadesi de pozitif olarak bulunmuştur. Bu proteinler kalp kasının temel kasılma birimi olan sarkomer yapısının birer elemanıdır [374]. Dolayısıyla, elde edilen sonuçlar bize biyoreaktörde uygulanan elektromekaniksel uyarımın MKH'lerin kardiyomiyosit benzeri hücrelere farklılaşmasında etkili olabileceği ve bu farklılaşmanın hasarlı kalp dokusunda kalp kası özelliklerinin tekrar geri kazandırılmasında ve hatta yara bölgesinde kasılabilen hücrelerin var olmasına neden olabileceğini düşündürmüştür.

Yara bölgesinden çıkarılan yamada yapılan immunohistokimyasal işaretlemede yamadaki hücrelerde MHC, SAC ve cTroT pozitif immunoreaktivitesi izlenmiştir (Şekil 4.20). Biyoyamada CD68 pozitif hücrelerin varlığı da gözlenmiştir. Bu hücreler yamanın bir tarafında daha çok sayıda iken karşı tarafında daha az sayıda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Bu bulgumuz bu hücrelerin kalp dokusundan yamaya göç eden makrofajlar olduğunu göstermektedir. Yama içindeki hücrelerde nCAD immunoreaktivitesi de izlenmiştir. Literatürde biyofiziksel uyarımların sırasıyla elektriksel ve mekaniksel etkileşimden sorumlu olan konneksin 43 ve nCAD ifadelerinin artmasına neden olduğu raporlanmıştır [360, 375, 376]. Kalp dokusunda komşu hücreler arasında adherens etkileşimler n-kaderinler aracılığıyla kurulur ve kasılma kuvvetinin hücreler arasında geçişini sağlar [377]. 21 gün *in vivo* koşullara maruz kalan yamada MHC, SAC, cTroT ve nCAD bakımından pozitif immünreaktif görülmesi yamada kültürü yapılan kök hücrelerin fonksiyonel kardiyomiyosit hücrelerine farklılaşmaya başladığını kanıtlar

niteliktedir. Bu sonuçlar *in vitro* koşullarda uygulanan stratejilerin yanında uygun mikroçevrenin varlığının hücre farklılaşmasında oldukça önemli bir role sahip olduğunu düşündürmüştür.

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasının birinci bölümünde aselüler doku iskeleleri üzerinde çeşitli fiziksel uyarımlar altında kültüre edilen rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması incelenmiş ve elde edilen sonuçlar *in vitro* koşullarda transkripsiyon düzeyinde düşük düzeyde de olsa kardiyomiyojenik farklılaşmanın gerçekleştiği görülmüştür. *in vivo* koşullarda ise yara bölgesinde kardiyak spesifik proteinlerin düşük düzeyde de olsa ifade oldukları tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında doku mühendisliği açısından rt-MKH'lerin aselüler doku iskelesinde canlılığı, hücre morfolojisi ve infiltrasyonu, yara bölgesine göçü gibi özellikler kardiyak yama için kanıtlanmış olmakla birlikte biyofiziksel uyarımların kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında yeterli olmadığı ve yeni stratejilerin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Dolayısıyla öncelikle *in vitro* koşullarda yüksek düzeyde MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmanın gerçekleştirilmesi ve bu amaçla indükleyici ajan olarak sıklıkla tercih edilen 5-Aza'ya alternatif molekül ya da molekül kombinasyonlarının uygulanması ile kültür koşullarının iyileştirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Bu amaçla tez çalışmasının 2. bölümünde; i) rt-MKH'lerin yüksek oranda kardiyomiyojenik farklılaştırılması için kimyasal ve biyolojik stimülatörlerin sinerjik etkisi; ii) Epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonu stratejilerinin birlikte kullanımı ile insan ve sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması için çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ileri bölümde sunulmuştur.

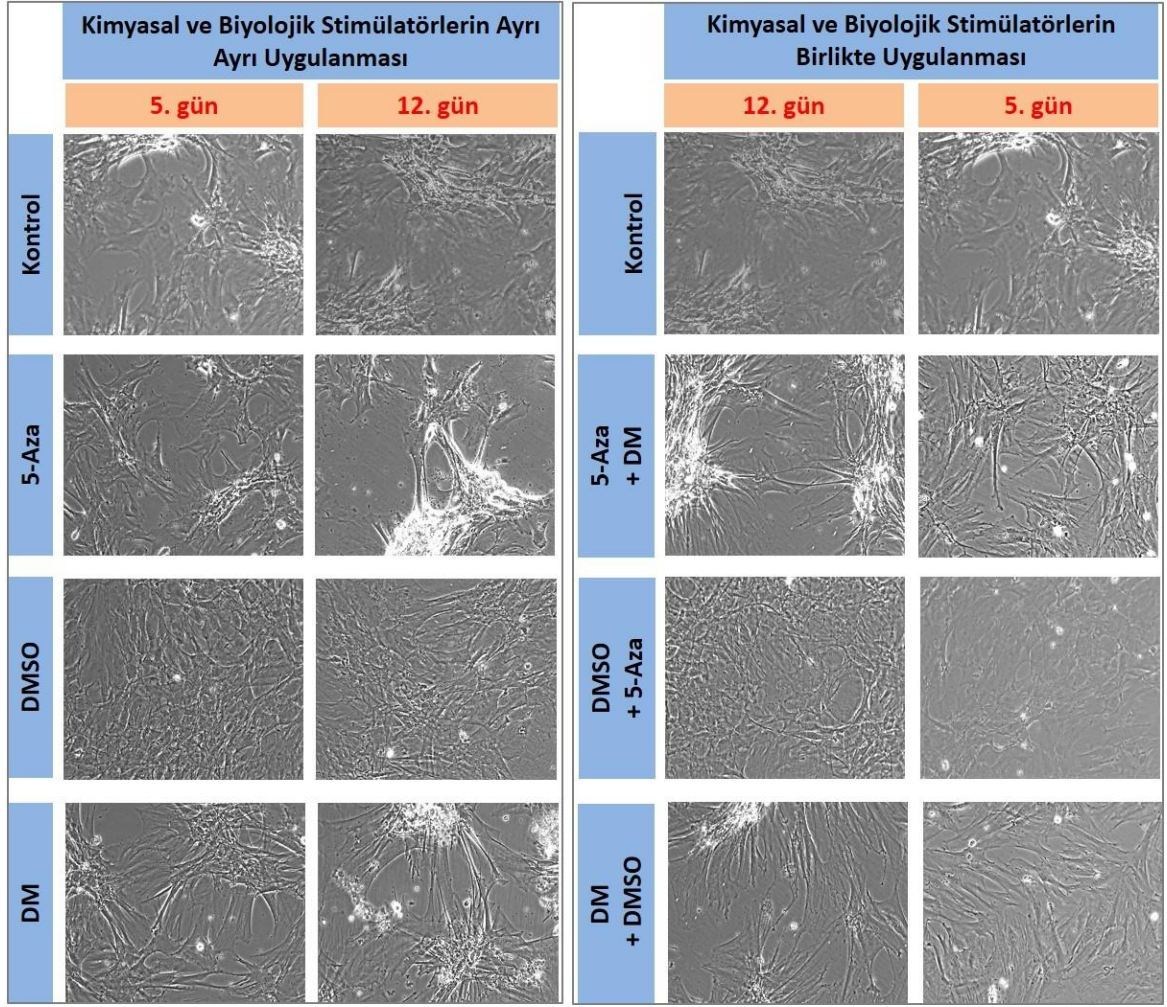
4.2. Küçük Moleküllerin Mezenkimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasına Etkisi

4.2.1. Kimyasal ve Biyolojik Stimülatörlerin Sinerjik Etkisi

rt-MKH'lerin kardiyomiyosit farklılaşma seviyesinin artırılması ve kök hücre farklılaşmasında sıklıkla tercih edilen kimyasal stimülatör olan 5-Aza'ya alternatif bir kombinasyon geliştirilmesi amacıyla çeşitli biyolojik ve kimyasal ajanlar tek tek ve kombine halde uygulanarak kardiyomiyojenik farklılaşma üzerine etkileri aşağıda sunulmuştur.

4.2.1.1. Morfolojik Değişimler

Şekil 4.21’de hücre farklılaşmasının artırılmasına yönelik tasarlanan gruplardaki 5. ve 12. gün hücre morfolojileri gösterilmiştir. Yapılan çalışmada hücre farklılaşması için hiçbir uyarının (kimyasal veya biyolojik) kullanılmadığı kontrol grubunda zamanla hücrelerin bir araya gelerek kümeler oluşturdıkları ve hücrelerin bu kümeler arasında geliştirdikleri uzantılar aracılığıyla etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Ancak kontrol grubu ile diğer gruplar hücre uzaması açısından kıyaslandığında biyolojik faktörlerin kullanıldığı DM ve kimyasal ile biyolojik uyarının beraber kullanıldığı 5-Aza+DM grubunda hücre uzamasının açık bir biçimde meydana geldiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak diğer bir kimyasal stimülatör olan DMSO ile DM’nin sinerjik etkisi altında da hücrelerde zamana bağlı olarak uzamaların ve içi yapının oluşmasının meydana geldiği çok açık bir şekilde görülmektedir. Kontrol grubu dahil diğer tüm gruplarla kıyaslandığında DMSO grubunda kültür süresi boyunca hücre kümelerinin oluşmadığı ve hücre uzamalarının net bir biçimde belirginleşmediği gözlemlenmiştir. DMSO ve 5-Aza’nın birlikte kullanıldığı grupta ise belirgin bir uzamanın meydana gelmediği tespit edilmiştir. Tüm gruplarda 5 ve 12 gün sonundaki morfolojik görünümünün benzer olduğu, 12 gün sonunda kontrol, 5-Aza, DM, 5-Aza+DM ve DM+ DMSO gruplarında hücrelerin bir araya gelerek hücre kümeleri oluşturdıkları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21. Biyolojik ve kimyasal uyarımların ayrı ayrı ve beraber uygulandığı gruplardaki rt-MKH'lerin 5 ve 12 gün sonundaki morfolojik görünüşleri

Zamana bağlı olarak hücrelerde meydana gelen uzamanın ve hücre kümelerinin oluşmasının kardiyomiyosit farklılaşmasının bir göstergesi olarak kabul edildiği literatürde yer almıştır [334, 378]. Ancak yapılan bu çalışmada herhangi bir uyarının uygulanmadığı kontrol grubunda da iğsi morfolojide hücreler olduğu ve zamanla hücrelerin bir araya gelerek hücre kümeleri oluşturdukları görülmüştür. Kardiyomiyojenik farklılaşmanın tetiklenmesi için 5-Aza'nın kullanıldığı çalışmada kök hücrelerde stoplazmik uzantıların görüldüğü ve hücre morfolojisinin kardiyomiyosit morfolojisine benzediği raporlanmıştır [334]. Bu çalışma kapsamında yapılan mikroskopik gözlemler çeşitli uyarılar ile uyarılan kök hücrelerin stoplazmik uzantılar uzatarak zamanla iğsi bir görünüm kazandığını göstermiştir. Bu da literatür verileri ile örtüşmekte ve hücrelerin morfolojik olarak başkalaşım sürecine girdiğini kanıtlar niteliktedir.

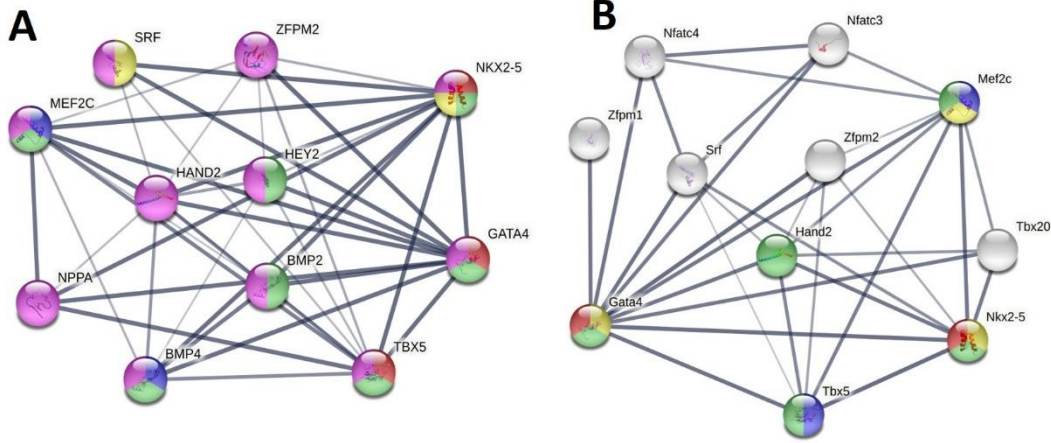
4.2.1.2. Kardiyak Spesifik Genlerin İfadesi

Çeşitli biyolojik ve kimyasal stimülatörlere maruz bırakılan rt-MKH'lerin başkalaşım geçirerek kardiyomiyojenik karakter gösterip göstermediklerinin tespit edilmesi için gerçek zamanlı qPCR analizi ile erken dönem kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin sentezinden sorumlu genlerin (*GATA-4*, *NKX2.5* ve *MEF2C*) ve kalp kası hücrelerinin kasılmasında kritik rol alan iyonların hücreler arasında geçişinde rol oynayan voltaj bağımlı kalsiyum kanalı alt biriminin sentezinden sorumlu genin (*CACNA1C*) ifadesine bakılmıştır.

Omurgalı canlılarda yapılan çalışmalarla, *Drosophila*'da bulunan ve kalp gelişiminden sorunlu olan *tinman* geninin homoloğu olan *NKX2.5*'in kalp oluşumundan hemen önce pre-kardiyak mezoderimde ifade olduğunu ve hücrelerin kardiyak soya geçmesinde en erken dönem belirteci olduğu ortaya çıkarılmıştır [379]. Yapılan çalışmalarda, *NKX2.5* geninin regülasyon bölgesinde *GATA-4/6* ve *Smad1/4* gibi bazı güçlendiricilerin ("enhancer") bulunduğu ve bu güçlendiricilerin *NKX2.5* geninin kalp spesifik ifadesini kontrol ettiği gösterilmiştir [380]. Ayrıca *GATA-4/6*'nın kalp gelişiminde kritik rol aldığı, *GATA-4/6* geninin ifade olmadığı farelerde kalp oluşumunda meydana gelen anomalilerin tespit edilmesi ve bu genin kalp spesifik yapısal proteinlerinin ifadesinde kritik rol alan genlerin aktifleşmesinden sorumlu olduğunun gösterilmesi ile kanıtlanmıştır [381, 382]. Tüm bunlara ek olarak Akavia ve ark. *GATA-4* ve *NKX2.5* transkripsiyon faktörlerinin iskelet kası hücreleri tarafından ifade edilemediğini, ancak kalp kası hücrelerine spesifik olup bu hücreler tarafından ifade edildiğini göstermiştir [383]. Miyosit artırıcı faktör-2 (*MEF2*) ailesi üyeleri arasında bulunan transkripsiyon faktörleri, kardiyak kasında yapısal genlerinin aktifleşmesini sağlayarak kardiyomiyosit farklılaşmasını kontrolünde kritik yol oynamaktadır [384]. Omurgalılarda ifade olan dört farklı *MEF2* geni (*MEF2A*, *MEF2B*, *MEF2C* ve *MEF2D*) gelişmekte olan kalp yapısı ile ilişkilendirilmiştir [385]. Bununla birlikte *MEF2C* ifadesi baskılanan farelerde kardiyak yapısal genlerin ifadesinin azalması nedeniyle ciddi ventriküler hipoplasiaların geliştiği ve bu durumun ölüm ile sonuçlandığı tespit edilmiştir [386]. Diğer taraftan *MEF2* transkripsiyon faktörleri ailesinin sadece kalp kası hücrelerinde değil aynı zamanda çizgili ve düz kas hücrelerinin morfogenez ve miyogenezinde de hayati önem taşıdığı ifade edilmiştir [387]. *MEF2* ailesi transkripsiyon faktörlerin nöron hücrelerinde de yüksek düzeyde ifade olduğu belirtilmiştir [384]. Tüm bunlara ek olarak *NKX2.5*, *GATA-4*, *MEF2C* ve aşağıda yapılan çalışmalarda kullanılan *TBX5* transkripsiyon faktörlerinin birbirileri ve diğer

transkripsiyon ve/veya proteinlerle olan protein-protein düzeyindeki etkileşimleri ve bu transkripsiyon faktörlerinin anlamlı düzeyde etkili oldukları biyolojik süreçlerin tespit edilmesi amacıyla proteinler arasındaki muhtemel fonksiyonel etkileşimleri tespit edilmesi için geliştirilen STRING veri tabanı [388] kullanılarak insan ve sıçan için ağlar çizilmiştir. Elde edilen ağlar Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Şekilden de anlaşılabacağı üzere, NKX2.5, GATA-4, MEF2C ve TBX5 transkripsiyon faktörleri hem insan hem de sıçanda birbirleri ile yüksek güvenirlilikte etkileşim göstermektedir. Bu faktörlerin etkileşime girdikleri diğer protein ve/veya transkripsiyon faktörleri organizmaya göre farklılıklar gösterdiği anlaşılmıştır. Bu transkripsiyon faktörlerin etkiledikleri biyolojik süreçlere bakıldığında NKX2.5, GATA-4 ve TBX5 transkripsiyon faktörleri insanda kardiyosit farklılaşmasının pozitif regülasyonu, sarkomer organizasyonu ve kardiyak farklılaşmanın regülasyonunda etkili oldukları anlaşılmaktadır. MEF2C faktörü ikincil kalp bölgesinin spesifikasyonu ile ilişkili süreçlerde etkili olduğu anlaşılmıştır. Sıçan da ise NKX2.5 ve GATA-4 kalp kasılmasının regülasyonu, kardiyak doku hücrelerin farklılaşması ve kalp gelişimi ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Ayrıca sıçanda MEF2C ve TBX5 faktörleri kalp gelişimi ve kardiyosit farklılaşmasında etkili bulunmuştur. Tüm bu sebeplerden dolayı, bu tez çalışmasının birinci bölümünde NKX2.5, GATA-4 ve MEF2C ve ikinci bölümünde bu üç transkripsiyon faktörünün yanında TBX5 ifadesinden sorumlu genler kardiyak farklılaşmasının göstergesi olarak kullanılmıştır.

qPCR sonuçları, 7 gün sonunda gruplar arasında en yüksek *GATA-4* ifadesinin 5-Aza ve DMSO’nun birlikte kullanıldığı grupta çıkmış olup tek başına 5-Aza’nın kullanıldığı grubuna göre 20 katlık, tek başına DMSO ‘nun kullanıldığı gruba göre ise 13 katlık bir artış olduğunu göstermiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.21A). DMSO ve farklı büyüme faktörlerin kullanıldığı DM grubunun birlikte kullanılması ile *GATA-4* ifadesi sadece DMSO ‘nun kullanıldığı ve sadece DM’nin kullanıldığı gruplara göre sırasıyla 2,4 ve 7,3 katlık artış sağlamıştır ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı tespit edilememiştir ($p > 0,05$). *GATA-4* ifadesi DM ve 5-Aza ile DM’nin birlikte kullanıldığı grupta aşağı yönde (< 1) tespit edilmişken, diğer gruplarda yukarı yönde (> 1) yönde tespit edilmiştir.



Şekil 4.22. STRING veri tabanı kullanılarak A) insan (*Homo sapiens*) ve B) rat (*Rattus norvegicus*) için çizilen GATA-4, NKX2.5, MEF2C ve TBX5 transkripsiyon faktörlerine ait protein-protein etkileşim ağı. Ağda yer alan iki protein arasındaki çizginin kalınlığı iki protein arasındaki etkileşimin güvenilirliği ile doğru orantılıdır. İki nod arasında çizgi ne kadar kalın ise bu iki nod o kadar güvenilir olarak etkileşmektedir. Ayrıca her iki ağda transkripsiyon faktörlerin görev aldığı biyolojik prosesler çeşitli renklerle gösterilmiştir. A'da; **kırmızı**: kardiyosit farklılaşmasının pozitif regülasyonu, **sarı**: sarkomer organizasyonunu, **mavi**: ikincil kalp bölgesinin spesifikasyonu, **yeşil**: kardiyosit farklılaşmasının regülasyonu, **mor**: kalp gelişimi göstermektedir. B'de ise **kırmızı**: kalp kasılmasının düzenlenmesi, **mavi**: kardiyosit farklılaşmasının pozitif regülasyonu, **sarı**: kardiyak doku hücrelerinin farklılaşması, **yeşil**: kalp gelişimi göstermektedir.

NKX2.5 geni için Şekil 4. 23B incelendiğinde 7 günlük kültür süresi sonunda en yüksek ifade *GATA-4* geninde olduğu gibi 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta çıkmıştır. Bu ifade tek başına 5-Aza'nın ve DMSO'nun kullanıldığı gruba göre sırasıyla 22 ve 3,12 katlık artış ile sonuçlanmış olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($p < 0,001$). 5-Aza, DM ve DMSO ayrı ayrı kullanıldığı gruplarda *NKX2.5* ifadesi benzer hesaplanmış olup, DM ve DMSO birlikte kullanıldığı grupta 5-Aza grubu ile kıyaslandığında 8,9 ($p < 0,05$) kat, DMSO grubu ile kıyaslandığında ise 1,26 katlık ($p > 0,05$) artış meydana geldiği hesaplanmıştır. 5-Aza ve DM'in birlikte kullanıldığı grupta elde edilen ifade ile bu iki stimülatörün ayrı ayrı kullanıldığı gruplarda benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p > 0,05$). *NKX2.5* geni ifadesi açısından test edilen gruplarda kontrol grubuna göre aşağı yönde (< 1) ifade sadece 5-Aza'nın tek başına kullanıldığı

grupta görülmüşken (0,78), diğer tüm gruplarda yukarı yönlü (>1) bir ifade olduğu anlaşılmıştır.

MEF2C ifadesi bakımından elde edilen sonuçlar incelendiğinde 7 günlük kültür süresi sonunda en yüksek ifade DMSO'nun tek başına kullanıldığı grupta elde edilmiştir (Şekil 4.23C). Bu fark DM (5,15 kat) ve DM ile 5-Aza'nın (3,48 kat) birlikte kullanıldığı duruma göre anlamlı bulunmuşken ($p<0,01$), diğer gruplar ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$). *GATA-4* ve *NKX2.5* gen ifadelerinin en yüksek çıktığı 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grup ile 5-Aza grubunda *MEF2C* açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p>0,05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında *MEF2C* gen ifadesi biyolojik stimülatörlerin kullanıldığı DM grubunda ve biyolojik stimülatörler ile metilasyon inhibisyonunu sağlayan 5-Aza'nın birlikte kullanıldığı grupta aşağı yönde (<1) meydana gelmişken diğer gruplarda yukarı yönde (>1) meydana gelmiştir.

7 günlük kültür süresi sonunda *CACNA1C* gen ifadesi *MEF2C* geninde olduğu gibi en yüksek DMSO'nun tek başına kullanıldığı grupta elde edilmiş olup bu fark diğer tüm gruplara göre anlamlı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.23D). 5-Aza'nın tek başına kullanıldığı, DMSO ve 5-Aza ile DMSO ve DM'nin birlikte kullanıldığı gruplar ile kıyaslandığında DMSO'nun tek başına kullanıldığı grupta *CACNA1C* geninde sırasıyla 2,75, 1,62 ve 1,9 katlık artış meydana gelmiştir. Test edilen gruplar arasında sadece DM grubunda aşağı yönde (<1) bir azalış meydana gelmiştir.

14 gün sonunda elde edilen *GATA-4* ifadesi incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiş olup, tüm test edilen gruplarda benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p>0,05$). 7 gün sonundaki veriler ile kıyaslandığında 5-Aza+DMSO grubu hariç diğer tüm gruplarda artışın meydana geldiği görülmüştür. Meydana gelen bu artış en fazla DM grubunda görülmüştür (11 kat, $p>0,05$). 7 gün sonunda elde edilen veriler ile kıyaslandığında 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta 14 gün sonunda 2,3 katlık bir azalışın meydana geldiği görülmektedir ($p<0,01$).

14 gün sonunda *NKX2.5* geni için elde edilen sonuçlar, tüm gruplarda benzer sonuçlar elde edildiğini ve 7 günlük kültür süresi sonunda elde edilen ifade ile kıyaslandığında 14 gün sonunda tüm gruplarda azalış meydana geldiğini göstermektedir. En fazla azalış 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta meydana gelmiş olup, 14,8 kat olarak hesaplanmıştır ($p<0,0001$). Diğer gruplarda tespit edilen azalışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı hesaplanmıştır ($p>0,05$).

MEF2C açısından 14 gün sonunda elde edilen veriler incelendiğinde DM grubu ile DM ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta elde edilen farklar istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiş, diğer gruplar arasında ise oluşan farkların anlamlı olmadığı, gruplarda benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür. 7 gün sonundaki veriler ile kıyaslandığında biyolojik stimülatörlerin kullanıldığı gruplar dışında diğer gruplarda 14 gün sonunda *MEF2C* ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. 7 gün sonuçlarına kıyasla DM ve DM ve 5-Aza'nın birlikte kullanıldığı grupta 14 gün sonunda 4 ve 2,5 katlık artış meydana gelmiştir ($p<0,05$). Sadece DMSO'nun kullanıldığı grupta 7 gün sonunda elde edilen sonuçlara kıyasla 14 gün sonunda 2,6 katlık bir azalış meydana geldiği hesaplanmıştır ($p<0,01$).

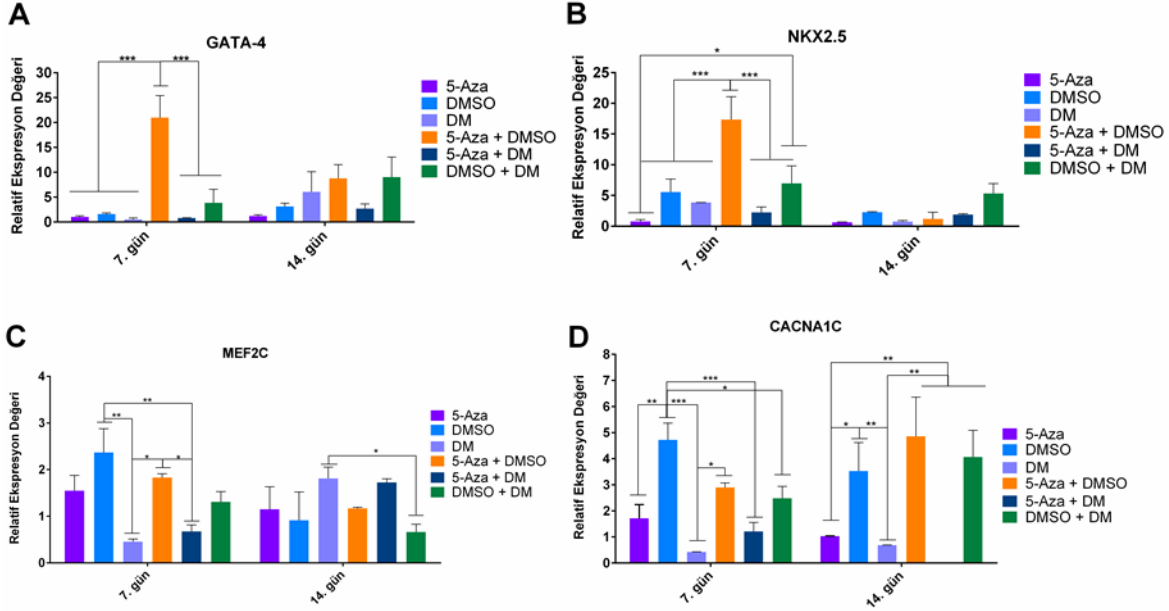
14 günlük kültür süresi sonunda *CACNA1C* ifadesi sonuçları incelendiğinde, DMSO'nun tek başına uygulandığı grupta elde edilen ifade düzeyi tek başına 5-Aza ve DM'nin kullanıldığı gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Kimyasal ve biyolojik stimülatörlerin birlikte kullanıldığı gruplarda (5-Aza+DMSO ve DMSO+DM grupları) elde edilen sonuçlar DMSO'nun tek başına kullanıldığı gruba göre yüksek tespit edilmiştir ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Bunlara ek olarak 14 günlük kültür süresi sonunda elde edilen *CACNA1C* ifadesinin gruplara bağlı olarak artış veya azalış meydana gelse de 7 günlük kültür süresi sonunda elde edilen ifade düzeyi ile benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$).

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında *GATA-4* ve *NKX2.5* gen ifadeleri bakımından rt-MKH'lerinin kardiyomiyositlere farklılaşmasında özellikle 5-Aza ve DMSO birlikte kullanılmasıyla oluşturulan sinerjik etkinin, biyolojik veya kimyasal stimülatörlerin ayrı ayrı kullanılması ile oluşturulan etkiye göre çok daha önemli olduğunu açık bir biçimde göstermiştir. Bu sonuçlar MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılmasında 5-Aza ile birlikte DMSO'nun kullanılabileceğini göstermiştir. EKH'ler kullanılarak yapılan çalışmalarda kardiyomiyosit farklılaştırma ajanı olarak DMSO kullanıldığı ve *GATA-4* ve *NKX2.5* transkripsiyon faktörlerinin yüksek oranda ifade edildiği raporlanmıştır [255, 389]. Ayrıca 5-Aza ve DMSO kimyasal indükleyici ajanların sinerjik etkisinin embriyonik kök hücrelerinin kardiyomiyositlere farklılaşmasında daha fazla etkili olduğu verilerle desteklenmiştir [256]. İnsan kaynaklı yağ dokusu kök hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada kök hücreler 48 sa. boyunca DMSO maruz bırakılmış ve kültür süresi sonunda kardiyak spesifik belirteçlerin ifadesinin (*GATA-4*, *NKX2.5*, Miyozin Ağır ve Hafif zinciri ve alfa Kardiyak Aktin) önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir [257]. Ayrıca kültür süresinin ifade düzeyine etkisi bakımından bu çalışmada

kardiyomiyosit farklılaşmasının belirteci olarak kullanılan genlerde farklı sonuçlar elde edildiği de açıkça görülmektedir. Zamana bağlı olarak test edilen grupların önemli bir kısmında *GATA-4* (5 grup) ifadesinde artış gözlemlenirken, *NKX2.5* (tüm gruplar) ve *MEF2C* (4 grup) ifadesinde azalış meydana geldiği görülmüştür. Bu da kültür süresinin gen ifadesinde kritik bir öneme sahip olduğunu açık bir biçimde göstermiştir.

TGF ailesinin bir üyesi olan BMP ve FGF gelişmekte olan embriyolarda kardiyak transkripsiyon faktörlerinin sentezinin indüklenmesinde önemli bir role sahip oldukları [385] ve pre-kardiyak mezodermal hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında etkili oldukları tespit edilmiştir [390]. *in vivo* koşullarda ise BMP-2'nin kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadesini tetiklediği ve kalp gelişiminde önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır [391]. Bununla birlikte FGF-2'nin kardiyak öncül hücrelerin fonksiyonel kardiyomiyositlere farklılaşması prosesinde etkili olduğu da tespit edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak kardiyomiyosit farklılaşmasında TGF- β süper ailesi üyelerinden TGF- β 1 faktörlerinin etkili olduğu bilinmektedir [263]. TGF- β 1 ve 5-Aza'nın kardiyomiyosit farklılaşmasına olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmada TGF- β 1'nin tek başına kullanıldığı deney grubunda kardiyomiyosit farklılaşma belirteçlerinden *GATA-4*, *cTroT*, *konneksin 43*, kardiyak aktin ve *MLC-2a*'nın ifadesinin 5-Aza grubu ile paralellik gösterdiği tespit edilmiştir [264]. Ayrıca başka bir çalışmada BMP-2, FGF-2 ve IGF-1 büyüme faktörlerini içeren serumsuz hücre kültürü ortamı kullanılmış ve *in vitro* da sıçan kemik iliği MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması noktasında başarılı sonuçlar alındığı ifade edilmiştir [265]. Bu çalışmada, bileşiminde biyolojik stimülatör olarak kullanılan TGF- β 1, BMP-2 ve FGF-2 (FGF basic olarak da bilinmektedir) büyüme faktörlerini bulunduran DM grubu kullanılarak zamana bağlı kök hücre farklılaşmasının 5-Aza ile kıyaslanması amaçlanmıştır. Zamana ve test edilen gruplara bağlı olarak elde edilen *MEF2C* gen ifade düzeyi dikkate alındığında 14 günlük kültür süresi sonunda biyolojik stimülatörlerin kullanıldığı gruplarda daha yüksek gen ifadesi elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuç bu genin ifadesi açısından eğer büyüme faktörleri temelli bir farklılaştırma prosedürü kullanılacak ise uzun süreli kültürün tercih edilmesi gerektiği sonucuna varmamızı sağlamıştır. Bununla birlikte elde edilen sonuçlar *GATA-4* ekspresyonu açısından incelendiğinde DM grubunda 14 gün sonunda 5-Aza'ya göre artış meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ancak 5-Aza ve DM grubunun beraber kullanıldığı deneysel çalışmada *GATA-4*, *NKX2.5*, *MEF2C* ve *CACNA1C* genlerinin ifade profili 7 günlük kültür süresi

sonunda DM grubu ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Bu da 5-Aza ile biyolojik faktörlerin beraber kullanılmasının kök hücre farklılaşmasında önemli bir katkı sağlamadığını düşündürmektedir.



Şekil 4.23. Çeşitli biyolojik ve kimyasal ajanların ayrı ayrı veya beraber kullanılarak 2B kültür sisteminde kültüre edilen rt-MKH'lerde zamana bağlı olarak (A) GATA-4, (B) NKX2.5, (C) MEF2C ve (D) CACNA1C gen ifadelerine ait qPCR analiz sonuçları (***) $P<0,001$, ** $P<0,01$, * $P<0,05$).

Literatür verileri incelendiğinde kimyasal stimülatörlerin kullanılması ile kasılma fonksiyonuna sahip kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin elde edilmediği görülmektedir [17, 249, 250]. Buna karşın GATA-4, MEF2C, ve TBX5 transkripsiyon faktörlerin fibroblast hücrelerine ifade ettirilmesi ile elde edilen hücre popülasyonunda kasılabilen hücre miktarının %0,5 olduğu tespit edilmiştir [392]. Yapılan çalışmada farklı kimyasal ve biyolojik ajanların sinerjik etkisi altında kemik iliği rt-MKH'lerin kasılabilen fonksiyonel kalp kası hücrelerine farklılaştırılmaları hedeflenmiş ancak yapılan mikroskopik gözlemler kültür süresi boyunca kasılan hücre varlığı tespit edilememiştir. Ancak morfolojik ve gen düzeyinde yapılan analizler sırasıyla kök hücrelerin uzadığını ve erken dönem kalp kası transkripsiyon faktörlerini ifade ettiklerini göstermiştir. Fonksiyonel kalp kası hücrelerinin elde edilememesi literatür verileri ile örtüşmektedir.

4.2.1.3. Kardiyak Spesifik Proteinlerin İfadesi

qPCR analizi 7 günlük kültür süresi sonunda *GATA-4* ve *NKX2.5* gen ifadeleri açısından en yüksek sonucun 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta elde edildiğini göstermiştir. Dolayısıyla erken dönem kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinden sorumlu genlerde meydana gelen bu artış rt-MKH'lerin başkalaşım sürecine girdiğinin bir göstergesi olduğu düşünülmüş ve bu durumun protein düzeyinde kardiyak spesifik proteinlerin ifadesinin tespit edilmesi ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu amaçla rt-MKH'leri 5-Aza ve DMSO'ya maruz bırakılmış ve 14 gün sonunda kardiyak spesifik proteinlerinden Cnx43, SAC, cTroT ve α -SMA protein ifadelerine immünfloresan boyama ile bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

İmmünfloresan sonuçları, 5-Aza ve DMSO'nun sinerjik etkisi altında rt-MKH'lerin Cnx43, SAC, cTroT ve α -SMA proteinlerini yüksek düzeyde ifade ettiklerini ve kontrol gruba göre önemli düzeyde artış meydana geldiğini göstermiştir (Şekil 4.24). Dolayısıyla rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştıkları ifade etmek mümkündür. Kontrol grubunda ise test edilen proteinlerin düşük düzeyde pozitif oldukları görülmüştür (Şekil 4.24 Panel B). Literatür verileri incelendiğinde MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasının hedeflendiği çalışmalarda kontrol grubunda kardiyak spesifik belirteçlerin (transkripsiyon ve translasyon düzeyinde) pozitif [250, 393] veya negatif [334, 394] olduklarının bulgularla desteklendiği görülmüştür. Bu çalışmada ise daha önce de ifade edildiği üzere kontrol grubunda düşük de olsa kardiyak spesifik proteinlerin ifadesi bakımından pozitif olan hücreler tespit edilmiştir. Bu durumun meydana gelmesinde kullanılan hücre kültür koşulları, hücrelerin izole edildiği kaynağın yaş veya fizyolojik özellikleri ve kullanılan hücrelerin pasaj numarası gibi parametrelerin etkili olabileceği düşünülmektedir.

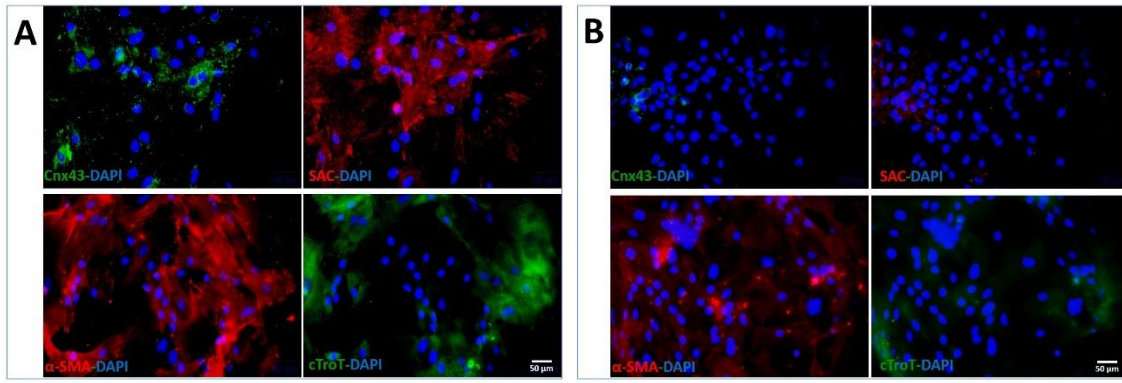
Gap bağlantılarının oluşmasından sorumlu olan 20 farklı konneksin arasında, Cnx40, Cnx43 ve Cnx45 kalp dokusunda ifade olmaktadır. Bu üç konneksin arasında Cnx43 fonksiyonel kalp kası hücresinde baskın bir biçimde ifade olmaktadır [395]. Elektriksel iletimin ve metabolitlerin kalp hücreleri arasında iletilmesinden ve kaderin bağlantıların oluşmasından sorumlu olan Cnx43, gap bağlatıları ile ilintili bir protein olup, bu proteinin ifadesi kök hücre temelli kardiyomiyojenik farklılaşmalarda artmaktadır [396]. Bu çalışmada immünfloresan analizi sonuçları Cnx43 ifadesinin kontrol grubuna göre önemli bir oranda arttığını ve konneksinlerin hücre stoplazması boyunca dağılarak hücre çekirdeği etrafında belirgin bir biçimde yoğunlaştıklarını göstermiştir. Az da olsa yer yer

rt-MKH'lerin sınırlarında görülebildikleri de gözlemlenmiştir [397]. Bununla birlikte bazı hücrelerde yoğun pozitif boyama görülürken bazılarında daha az sayıda ve nokta şeklinde hücre stoplazmasına dağılmış Cnx43 görülmüştür (Şekil 4.24 Panel A). Vreeker ve ark. insan kalp dokuları ile yaptıkları çalışmada doğumdan önce 30 haftalık olan bebeklerden aldıkları örneklerde Cnx43'lerin tamamen hücre stoplazmasında, doğumdan sonra 5 aylık bebeklerden aldıkları örneklerde Cnx43'ün hem stoplazma hem de yanal membranda, 7 yaşındaki çocuklardan alınan örneklerde ise tamamen yanal mebranda lokalize olduğunu tespit etmişlerdir [398]. Bu bilgiler ve çalışmamızda Cnx43 için elde edilen immünreaktivite sonuçları göz önünde bulundurulduğunda elde edilen kardiyomiyositlerin erken dönem (fetal dönem) özellikleri taşıdıkları ve olgunlaşmamış kardiyomiyositler olarak nitelendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasının hedeflendiği çalışmalarda α -SMA belirteç olarak kullanılmış [334] ve ayrıca insan kaynaklı kardiyomiyositlerde ifade olduğu da gösterilmiştir [244]. Bununla birlikte erken dönem kalp gelişiminde α -SMA eksprese olduğu ve kalp gelişimin geç evrelerinde ortadan kalktığı ifade edilmiştir [399]. Prenatal dönemde sıçan kalp dokusunda α -SMA'nın kardiyomiyositlerin olgunlaşmasında oldukça kritik öneme sahip olduğu da bildirilmiştir [400]. Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada da α -SMA kardiyomiyojenik farklılaşmanın belirteci olarak kullanılmıştır. Yapılan immünofloresan analizi, 14 günlük kültür süresi sonunda rt-MKH'lerin α -SMA ifadesi bakımından yüksek oranda pozitif olduklarını göstermiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise α -SMA ifadesinin test grubunda önemli miktarda artışı anlaşılmaktadır. Bu sonuç Kumar ve ark. yaptıkları çalışmada elde edilen sonuçlar ile örtüşmekte olup [334], diğer belirteçlerin sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde rt-MKH'lerin kardiyomiyosit hücrelerine farklılaştıklarını düşündürmektedir. Ayrıca yukarıda da ifade edildiği üzere, erken dönem kalp gelişiminde α -SMA'nın ifade olduğu ve zamanla bu ifadenin ortadan kalktığı bilinmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin kalp dokusundaki erken dönem kardiyomiyosit özelliklerini taşıdığı ve olgunlaşmamış kardiyomiyosit olarak nitelendirilebileceği düşünülmektedir.

İnce filamentlerin birer bileşeni olan troponin proteinleri, çizgili kasların kasılma-gevşeme döngüsünde ve kalbin kan pompalama dinamiğinin düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir [401]. Kardiyak troponin kompleksi, kardiyak troponin I (cTroI), cTroT ve kardiyak troponin C (cTroC) olmak üzere 3 alt birimden oluşmaktadır. cTroI ve

cTroT'in serumdaki düzeyleri kalp krizinin teşhis edilmesi için belirteç olarak kullanılmaktadır [402]. Ayrıca fetal ve yetişkin dönemde cTroT ifadesinin kalp kası hücrelerinde yüksek oranda ifade olduğu ancak çizgili kas hücrelerinde fetal dönemde az da olsa ifade olduğu, yetişkin dönemde ise ifade olmadığı gösterilmiştir [403]. Dolayısıyla, bu çalışmada cTroT ifadesi kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin tespit edilmesinde belirteç olarak kullanılmıştır. Markmee ve ark. yaptıkları çalışmada cTroT'nin hücre sitoplazmasında lokalize olduğunu raporlamışlardır [404]. Aynı şekilde Jain ve ark. yaptıkları çalışmada insan kaynaklı kemik iliği mezenkimal kök hücrelerini 5-Aza maruz bırakmış ve yapılan immünfloresan boyama cTroT ifadesinin stoplazmada hücre çekirdeği etrafında lokalize olduğunu göstermiştir [405]. Bunlara ek olarak Asumda ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan kemik iliğinden izole ettikleri kök hücreleri çeşitli büyüme faktörlerine maruz bırakarak kardiyomiyositlere farklılaştırmış ve elde ettikleri bu hücrelerde kardiyak tropoinlerin lokalizasyonunu (cTroT, cTroI ve cTroC) araştırmışlardır. Yapılan analizler, farklılaşma prosedürünün 5. gününden itibaren cTroT'nin hem stoplazmada hem de hücre çekirdeğinde lokalize olduğunu ve bu lokalizasyon paternin neonatal kardiyomiyositlerde de olduğunu göstermiştir [406]. Bu çalışmada da immünfloresan analiz sonuçları 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanılmasından sonra cTroT'in hücre stoplazmasında ancak daha yoğun olarak hücre çekirdeği etrafında lokalize olduğunu açık bir biçimde göstermiş olup bu sonucumuz literatür verileri ile örtüşmektedir. Yanı sıra cTroT'nin lokalizasyon paterni ve Asumda ve ark. yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlar bu çalışmada elde edilen kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin neonatal (olgunlaşmamış) kardiyomiyosit özelliğinde olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 4.24. Kardiyak spesifik proteinlerin immüno Floresan boyama ile aktivitelerinin tespit edilmesi. Panel A) 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta 14 günlük kültür süresi sonunda tespit edilen kardiyak spesifik proteinlerin ifadesi, Panel B) 14 günlük kültür süresi sonunda kontrol grubunda tespit edilen kardiyak spesifik proteinlerin ifadesi. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiştir. Ölçek çizgisi 50 μ m

α -aktinin hem çizgili hem de kalp kasında bulunan ve aktin filamentlerini birbirine bağlayan bir proteindir [407]. Efe ve ark. yaptıkları çalışmada fibroblast hücrelerine Yamanaka faktörlerini (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) yüksek düzeyde ifade ettirmiş ve ardından bu hücreleri BMP-4 içeren farklılaştırma ortamı ile kültüre ettiklerinde kasılabilir kardiyomiyositler elde edildiğini göstermiştir. Yapılan analizler kasılan hücrelerde α -aktinin ifade olduğunu ve bu proteinin hücre stoplazmasında lokalize olduğunu göstermiştir [408]. Öte yandan Cnx43 ifadesi ile birlikte kardiyak alfa aktinin ifadesinde meydana gelen artış, insan kaynaklı göbek kordonu kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşması ile pozitif yönde korelasyon göstermiştir [396]. Bu çalışmada da 5-Aza ve DMSO ile muamele edilen rt-MKH'lerinin 14 gün sonunda SAC ifadesi immüno Floresan boyama ile araştırılmış ve kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). SAC ifadesi hücre stoplazmasında görülmüştür [409]. Yetişkin kardiyomiyositlerde α -aktinin proteinlerinin F-aktin filamentlerini çapraz bağlayarak Z diskinin stabilitesini sağlamakta [410] ve mikroskop altında bakıldığında hücre eksenine dik bir biçimde lokalize oldukları görülmektedir. Ancak bu çalışmada SAC proteinleri hücre stoplazmasında dağılmış şekilde görülmüş olup, hücre eksenine dik lokalizasyon paterni tespit edilememiştir. Diğer proteinlerin (Cnx43, cTroT ve α -SMA) lokalizasyon paterni de göz önünde bulundurulduğunda SAC için gözlemlenen

paterninin elde edilen hücrelerin olgunlaşmamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak immünfloresans boyama sonuçları 5-Aza ve DMSO maruz bırakılan rt-MKH'lerin kardiyak spesifik proteinlerini yüksek düzeyde ifade ettiğini, dolayısıyla kardiyomiyositlere başarılı bir biçimde farklılaştığını göstermiştir. Ancak elde edilen protein paterni, bu çalışmada kök hücrelerin farklılaştırılması ile elde edilen kardiyomiyositlerin olgunlaşmamış özellikte ve organize sarkomer yapısına sahip olmadıklarını göstermektedir. Bu nedenle, daha olgun ve yetişkin kardiyomiyositlere benzer özelliklere sahip kardiyomiyositlerin elde edilmesi için küçük molekülleri içeren daha etkin protokollerin araştırılmasına devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmış ve aşağıda detayları verilen çalışmalar yapılarak, sonuçlar sunulmuştur.

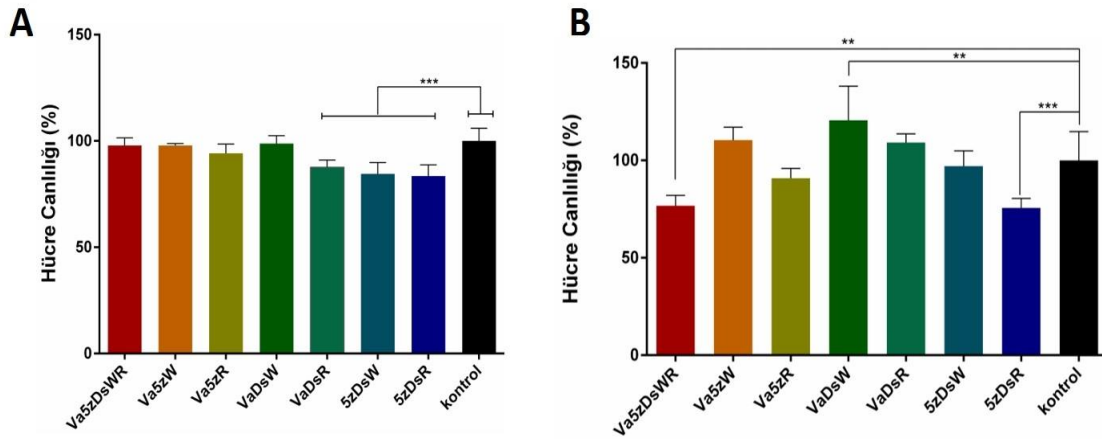
4.2.2. Epigenetik Yeniden Programlama ve Biyolojik Yolak Manipülasyonun Kardiyomiyosit Farklılaştırılmasına Etkisi

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde iki farklı MKH kaynağı kullanılarak epigenetik yeniden programlama ajanları ve kardiyomiyogenezde etkisi olduğu bilinen biyolojik yolakların manipülasyonu ile kardiyomiyositlerin eldesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kök hücre kaynağının kardiyomiyojenik farklılaşmadaki etkisini araştırmak amacıyla h-MKH ve rt-MKH olmak üzere iki farklı MKH kullanılmıştır. Epigenetik yeniden programlamayı (metilasyon inhibisyonu ve asetilasyon aktivasyonu) sağlamak amacıyla 5-Aza ve Va, biyolojik yolak manipülasyonu sağlamak amacıyla ise IWP-2 (W, WNT yolak inhibitörü) ve repsox (R, TGF- β inhibitörü) kullanılmıştır. Bunlara ek olarak 5-Aza ile birlikte kullanıldığında kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında etkiliği olduğunu gösterdiğimiz DMSO da farklılaştırma prosedürüne eklenmiştir. Her iki kök hücre kaynağında çeşitli kombinasyonlarda olmak üzere epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonunu sağlayan küçük moleküller denenmiş ve kültür süresi sonunda hücre canlılığı, hücre morfolojisi, kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadesini sağlayan genlerin ekspresyonu ve kardiyak spesifik proteinlerin ifadesi analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

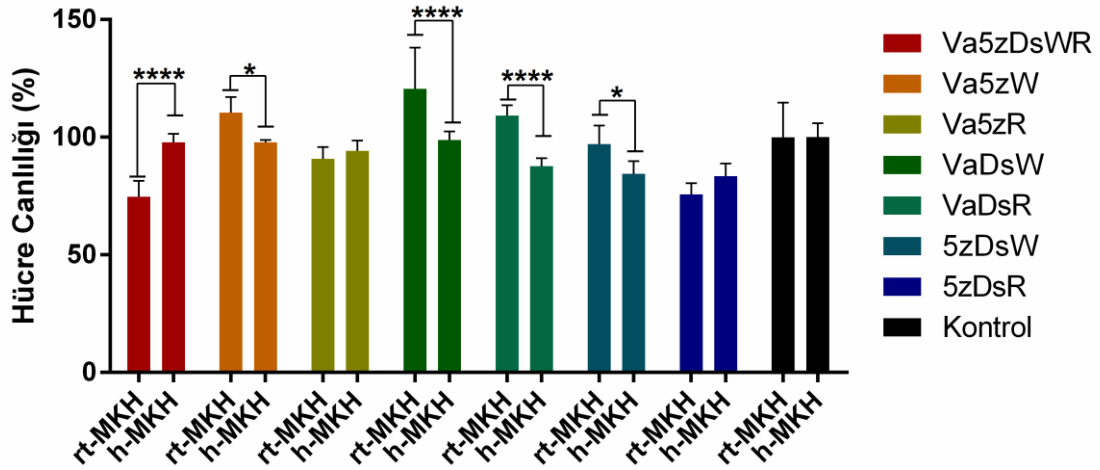
4.2.2.1. Hücre Canlılığı

MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasının tetiklenmesi için küçük moleküllere maruz bırakılmasının ve küçük moleküllerin test edilen konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde etkisinin olup olmadığının araştırılması için kök hücreler tespit edilen

kombinasyonlarda küçük moleküller ile uyarılmış ve kültürün 7. gününde MTT yapılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. MTT sonuçları h-MKH'lerin canlılığının tüm kombinasyonlarda %80'in üzerinde olduğunu göstermiştir. Va5zDsWR, Va5zW, Va5zR ve VaDsW gruplarında ölçülen hücre canlılığı kontrol grubu ile benzer bulunmuşken ($p>0,05$), VaDsR, 5zDSW ve 5zDsR gruplarında anlamlı düzeyde kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 4.25 A). rt-MKH'lerin MTT sonuçları hücre canlılığının 5zDsR ve Va5zDsRW gruplarında sırasıyla %75 ($p<0,001$) ve %76 ($p<0,01$) olarak ölçüldüğünü, diğer tüm gruplarda ise %90'nın üzerinde olduğunu göstermiştir. VaDsW grubunda elde edilen hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,01$) bulunmuşken diğer gruplarda kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.25 B).



Şekil 4.25. A) h-MKH ve B) rt-MKH kök hücrelerine uygulanan küçük molekül kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Deneysel gruplar ile kontrol arasında elde edilen verilerin istatistiksel analizi tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmış olup, gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma Bonferroni testi kullanılarak yapılmıştır. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ temsil etmektedir.



Şekil 4.26. Hücre kaynağına ve uygulanan küçük molekül kombinasyonlarına göre elde edilen % hücre canlılık verileri. rt-MKH: Sıçan kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreleri; h-MKH: İnsan kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreleri; Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi iki yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmış olup, gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma Bonferroni testi kullanılarak yapılmıştır. * $p<0,05$ ve **** $p<0,0001$ temsil etmektedir.

Hücre kaynağının ve uygulanan kombinasyonların hücre canlılığına olan etkisine dair MTT sonuçları Şekil 4.26’te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre; Va5zW, VaDsW, VaDsR ve 5zDsW gruplarında elde edilen hücre canlılığı rt-MKH’lerinde daha yüksek bulunmuşken (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,05$), Va5zDsWR grubunda h-MKH’lerinde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). Diğer gruplarda hücre canlılığı her iki hücre kaynağında benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Bu sonuçlar hücre canlılığı açısından hücre kaynağının farklı sonuçlara neden olduğu ve rt-MKH’lerin daha yüksek hücre canlılığına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada her bir küçük molekül için test edilen konsantrasyonların hücre canlılığı açısından önemli bir toksisite oluşturmadığı, devam eden deneylerde test edilen konsantrasyonların güvenli bir şekilde kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Va’nın kanser hücrelerinde doz ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığını düşürdüğü raporlanmıştır [411]. Bu nedenle bu çalışmada küçük moleküllerle yapılan uyarımlardan sonra hücre canlılığının tespit edilmesi gerektiği düşünülmüştür. Literatür verileri incelendiğinde insan kaynaklı yağ doku kök hücreleri ile yapılan doz çalışmasında 1 mM

Va konsantrasyonunun güvenilir doz olduğu, daha yüksek Va konsantrasyonlarının (>2 mM) ise hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir [394]. Ayrıca; 1 mM Va'nın endotel öncül hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasında başarılı sonuçlar verdiği de raporlanmıştır [412]. Dolayısıyla bu çalışmada da Va konsantrasyonu olarak 1mM Va kullanılmış ve MTT sonuçları asetilasyon aktivasyonunu sağlayan Va'nın kullanıldığı gruplarda yüksek hücre canlılığı (>%76) elde edildiğini göstermiş olup, bu sonuçların literatür verileri ile örtüştüğünü söylemek mümkündür. Sonuç olarak; Va aracılıklı asetilasyon aktivasyonunun hücre canlılığında düşüşe neden olmadığı görülmüştür.

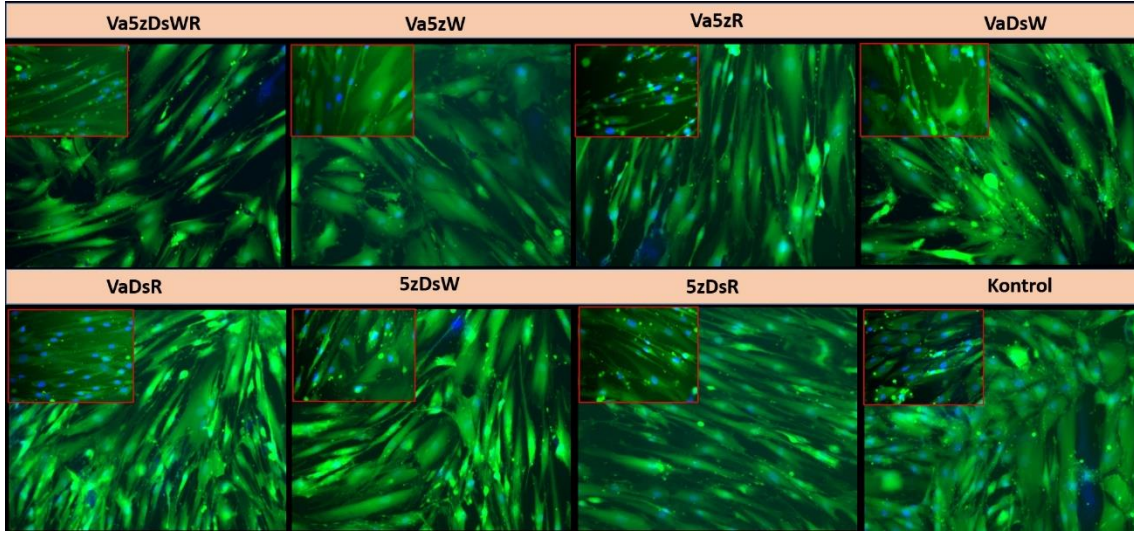
IWP-2 omurgalılarda kalp gelişiminde oldukça önemli olan WNT sinyal yolağının inhibisyonunu sağlayan küçük bir moleküldür [19]. Bu molekülün WNT yolağının inhibisyonunu O-asetiltransferaz ailesinden olan “*porcn*” proteini üzerinden sağladığı tespit edilmiştir [413]. IWP-2 molekülünün kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [414]. Dolayısıyla bu çalışmada da IWP-2 kaynaklı bir toksisite oluşup oluşmadığının test edilmesi gerektiği düşünülmüş ve MTT analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler ışığında 5 µM IWP-2'nin kullanıldığı gruplarda her iki hücre tipinde toksik etki meydana getirmediğini, dolayısıyla WNT yolağının inhibisyonu kaynaklı hücre canlılığında bir azalış meydana gelmediği sonucuna varılmıştır.

TGF-β reseptörlerinden ALK5'nin küçük moleküller ile inhibisyonunun kalp krizi sonrasında yara bölgesinde NKX2.5 pozitif kardiyomiyositlerinin oranını artırarak doku rejenerasyonunu sağladığı tespit edilmiştir [415]. Bununla birlikte fibroblast hücrelerine GATA-4, HAND2, MEF2C, TBX5, miR-1 ve miR-133 (GHMT2m) gibi faktörlerinin ifade ettirilmesi ile direkt olarak kardiyomiyositlerin elde edilmesi veriminin TGF-β inhibisyonu ile artılacağı da ifade edilmiştir [416]. Son olarak insan pluripotent kök hücrelerinde RepSox aracılıklı TGF-β reseptörlerinden ALK-5'in inhibisyonun kardiyomiyositlerin elde edilmesinde kritik rol aldığı rapor edilmiştir [272]. Dolayısıyla bu çalışmada MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması amacıyla RepSox kullanılarak ALK-5'in inhibisyonunun sağlanması ve kardiyomiyositlerin elde edilmesi amaçlanmış olup ALK-5'in inhibisyonunun hücre canlılığı üzerine olan etkisinin olup olmadığının araştırılması amacıyla MTT yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar RepSox kaynaklı toksik bir etkinin (Canlılığın %70'in altında olmasıdır.) görülmediğini ancak rt-MKH'lerinde en düşük hücre canlılığının (%75) 5-Aza, DMSO ve RepSox'un birlikte kullanıldığı grupta elde edildiğini göstermiştir.

4.2.2.2. Hücre Morfolojisi

rt-MKH'leri ve h-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarının sağlanması için kullanılan protokollerin hücre morfolojisinde değişim meydana getirip getirmediğinin anlaşılması amacıyla her iki hücre tipi küçük moleküllere maruz bırakılarak kardiyomiyojenik farklılaştırılma indüklenmiş ve 7 gün sonunda hücre morfolojilerinin tespit edilmesi için Canlı&ölü analizi yapılmış ve hücreler floresan mikroskop altında incelenmiştir. h-MKH'leri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'te ve rt-MKH'leri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.28'de verilmiştir.

Canlı&ölü hücre analizi sonuçları test edilen tüm gruplarda ve kontrol grubunda h-MKH'lerin canlılığının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.27). Bu sonuç MTT sonuçlarını destekler niteliktedir. Hücre morfolojisi açısından değerlendirildiğinde ise test edilen tüm farklılaştırma prosedürlerinde uzamış ve iğsi morfolojide hücreler gözlemlenmiş olup [351] uygulanan farklılaştırma prosedürleri arasında belirgin bir fark tespit edilmemiştir. Test edilen tüm prosedürlerde uzamış ve iğsi morfolojideki hücreler kültürde baskın olmasına rağmen, yer yer boyut ve genişlik bakımından daha büyük hücreler de görülmüştür. Şekil 4.25'te yer alan 20X büyütme ile çekilmiş görüntülerde tüm prosedürlerde uzun ve ince yapıya sahip hücreler açık bir biçimde görülmektedir. Kontrol grubunda ise yayılmış, boyut olarak daha büyük ve geniş hücreler baskın popülasyon olarak gözlemlenmiştir. Test edilen tüm farklılaştırma prosedürlerinde elde edilen iğsi ve uzamış hücrelerin yan yana dizildikleri ancak kontrol grubunda ise hücrelerin rastgele dizildiği görülmüştür. (Şekil 4.27). Farklılaştırma prosedürlerinin uygulamasında sonra h-MKH'lerin morfolojisinde meydana gelen değişim, uygulanan küçük moleküllerin hücre iskeletinde açık bir biçimde değişimlere ve kültürde kardiyomiyosit benzeri hücrelerin gelişmesine neden olduğunu göstermektedir [397].

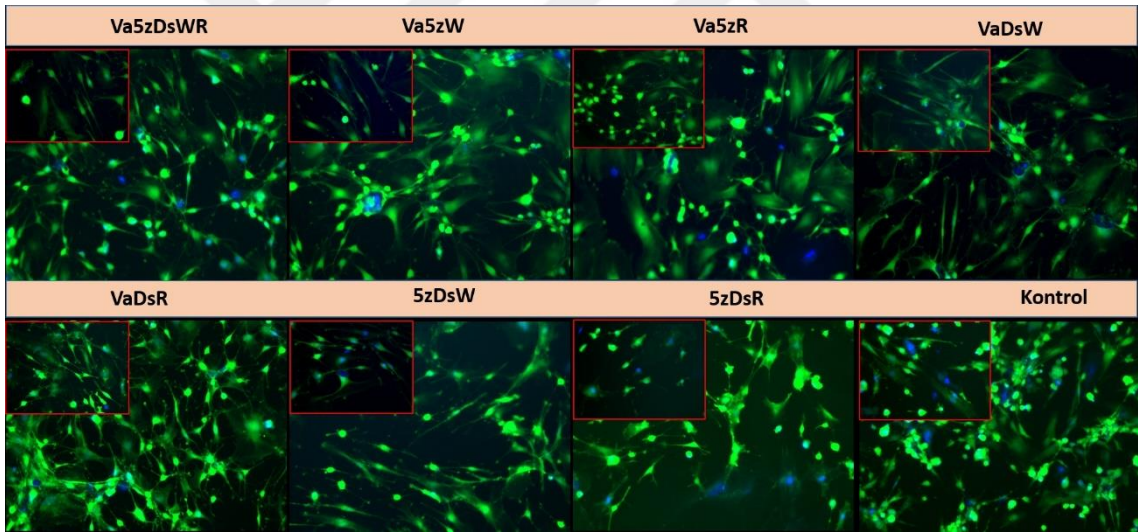


Şekil 4.27. h-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için kullanılan farklılaştırma prosedürlerinden sonra hücrelerde meydana gelen morfolojik değişim ve hücre canlılığı. Büyük fotoğraflar 10X, küçük fotoğraf 20X büyütmede çekilmiştir. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiş olup mavi renkte görünmektedir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox

rt-MKH'lerin canlı&ölü analizi sonuçları hücre canlılığı bakımından test edilen tüm farklılaştırma prosedürlerinde yüksek hücre canlılığının elde edildiğini ve hücre canlılığı açısından gruplar arasında belirgin bir fark oluşmadığını göstermiştir. Hücre morfolojisi açısından değerlendirildiğinde ise kültürde tespit edilen hücre morfolojisi bakımından heterojen bir görünümün ortaya çıktığı gözlemlenmiş olup, üç farklı morfolojide hücre tespit edilmiştir. Bunlar; i) uzamış iğsi hücreler, ii) küçük ve ince stoplazmik uzantıları olan yıldız şeklinde hücreler ve iii) büyük ve geniş hücreler [394]. Tüm küçük moleküllerin bir arada kullanıldığı prosedürde (Va5zDsWR) bu durum açık bir biçimde görülmektedir. Uzamış ve iğsi morfolojiye sahip hücreler IWP-2 aracılıklı WNT yolak inhibisyonunun yapıldığı gruplarda daha fazla iken, RepSox aracılıklı TGF- β yolak inhibisyonunun yapıldığı gruplarda küçük, ince stoplazmik uzantıları olan yıldız biçiminde hücrelerin daha fazla olduğu görülmüştür. Va aracılıklı asetilasyon aktivasyonu, 5-Aza aracılıklı metilasyon inhibisyonu ve RepSox aracılıklı TGF- β yolak inhibisyonunun birlikte yapıldığı grupta diğer gruplara kıyasla daha fazla sayıda yıldız biçiminde ve yer yer büyük ve geniş hücreler gözlemlenmiştir. İğsi ve uzamış morfolojiye sahip hücrelerin ise daha çok Va, DMSO ve IWP-2'nin birlikte kullanıldığı grupta görüldüğü anlaşılmıştır. Kontrol grubunda da yer yer iğsi ve yıldız biçimde

morfolojiye sahip hücreler görülmüştür ancak test edilen farklılaşma prosedürlerinde elde edilene göre daha az sayıdadır. Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak farklılaştırma prosedürlerinde kullanılan ve epigenetik yeniden programlama ile biyolojik yolak manipülasyonu noktasında etkili olan küçük moleküllerin hücre morfolojisini bariz bir biçimde değiştirdiği, dolayısıyla hücre farklılaşmasını tetiklediği sonucuna varılmıştır.

Yukarıda sonuçları verilen ve biyolojik ve kimyasal moleküllerin birlikte kullanılması ile rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasının hedeflendiği çalışmada, farklılaştırma prosedürlerinden (Tablo 3.4) sonra kültürde bazı gruplarda uzamış ve iğsi morfolojiye sahip olan hücreler gözlemlenmiştir. 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta ise uzamış ve iğsi yapıda hücreler belirgin bir biçimde gözlemlenememiştir (Şekil 4.21). Bu kısımda ise rt-MKH'lerin farklılaştırma prosedürlerinden sonra morfolojileri gözle görülür bir biçimde değiştirdikleri ve kültürde uzamış, iğsi ve yıldız şeklinde hücreler görülmüştür. Tespit edilen bu farkın 5-Aza ve DMSO'nun yanında IWP-2 ve RepSox gibi yolak inhibitörlerinin kullanılmasına dayandırılmıştır.



Şekil 4.28. rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırılması için kullanılan farklılaştırma prosedürlerinden sonra hücrelerde meydana gelen morfolojik değişim ve hücre canlılığı. Büyük fotoğraflar 10X, küçük fotoğraf 20X büyütmede çekilmiştir. Hücre çekirdekleri DAPI ile işaretlenmiş olup mavi renkte görünmektedir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.

Farklılaşma prosedürlerin uygulamasından sonra h-MKH ve rt-MKH'lerinde meydana gelen değişimler kıyaslandığında açık bir biçimde hücre kaynağının hücre morfolojisi açısından fark oluşturduğu anlaşılmaktadır. Yukarıda da bahsedildiği üzere h-MKH'lerin kullanıldığı çalışmada tüm farklılaşma prosedürlerinde baskın olan hücre morfolojisinin uzamış ve iğsi yapıdır. Ve bu morfoloji kültürde homojen olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.27). rt-MKH hücreleri ile yapılan çalışmada ise uygulanan farklılaştırma prosedürüne bağlı olarak farklı sonuçlar elde edildiği ve kültürde uzamış ve iğsi hücre morfolojisinin yanında küçük boyutta ve yıldız şeklinde hücre morfolojisi elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.28). Tespit edilen bu belirgin fark, hücrelerin epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonlarına farklı şekilde cevap verdiği ve oluşan bu cevaba bağlı olarak da hücrelerin farklı şekilde hücre iskeletini yeniden organize ettiğini düşündürmüştür. Her iki hücre tipinde meydana gelen morfolojik değişim başkalaşım süreçlerinin başarılı bir biçimde tetiklendiğini göstermiştir. Meydana gelen bu değişimin kardiyomiyojenik farklılaşma olup olmadığının tespit edilmesi için kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin ve proteinlerinin ifadelerine bakılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.2.2.3. Kardiyak Spesifik Genlerin İfadesi

Kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin ifadesinden sorumlu olan genlerin (*GATA-4*, *NKX2.5*, *TBX5* ve *MEF2C*) uygulanan farklılaştırma prosedürüne bağlı olarak oluşan ekspresyon profilinin tespit edilmesi amacıyla qPCR analizi yapılmıştır. Bu genlerden neden *GATA-4*, *NKX2.5* ve *MEF2C*'nin belirteç olarak kullanıldığı yukarıda detaylı bir biçimde açıklanmıştır. Bu kısımda bu genlerle birlikte daha önce yapılan çalışmalarda kardiyak farklılaşmanın belirteci olarak kullanılan [417-419] "*T-box transcription factor 5*" (*TBX5*) de çalışmaya dahil edilmiştir.

h-MKH Kaynaklı Hücrelerde Kardiyak Spesifik Genlerin İfadesi: h-MKH'leri farklılaştırma prosedürlerine maruz bırakılmış ve 7 gün sonunda elde edilen kardiyak spesifik gen ifade profili Şekil 4.29'de verilmiştir. Elde edilen qPCR sonuçları incelendiğinde hedef belirteçlerin ifadesinin kullanılan farklılaştırma prosedürüne bağlı olarak değişiklik gösterdiği açık bir biçimde görülmektedir. *GATA-4* ifadesi açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla 5-Aza, DMSO ve IWP-2 küçük moleküllerinin birlikte kullanıldığı grupta yaklaşık 13 katlık bir artışın meydana geldiği görülmekte olup ($p < 0,0001$), en yüksek ifadenin bu grupta olduğu tespit edilmiştir. Diğer gruplarda ise *GATA-4* ifadesi kontrol grubu ile benzer bulunmuştur ($p > 0,05$).

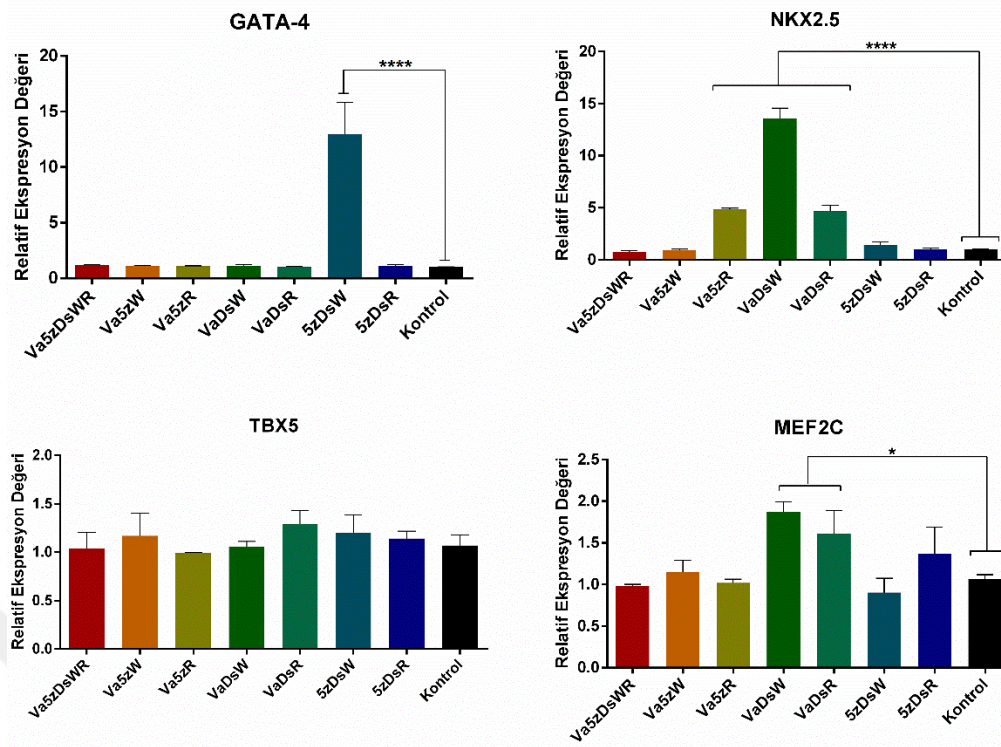
Kardiyomiyojenik farklılaşmanın erken dönem belirteci olarak kullanılan *NKX2.5* ifadesine bakıldığında, 3 grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış sağlandığı açık bir şekilde görülmektedir ($p<0,0001$). *NKX2.5* ifadesi kontrol grubuna göre Va5zR, VaDsW ve VaDsR gruplarında sırasıyla yaklaşık olarak 5, 15 ve 5 kat olarak artış tespit edilmiştir. Diğer gruplarda ise kontrol grubuna benzer bir profil elde edilmiştir. En yüksek *NKX2.5* ifadesi Va, DMSO ve IWP-2 küçük moleküllerinin birlikte kullanıldığı grupta ölçülmüştür. *TBX5* ifadesi açısından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, farklılaştırma prosedürleri ve kontrol grubu arasında bir farkın oluşmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Ancak *MEF2C* açısından incelendiğinde VaDsW ve VaDsR gruplarında gen ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu artış Va, DMSO ve IWP-2'nin birlikte kullanıldığı grupta 1,8 kat, Va, DMSO ve RepSox'nin birlikte kullanıldığı grupta ise 1,6 kat olarak hesaplanmıştır. Diğer gruplarda kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p>0,05$).

h-MKH'lerin qPCR sonuçları metilasyon inhibisyonu ve asetilasyon aktivasyonu ile WNT ve TGF- β yolaklarının aynı anda modüle edilmesinin (Va5zDsWR) transkripsiyon düzeyinde kardiyomiyojenik farklılaşmayı tetikleyemediğini göstermiştir. Bu sonucun muhtemel sebebi özellikle ard arda WNT ve TGF- β yolaklarının inhibe edilmesinin kardiyomiyojenik farklılaştırma açısından ortaya çıkması muhtemelen olumlu etkinin de baskılanmış olması olarak düşünülmüştür. Çünkü daha önce yapılan çalışmalarda, SAHA (asetilasyon aktivasyonu sağlamaktadır) ve 5-Aza'nın (metilasyon inhibisyonunu sağlayamaktadır) birlikte kullanılması durumunda, bu iki moleküllerin birbirleri ile sinerjik ya da antagonist etki göstermedikleri tespit edilmiştir [420]. Yine de WNT ve TGF- β yolaklarının ard arda baskılanmasının h-MKH'lerinde kardiyomiyojenik farklılaşmayı transkripsiyon düzeyinde baskıladığı hipotezi detaylı araştırmalar yapılarak araştırılmalıdır.

Beş küçük molekülün birlikte kullanıldığı farklılaşma prosedürünün aksine küçük moleküllerin bazı üçlü kombinasyonlarının kullanıldığı prosedürlerde transkripsiyon düzeyinde daha olumlu sonuçların elde edildiği görülmüştür. Örneğin, yukarıda da ifade edildiği üzere *GATA-4* ifadesi en yüksek metilasyon ve WNT yolak inhibisyonunun birlikte kullanıldığı grupta görülürken, en yüksek *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadesi asetilasyon aktivasyonu ve WNT yolağı inhibisyonunun yapıldığı grupta elde edilmiştir. *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadelerinin en yüksek VaDsW grubunda elde edilmesi, bu kombinasyonun diğer kombinasyonlara göre kardiyomiyojenik farklılaşmayı tetikleme bakımından daha

başarılı olduğunu düşündürmüştür. Epigenetik yeniden programlama stratejilerinin kardiyomiyojenik farklılaşmasının tetiklenmesi bakımından kıyaslandığında elde edilen sonuçlar en yüksek *GATA-4* ifadesinin metilasyon inhibisyonunun yapıldığı grupta (5zDsW) elde edildiğini, en yüksek *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadelerinin ise asetilasyon aktivasyonunun yapıldığı grupta elde edildiğini göstermiştir. İnsan kaynaklı kardiyak mezenşimal hücrelerde histon deasetilaz enzimlerinden (HDAC) HDAC1'in baskılanması, kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinden *NKX2.5*, *MEF2C* ve *TBX5* ifadelerinde anlamlı düzeyde artış sağladığını ancak *GATA-4* ifadesinde anlamlı düzeyde artışa neden olmadığı tespit edilmiştir [421]. Dolayısıyla bu çalışmada asetilasyon aktivasyonunun yapıldığı gruplarda *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadelerinin anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmesi, h-MKH'lerinde Va ve DMSO ile asetilasyon aktivasyonunun başarılı bir biçimde sağlandığını ve bunun da kardiyomiyojenik farklılaşma ile sonuçlandığı sonucuna varmamızı sağlamıştır. Biyolojik yolak inhibisyonu açısından değerlendirildiğinde ise h-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarının tetiklenmesinde WNT yolağının inhibe edilmesinin daha başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Çünkü yukarıda da ifade edildiği üzere, en yüksek *GATA-4*, *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadesi WNT yolak inhibitörü olan IWP-2'nin kullanıldığı grupta ölçülmüştür.

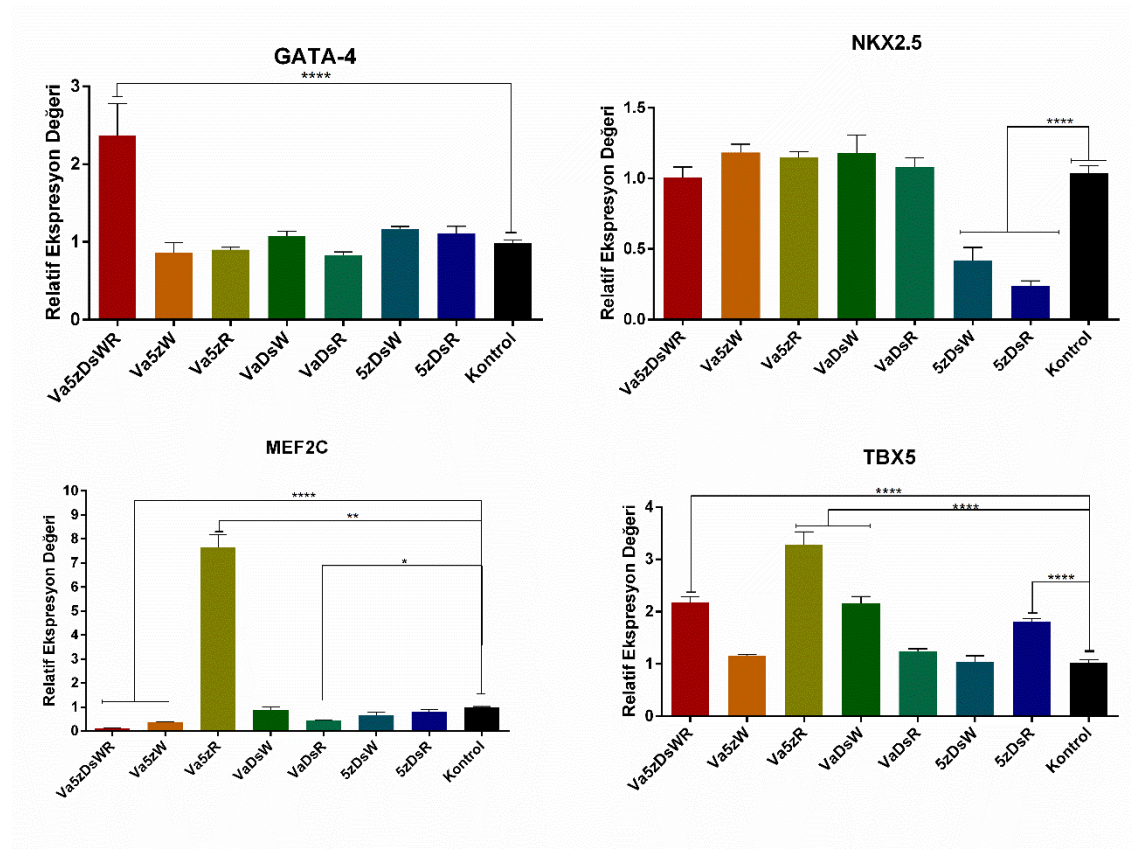
Bu çalışmada Va5zW ve VaDsW grupları için elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadeleri bakımından önemli farkların olduğu açık bir biçimde görülmektedir. VaDsW grubunda *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadelerinin Va5zW grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek çıkması (sırasıyla $p<0,0001$ ve $p<0,01$, grafikte gösterilmemiştir), DMSO'nun Va ile sinerjik etki göstererek kardiyomiyojenik farklılaşmada 5-Aza'dan daha etkili olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim fare kaynaklı EKH'ler ile yapılan çalışmalar DMSO'nun epigenetik yapıda değişimler meydana getirdiği (bazı gen bölgelerinde hipermetilasyon bazı gen bölgelerinde hipometilasyon) tespit edilmiştir [422]. Daha da önemlisi yakın zamanda yapılan bir çalışmada DMSO'nun asetilasyonu artırdığı tespit edilmiş ve DMSO'nun HDAC inhibitörü olarak etki gösterdiği ifade edilmiştir [423]. Tüm bunlarla birlikte insan kaynaklı EKH'ler ile yapılan çalışmada düşük ve orta konsatrasyonda DMSO'nun (sırasıyla %0,01 ve %0,1) *HAND1*, *MEF2C*, *GATA-4* ve *C-aktin* genlerinin ifadesini artırdığı da tespit edilmiştir [253].



Şekil 4.29. h-MKH'lerde uygulanan farklılaştırma prosedürlerine bağlı olarak meydana gelen kardiyak spesifik genlerin ifadesi. Test edilen prosedürler ve kontrol grubu arasında fark olup olmadığının tespit edilmesi için tek yönlü ANOVA analizi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırmalar Bonferroni testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ * ve $p < 0,0001$ **** ile gösterilmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox

rt-MKH Kaynaklı Hücrelerde Kardiyak Spesifik Genlerin İfadesi: rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarının tetiklenmesi için uygulanan farklılaştırma prosedürlerinden sonra qPCR yapılmış ve edilen kardiyak spesifik gen ifade profili şekil 4.30'de gösterilmiştir. qPCR sonuçları farklılaştırma prosedürüne bağlı olarak kardiyak spesifik genlerde farklı ifade profillerinin ortaya çıktığını açık bir biçimde göstermiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında GATA-4 ifadesinin sadece Va5zDsWR prosedüründe anlamlı düzeyde arttığı ve bu artışın yaklaşık 2,4 kat olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,0001$). Diğer prosedürlerde ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p > 0,05$). Elde edilen sonuçlar NKX2.5 ifadesi bakımından incelendiğinde ise iki prosedürde (5zDsW ve 5zDsR) anlamlı düzeyde aşağı yönlü ifadenin elde edildiği ($p < 0,001$), diğer gruplarda ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir ($p > 0,05$). MEF2C ifadesi bakımından incelendiğinde ise Va, 5-Aza ve RepSox'un birlikte kullanıldığı farklılaştırma prosedüründe kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde 7,7 katlık bir artışın

meydana geldiği, 3 prosedürde ise (Va5zDsWR, Va5zW ve VaDsR) anlamlı düzeyde aşağı yönlü azalış meydana geldiği tespit edilmiştir. Diğer gruplarda ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. qPCR sonuçları en yüksek *TBX5* ifadesinin Va, 5-Aza ve RepSox'un birlikte kullanıldığı prosedürde elde edildiğini ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde yaklaşık 3,3 katlık bir artış meydana geldiğini göstermiştir. Va5zDsWR, VaDsW ve 5zDsR prosedürlerinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde sırasıyla 2,18, 2,16 ve 1,8 katlık artışlar meydana geldiği hesaplanmış olup ($p<0,0001$), diğer gruplarda benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.30. rt-MKH'lerde uygulanan farklılaştırma prosedürlerine bağlı olarak meydana gelen kardiyak spesifik genlerin ifadesi. Test edilen prosedürler ve kontrol grubu arasında fark olup olmadığının tespit edilmesi için tek yönlü ANOVA analizi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırmalar Bonferroni testi ile yapılmıştır. $p<0,05$ * ve $p<0,0001$ **** ile gösterilmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.

rt-MKH'lerin qPCR sonuçları metilasyon inhibisyonu ve asetilasyon aktivasyonu ile WNT ve TGF- β yollarının aynı anda modüle edilmesinin (Va5zDsWR) transkripsiyon düzeyinde düşük olsa da *GATA-4* ve *TBX5* ifadelerinde bir artış meydana getirdiğini göstermiştir. Bu da h-MKH'lerinin aksine, rt-MKH'lerinde ard arda asetilasyon

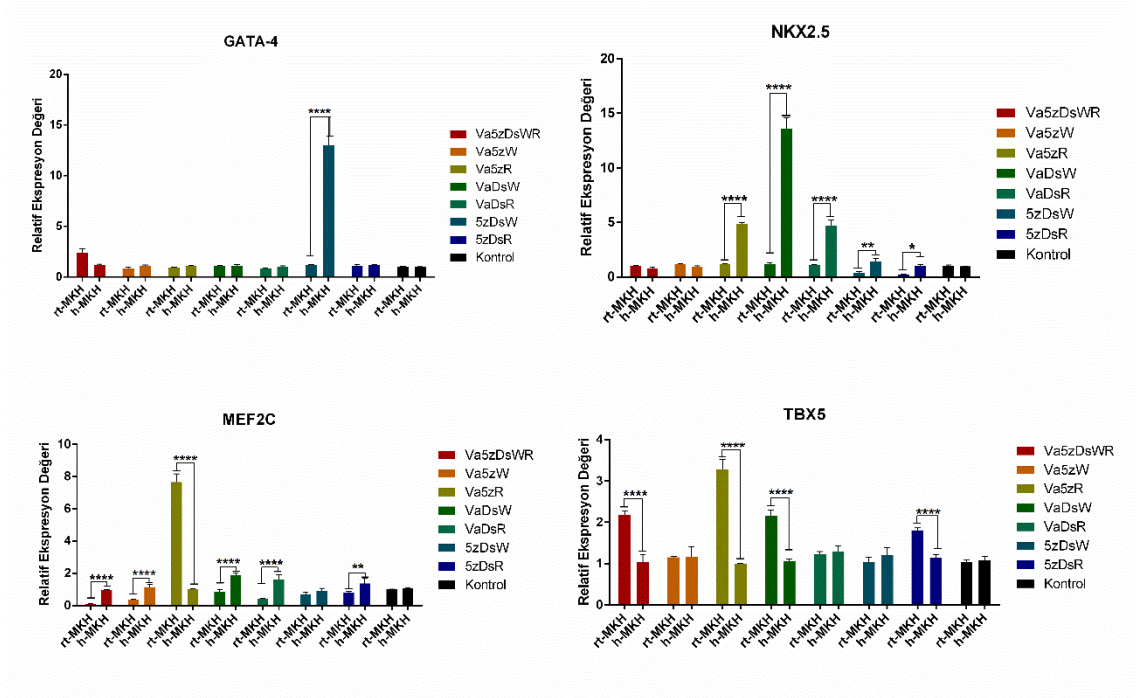
aktivasyonu, metilasyon inhibisyonu, WNT ve TGF- β yolaklarının inhibisyonunun yapılmasının az da olsa kardiyomiyojenik farklılaşmayı tetiklediğini düşündürmüştür. Yine h-MKH'lerinde olduğu gibi, rt-MKH'lerinde de küçük moleküllerin üçlü kombinasyonlarının daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Çünkü, yukarıda ifade edildiği üzere en yüksek *MEF2C* ve *TBX5* ifadesi Va, 5-Aza ve RepSox'un birlikte kullanıldığı grupta elde edilmiştir.

Va, 5-Aza ve RepSox'un birlikte kullanıldığı grupta en yüksek *MEF2C* ve *TBX5* ifadelerinin ölçülmesi, rt-MKH'lerde Va aracılıklı asetilasyon aktivasyonu, 5-Aza aracılıklı metilasyon inhibisyonu ve RepSox aracılıklı TGF- β yolağı inhibisyonunun ard arda sağlanmasının, kardiyomiyojenik farklılaşmada etkili olduğunu düşündürmüştür. Daha önce de ifade edildiği üzere, SAHA (asetilasyon aktivasyonu sağlamaktadır) ve 5-Aza'nın (metilasyon inhibisyonunu sağlayamaktadır) birlikte kullanılması durumunda, bu iki moleküllerin birbirleri ile sinerjik ya da antagonist etki göstermedikleri tespit edilmiştir [420]. Dolayısıyla bu gruplarda transkripsiyon düzeyinde meydana gelen bu artışın RepSox'un 5-Aza ve/veya Va ile sinerjik etkisi ile meydana geldiği düşünülmüştür. Ancak bu hipotezin desteklenmesi için daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği de vurgulanmalıdır. Diğer yandan Cho ve ark. 5-Aza etkisi altında fare kemik iliği MKH'lerin kardiyak farklılaşmasının tetiklenmesi için Akt/GSK-3 β yolağının aktivitesinin yüksek düzeyde meydana gelmesi gerektiğini, 5-Aza'nın GSK-3 β 'ün yukarı yönlü ifadesini sağlayarak β -katenini inhibe ettiğini raporlanmıştır. Ayrıca kontrol grubu MKH'lerinde GSK-3 β 'nin promotor bölgesinin yüksek düzeyde metillendiğini ancak 5-Aza uygulanan grupta ise promotor bölgesinde metilasyonun inhibe edildiğini tespit etmişlerdir [424]. Bununla birlikte De Sarno ve ark. ise yaptıkları çalışmada Va gibi HDACI'lerin Akt ve GSK3 β 'nin fosforlanmasını sağlayarak Akt/GSK-3 β sinyal yolağını aktive ettiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca fosforilasyonun meydana gelmesi için optimum konsantrasyonun ve 12 sa. gibi uzun bir uygulama süresinin dikkate alınması gerektiğini de tespit etmişlerdir [425]. Dolayısıyla bu çalışmada Va'nın ve 5-Aza'nın art arda kullanılması ile muhtemelen Akt/GSK-3 β sinyal yolağını aktive ettiği ve RepSox ile birlikte rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarını artırdığı sonucuna varılmıştır.

Yukarıda da bahsedildiği üzere en yüksek *MEF2C* ifadesi Va, 5-Aza ve RepSox'un birlikte kullanıldığı grupta elde edilmiştir. Lu ve ark. tarafından yapılan çalışmada, MEF2 transkripsiyon ailesinin transkripsiyon düzeyinde negatif yönde regüle edilmesinde klas

II HDAC'lerin etkin rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, MEF2C'nin içinde bulunduğu transkripsiyon faktörlerin transkripsiyonunun HDAC4 ve 5 tarafından inhibe edildiğini, ortamda kalmodilin bağımlı protein kinaz (CaMK) sinyalinin olması halinde HDAC'ların etkisinin ortadan kalkarak MEF2 genlerinin aktifleştiğini bulgularla kanıtlamışlardır [426]. Dolayısıyla bu sonuçlar MEF2C'nin yukarı yönlü ifadesinin histon asetilasyonunun aktifleşmesi ile direk ilintili olduğunu kanıtlar niteliktedir. Ortamda Va gibi histon deasetilazları inhibe edici bir molekülün bulunması MEF2C'nin transkripsiyon düzeyindeki ifadesinde yukarı yönlü bir artışın meydana gelmesi ile sonuçlanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada qPCR analizi sonuçları özellikle rt-MKH'lerde MEF2C ifadesi açısından Va5zR grubunda kontrole göre yaklaşık 7,7 katlık bir artış meydana geldiğini, h-MKH'lerinde ise VaDsW ve VaDsR gruplarında yaklaşık 1,5 katlık bir artışın meydana geldiğini göstermiştir. Bu sonuçlar ortamda Va'nın bulunmasının MEF2C ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artışın meydana gelmesine neden olduğunu düşündürmüştür.

5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanılması ile rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmalarında 5-Aza'nın tek başına kullanılması ile kıyaslandığında GATA-4 ifadesi açısından 20, NKX2.5 ifadesi açısından ise 22 katlık bir artış ile sonuçladığı gösterilmiş ve protein düzeyinde de elde edilen hücrelerin kardiyak spesifik proteinlerinden Cnx43, SAC, cTroT ve α -SMA yüksek düzeyde ifade ettikleri tespit edilmiştir. Bu kısımda ise 5-Aza ve DMSO ile birlikte kök hücre temelli çalışmalarda kardiyomiyojenik farklılaşmada etkileri olduğu gösterilen WNT ve TGF- β sinyal yollarının inhibisyonlarını sağlayacak küçük moleküller kullanılmış ve farklılaştırma etkinliğinin artıp artmayacağı araştırılmıştır. Elde edilen qPCR sonuçları kontrol grubuna göre sadece TBX5 ifadesinin anlamlı düzeyde arttığı, GATA-4 ve MEF2C'nin ise kontrol grubu ile benzer olduğu görülmüştür. NKX2.5 ifadesinde ise 5-Aza ve DMSO ile birlikte WNT ve TGF- β sinyal yolağı inhibitörlerinin kullanılması aşağı yönlü ifadenin meydana gelmesine neden olmuştur. Bu da 5-Aza ve DMSO ile birlikte sinyal yollarının inhibitörlerinin kullanılmasının beklendiğinin aksine rt-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasını transkripsiyonel düzeyde azaltmıştı. Bu durumun ortaya çıkmasının muhtemel sebebi, WNT ve TGF- β sinyal yollarının inhibe edilmesinin 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanılmasından dolayı meydana gelen kardiyomiyojenik etkinin baskılanması ile sonuçlanması ihtimalidir. Bu durumun meydana gelip gelmediği ancak daha detaylı çalışmalar ile açıklanacaktır.



Şekil 4.31. Kardiyak spesifik genlerin ifade profilinin kullanılan farklılaştırma prosedürü ve kök hücre kaynağına göre karşılaştırılması. Her bir gen için aynı farklılaştırma prosedüründe hücre kaynağının etkisinin tespit edilmesi için istatistiksel analiz olarak iki yönlü ANOVA testi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan farklar grafik üzerinde gösterilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** ise $p < 0,0001$ göstermektedir. h-MKH: İnsan Kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreler; rt-MKH: Sıçan Kaynaklı Kemik İliği Kök Hücreler; Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox.

Diğer taraftan kök hücre kaynağının uygulanan farklılaştırma prosedürüne bağlı olarak kardiyomiyojenik farklılaşmada transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde etkisinin araştırılması için h-MKH ve rt-MKH'ler aynı farklılaştırma prosedürlerine maruz bırakılmış ve qPCR analizi ile kardiyak spesifik genlerin ifadesine bakılmıştır. Hücre kaynağına göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.31'de gösterilmiştir. Kök hücre kaynağına bağlı olarak oluşan gen profilinin açık bir biçimde farklı olduğu ve h-MKH'lerin uygulanan farklılaştırma prosedürlerine daha etkili bir biçimde reaksiyon göstererek kardiyak soya farklılaştıkları görülmektedir. Çünkü, farklılaştırma prosedürlerin h-MKH'lerinde *GATA-4*, *NKX2.5* ve *MEF2C* ifadesinde rt-MKH'lerine göre anlamlı düzeyde artış meydana getirirken rt-MKH'lerde belirteç olarak kullanılan genler arasında

sadece *TBX5* geninde h-MKH'lere kıyasla anlamlı düzeyde artışın meydana geldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen bu sonuçlar epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonlarının birlikte kullanıldığı kardiyomiyojenik farklılaştırma prosedürlerinde kök hücre kaynağının kritik bir parametre olduğu ve hücre kaynağı olarak insan kaynağından izole edilen hücrelerin kullanılmasının daha başarılı sonuçlar elde edilmesine aracılık edeceğini göstermiştir. Bu durumun desteklenmesi için protein düzeyinde analizlerin yapılmış ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.2.2.4. Kardiyak Spesifik Proteinlerin İfadesi

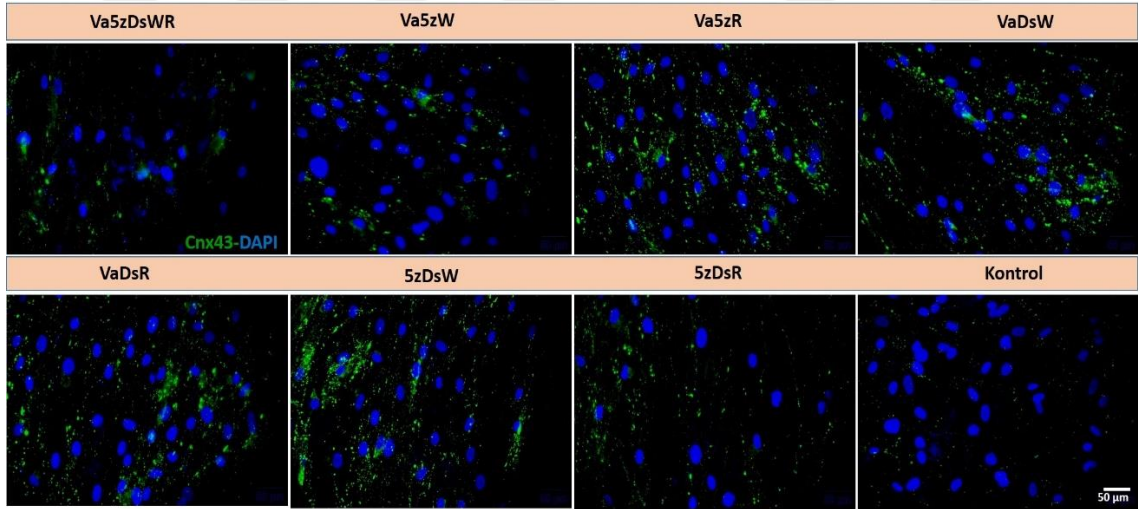
h-MKH ve rt-MKH'lerin farklılaştırma prosedürlerine maruz bırakılmış ve 14 gün sonunda immünfloresan boyama yapılarak Cnx43, SAC, cTroT ve α -SMA ifadesine bakılmıştır. Bu proteinlerin kök hücre temelli kardiyomiyojenik farklılaştırma çalışmalarında kullanıldığına ve neden belirteç olarak seçildiğine dair yukarıda detaylı bilgi verilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde kök hücre temelli kardiyomiyojenik farklılaşma çalışmalarında kardiyak spesifik proteinlerinin immünfloresan boyama ile tespit edilmesi için 12, 14 veya 28 günlük kültür sürelerinin kullanıldığı tespit edilmiştir [351, 397, 409, 427, 428]. Dolayısıyla kök hücre temelli kardiyomiyojenik farklılaştırma çalışmalarında kültür süresi bakımından bir konsensusun olmadığı görülmüş ve proteinlerin ifade olması için uzun süreli kültürün gerektiği düşünülerek kültür süresi olarak 14 gün seçilmiştir. Her iki hücre kaynağı için elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.2.2.4.1 h-MKH Kaynaklı Hücrelerde Kardiyak Spesifik Proteinlerin İfadesi

h-MKH'lere farklılaştırma prosedürleri uygulanmış ve 14 gün sonunda elde edilen hücreler Cnx43 ifade bakımından analiz edilmek üzere immünfloresan boyama yapılmıştır (Şekil 4.32). Tüm farklılaştırma prosedürlerinde daha çok hücre stoplazmasında, ancak bazı hücrelerde hücre çekirdeğinin etrafında nokta şeklinde Cnx43'lerin ifade olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen farklılaştırma prosedürleri arasında Cnx43 ifadesi en çok Va5zR, VaDsW, 5zDsW gruplarında gözlenmişken diğer gruplarda daha az miktarda ifade olduğu gözlemlenmişti. Kontrol grubunda az da olsa Cnx43 pozitif hücrelerin olduğu ancak farklılaştırma prosedürlerinin test edildiği gruplara göre açık bir biçimde az olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar test edilen farklılaştırma prosedürlerinin h-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmalarını sağladığını açık bir

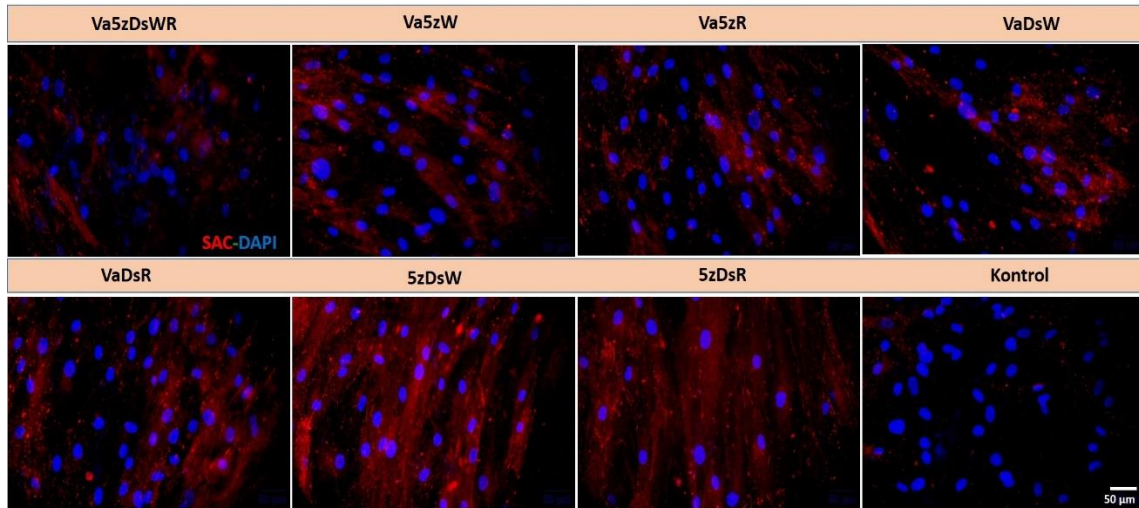
biçimde göstermiştir. Çünkü daha önce de bahsedildiği üzere kök hücre temelli kardiyomiyojenik farklılaştırma çalışmalarında Cnx43 ifadesi yukarı yönlü artmaktadır.

Daha önce ifade edildiği üzere, Cnx43 proteinleri kalp dokusunda hücre-hücre etkileşimini sağlayarak, elektriksel uyarımların hücreler arasında transfer olmasında görev alarak kalbin kasılmasını sağlarlar. Bununla birlikte konneksin proteinlerin hücredeki lokalizasyon paterni hücrenin olgunluk düzeyi hakkında fikir edinmemizi de sağlamaktadır. Bu çalışmada elde edilen h-MKH'leri kaynaklı kardiyomiyosit hücrelerinde Cnx43 proteinlerinin hem hücre stoplazmasında hem de hücrelerin lateral membranlarında oldukları açık bir biçimde görülmektedir. Lateral membranda lokalize olan Cnx43 proteinleri tüm gruplarda olmasına rağmen daha çok Va5zR, VaDsW ve 5zDsW gruplarında görülmüştür. Bilindiği üzere, lateral memrandaki konneksinlerin varlığı olgun kardiyomiyosit fenotipi ile ilişkilendirilmiştir [398]. Dolayısıyla bu çalışmada lateral membranda daha çok konneksinlerin gözlemlenmesi h-MKH'lerden elde edilen kardiyomiyositlerin olgun kardiyomiyositlere benzer özellikler gösterdiği ancak hücre stoplazmasında henüz lateral membrana yerleşmemiş Cnx43'lerin varlığı bu hücrelerin tam olarak yetişkin kardiyomiyosit fenotipine henüz sahip olamadıklarını düşündürmüştür.



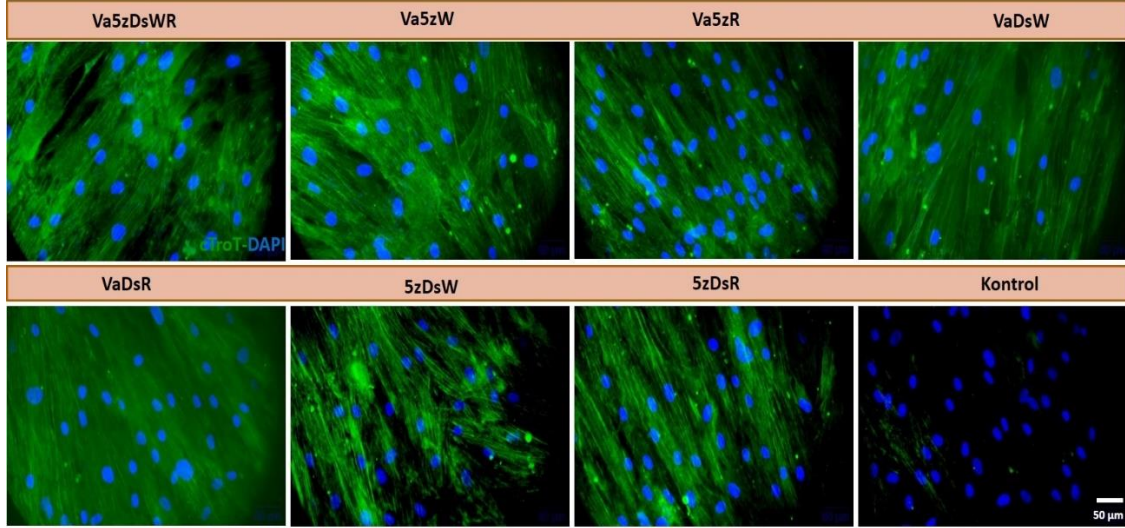
Şekil 4.32. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde Cnx43 ifadesi. Konneksin yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.

h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde kalp kası hücrelerinin en temel kasılma birimi olan sarkomerde bulunan ve Z diskinin stabilisini F-aktin filamentlerini çapraz bağlayarak sağlayan SAC proteinin ifadesine immünfloresan analiz ile bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.33'de gösterilmiştir. İmmünfloresan analiz sonuçları kontrol grubu ile kıyaslandığında farklılaştırma prosedürlerinin uygulandığı grupta SAC ifadesinin önemli düzeyde arttığını göstermiştir. Farklılaştırma prosedürleri kendi arasında kıyaslandığında ise 5zDsW ve 5zDsR gruplarında diğerlerine göre daha kuvvetli SAC immün reaktivitesi gözlemlenmiştir [429]. En zayıf immünreaktivite ise Va5zDsWR grubunda gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda kuvvetli SAC ifadesi kardiyomiyosit farklılaşması ile ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada da elde edilen kuvvetli SAC immün reaktivitesi h-MKH'lerin kardiyomiyojenik soya farklılaştırdıklarını düşündürmüştür. Daha önce de ifade edildiği üzere, SAC mikrofilamenti yetişkin kalp kası hücrelerinde F-aktin filamentlerini çapraz bağlamakta ve mikroskop altına bakıldığında hücre eksenine dik belirgin demetler şeklinde görülmektedir. Ancak bu çalışmada elde edilen sonuçlar SAC proteinlerinin hücre stoplazması boyunca ifade olduğunu göstermektedir. Hücre eksenine dik SAC demetlerinin gözlemlenememesi, elde edilen hücrelerin olgunlaşmamış kardiyomiyosit fenotipinde olduklarını düşündürmüştür.



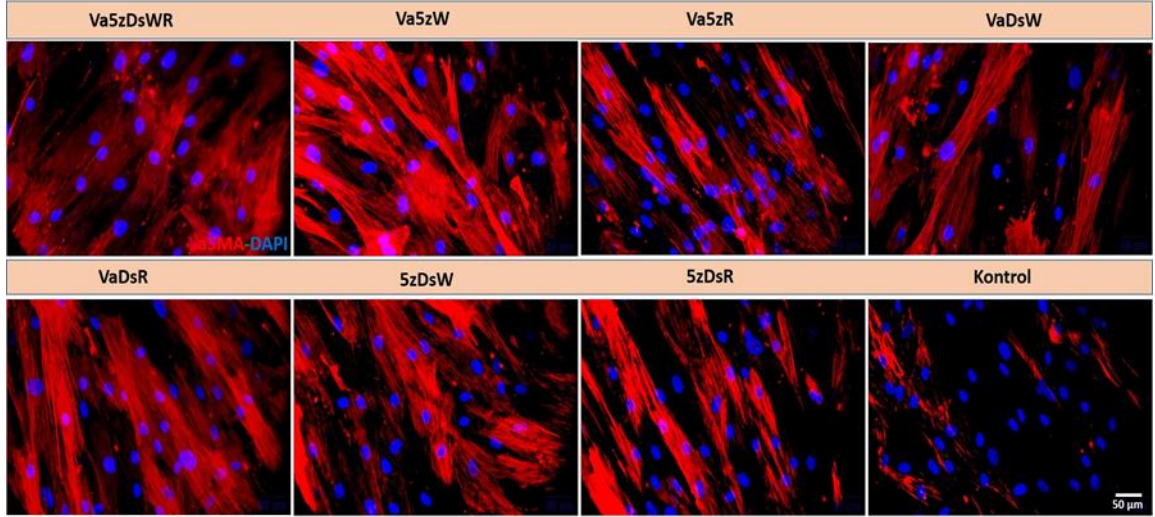
Şekil 4.33. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde SAC ifadesi. SAC kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.

h-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde cTroT ifadesinin sonuçları Şekil 4.34’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubuna göre test edilen farklılaştırma prosedürlerin tümünde cTroT proteinini kuvvetli bir biçimde ifade eden hücreler görülmüştür. cTroT proteinlerin ince filamentler boyunca hücre stoplazmasında ifade oldukları gözlemlenmiştir. Test edilen farklılaştırma prosedürleri arasında belirgin bir fark görülmesi de cTroT ifade en belirgin ve kuvvetli bir biçimde Va5zW, Va5zR, VaDsW, 5zDsW ve 5zDsR gruplarında görülmüştür. Kontrol grubunda da bazı hücreler pozitif immün reaktivite göstermiştir. Potta ve ark. yaptıkları çalışmada, EKH’leri kardiyomiyositlere farklılaştırmış ve kardiyomiyosit belirteçlerinden cTroT ifadesine immünfloresan analiz ile bakmışlardır. Sonuçlar, cTroT’nin hücre stoplazmasında ve hücrenin membranına yakın bölgelerinde ince lifler şeklinde görüldüğünü göstermiştir [400]. Bununla birlikte Jain ve ark. yaptıkları çalışmada insan kaynaklı amniyotik sıvıdan ve kemik iliğinden izole ettikleri kök hücreleri 5-Aza ile muamele etmiş ve kültürün sonunda her iki hücre kaynağından elde edilen hücrelerin cTroT ifade ettikleri ve amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerden edilen kardiyomiyositlerde bu proteinin sitoplazmada ve hücre membranına yakınında ince lifler şeklinde lokalize olduğunu, kemik iliği kök hücrelerinde ise cTroT’in hücre çekirdeği etrafında yoğunlaştığını göstermişlerdir [405]. Son olarak Marttila ve ark. indüklenmiş pluripotent kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin olgunlaştırılmasını amaçladıkları çalışmada elde ettikleri hücrelerde cTroT ifadesine bakmış ve elde ettikleri sonuçlar cTroT proteinlerin hücre stoplazmasında ince fiberler boyunca lokalize olduklarını göstermiş ve araştırmacılar bu paterni kardiyomiyositlerin olgunlaşması ile ilişkilendirmişlerdir [430]. Bu çalışmada da küçük molekül uyarımları sonunda h-MKH’lerde cTroT ifadesine bakılmış ve hücrelerin yüksek oranda cTroT ifade ettikleri görülmüştür. (Şekil 4.34). Elde edilen immünfloresan sonuçları incelendiğinde cTroT’lerin hücre stoplazmasında ve hücre membranının yakınında ince lifler şeklinde lokalize olduğu açık bir biçimde görülmektedir. Bu sonuç literatür verileri ile örtüşmekte olup, çeşitli epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonlarını sağlayan küçük molekül uygulamalarının h-MKH’lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılmasında etkili olduklarını kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.34. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde cTroT ifadesi. cTroT yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.

α -SMA immün reaktivite sonuçları, farklılaştırma prosedürlerine maruz bırakılan h-MKH'lerin 14 gün sonunda test edilen tüm prosedürlerde α -SMA ifadesinin yüksek düzeyde meydana geldiğini açık bir biçimde göstermektedir. Kontrol grubunda ise az da olsa pozitif immün reaktivite gösteren hücreler gözlemlenmiştir (Şekil 4.35). α -SMA, h-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde hücre stoplazmasında boyunca hücre eksenine paralel olarak filamentler şeklinde ifade oldukları belirgin bir biçimde gözlemlenmiştir. Gruplar arasında α -SMA açısından belirgin bir fark olmasa da diğer gruplara göre Va5zDsWR grubunda filament yapısı açık bir biçimde seçilememektedir. Fare embriyolarından alınan kalp dokusu ile yapılan çalışmada α -SMA proteinin erken embriyonik dönemde (E9.5) ifade olduğu ancak 2 haftalık fare dokularında ifade olmadığı tespit edilmiştir [431]. Bununla birlikte *in vivo* kalp oluşumu sürsünce, α -SMA ifadesinin kardiyomiyosit farklılaşmasının bir işareti olduğu da belirtilmiştir [432]. Daha da önemlisi normal miyokardiyumda türe, yaşa ve gelişim durumuna bağlı olarak değişmekle birlikte, α -kardiyak aktin, α -iskelet aktini ve α -düz kas aktininin birlikte bulunduğu ifade edilmiştir [431]. Bu veriler α -SMA proteinin kardiyomiyosit belirteci olduğunu ve bu proteinin varlığının kardiyomiyosit farklılaşmasında erken döneme işaret ettiğini göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen güçlü α -SMA ifadesi h-MKH'leri kaynaklı kardiyomiyositlerin fetal dönem fenotipiği özelliği taşıdığını düşündürmüştür.



Şekil 4.35. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra h-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde α -SMA ifadesi. α -SMA kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 μ m.

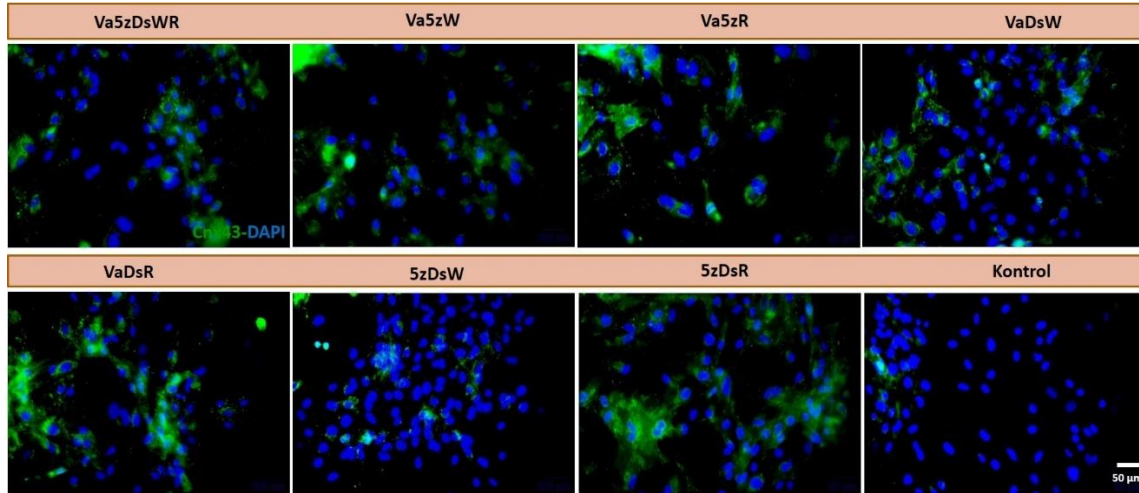
Sonuç olarak h-MKH'lerin epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonları stratejilerinin ard arda kullanılması ile edilen hücrelerde kardiyak spesifik proteinlerden Cnx43, SAC, cTroT ve α -SMA'nın kuvvetli bir biçimde ifade olduğunu ve dolayısıyla kök hücrelerin başarılı bir biçimde kardiyomiyositlere farklılaştırıldığını söylemek mümkündür. İmmünfloresan analizi, sayısal bir veri sağlayamadığı için uygulanan prosedürlerden hangisinin en iyi sonucu verdiğine dair bir sonuca ulaşmak zordur. Dolayısıyla akış sitometrisi gibi sayısal sonuç veren yöntemler kullanılarak bu sonuçların teyit edilmesi gerektiği vurgulanmalıdır.

4.2.2.4.2 rt-MKH Kaynaklı Hücrelerde Kardiyak Spesifik Proteinlerin İfadesi

rt-MKH'lerinin epigenetik yeniden programlanma ve biyolojik yolak manipülasyonlarını içeren farklılaşma prosedürleri sonunda kardiyomiyojenik soya translasyon düzeyinde geçip geçmediğinin tespit edilmesi amacıyla kardiyak spesifik proteinlerden Cnx43, SAC, cTroT ve α -SMA ifadesi immün boyama yapılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.36-39'de gösterilmiştir.

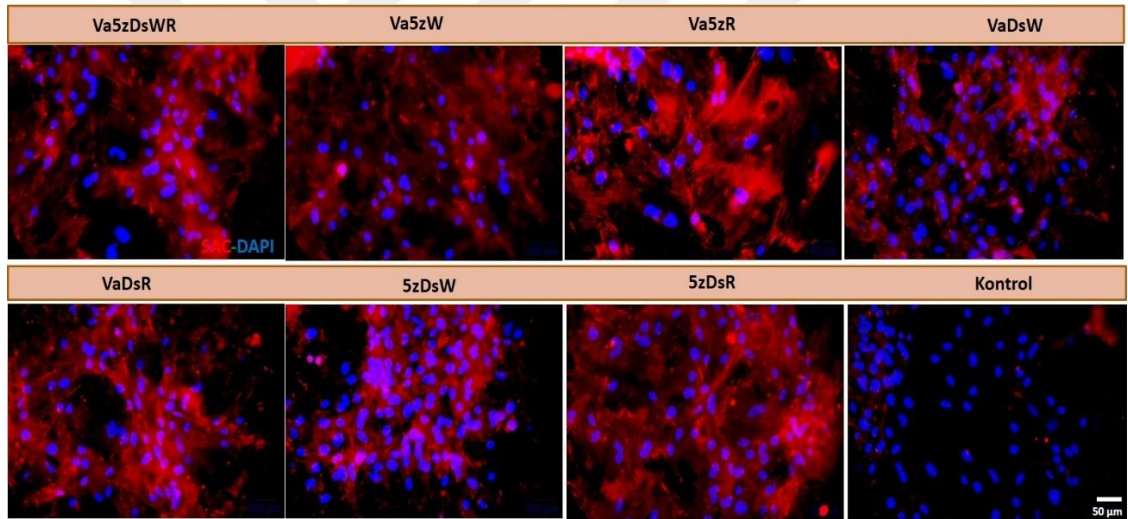
Farklılaştırma prosedürleri sonunda rt-MKH'lerden elde edilen hücrelerde gözlemelenen Cnx43 immün reaktivitesi Şekil 4.36'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, test edilen tüm farklılaşma prosedürlerinde Cnx43 ifadesi kuvvetli pozitif olan hücrelerin olduğu açık bir biçimde görülmektedir. Kontrol grubunda az da olsa Cnx43 ifade eden

hücrelere rastlanmıştır. rt-MKH'lerinde elde edilen hücrelerde Cnx43 proteinlerin stoplazmada hücre çekirdeği etrafında yoğunlaştıkları görülmüştür. Test edilen farklılaştırma prosedürlerinin hepsinde benzer Cnx43 yerleşim paterni gözükmesine rağmen, bazı gruplarda (Va5zR ve Va5zDsWR) az da olsa bazı hücrelerde hücre stoplazmasında nokta şeklinde Cnx43'lerin olduğu görülmüştür. 14 günlük kültür sonunda hücre kümelerinin oluştuğu gözlemlenmiş ve Şekil 4.36'de de görüldüğü üzere bu kümelerde yoğun Cnx43 pozitif boyama tespit edilmiştir. Tüm test edilen farklılaştırma prosedürlerinde hücrelerin lateral membranlarında konneksin proteinleri gözlemlenememiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, gelişim düzeyine göre Cnx43 proteinlerinin hücredeki lokalizasyon paterni değişmekte olup, embriyonik gelişim döneminde sadece stoplazmada ifade olurken, yetişkin dönemde hücrelerin sadece lateral membranında lokalize olmaktadır [398]. Markmee ve ark. yaptıkları çalışmada insan kaynaklı amniyotik sıvıdan izole ettikleri hücrelerinin 5-Aza ve platelat lizatinin birlikte kullanılmasının kardiyomiyojenik farklılaşmaya olan etkisini araştırmış ve immünfloresan analiz sonuçları Cnx43 proteinlerinin hücre çekirdeğinin etrafında lokalize olduğunu göstermiştir [404]. Dolayısıyla bu çalışmada Cnx43 için elde edilen sonuçlar literatür verileri ile örtüşmekte olup kardiyomiyositlere farklılaştıkları ancak Cnx43 proteinin lokalizasyon paterni elde edilen hücrelerin fetal dönem özelliği taşıdıkları düşündürmüştür.



Şekil 4.36. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde Cnx43 ifadesi. Cnx43 yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm

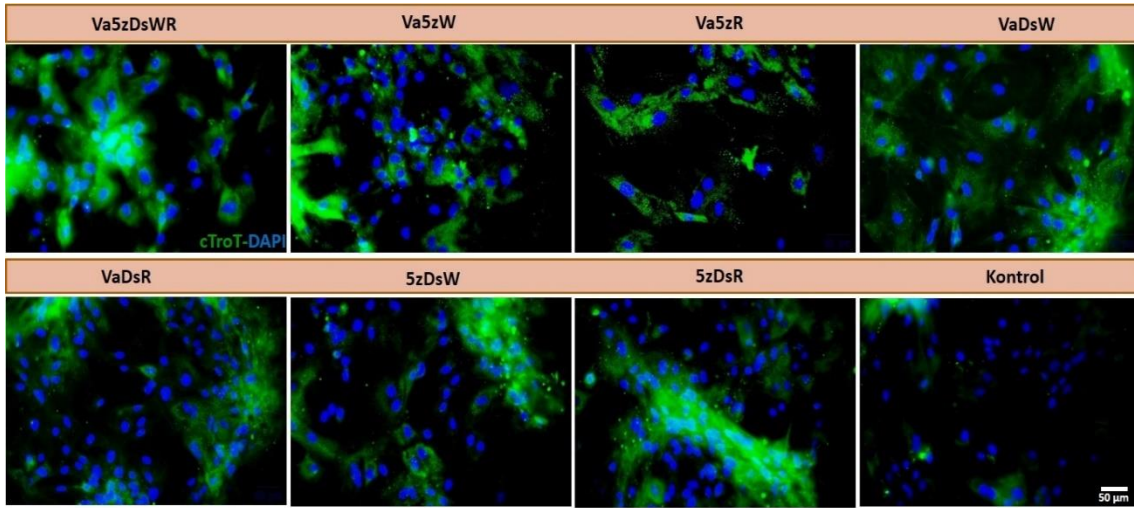
rt-MKH'leri kaynaklı hücrelerde kalp kası hücrelerinde bulunan ve temel kasılma birimi olan sarkomerin yapısında bulunan ince aktin filamentleri çapraz bağlama işlevini üstlenen sarkomerik alfa aktinin ifadesine ait immün reaktivite sonuçları Şekil 4.37'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar test edilen tüm farklılaştırma prosedürlerinde SAC ifadesinin kontrol grubuna göre belirgin bir biçimde arttığını göstermiştir. Şekil 4.37'ten de açık bir biçimde görüldüğü üzere, SAC hücre stoplazması boyunca belli bir patern göstermeden rastgele dağılmıştır. Farklılaştırma prosedürleri SAC ifadesi bakımından belirgin bir fark oluşturmamış olup tüm gruplarda benzer yoğunlukta protein ifadesi ile sonuçlanmıştır. Daha önce de bahsedildiği üzere yetişkin kardiyomiyositlerde mikroskopik inceleme yapıldığında SAC proteininin hücre eksenine dik konumlanan demet yapısında lokalize olduğu görülmektedir. Ancak bu çalışmada SAC proteinlerin hücre stoplazması boyunca dağıldığı gözlemlenmiştir. Bunun muhtemel sebebi olarak elde edilen kardiyomiyositlerin fetal dönem özelliği göstermesi düşünülmüştür.



Şekil 4.37. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde SAC ifadesi. SAC kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.

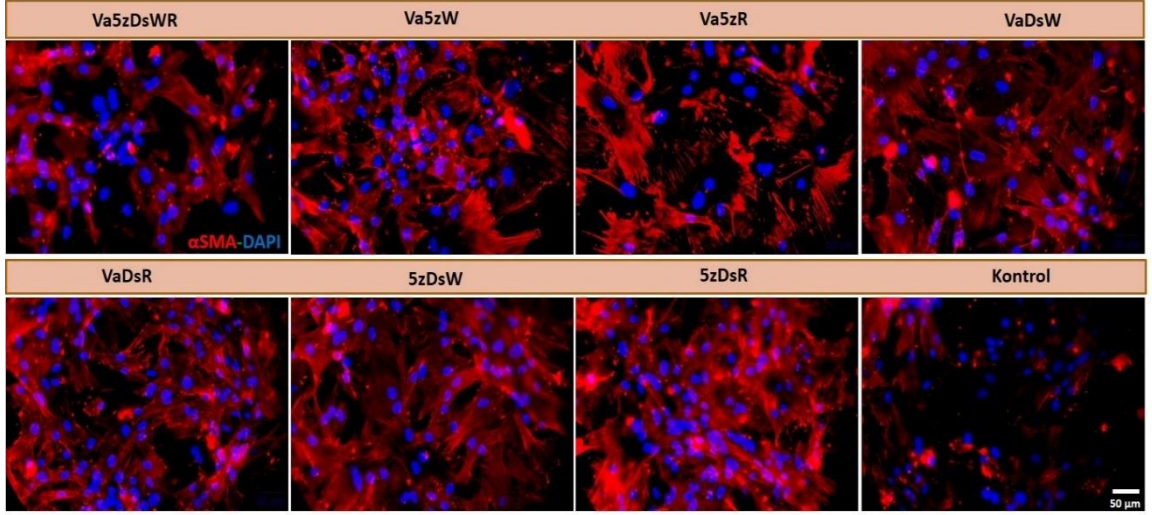
rt-MKH'leri kaynaklı kardiyomiyositlerde kalp kasının kasılmasında oldukça kritik bir rol alan ve ince filamentler üzerinde cTroI ve cTroC ile kompleks kuran cTroT ifadesine ait sonuçlar 4.38'da verilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere test edilen tüm farklılaştırma prosedürlerinde elde edilen hücreler belirgin bir biçimde cTroT ifade eden hücreler gözlemlenmiştir. Yine açık bir biçimde görüleceği üzere, cTroT proteini hücre

stoplazmasında, özellikle hücre çekirdeği etrafında nokta şeklinde lokalize olmuştur. 14 günlük kültür süresi sonunda kültürde oluşan hücre kümelerinde de yoğun pozitif reaksiyon olduğu görülmektedir. Kontrol grubunda bazı hücrelerde zayıf da olsa cTroT ifadesi görülmüştür. Uygulanan farklılaştırma prosedürleri cTroT ifadesi açısından belirgin bir fark oluşturmada Va5zR grubunda nokta şeklinde cTroT'ler daha belirgin olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar rt-MKH'lerin kardiyomiyositlere başarılı bir biçimde farklılaştığını ancak cTroT'in hücre çekirdeği etrafında lokalize olması bu hücrelerin fetal dönem kardiyomiyosit özellikleri gösterdiğini göstermektedir. Ancak hangi farklılaştırma prosedürün daha etkili olduğunun tespit edilmesi için % kardiyomiyosit oranının akış sitometrisi ile tespit edilmesi gerektiği vurgulanmalıdır.



Şekil 4.38. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde cTroT ifadesi. cTroT yeşil, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 µm.

Son olarak rt-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde α -SMA ifadesine bakılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.39'de sunulmuştur. Sonuçlar test edilen tüm farklılaştırma prosedürlerinde elde edilen hücrelerin yüksek oranda α -SMA ifade ettiğini ve kontrole göre belirgin bir biçimde α -SMA ifadesinin arttığını göstermiştir. rt-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde α -SMA hücre stoplazmasında hücre eksenine paralel filamentler şeklinde lokalize oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.39. Farklılaştırma prosedürlerinden sonra rt-MKH'lerinden elde edilen hücrelerde α -SMA ifadesi. α -SMA kırmızı, hücre çekirdeği mavi florofofor ile işaretlenmiştir. Va: Valproik Asit; 5z: 5-Azasitidin; Ds: DMSO; W: IWP-2; R: RepSox. Ölçek çizgisi 50 μ m.

Sonuç olarak kardiyak spesifik protein ifadesi bakımından incelendiğinde hem h-MKH'leri hem de rt-MKH'leri başarılı bir biçimde kardiyomiyositlere farklılaştırılmıştır. Ancak hedef proteinlerin hücrede lokalizasyon paterni açısından hücre kaynağı temelli belirgin farklar oluşmuştur. Cnx43 ifadesi bakımından irdelendiğinde, h-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde Cnx43 proteinlerinin hücre stoplazmasına dağıldığı ve daha da önemlisi bazı hücrelerin lateral membranlarına yerleştikleri, ancak rt-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde Cnx43 proteinlerinin hücre çekirdeği etrafında yoğunlaştığı, hücrelerin lateral membranlarına yerleşmediği gözlemlenmiştir. İki hücre kaynağı açısından cTroT açısından da belirgin bir biçimde farkın olduğu tespit edilmiştir. h-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde cTroT 'ler iPKH-KM'lerde olduğu gibi hücre stoplazmasında ince filamentler üzerinde lokalize olmuşlardır. rt-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde ise bu protein fetal dönem kardiyomiyositlerde olduğu gibi hücre stoplazmasında ve özellikle hücre çekirdeği etrafında lokalize olmuştur. Cnx43 ve cTroT ifadesinde tespit edilen fark gibi açık bir biçimde belirgin olmasa da elde edilen kardiyomiyositler α -SMA ifadesi açısından da farklılıklar göstermektedir. h-MKH kaynaklı kardiyomiyositlerde hücre eksenine paralel olarak yerleşen düz kas aktin filamentler çok belirgin biçimde seçilirken, rt-MKH'lerinde filament yapısı belirgin biçimde görülememektedir. SAC açısından ise hücre kaynağına bağlı bir fark tespit edilememiş olup her iki kök hücre tipinden elde edilen kardiyomiyositlerin

stoplazmasında lokalize olmuş ve hücre eksenine dik demet yapısı gözlemlenememiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak h-MKH'lerden elde edilen kardiyomiyositlerin daha olgun fenotipe sahip oldukları ancak tam olarak yetişkin kardiyomiyositlerde görülen ve hücrelerin fonksiyonel olması ile sonuçlanan sarkomer yapısına sahip olmadıkları sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmanın ikinci bölümünde yapılan çalışmalar MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşma düzeyinin artırılmasında küçük molekül kombinasyonlarının etkili bir strateji olduğunu ve yetişkin kardiyomiyosit benzeri sarkomer yapısına benzer sarkomer organizasyonuna sahip hücreler elde edilebildiğini göstermiştir. Ancak elde edilen sarkomer organizasyonunun kasılabilir hücrelerin elde edilmesi için yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Bu bölümde tespit edilen küçük molekül kombinasyonunun kardiyomiyojenik etkisinin elektromekaniksel uyarımlarla daha da artırılacağı ve 3B aselüler doku iskeleleri üzerinde yetişkin kardiyomiyosit benzeri organize sarkomer yapısına sahip fonksiyonel kalp kası hücrelerin elde edileceği sonucuna varılmıştır. Bu amaçla gelecek dönemde bu konuda çalışmalar planlanmıştır.

5. YORUM

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde literatürde ilk defa aselüler hale getirilmiş sıgır perikardiyumu üzerinde kültüre edilen rt-MKH'ler elektromekaniksel uyarım ile kardiyomiyositlere farklılaştırılarak rejeneratif bir kardiyak yama geliştirilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar rt-MKH'lerin elektriksel, mekaniksel ve elektromekaniksel uyarımlarla kardiyomiyojenik farklılaşmalarının tetiklenebileceğini ve bu etkinin oluşmasında elektromekaniksel uyarımın uzun dönemde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 3B aselüler doku iskelelerinde mekaniksel uyarımın hücrelerin yeniden dizilmesini sağladığını ancak elektriksel uyarımın hücre dizilmesi bakımından bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Elektromekaniksel uyarımlar altında geliştirilen rejeneratif yamanın kalp krizi kaynaklı iskemilerin onarılmasında etkili olup olmadığı *in vivo* deneyler ile test edilmiş ve elde edilen sonuçlar 3 haftalık implantasyon süresi sonunda *in vivo* koşullarda yama kaynaklı kalsifikasyonun meydana gelmediği ve elektromekaniksel olarak uyarılmış yamanın uygulandığı deneklerde yama ile doğal doku arasında daha fazla hücrenin göç ettiğini ve yara bölgesinde kardiyak spesifik proteinlerin daha fazla ifade olduğunu göstermiştir. Daha da önemlisi, yara bölgesinden alınan yamada da kardiyak spesifik proteinleri ifade eden hücrelerin olduğu görülmüştür. Sonuç olarak elektromekaniksel uyarımın kardiyak doku mühendisliği ürünlerin geliştirilmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda göz önünde bulundurulması gereken oldukça önemli bir parametre olduğu gösterilmiştir. Ancak yüksek düzeyde etkinin elde edilmesi için çalışmaların devam etmesi ve kültür koşullarının iyileştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasının ikinci bölümünde ise MKH'lerin daha etkin bir biçimde kardiyomiyositlere farklılaştırılmasında kullanılabilecek yeni ve özgün stratejilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalarla ilk defa biyolojik (büyüme faktörleri) ve kimyasal (5-Aza ve DMSO) stimülatörlerin birlikte kullanılmasının sıçan kaynaklı kemik iliği MKH kaynaklı kardiyomiyositlerin elde edilmesindeki etkisi araştırılmış ve transkripsiyon düzeyinde en iyi farklılaştırma sağlayan kombinasyonun 5-Aza ve DMSO olduğunu, büyüme faktörlerin kimyasal faktörlerle birlikte kullanılmasının transkripsiyonel düzeyde etkili olmadıkları gösterilmiştir. 5-Aza ve DMSO'nun birlikte kullanıldığı grupta elde edilen hücrelerde kardiyak spesifik proteinlerin yüksek düzeyde ifade olduğu tespit edilmiş ancak elde edilen

kardiyomiyositlerin olgunlaşmamış ve organize bir sarkomer yapısı göstermedikleri görülmüştür. Dolayısıyla organize bir sarkomer yapısına sahip olan ve kasılabilen kardiyomiyositlerin geliştirilmesi için ilk defa iki farklı kök hücre kaynağında epigenetik yeniden programlama (metilasyon inhibisyonu ve asetilasyon inhibisyonu) ve biyolojik yolak manipülasyonu (WNT ve TGF β yolak inhibisyonu) yöntemleri birlikte kullanılarak MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılması üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonu stratejilerinin hücre canlılığına olumsuz bir etkisinin olmadığını, uyarımlar sonunda insan kaynaklı MKH'lerin homojen (iğsi ve uzamış hücreler) bir morfoloji gösterdikleri, sıçan kaynaklı MKH'lerin ise heterojen (iğsi, yıldız şeklinde ve yayılmış) bir morfoloji sergiledikleri gösterilmiştir. Hücre kaynağına ve kullanılan küçük molekülün etkisine bağlı olarak MKH'lerin farklı oranda kardiyak spesifik genleri ifade ettiğini, uygulanan farklılaştırma prosedürlerinin çoğunluğunda insan kaynaklı MKH'lerin kardiyak spesifik genlerini daha yüksek düzeyde ifade ettiğini göstermiştir. Ayrıca her iki hücre kaynağının uygulanan farklılaştırma prosedürlerine cevap vererek transkripsiyon düzeyinde kardiyak spesifik proteinleri ifade ettiği ancak insan kaynaklı kemik iliği MKH'lerden elde edilen kardiyomiyositlerin proteinlerin lokalizasyon paterni bakımından yetişkin kardiyomiyositlere daha çok benzedikleri gözlenmiştir. Sonuç olarak kök hücrelerin epigenetik profilinde ve biyolojik yollarında yapılacak modifikasyonlarla daha etkin bir biçimde farklılaşmanın meydana getirileceği ve bu çalışmalarda kullanılacak olan kök hücre kaynağının dikkatli bir biçimde seçilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Ayrıca kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında insan kaynaklı kemik iliği MKH'lerinden elde edilen kardiyomiyositlerin kullanılması ile kardiyak doku mühendisliği ürünlerinin tedavi etkinliğinin daha başarılı olacağı sonucuna varılmıştır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda epigenetik yeniden programlama ve biyolojik yolak manipülasyonları ile insan kaynaklı MKH'lerde elde edilen kardiyomiyositlerin aselüler doku iskelelerine ekilerek biyomimetik biyoreaktörde elektromekaniksel uyartım altında olgunlaştırılmaları planlanmaktadır. Ayrıca, bu olgun kardiyomiyositlerin poli ya da monogenik kardiyak hastalıkların modellenmesinde, bu hastalıkların araştırılmasında ve ilaç araştırma ve geliştirilmesinde kullanılması da planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] V. Garg, I.S. Kathiriyai, R. Barnes, M.K. Schluterman, I.N. King, C.A. Butler, C.R. Rothrock, R.S. Eapen, K. Hirayama-Yamada, K. Joo, GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5, *Nature*, 424 (2003) 443-447.
- [2] M.P. Prabhakaran, J. Venugopal, L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kai, G. Jin, S. Ramakrishna, *Stem cells and nanostructures for advanced tissue regeneration, Biomedical applications of polymeric nanofibers*, Springer, 2011, pp. 21-62.
- [3] G.A. Roth, G.A. Mensah, C.O. Johnson, G. Addolorato, E. Ammirati, L.M. Baddour, N.C. Barengo, A.Z. Beaton, E.J. Benjamin, C.P. Benziger, Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study, *Journal of the American College of Cardiology*, 76 (2020) 2982-3021.
- [4] R. Jonas, *Comprehensive surgical management of congenital heart disease*, CRC press, 2002.
- [5] J.J. Song, H.C. Ott, Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds, *Trends in Molecular Medicine*, 17 (2011) 424-432.
- [6] M. Arnal-Pastor, J. Chachques, M.M. Pradas, A. Vallés-Lluch, *Biomaterials for cardiac tissue engineering, Regenerative Medicine And Tissue Engineering*, Intechopen, 2013.
- [7] J.N. Tang, J. Cores, K. Huang, X.L. Cui, L. Luo, J.Y. Zhang, T.S. Li, L. Qian, K. Cheng, Concise review: is cardiac cell therapy dead? Embarrassing trial outcomes and new directions for the future, *Stem Cells Translational Medicine*, 7 (2018) 354-359.
- [8] A.A. Quyyumi, A. Vasquez, D.J. Kereiakes, M. Klapholz, G.L. Schaer, A. Abdel-Latif, S. Frohwein, T.D. Henry, R.A. Schatz, N. Dib, C. Toma, C.J. Davidson, G.W. Barsness, D.M. Shavelle, M. Cohen, J. Poole, T. Moss, P. Hyde, A.M. Kanakaraj, V. Druker, A. Chung, C. Junge, R.A. Preti, R.L. Smith, D.J. Mazzo, A. Pecora, D.W. Losordo, PreSERVE-AMI, *Circulation Research*, 120 (2017) 324-331.
- [9] G.P. Meyer, K.C. Wollert, J. Lotz, J. Steffens, P. Lippolt, S. Fichtner, H. Hecker, A. Schaefer, L. Arseniev, B. Hertenstein, Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction, *Circulation*, 113 (2006) 1287-1294.
- [10] R. Madonna, L.W. Van Laake, H.E. Botker, S.M. Davidson, R. De Caterina, F.B. Engel, T. Eschenhagen, F. Fernandez-Aviles, D.J. Hausenloy, J.-S. Hult, ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart: position paper for Cardiovascular Research: tissue engineering strategies combined with cell therapies for cardiac repair in ischaemic heart disease and heart failure, *Cardiovascular Research*, 115 (2019) 488-500.
- [11] D. Nurzynska, M.-E.P. Iruegas, C. Castaldo, P. Müller-Best, F. Di Meglio, *Application of biotechnology in myocardial regeneration-tissue engineering triad: Cells, scaffolds, and signaling molecules*, Hindawi, 2013.

- [12] V. Karantalis, J.M. Hare, Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease, *Circulation Research*, 116 (2015) 1413-1430.
- [13] J. Zhang, G.F. Wilson, A.G. Soerens, C.H. Koonce, J. Yu, S.P. Palecek, J.A. Thomson, T.J. Kamp, Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells, *Circulation Research*, 104 (2009) e30-e41.
- [14] R. Lakshmanan, P. Kumaraswamy, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, Engineering a growth factor embedded nanofiber matrix niche to promote vascularization for functional cardiac regeneration, *Biomaterials*, 97 (2016) 176-195.
- [15] K.M. Park, Y.M. Shin, K. Kim, H. Shin, Tissue Engineering and regenerative medicine 2017: a year in review, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 24 (2018) 327-344.
- [16] M.A. Thal, P. Krishnamurthy, A.R. Mackie, E. Hoxha, E. Lambers, S. Verma, V. Ramirez, G.J. Qin, D.W. Losordo, R. Kishore, Enhanced angiogenic and cardiomyocyte differentiation capacity of epigenetically reprogrammed mouse and human endothelial progenitor cells augments their efficacy for ischemic myocardial repair, *Circulation Research*, 111 (2012) 180-U141.
- [17] B. Balana, C. Nicoletti, I. Zahanich, E.M. Graf, T. Christ, S. Boxberger, U. Ravens, 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells, *Cell Research*, 16 (2006) 949-960.
- [18] A.-M. Rosca, A. Burlacu, Effect of 5-azacytidine: evidence for alteration of the multipotent ability of mesenchymal stem cells, *Stem Cells And Development*, 20 (2011) 1213-1221.
- [19] S. Mazzotta, C. Neves, Rory, Andreia, K. Docherty, S. Hoppler, Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development, *Stem Cell Reports*, 7 (2016) 764-776.
- [20] D. Schade, A.T. Plowright, Medicinal chemistry approaches to heart regeneration, *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (2015) 9451-9479.
- [21] C.M. Kofron, U. Mende, In vitro models of the cardiac microenvironment to study myocyte and non-myocyte crosstalk: bioinspired approaches beyond the polystyrene dish, *The Journal of Physiology*, (2017).
- [22] W.L. Stoppel, D.L. Kaplan, L.D. Black, Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 96 (2016) 135-155.
- [23] S.R. Gu, Y.G. Kang, J.W. Shin, J.-W. Shin, Simultaneous engagement of mechanical stretching and surface pattern promotes cardiomyogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123 (2017) 252-258.

- [24] N. Rezaee, M. Tafazzoli-Shadpour, N. Haghighipour, Effect of equiaxial cyclic strain on cardiomyogenic induction in mesenchymal stem cells, *Progress in Biomaterials*, 7 (2018) 279-288.
- [25] X. He, L. Li, M. Tang, Y. Zeng, H. Li, X. Yu, Biomimetic electrical stimulation induces rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells via TGF-beta 1 in vitro, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 148 (2019) 47-53.
- [26] G.A. Mensah, G.A. Roth, V. Fuster, The global burden of cardiovascular diseases and risk factors: 2020 and beyond, *Journal of the American College of Cardiology*, 74 (2019) 2529-2532.
- [27] D. Taylor, L. Sampaio, A. Gobin, Building new hearts: a review of trends in cardiac tissue engineering, *American Journal of Transplantation*, 14 (2014) 2448-2459.
- [28] S. Mitchell, S. Korones, H. Berendes, Congenital heart disease in 56,109 births incidence and natural history, *Circulation*, 43 (1971) 323-332.
- [29] T. Van Der Bom, A.C. Zomer, A.H. Zwinderman, F.J. Meijboom, B.J. Bouma, B.J. Mulder, The changing epidemiology of congenital heart disease, *Nature Reviews Cardiology*, 8 (2011) 50.
- [30] G. Bol-Raap, Aspects of surgery for congenital ventricular septal defect, 2007.
- [31] H.S. Bernstein, D. Srivastava, Stem cell therapy for cardiac disease, *Pediatric Research*, 71 (2012) 491-499.
- [32] C.T. Mai, J.L. Isenburg, M.A. Canfield, R.E. Meyer, A. Correa, C.J. Alverson, P.J. Lupo, T. Riehle-Colarusso, S.J. Cho, D. Aggarwal, R.S. Kirby, National population-based estimates for major birth defects, 2010-2014, *Birth Defects Research*, 111 (2019) 1420-1435.
- [33] B.G. Bruneau, The developmental genetics of congenital heart disease, *Nature*, 451 (2008) 943-948.
- [34] T. Kofidis, P. Akhyari, B. Wachsmann, J. Boublik, K. Mueller-Stahl, R. Leyh, S. Fischer, A. Haverich, A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 22 (2002) 238-243.
- [35] T. Geva, J.D. Martins, R.M. Wald, Atrial septal defects, *The Lancet*, 383 (2014) 1921-1932.
- [36] M.G. Posch, A. Perrot, F. Berger, C. Özcelik, Molecular genetics of congenital atrial septal defects, *Clinical Research in Cardiology*, 99 (2010) 137-147.
- [37] D.S. Celermajer, Atrial septal defects: even simple congenital heart diseases can be complicated, *European Heart Journal*, 39 (2018) 999-1001.
- [38] E.A. Bradley, A.N. Zaidi, Atrial septal defect, *Cardiology Clinics*, 38 (2020) 317-324.

- [39] D. Shi, Y. Kang, G. Zhang, C. Gao, W. Lu, H. Zou, H. Jiang, Biodegradable atrial septal defect occluders: A current review, *Acta Biomaterialia*, 96 (2019) 68-80.
- [40] M. Aksüt, K. Boyacıoğlu, N. Kayalar, Double-layer pericardial patch for atrial septal defect closure, *Heart, Lung and Circulation*, 23 (2014) 181-182.
- [41] D.J. Penny, G.W. Vick, Ventricular septal defect, *The Lancet*, 377 (2011) 1103-1112.
- [42] F. Schlotter, S. De Waha, I. Eitel, S. Desch, G. Fuernau, H. Thiele, Interventional post-myocardial infarction ventricular septal defect closure: a systematic review of current evidence, *Euro Intervention*, 12 (2016) 94-102.
- [43] F.G. Scholl, M.M. Boucek, K.-C. Chan, L. Valdes-Cruz, R. Perryman, Preliminary experience with cardiac reconstruction using decellularized porcine extracellular matrix scaffold: human applications in congenital heart disease, *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery*, 1 (2010) 132-136.
- [44] M. Us, M. Sungun, S. Sanioglu, S. Pocan, B. Cebeci, T. Ogus, A. Ucak, A. Guler, A Retrospective comparison of bovine pericardium and polytetrafluoroethylene patch for closure of ventricular septal defects, *Journal of International Medical Research*, 32 (2004) 218-221.
- [45] R.V. Parikh, J. Boyd, D.P. Lee, R. Witteles, Atrial septal defect as unexpected cause of pulmonary artery hypertension, *Texas Heart Institute Journal*, 45 (2018) 42-44.
- [46] V.R. Parachuri, A.K. Tripathy, N.M. Gaikwad, A.P. Singh, V. Mahajan, S. Niranjana, Modified infarct exclusion technique for repair of postinfarction ventricular septal rupture, *The Annals of Thoracic Surgery*, 107 (2019) e219-e221.
- [47] A. Alcon, E.C. Bozkulak, Y. Qyang, Regenerating functional heart tissue for myocardial repair, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (2012) 2635-2656.
- [48] G. Vunjak-Novakovic, N. Tandon, A. Godier, R. Maidhof, A. Marsano, T.P. Martens, M. Radisic, Challenges in cardiac tissue engineering, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16 (2010) 169-187.
- [49] R.C. Lai, T.S. Chen, S.K. Lim, Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease, *Regenerative medicine*, 6 (2011) 481-492.
- [50] H. Yu, K. Lu, J. Zhu, J.a. Wang, Stem cell therapy for ischemic heart diseases, *British Medical Bulletin*, 121 (2017) 135-154.
- [51] K.C. Wollert, G.P. Meyer, J. Lotz, S.R. Lichtenberg, P. Lippolt, C. Breidenbach, S. Fichtner, T. Korte, B. Hornig, D. Messinger, Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial, *The Lancet*, 364 (2004) 141-148.

- [52] V. Schächinger, S. Erbs, A. Elsässer, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Hölschermann, J. Yu, R. Corti, D.G. Mathey, C.W. Hamm, Intracoronary bone marrow–derived progenitor cells in acute myocardial infarction, *New England Journal of Medicine*, 355 (2006) 1210-1221.
- [53] S.A. Fisher, H. Zhang, C. Doree, A. Mathur, E. Martin-Rendon, Stem cell treatment for acute myocardial infarction, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2015).
- [54] A.A. Quyyumi, A. Vasquez, D.J. Kereiakes, M. Klapholz, G.L. Schaer, A. Abdel-Latif, S. Frohwein, T.D. Henry, R.A. Schatz, N. Dib, PreSERVE-AMI: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of intracoronary administration of autologous CD34+ cells in patients with left ventricular dysfunction post STEMI, *Circulation Research*, 120 (2017) 324-331.
- [55] J. Zhang, W. Zhu, M. Radisic, G. Vunjak-Novakovic, Can we engineer a human cardiac patch for therapy?, *Circulation Research*, 123 (2018) 244-265.
- [56] A.N. Steele, J.W. MacArthur, Y.J. Woo, Stem cell therapy: healing or hype? why stem cell delivery doesn't work, *Circulation Research*, 120 (2017) 1868-1870.
- [57] D. Hou, E.A.-S. Youssef, T.J. Brinton, P. Zhang, P. Rogers, E.T. Price, A.C. Yeung, B.H. Johnstone, P.G. Yock, K.L. March, Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials, *Circulation*, 112 (2005) I-150-I-156.
- [58] P.K. Nguyen, E. Neofytou, J.-W. Rhee, J.C. Wu, Potential strategies to address the major clinical barriers facing stem cell regenerative therapy for cardiovascular disease: a review, *JAMA Cardiology*, 1 (2016) 953-962.
- [59] P.K. Nguyen, J.-W. Rhee, J.C. Wu, Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review, *JAMA Cardiology*, 1 (2016) 831-841.
- [60] F. van den Akker, D.A. Feyen, P. van den Hoogen, L.W. van Laake, E.C. van Eeuwijk, I. Hoefler, G. Pasterkamp, S.A. Chamuleau, P.F. Grundeman, P.A. Dövendans, Intramyocardial stem cell injection: go (ne) with the flow, *European Heart Journal*, 38 (2017) 184-186.
- [61] X. Mei, K. Cheng, Recent development in therapeutic cardiac patches, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7 (2020).
- [62] K. Tweden, H. Harasaki, M. Jones, J. Blevitt, W. Craig, M. Pierschbacher, M. Helmus, Accelerated healing of cardiovascular textiles promoted by an RGD peptide, *The Journal of Heart Valve Disease*, 4 (1995) S90-97.
- [63] M.T. Lam, J.C. Wu, Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration, *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 10 (2012) 1039-1049.
- [64] S. Pok, J.D. Myers, S.V. Madhally, J.G. Jacot, A multilayered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a PCL core for cardiac tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 5630-5642.

- [65] T. Holubec, E. Caliskan, S.H. Sündermann, C.T. Starck, A. Plass, D. Bettex, V. Falk, F. Maisano, The use of extracellular matrix patches in cardiac surgery, *Journal of Cardiac Surgery*, 30 (2015) 145-148.
- [66] E. Avolio, M. Caputo, P. Madeddu, Stem cell therapy and tissue engineering for correction of congenital heart disease, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3 (2015).
- [67] L. Ye, W.-H. Zimmermann, D.J. Garry, J. Zhang, Patching the heart: cardiac repair from within and outside, *Circulation Research*, 113 (2013) 922-932.
- [68] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue Engineering, *Science*, 260 (1993) 920-926.
- [69] M.W. Curtis, B. Russell, Cardiac tissue engineering, *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24 (2009) 87-92.
- [70] P. Horvath, N. Aulner, M. Bickle, A.M. Davies, E. Del Nery, D. Ebner, M.C. Montoya, P. Östling, V. Pietiäinen, L.S. Price, Screening out irrelevant cell-based models of disease, *Nature Reviews Drug Discovery*, 15 (2016) 751.
- [71] D.W. Thomas, J. Burns, J. Audette, A. Carroll, C. Dow-Hygelund, M. Hay, Clinical development success rates 2006-2015, San Diego: Biomedtracker/Washington, DC: BIO/Bend: Amplion, (2016).
- [72] S. Fukuhara, S. Tomita, T. Nakatani, T. Fujisato, Y. Ohtsu, M. Ishida, C. Yutani, S. Kitamura, Bone marrow cell-seeded biodegradable polymeric scaffold enhances angiogenesis and improves function of the infarcted heart, *Circulation Journal*, 69 (2005) 850-857.
- [73] R.S.-Y. Foo, K. Mani, R.N. Kitsis, Death begets failure in the heart, *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (2005) 565-571.
- [74] J. Leor, S. Aboulafia-Etzion, A. Dar, L. Shapiro, I.M. Barbash, A. Battler, Y. Granot, S. Cohen, Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium?, *Circulation*, 102 (2000) Iii-56-Iii-61.
- [75] M. Shevach, B.M. Maoz, R. Feiner, A. Shapira, T. Dvir, Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering, *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (2013) 5210-5217.
- [76] A. Mancuso, A. Barone, M.C. Cristiano, E. Cianflone, M. Fresta, D. Paolino, Cardiac stem cell-loaded delivery systems: a new challenge for myocardial tissue regeneration, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 7701.
- [77] S. McMahan, A. Taylor, K.M. Copeland, Z. Pan, J. Liao, Y. Hong, Current advances in biodegradable synthetic polymer based cardiac patches, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108 (2020) 972-983.

- [78] D. Sharma, M. Ferguson, T.J. Kamp, F. Zhao, Constructing biomimetic cardiac tissues: a review of scaffold materials for engineering cardiac patches, *Emergent Materials*, 2 (2019) 181-191.
- [79] A. Furuta, S. Miyoshi, Y. Itabashi, T. Shimizu, S. Kira, K. Hayakawa, N. Nishiyama, K. Tanimoto, Y. Hagiwara, T. Satoh, K. Fukuda, T. Okano, S. Ogawa, Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo, *Circulation Research*, 98 (2006) 705-712.
- [80] K.R. Stevens, K.L. Kreutziger, S.K. Dupras, F.S. Korte, M. Regnier, V. Muskheli, M.B. Nourse, K. Bendixen, H. Reinecke, C.E. Murry, Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 16568-16573.
- [81] R. Suzuki, F. Hattori, Y. Itabashi, M. Yoshioka, S. Yuasa, H. Manabe-Kawaguchi, M. Murata, S. Makino, K. Kokaji, R. Yozu, K. Fukuda, Omentopexy enhances graft function in myocardial cell sheet transplantation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387 (2009) 353-359.
- [82] K. Huang, S. Hu, K. Cheng, A new era of cardiac cell therapy: opportunities and challenges, *Advanced Healthcare Materials*, (2018) 1801011.
- [83] J.C. Chachques, J.C. Trainini, N. Lago, M. Cortes-Morichetti, O. Schussler, A. Carpentier, Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM Trial): clinical feasibility study, *The Annals of Thoracic Surgery*, 85 (2008) 901-908.
- [84] H.E.M. Mewhort, J.D. Turnbull, A. Satriano, K. Chow, J.A. Flewitt, A.-C. Andrei, D.G. Guzzardi, D.A. Svystonyuk, J.A. White, P.W.M. Fedak, Epicardial infarct repair with bioinductive extracellular matrix promotes vasculogenesis and myocardial recovery, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 35 (2016) 661-670.
- [85] S.D. Anker, A.J. Coats, G. Cristian, D. Dragomir, E. Pusineri, M. Piredda, L. Bettari, R. Dowling, M. Volterrani, B.-A. Kirwan, A prospective comparison of alginate-hydrogel with standard medical therapy to determine impact on functional capacity and clinical outcomes in patients with advanced heart failure (AUGMENT-HF trial), *European Heart Journal*, 36 (2015) 2297-2309.
- [86] N. Frey, A. Linke, T. Süselbeck, J. Müller-Ehmsen, P. Vermeersch, D. Schoors, M. Rosenberg, F. Bea, S. Tuvia, J. Leor, Intracoronary delivery of injectable bioabsorbable scaffold (IK-5001) to treat left ventricular remodeling after st-elevation myocardial infarction, *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 7 (2014) 806-812.
- [87] F. Weinberger, I. Mannhardt, T. Eschenhagen, Engineering cardiac muscle tissue, *Circulation Research*, 120 (2017) 1487-1500.
- [88] J.L. Horning, S.K. Sahoo, S. Vijayaraghavalu, S. Dimitrijevic, J.K. Vasir, T.K. Jain, A.K. Panda, V. Labhasetwar, 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs, *Molecular Pharmaceutics*, 5 (2008) 849-862.

- [89] K.M. Yamada, E. Cukierman, Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D, *Cell*, 130 (2007) 601-610.
- [90] V. Barron, C. Brougham, K. Coghlan, E. McLucas, D. O'Mahoney, C. Stenson-Cox, P.E. McHugh, The effect of physiological cyclic stretch on the cell morphology, cell orientation and protein expression of endothelial cells, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1973-1981.
- [91] K.A. Fitzgerald, M. Malhotra, C.M. Curtin, F.J. O'Brien, C.M. O'Driscoll, Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 215 (2015) 39-54.
- [92] H.K. Kim, D. Missiakas, O. Schneewind, Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*, *Journal of immunological methods*, 410 (2014) 88-99.
- [93] A.J. Ryan, C.M. Brougham, C.D. Garcarena, S.W. Kerrigan, F.J. O'Brien, Towards 3D in vitro models for the study of cardiovascular tissues and disease, *Drug Discovery Today*, 21 (2016) 1437-1445.
- [94] S.M. Paul, D.S. Mytelka, C.T. Dunwiddie, C.C. Persinger, B.H. Munos, S.R. Lindborg, A.L. Schacht, How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9 (2010) 203.
- [95] M.P. Prabhakaran, D. Kai, L. Ghasemi-Mobarakeh, S. Ramakrishna, Electrospun biocomposite nanofibrous patch for cardiac tissue engineering, *Biomedical Materials*, 6 (2011) 055001.
- [96] S.M. Parizadeh, R. Jafarzadeh-Esfehani, M. Ghandehari, M.R. Parizadeh, G.A. Ferns, A. Avan, S.M. Hassanian, Stem cell therapy: A novel approach for myocardial infarction, *Journal of Cellular Physiology*, 234 (2019) 16904-16912.
- [97] J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282 (1998) 1145-1147.
- [98] A. Vassilev, M. Depamphilis, Links between DNA replication, stem cells and cancer, *Genes*, 8 (2017) 45.
- [99] Chris, Paul, N. Benvenisty, Peter, U. Ben-David, R. Eakins, N. French, Neil, L. Kelly, Neil, J. Kurth, D. Ladenheim, H. Laverty, J. McBlane, G. Narayanan, S. Patel, J. Reinhardt, A. Rossi, M. Sharpe, B, Assessing the safety of stem cell therapeutics, *Cell Stem Cell*, 8 (2011) 618-628.
- [100] Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang, J. Ding, Mesenchymal stem cells for regenerative medicine, *Cells*, 8 (2019) 886.
- [101] A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research*, 9 (1991) 641-650.

- [102] A. Andrzejewska, B. Lukomska, M. Janowski, Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost, *Stem Cells*, 37 (2019) 855-864.
- [103] C. Brown, C. McKee, S. Bakshi, K. Walker, E. Hakman, S. Halassy, D. Svinarich, R. Dodds, C.K. Govind, G.R. Chaudhry, Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13 (2019) 1738-1755.
- [104] A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells: time to change the name!, *Stem Cells Translational Medicine*, 6 (2017) 1445-1451.
- [105] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society For Cellular Therapy Position Statement, *Cytotherapy*, 8 (2006) 315-317.
- [106] I.R. Murray, C.C. West, W.R. Hardy, A.W. James, T.S. Park, A. Nguyen, T. Tawonsawatruk, L. Lazzari, C. Soo, B. Péault, Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71 (2014) 1353-1374.
- [107] M. Crisan, M. Corselli, W.C.W. Chen, B. Péault, Perivascular cells for regenerative medicine, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16 (2012) 2851-2860.
- [108] A.I. Caplan, New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers, *Journal of Orthopaedic Research*, 35 (2017) 1151-1159.
- [109] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C.-W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.-N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badylak, H.-J. Bühring, J.-P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, B. Péault, A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs, *Cell Stem Cell*, 3 (2008) 301-313.
- [110] M.A. Haniffa, M.P. Collin, C.D. Buckley, F. Dazzi, Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes?, *Haematologica*, 94 (2009) 258-263.
- [111] K. Lorenz, M. Sicker, E. Schmelzer, T. Rupf, J. Salvetter, M. Schulz-Siegmund, A. Bader, Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts, *Experimental Dermatology*, 17 (2008) 925-932.
- [112] M.A. Haniffa, X.-N. Wang, U. Holtick, M. Rae, J.D. Isaacs, A.M. Dickinson, C.M. Hilken, M.P. Collin, Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells, *The Journal of Immunology*, 179 (2007) 1595-1604.
- [113] P.A. Lysy, F. Smets, C. Sibille, M. Najimi, E.M. Sokal, Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation, *Hepatology*, 46 (2007) 1574-1585.
- [114] W. Wagner, F. Wein, A. Seckinger, M. Frankhauser, U. Wirkner, U. Krause, J. Blake, C. Schwager, V. Eckstein, W. Ansorge, A.D. Ho, Comparative characteristics of

mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Experimental Hematology*, 33 (2005) 1402-1416.

[115] A. Blasi, C. Martino, L. Balducci, M. Saldarelli, A. Soleti, S.E. Navone, L. Canzi, S. Cristini, G. Invernici, E.A. Parati, G. Alessandri, Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential, *Vascular Cell*, 3 (2011) 5.

[116] D.T. Covas, R.A. Panepucci, A.M. Fontes, W.A. Silva, M.D. Orellana, M.C.C. Freitas, L. Neder, A.R.D. Santos, L.C. Peres, M.C. Jamur, M.A. Zago, Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts, *Experimental Hematology*, 36 (2008) 642-654.

[117] H. Kalervo Väänänen, Mesenchymal stem cells, *Annals of Medicine*, 37 (2005) 469-479.

[118] T.D. Johnson, R.L. Braden, K.L. Christman, Injectable ECM Scaffolds for Cardiac Repair, in: M. Radisic, L.D. Black Iii (Eds.) *Cardiac Tissue Engineering: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2014, pp. 109-120.

[119] J. Wu, F. Zeng, R.D. Weisel, R.-K. Li, *Stem Cells for Cardiac Regeneration by Cell Therapy and Myocardial Tissue Engineering*, Springer Berlin Heidelberg 2009, pp. 107-128.

[120] Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura, H. Mori, Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction, *Nature Medicine*, 12 (2006) 459-465.

[121] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126 (2006) 663-676.

[122] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 131 (2007) 861-872.

[123] J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318 (2007) 1917-1920.

[124] M.C. Puri, A. Nagy, Concise review: embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on, *Stem Cells*, 30 (2012) 10-14.

[125] F. González, S. Boué, J.C.I. Belmonte, Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte, *Nature Reviews Genetics*, 12 (2011) 231-242.

[126] X. Yang, L. Pabon, C.E. Murry, Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Circulation Research*, 114 (2014) 511-523.

- [127] Q. Zhang, J. Jiang, P. Han, Q. Yuan, J. Zhang, X. Zhang, Y. Xu, H. Cao, Q. Meng, L. Chen, Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals, *Cell Research*, 21 (2011) 579.
- [128] T.M. Mohamed, N.R. Stone, E.C. Berry, E. Radzinsky, Y. Huang, K. Pratt, Y.-S. Ang, P. Yu, H. Wang, S. Tang, Chemical enhancement of in vitro and in vivo direct cardiac reprogramming, *Circulation*, 135 (2016) 978–995.
- [129] I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, L. Gepstein, Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, *The Journal of Clinical Investigation*, 108 (2001) 407–414.
- [130] C.L. Mummery, J. Zhang, E.S. Ng, D.A. Elliott, A.G. Elefanty, T.J. Kamp, Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes, *Circulation Research*, 111 (2012) 344–358.
- [131] M.A. Laflamme, K.Y. Chen, A.V. Naumova, V. Muskheli, J.A. Fugate, S.K. Dupras, H. Reinecke, C. Xu, M. Hassanipour, S. Police, Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts, *Nature Biotechnology*, 25 (2007) 1015–1024.
- [132] X. Lian, C. Hsiao, G. Wilson, K. Zhu, L.B. Hazeltine, S.M. Azarin, K.K. Raval, J. Zhang, T.J. Kamp, S.P. Palecek, Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) E1848–E1857.
- [133] N. Cao, H. Liang, J. Huang, J. Wang, Y. Chen, Z. Chen, H.-T. Yang, Highly efficient induction and long-term maintenance of multipotent cardiovascular progenitors from human pluripotent stem cells under defined conditions, *Cell Research*, 23 (2013) 1119–1132.
- [134] G. Gintant, B. Fermini, N. Stockbridge, D. Strauss, The evolving roles of human ipsc-derived cardiomyocytes in drug safety and discovery, *Cell Stem Cell*, 21 (2017) 14–17.
- [135] F.B. Bedada, S.S. Chan, S.K. Metzger, L. Zhang, J. Zhang, D.J. Garry, T.J. Kamp, M. Kyba, J.M. Metzger, Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratiometric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes, *Stem Cell Reports*, 3 (2014) 594–605.
- [136] F.B. Bedada, M. Wheelwright, J.M. Metzger, Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863 (2016) 1829–1838.
- [137] C. Xu, S. Police, N. Rao, M.K. Carpenter, Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells, *Circulation Research*, 91 (2002) 501–508.

- [138] M. Snir, I. Kehat, A. Gepstein, R. Coleman, J. Itskovitz-Eldor, E. Livne, L. Gepstein, Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285 (2003) H2355-H2363.
- [139] C. Mummery, D. Ward-van Oostwaard, P. Doevendans, R. Spijker, S. van den Brink, R. Hassink, M. van der Heyden, T. Opthof, M. Pera, A.B. de la Riviere, Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells, *Circulation*, 107 (2003) 2733-2740.
- [140] I. Kehat, A. Gepstein, A. Spira, J. Itskovitz-Eldor, L. Gepstein, High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction, *Circulation Research*, 91 (2002) 659-661.
- [141] Q.-Z. Chen, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Lyon, A.R. Boccaccini, Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59 (2008) 1-37.
- [142] D. Shum-Tim, K. Ridwan, M. Alrefai, J. Connell, A. Paul, D. Murali, Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy, *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, (2015) 81.
- [143] F. Wang, J. Guan, Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (2010) 784-797.
- [144] T.J. Herron, 57 - Highly Mature Human iPSC-Derived Cardiomyocytes as Models for Cardiac Electrophysiology and Drug Testing, in: D.P. Zipes, J. Jalife, W.G. Stevenson (Eds.) *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside* (Seventh Edition), Elsevier 2018, pp. 541-551.
- [145] P. Menasché, O. Alfieri, S. Janssens, W. McKenna, H. Reichenspurner, L. Trinquart, J.-T. Vilquin, J.-P. Marolleau, B. Seymour, J.R.M. Larghero, S. Lake, G. Chatellier, S. Solomon, M. Desnos, A.A. Hagège, The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial, *Circulation*, 117 (2008) 1189-1200.
- [146] G.M. Ellison, A.J. Smith, C.D. Waring, B.J. Henning, A.O. Burdina, J. Polydorou, C. Vicinanza, F.C. Lewis, B. Nadal-Ginard, D. Torella, *Adult cardiac stem cells: Identity, location and potential*, Springer New York 2014, pp. 47-90.
- [147] E. Messina, L. De Angelis, G. Frati, S. Morrone, S. Chimenti, F. Fiordaliso, M. Salio, M. Battaglia, M.V.G. Latronico, M. Coletta, E. Vivarelli, L. Frati, G. Cossu, A. Giacomello, Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart, *Circulation Research*, 95 (2004) 911-921.
- [148] D. Torella, G.M. Ellison, I. Karakikes, B. Nadal-Ginard, Cardiovascular development: towards biomedical applicability, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (2007) 661-673.

- [149] R. Koninckx, A. Daniëls, S. Windmolders, F. Carlotti, U. Mees, P. Steels, J.-L. Rummens, M. Hendrikx, K. Hensen, Mesenchymal stem cells or cardiac progenitors for cardiac repair? A comparative study, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (2011) 2141-2156.
- [150] B.N. Oskouei, G. Lamirault, C. Joseph, A.V. Treuer, S. Landa, J. Da Silva, K. Hatzistergos, M. Dauer, W. Balkan, I. McNiece, J.M. Hare, Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair, *Stem Cells Translational Medicine*, 1 (2012) 116-124.
- [151] M.P. Santini, E. Forte, R.P. Harvey, J.C. Kovacic, Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells, *Development*, 143 (2016) 1242-1258.
- [152] T.D. Johnson, R.C. Hill, M. Dzieciatkowska, V. Nigam, A. Behfar, K.L. Christman, K.C. Hansen, Quantification of decellularized human myocardial matrix: A comparison of six patients, *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 10 (2016) 75-83.
- [153] D. Bejleri, M.E. Davis, Decellularized extracellular matrix materials for cardiac repair and regeneration, *Advanced Healthcare Materials*, 8 (2019) 1801217.
- [154] A.C. Silva, S.C. Rodrigues, J. Caldeira, A.M. Nunes, V. Sampaio-Pinto, T.P. Resende, M.J. Oliveira, M.A. Barbosa, S. Thorsteinsdóttir, D.S. Nascimento, P. Pinto-Do-Ó, Three-dimensional scaffolds of fetal decellularized hearts exhibit enhanced potential to support cardiac cells in comparison to the adult, *Biomaterials*, 104 (2016) 52-64.
- [155] L.A. Reis, L.L.Y. Chiu, N. Feric, L. Fu, M. Radisic, Biomaterials in myocardial tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10 (2016) 11-28.
- [156] M. Shin, O. Ishii, T. Sueda, J.P. Vacanti, Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh, *Biomaterials*, 25 (2004) 3717-3723.
- [157] Y. Liu, Y. Xu, Z. Wang, D. Wen, W. Zhang, S. Schmull, H. Li, Y. Chen, S. Xue, Electrospun nanofibrous sheets of collagen/elastin/polycaprolactone improve cardiac repair after myocardial infarction, *American Journal of Translational Research*, 8 (2016) 1678.
- [158] Y. Yang, D. Lei, S. Huang, Q. Yang, B. Song, Y. Guo, A. Shen, Z. Yuan, S. Li, F.L. Qing, X. Ye, Z. You, Q. Zhao, Elastic 3D-printed hybrid polymeric scaffold improves cardiac remodeling after myocardial infarction, *Advanced Healthcare Materials*, 8 (2019) 1900065.
- [159] J. Chen, H. Hu, L. Feng, Q. Zhu, A. Hancharou, B. Liu, C. Yan, Y. Xu, R. Guo, Preparation and characterization of 3D porous conductive scaffolds with magnetic resonance enhancement in tissue engineering, *Biomedical Materials*, 14 (2019) 045013.
- [160] A. Talebi, S. Labbaf, F. Karimzadeh, A conductive film of chitosan-polycaprolactone-polypyrrole with potential in heart patch application, *Polymer Testing*, 75 (2019) 254-261.

- [161] T.H. Qazi, R. Rai, D. Dippold, J.E. Roether, D.W. Schubert, E. Rosellini, N. Barbani, A.R. Boccaccini, Development and characterization of novel electrically conductive PANI-PGS composites for cardiac tissue engineering applications, *Acta Biomaterialia*, 10 (2014) 2434-2445.
- [162] A. Marsano, R. Maidhof, J. Luo, K. Fujikara, E.E. Konofagou, A. Banfi, G. Vunjak-Novakovic, The effect of controlled expression of VEGF by transduced myoblasts in a cardiac patch on vascularization in a mouse model of myocardial infarction, *Biomaterials*, 34 (2013) 393-401.
- [163] Q.-Z. Chen, H. Ishii, G.A. Thouas, A.R. Lyon, J.S. Wright, J.J. Blaker, W. Chrzanowski, A.R. Boccaccini, N.N. Ali, J.C. Knowles, An elastomeric patch derived from poly (glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart, *Biomaterials*, 31 (2010) 3885-3893.
- [164] M. Radisic, H. Park, T.P. Martens, J.E. Salazar-Lazaro, W. Geng, Y. Wang, R. Langer, L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, Pre-treatment of synthetic elastomeric scaffolds by cardiac fibroblasts improves engineered heart tissue, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86 (2008) 713-724.
- [165] Q. Zhou, J.-Y. Zhou, Z. Zheng, H. Zhang, S.-S. Hu, A novel vascularized patch enhances cell survival and modifies ventricular remodeling in a rat myocardial infarction model, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 140 (2010) 1388-1396.e1383.
- [166] C. Cristallini, G. Vaccari, N. Barbani, E. Cibrario Rocchietti, R. Barberis, M. Falzone, K. Cabiale, G. Perona, E. Bellotti, R. Rastaldo, S. Pascale, P. Pagliaro, C. Giachino, Cardioprotection of PLGA/gelatine cardiac patches functionalised with adenosine in a large animal model of ischaemia and reperfusion injury: A feasibility study, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13 (2019) 1253-1264.
- [167] J.M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess, Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response, *The AAPS Journal*, 12 (2010) 188-196.
- [168] H. Xing, H. Lee, L. Luo, T.R. Kyriakides, Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function, *Biotechnology Advances*, 42 (2020) 107421.
- [169] A.H. Morris, D. Stamer, T. Kyriakides, The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials, *Seminars in Immunology*, Elsevier, 2017, pp. 72-91.
- [170] I. Perea-Gil, C. Prat-Vidal, A. Bayes-Genis, In vivo experience with natural scaffolds for myocardial infarction: the times they are a-changin', *Stem Cell Research & Therapy*, 6 (2015).
- [171] A. Lee, A.R. Hudson, D.J. Shiwardski, J.W. Tashman, T.J. Hinton, S. Yerneni, J.M. Bliley, P.G. Campbell, A.W. Feinberg, 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart, *Science*, 365 (2019) 482-487.

- [172] R. Nazir, A. Bruyneel, C. Carr, J. Czernuszka, Collagen type I and hyaluronic acid based hybrid scaffolds for heart valve tissue engineering, *Biopolymers*, 110 (2019) e23278.
- [173] W.-Q. Wu, S. Peng, Z.-Y. Song, S. Lin, Collagen biomaterial for the treatment of myocardial infarction: an update on cardiac tissue engineering and myocardial regeneration, *Drug Delivery and Translational Research*, (2019).
- [174] Q.A. Majid, A.T.R. Fricker, D.A. Gregory, N. Davidenko, O. Hernandez Cruz, R.J. Jabbour, T.J. Owen, P. Basnett, B. Lukasiewicz, M. Stevens, S. Best, R. Cameron, S. Sinha, S.E. Harding, I. Roy, natural biomaterials for cardiac tissue engineering: a highly biocompatible solution, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7 (2020).
- [175] H. Li, M. Bao, Y. Nie, Extracellular matrix-based biomaterials for cardiac regeneration and repair, *Heart Failure Reviews*, (2020).
- [176] D.A. Taylor, L.C. Sampaio, Z. Ferdous, A.S. Gobin, L.J. Taite, Decellularized matrices in regenerative medicine, *Acta Biomaterialia*, 74 (2018) 74-89.
- [177] Y. Efraim, H. Sarig, N. Cohen Anavy, U. Sarig, E. De Berardinis, S.-Y. Chaw, M. Krishnamoorthi, J. Kalifa, H. Bogireddi, T.V. Duc, T. Kofidis, L. Baruch, F.Y.C. Boey, S.S. Venkatraman, M. Machluf, Biohybrid cardiac ECM-based hydrogels improve long term cardiac function post myocardial infarction, *Acta Biomaterialia*, 50 (2017) 220-233.
- [178] K.H. Hillebrandt, H. Everwien, N. Haep, E. Keshi, J. Pratschke, I.M. Sauer, Strategies based on organ decellularization and recellularization, *Transplant. International*, 32 (2019) 571-585.
- [179] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32 (2011) 3233-3243.
- [180] D. Choudhury, M. Yee, Z.L.J. Sheng, A. Amirul, M.W. Naing, Decellularization Systems and Devices: State-of-the-art Review, *Acta Biomaterialia*, (2020).
- [181] T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27 (2006) 3675-3683.
- [182] B. Cox, A. Emili, Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics, *Nature Protocols*, 1 (2006) 1872-1878.
- [183] N. Patel, E. Solanki, R. Picciani, V. Cavett, J.A. Caldwell-Busby, S.K. Bhattacharya, Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics, *Proteomics*, 8 (2008) 1055-1070.
- [184] R.-N. Chen, H.-O. Ho, Y.-T. Tsai, M.-T. Sheu, Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications, *Biomaterials*, 25 (2004) 2679-2686.
- [185] K.H. Nakayama, C.A. Batchelder, C.I. Lee, A.F. Tarantal, Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering, *Tissue Engineering. Part A*, 16 (2010) 2207-2216.

- [186] S.R. Meyer, B. Chiu, T.A. Churchill, L. Zhu, J.R. Lakey, D.B. Ross, Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79 (2006) 254-262.
- [187] T. Woods, P.F. Gratzner, Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft, *Biomaterials*, 26 (2005) 7339-7349.
- [188] B. Yang, Y. Zhang, L. Zhou, Z. Sun, J. Zheng, Y. Chen, Y. Dai, Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering, *Tissue Engineering Part C Methods*, 16 (2010) 1201-1211.
- [189] T.W. Hudson, S. Zawko, C. Deister, S. Lundy, C.Y. Hu, K. Lee, C.E. Schmidt, Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration, *Tissue Engineering*, 10 (2004) 1641-1651.
- [190] L. Gui, A. Muto, S.A. Chan, C.K. Breuer, L.E. Niklason, Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts, *Tissue Engineering Part A*, 15 (2009) 2665-2676.
- [191] T.H. Petersen, E.A. Calle, L. Zhao, E.J. Lee, L. Gui, M.B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z.W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog, L.E. Niklason, Tissue-engineered lungs for in vivo implantation, *Science*, 329 (2010) 538-541.
- [192] A.M. Seddon, P. Curnow, P.J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666 (2004) 105-117.
- [193] J.S. Cartmell, M.G. Dunn, Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties, *Journal of Biomedical Materials Research*, 49 (2000) 134-140.
- [194] G.H. Borschel, R.G. Dennis, W.M.J. Kuzon, Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 113 (2004) 595-602.
- [195] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32 (2011) 3233-3243.
- [196] L. Iop, T. Palmosi, E. Dal Sasso, G. Gerosa, Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery, *Journal of Thoracic Disease*, 10 (2018) S2390-S2411.
- [197] P. Thampi, D. Nair, L. R, V. N, S. Venugopal, U. Ramachandra, Pathological Effects of Processed Bovine Pericardial Scaffolds-A Comparative In Vivo Evaluation, *Artificial Organs*, 37 (2013) 600-605.
- [198] S. Mathapati, D.K. Bishi, S. Guhathakurta, K.M. Cherian, J.R. Venugopal, S. Ramakrishna, R.S. Verma, Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked

bovine pericardium for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 33 (2013) 1561-1572.

[199] F. Shahabipour, M. Banach, T.P. Johnston, M. Pirro, A. Sahebkar, Novel approaches toward the generation of bioscaffolds as a potential therapy in cardiovascular tissue engineering, *International Journal of Cardiology*, 228 (2017) 319-326.

[200] S. Jeong, E.J. Yoon, H.G. Lim, S.C. Sung, Y.J. Kim, The effect of space fillers in the cross-linking processes of bioprosthesis, *BioResearch Open Access*, 2 (2013) 98-106.

[201] X. Li, Y. Guo, K.R. Ziegler, L.S. Model, S.D.D. Eghbalieh, R.A. Brenes, S.T. Kim, C. Shu, A. Dardik, Current usage and future directions for the bovine pericardial patch, *Annals of Vascular Surgery*, 25 (2011) 561-568.

[202] S.F. Badylak, D. Taylor, K. Uygun, Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13 (2011) 27-53.

[203] E.A. Grebenik, E.R. Gafarova, L.P. Istranov, E.V. Istranova, X. Ma, J. Xu, W. Guo, A. Atala, P.S. Timashev, mammalian pericardium-based bioprosthetic materials in xenotransplantation and tissue engineering, *Biotechnology Journal*, 15 (2020) 1900334.

[204] N. Li, Y. Li, D. Gong, C. Xia, X. Liu, Z. Xu, Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility, *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 26 (2018) 768-776.

[205] M. Alizadeh, L. Rezakhani, M. Khodaei, M. Soleimannejad, A. Alizadeh, Evaluating the effects of vacuum on the microstructure and biocompatibility of bovine decellularized pericardium, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15 (2021) 116-128.

[206] H.-J. Wei, H.-C. Liang, M.-H. Lee, Y.-C. Huang, Y. Chang, H.-W. Sung, Construction of varying porous structures in acellular bovine pericardia as a tissue-engineering extracellular matrix, *Biomaterials*, 26 (2005) 1905-1913.

[207] X. Dong, X. Wei, W. Yi, C. Gu, X. Kang, Y. Liu, Q. Li, D. Yi, RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (2009) 2327-2336.

[208] D. Gabriel, T. Dvir, D.S. Kohane, Delivering bioactive molecules as instructive cues to engineered tissues, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9 (2012) 473-492.

[209] L.S. Carasso, I. Benhar, T. Dvir, Universal Biofactor-Releasing Scaffold Enabling in Vivo Reloading, *Nano Letters*, 19 (2019) 1838-1843.

[210] P. Chandika, S.-Y. Heo, T.-H. Kim, G.-W. Oh, G.-H. Kim, M.-S. Kim, W.-K. Jung, Recent advances in biological macromolecule based tissue-engineered composite scaffolds for cardiac tissue regeneration applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164 (2020) 2329-2357.

- [211] T. Simón-Yarza, F.R. Formiga, E. Tamayo, B. Pelacho, F. Prosper, M.J. Blanco-Prieto, Vascular endothelial growth factor-delivery systems for cardiac repair: an overview, *Theranostics*, 2 (2012) 541-552.
- [212] D. Kai, M.P. Prabhakaran, G. Jin, L. Tian, S. Ramakrishna, Potential of VEGF-encapsulated electrospun nanofibers for in vitro cardiomyogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine*, 11 (2017) 1002-1010.
- [213] A.J. Rufaihah, S.R. Vaibavi, M. Plotkin, J. Shen, V. Nithya, J. Wang, D. Seliktar, T. Kofidis, Enhanced infarct stabilization and neovascularization mediated by VEGF-loaded PEGylated fibrinogen hydrogel in a rodent myocardial infarction model, *Biomaterials*, 34 (2013) 8195-8202.
- [214] E. Kardami, L. Liu, S.K.B. Pasumarthi, B.W. Doble, P.A. Cattini, Regulation of basic fibroblast growth factor (BFGF) and FGF receptors in the heart, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 752 (1995) 353-369.
- [215] C. Franco, B.-Å. Bengtsson, G. Johannsson, The GH/IGF-1 axis in obesity: physiological and pathological aspects, *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 4 (2006) 51-56.
- [216] G.M. Ellison, D. Torella, S. Dellegrottaglie, C. Perez-Martinez, A. Perez de Prado, C. Vicinanza, S. Purushothaman, V. Galuppo, C. Iaconetti, C.D. Waring, Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart, *Journal of the American College of Cardiology*, 58 (2011) 977-986.
- [217] H. Park, B.L. Larson, M.E. Kolewe, G. Vunjak-Novakovic, L.E. Freed, Biomimetic scaffold combined with electrical stimulation and growth factor promotes tissue engineered cardiac development, *Experimental Cell Research*, 321 (2014) 297-306.
- [218] E. Rosellini, N. Barbani, C. Frati, D. Madeddu, D. Massai, U. Morbiducci, L. Lazzeri, A. Falco, G. Graiani, C. Lagrasta, A. Audenino, M.G. Cascone, F. Quaini, IGF-1 loaded injectable microspheres for potential repair of the infarcted myocardium, *Journal of Biomaterials Applications*, 35 (2021) 762-775.
- [219] A.F.G. Godier-Furnemont, T.P. Martens, M.S. Koeckert, L. Wan, J. Parks, K. Arai, G. Zhang, B. Hudson, S. Homma, G. Vunjak-Novakovic, Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (2011) 7974-7979.
- [220] I. Pallotta, B. Sun, G. Lallios, C. Terrenoire, D.O. Freytes, Contributions of bone morphogenetic proteins in cardiac repair cells in three-dimensional in vitro models and angiogenesis, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (2018) 349-359.
- [221] M. Gnecci, E. Cervio, *Mesenchymal stem cell therapy for heart disease*, *Mesenchymal Stem Cell Therapy*, Springer 2013, pp. 241-270.

- [222] D.G. Phinney, D.J. Prockop, Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views, *Stem Cells*, 25 (2007) 2896-2902.
- [223] M. Mirotsov, T.M. Jayawardena, J. Schmeckpeper, M. Gnechi, V.J. Dzau, Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50 (2011) 280-289.
- [224] A.I. Caplan, J.E. Dennis, Mesenchymal stem cells as trophic mediators, *Journal of Cellular Biochemistry*, 98 (2006) 1076-1084.
- [225] B. Zhang, R.W.Y. Yeo, K.H. Tan, S.K. Lim, Focus on extracellular vesicles: therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (2016) 174.
- [226] M. Gnechi, H. He, N. Noiseux, O.D. Liang, L. Zhang, F. Morello, H. Mu, L.G. Melo, R.E. Pratt, J.S. Ingwall, Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement, *The FASEB Journal*, 20 (2006) 661-669.
- [227] J.-H. Jung, X. Fu, P.C. Yang, Exosomes generated from iPSC-derivatives: new direction for stem cell therapy in human heart diseases, *Circulation Research*, 120 (2017) 407-417.
- [228] R. Kishore, M. Khan, More than tiny sacks: stem cell exosomes as cell-free modality for cardiac repair, *Circulation Research*, 118 (2016) 330-343.
- [229] G. Bellin, C. Gardin, L. Ferroni, J. Chachques, M. Rogante, D. Mitrečić, R. Ferrari, B. Zavan, exosome in cardiovascular diseases: a complex world full of hope, *Cells*, 8 (2019) 166.
- [230] S. Bheri, J.R. Hoffman, H.-J. Park, M.E. Davis, Biomimetic nanovesicle design for cardiac tissue repair, *Nanomedicine*, 15 (2020) 1873-1896.
- [231] Y. Yuan, W. Du, J. Liu, W. Ma, L. Zhang, Z. Du, B. Cai, Stem cell-derived exosome in cardiovascular diseases: macro roles of micro particles, *Frontiers in Pharmacology*, 9 (2018) 547.
- [232] J.P. Armstrong, M.M. Stevens, Strategic design of extracellular vesicle drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 130 (2018) 12-16.
- [233] K. Lv, Q. Li, L. Zhang, Y. Wang, Z. Zhong, J. Zhao, X. Lin, J. Wang, K. Zhu, C. Xiao, Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction, *Theranostics*, 9 (2019) 7403.
- [234] C.W. Chen, L.L. Wang, S. Zaman, J. Gordon, M.F. Arisi, C.M. Venkataraman, J.J. Chung, G. Hung, A.C. Gaffey, L.A. Spruce, H. Fazelinia, R.C. Gorman, S.H. Seeholzer, J.A. Burdick, P. Atluri, Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction, *Cardiovascular Research*, 114 (2018) 1029-1040.

- [235] S. Fais, L. O'Driscoll, F.E. Borrás, E. Buzas, G. Camussi, F. Cappello, J. Carvalho, A. Cordeiro da Silva, H. Del Portillo, S. El Andaloussi, T. Ficko Trček, R. Furlan, A. Hendrix, I. Gursel, V. Kralj-Iglic, B. Kaeffer, M. Kosanovic, M.E. Lekka, G. Lipps, M. Logozzi, A. Marcilla, M. Sammar, A. Llorente, I. Nazarenko, C. Oliveira, G. Pocsfalvi, L. Rajendran, G. Raposo, E. Rohde, P. Siljander, G. van Niel, M.H. Vasconcelos, M. Yáñez-Mó, M.L. Yliperttula, N. Zarovni, A.B. Zavec, B. Giebel, Evidence-based clinical use of nanoscale extracellular vesicles in nanomedicine, *ACS Nano*, 10 (2016) 3886-3899.
- [236] M. Yáñez-Mó, P.R.-M. Siljander, Z. Andreu, A. Bedina Zavec, F.E. Borrás, E.I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *Journal of Extracellular Vesicles*, 4 (2015) 27066.
- [237] A. Hoshino, B. Costa-Silva, T.-L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M.T. Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, 527 (2015) 329-335.
- [238] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, J.O. Lötvall, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nature Cell Biology*, 9 (2007) 654-659.
- [239] J. Ratajczak, K. Miekus, M. Kucia, J. Zhang, R. Reca, P. Dvorak, M. Ratajczak, Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery, *Leukemia*, 20 (2006) 847-856.
- [240] G. Qiu, G. Zheng, M. Ge, J. Wang, R. Huang, Q. Shu, J. Xu, Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, *Stem Cell Research & Therapy*, 10 (2019) 359.
- [241] B. György, T.G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, E. Pállinger, E. Pap, A. Kittel, Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (2011) 2667-2688.
- [242] J.H. Kim, S.H. Shin, T.Z. Li, H. Suh, Influence of in vitro biomimicked stem cell 'niche' for regulation of proliferation and differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to myocardial phenotypes: serum starvation without aid of chemical agents and prevention of spontaneous stem cell transformation enhanced by the matrix environment, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10 (2016) E1-E13.
- [243] J. Cheng, Q. Ding, J. Wang, L. Deng, L. Yang, L. Tao, H. Lei, S. Lu, 5-Azacytidine delivered by mesoporous silica nanoparticles regulates the differentiation of P19 cells into cardiomyocytes, *Nanoscale*, 8 (2016) 2011-2021.
- [244] Q. Qian, H. Qian, X. Zhang, W. Zhu, Y. Yan, S. Ye, X. Peng, W. Li, Z. Xu, L. Sun, 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived

mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase, *Stem Cells and Development*, 21 (2012) 67-75.

[245] A. Burlacu, A.-M. Rosca, H. Maniu, I. Titorencu, E. Dragan, V. Jinga, M. Simionescu, Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells, *European Journal of Cell Biology*, 87 (2008) 173-184.

[246] A. Kakkar, S.B. Nandy, S. Gupta, B. Bharagava, B. Airan, S. Mohanty, Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are better respondents to TGF β 1 for in vitro generation of cardiomyocyte-like cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 460 (2019) 53-66.

[247] P.D. Potdar, P. Prasannan, Differentiation of Human Dermal Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes by Treatment with 5-Azacytidine: Concept for Regenerative Therapy in Myocardial Infarction, *ISRN Stem Cells*, 2013 (2013) 687282.

[248] J. Shi, W. Xing, J. Yang, S. Li, Comparison and mechanism research of the differentiation of bone mesenchymal stem cells into cardiomyocytes induced by 5-azacytidine or angiotensin II, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 5 (2015) 364-371.

[249] Y. Liu, J. Song, W. Liu, Y. Wan, X. Chen, C. Hu, Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation?, *Cardiovascular Research*, 58 (2003) 460-468.

[250] G. Siegel, P. Krause, S. Wöhrle, P. Nowak, M. Ayturan, T. Kluba, B.R. Brehm, B. Neumeister, D. Köhler, P. Rosenberger, Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential, *Stem Cells and Development*, 21 (2012) 2457-2470.

[251] S. Roura, J. Farré, L. Hove-Madsen, C. Prat-Vidal, C. Soler-Botija, C. Gálvez-Montón, M. Vilalta, A. Bayes-Genis, Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, *Basic Research in Cardiology*, 105 (2010) 419-430.

[252] F. Deng, H. Lei, Y. Hu, L. He, H. Fu, R. Feng, P. Feng, W. Huang, X. Wang, J. Chang, Combination of retinoic acid, dimethyl sulfoxide and 5-azacytidine promotes cardiac differentiation of human fetal liver-derived mesenchymal stem cells, *Cell and Tissue Banking*, 17 (2016) 147-159.

[253] R. Pal, M.K. Mamidi, A.K. Das, R. Bhonde, Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells, *Archives of Toxicology*, 86 (2012) 651-661.

[254] I.S. Skerjanc, H. Petropoulos, A.G. Ridgeway, S. Wilton, Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 34904-34910.

[255] C. Ventura, M. Maioli, Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells, *Circulation Research*, 87 (2000) 189-194.

- [256] Y. Ohtsu, K. Johkura, K.-i. Ito, T. Akashima, K. Asanuma, N. Ogiwara, T. Oka, I. Komuro, K. Sasaki, J. Amano, Stimulation of P19CL6 with multiple reagents induces pulsating particles in vivo, *Current Medical Research and Opinion*, 21 (2005) 795-803.
- [257] H. Okura, A. Matsuyama, C.-M. Lee, A. Saga, A. Kakuta-Yamamoto, A. Nagao, N. Sougawa, N. Sekiya, K. Takekita, Y. Shudo, Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16 (2010) 417-425.
- [258] T. Jenuwein, C.D. Allis, Translating the histone code, *Science*, 293 (2001) 1074-1080.
- [259] T. Tomson, D. Battino, E. Perucca, The remarkable story of valproic acid, *The Lancet Neurology*, 15 (2016) 141.
- [260] M. Kostrouchova, Z. Kostrouch, M. Kostrouchova, Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways, *Folia Biologica-Praha*, 53 (2007) 37.
- [261] S.Y. Xie, W.B. Fu, G.J. Yu, X.L. Hu, K.S. Lai, X.W. Peng, Y.T. Zhou, X.J. Zhu, P. Christov, L. Sawyer, T.T. Ni, G.A. Sulikowski, Z.Z. Yang, E. Lee, C.Y. Zeng, W.E. Wang, T.P. Zhong, Discovering small molecules as Wnt inhibitors that promote heart regeneration and injury repair, *Journal of Molecular Cell Biology*, 12 (2020) 42-54.
- [262] S. Hasani, A. Javeri, A. Asadi, M.F. Taha, Cardiac differentiation of adipose tissue-derived stem cells is driven by BMP4 and bFGF but counteracted by 5-azacytidine and valproic acid, *Cell Journal (Yakhteh)*, 22 (2020).
- [263] M.G. Perino, S. Yamanaka, J. Li, A.M. Wobus, K.R. Boheler, Cardiomyogenic stem and progenitor cell plasticity and the dissection of cardiopoiesis, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45 (2008) 475-494.
- [264] S. Mohanty, S. Bose, K.G. Jain, B. Bhargava, B. Airan, TGF β 1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells, *International Journal of Cardiology*, 163 (2013) 93-99.
- [265] J.-Y. Hahn, H.-J. Cho, H.-J. Kang, T.-S. Kim, M.-H. Kim, J.-H. Chung, J.-W. Bae, B.-H. Oh, Y.-B. Park, H.-S. Kim, Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, 51 (2008) 933-943.
- [266] H. Nemade, A. Acharya, U. Chaudhari, E. Nembo, F. Nguemo, N. Riet, H. Abken, J. Hescheler, S. Papadopoulos, A. Sachinidis, Cyclooxygenases inhibitors efficiently induce cardiomyogenesis in human pluripotent stem cells, *Cells*, 9 (2020) 554.
- [267] J. Moon, H. Zhou, L.-s. Zhang, W. Tan, Y. Liu, S. Zhang, L.K. Morlock, X. Bao, S.P. Palecek, J.Q. Feng, Blockade to pathological remodeling of infarcted heart tissue

using a porcupine antagonist, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (2017) 1649-1654.

[268] S. Saraswati, M.P. Alfaro, C.A. Thorne, J. Atkinson, E. Lee, P.P. Young, Pyrvinium, a potent small molecule Wnt inhibitor, promotes wound repair and post-MI cardiac remodeling, *PLoS One*, 5 (2010) e15521.

[269] J.P. Connell, R. Ruano, J.G. Jacot, Amniotic fluid-derived stem cells demonstrate limited cardiac differentiation following small molecule-based modulation of Wnt signaling pathway, *Biomedical Materials*, 10 (2015) 034103.

[270] E. Willems, J. Cabral-Teixeira, D. Schade, W. Cai, P. Reeves, P.J. Bushway, M. Lanier, C. Walsh, T. Kirchhausen, J.C.I. Belmonte, Small molecule-mediated TGF- β type II receptor degradation promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, 11 (2012) 242-252.

[271] F. Laco, J.-L. Low, J. Seow, T.L. Woo, Q. Zhong, J. Seayad, Z. Liu, H. Wei, S. Reuveny, D.A. Elliott, Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells with SB203580 analogues correlates with Wnt pathway CK1 inhibition independent of p38 MAPK signaling, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 80 (2015) 56-70.

[272] Q. Zhong, F. Laco, M.C. Liao, T.L. Woo, S.K. Oh, C.L. Chai, Influencing the fate of cardiac and neural stem cell differentiation using small molecule inhibitors of ALK5, *Stem Cells Translational Medicine*, 7 (2018) 709-720.

[273] H.H. Vandeburgh, R. Solerssi, J. Shansky, J.W. Adams, S.A. Henderson, Mechanical stimulation of organogenic cardiomyocyte growth in vitro, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 270 (1996) C1284-C1292.

[274] A. Salameh, A. Wustmann, S. Karl, K. Blanke, D. Apel, D. Rojas-Gomez, H. Franke, F.W. Mohr, J. Janousek, S. Dhein, Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43, *Circulation Research*, 106 (2010) 1592-1602.

[275] D.P. Crosara-Alberto, R.Y. Inoue, C.R.C. Costa, FAK signalling mediates NF- κ B activation by mechanical stress in cardiac myocytes, *Clinica Chimica Acta*, 403 (2009) 81-86.

[276] V.F. Shimko, W.C. Claycomb, Effect of mechanical loading on three-dimensional cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Tissue Engineering Part A*, 14 (2008) 49-58.

[277] J.L. Ruan, N.L. Tulloch, M. Saiget, S.L. Paige, M.V. Razumova, M. Regnier, K.C. Tung, G. Keller, L. Pabon, H. Reinecke, Mechanical stress promotes maturation of human myocardium from pluripotent stem cell-derived progenitors, *Stem Cells*, 33 (2015) 2148-2157.

[278] G. Song, Y. Ju, X. Shen, Q. Luo, Y. Shi, J. Qin, Mechanical stretch promotes proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58 (2007) 271-277.

- [279] Z. Zhu, X. Gan, H. Fan, H. Yu, Mechanical stretch endows mesenchymal stem cells stronger angiogenic and anti-apoptotic capacities via NF κ B activation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468 (2015) 601-605.
- [280] W.H. Zimmermann, K. Schneiderbanger, P. Schubert, M. Didié, F. MüNzel, J.F. Heubach, S. Kostin, W.L. Neuhuber, T. Eschenhagen, Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct, *Circulation Research*, 90 (2002) 223-230.
- [281] W.-H. Zimmermann, I. Melnychenko, G. Wasmeier, M. Didié, H. Naito, U. Nixdorff, A. Hess, L. Budinsky, K. Brune, B. Michaelis, S. Dhein, A. Schwoerer, H. Ehmke, T. Eschenhagen, Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts, *Nature Medicine*, 12 (2006) 452-458.
- [282] W. Zhang, C.W. Kong, M.H. Tong, W.H. Chooi, N. Huang, R.A. Li, B.P. Chan, Maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) in 3D collagen matrix: effects of niche cell supplementation and mechanical stimulation, *Acta Biomaterialia*, 49 (2017) 204-217.
- [283] J. Guan, F. Wang, Z. Li, J. Chen, X. Guo, J. Liao, N.I. Moldovan, The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics, *Biomaterials*, 32 (2011) 5568-5580.
- [284] Z.-Y. Wang, E.Y. Teo, M.S.K. Chong, Q.-Y. Zhang, J. Lim, Z.-Y. Zhang, M.-H. Hong, E.-S. Thian, J.K.Y. Chan, S.-H. Teoh, Biomimetic three-dimensional anisotropic geometries by uniaxial stretch of poly(ϵ -caprolactone) films for mesenchymal stem cell proliferation, alignment, and myogenic differentiation, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19 (2013) 538-549.
- [285] J.-L. Ruan, N.L. Tulloch, M.V. Razumova, M. Saiget, V. Muskheli, L. Pabon, H. Reinecke, M. Regnier, C.E. Murry, Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue, *Circulation*, 134 (2016) 1557-1567.
- [286] A. Korolj, E.Y. Wang, R.A. Civitarese, M. Radisic, Biophysical stimulation for in vitro engineering of functional cardiac tissues, *Clinical Science*, 131 (2017) 1393-1404.
- [287] S. Baumgartner, M. Halbach, B. Krausgrill, M. Maass, S.P. Srinivasan, R.G.A. Sahito, G. Peinkofer, F. Nguemo, J. Müller-Ehmsen, J. Hescheler, Electrophysiological and morphological maturation of murine fetal cardiomyocytes during electrical stimulation in vitro, *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 20 (2015) 104-112.
- [288] H. Sauer, G. Rahimi, J. Hescheler, M. Wartenberg, Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 75 (1999) 710-723.
- [289] E. Serena, E. Figallo, N. Tandon, C. Cannizzaro, S. Gerecht, N. Elvassore, G. Vunjak-Novakovic, Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac

differentiation and the generation of reactive oxygen species, *Experimental Cell Research*, 315 (2009) 3611-3619.

[290] H. Nazari, M. Kehtari, I. Rad, B. Ashtari, M.T. Joghataei, Electrical stimulation induces differentiation of human cardiosphere-derived cells (hCDCs) to committed cardiomyocyte, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 470 (2020) 29-39.

[291] S. Pecha, T. Eschenhagen, H. Reichenspurner, Myocardial tissue engineering for cardiac repair, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 35 (2016) 294-298.

[292] Y. Jiang, P. Park, S.-M. Hong, K. Ban, Maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells: current strategies and limitations, *Molecules and Cells*, 41 (2018) 613.

[293] G. Vunjak-Novakovic, Tissue engineering of the heart: An evolving paradigm, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 153 (2017) 593-595.

[294] M.A.C. Williams, D.B. Mair, W. Lee, E. Lee, D.-H. Kim, Engineering Three-Dimensional Vascularized Cardiac Tissues, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, (2021).

[295] J. Paez-Mayorga, G. Hernández-Vargas, G.U. Ruiz-Esparza, H.M.N. Iqbal, X. Wang, Y.S. Zhang, R. Parra-Saldivar, A. Khademhosseini, Bioreactors for Cardiac Tissue Engineering, *Advanced Healthcare Materials*, 8 (2019) 1701504.

[296] D. Odedra, L. Chiu, L. Reis, F. Rask, K. Chiang, M. Radisic, *Cardiac Tissue Engineering*, Springer Vienna, 2011, pp. 421-456.

[297] L. Wen, F. Tang, Single-cell sequencing in stem cell biology, *Genome Biology*, 17 (2016).

[298] M.-N. Hsu, Y.-H. Chang, V.A. Truong, P.-L. Lai, T.K.N. Nguyen, Y.-C. Hu, CRISPR technologies for stem cell engineering and regenerative medicine, *Biotechnology Advances*, 37 (2019) 107447.

[299] M.N. Hirt, A. Hansen, T. Eschenhagen, Cardiac Tissue Engineering, *Circulation Research*, 114 (2014) 354-367.

[300] B. Mendoza-Novelo, E.E. Avila, J.V. Cauich-Rodríguez, E. Jorge-Herrero, F.J. Rojo, G.V. Guinea, J.L. Mata-Mata, Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content, *Acta Biomaterialia*, 7 (2011) 1241-1248.

[301] M. Bai, T. Zhang, T. Ling, Z. Zhou, H. Xie, W. Zhang, G. Hu, C. Jiang, M. Li, B. Feng, Guided bone regeneration using acellular bovine pericardium in a rabbit mandibular model: in-vitro and in-vivo studies, *Journal of Periodontal Research*, 49 (2014) 499-507.

[302] Y. Chang, C.-C. Tsai, H.-C. Liang, H.-W. Sung, In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin), *Biomaterials*, 23 (2002) 2447-2457.

- [303] C.A.P. David W. Courtman, Villa Kashef, Donna McComb, J.M.L.a.G.J. Wilson, Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction, *Journal of Biomedical Materials Research*, 28 (1994) 655-666.
- [304] E. Imamura, O. Sawatani, H. Koyanagi, Y. Noishiki, T. Miyata, Epoxy compounds as a new cross-linking agent for porcine aortic leaflets: Subcutaneous implant studies in rats, *Journal of Cardiac Surgery*, 4 (1989) 50-57.
- [305] L.L. Huang, H.W. Sung, C.C. Tsai, D.M. Huang, Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42 (1998) 568-576.
- [306] H.W. Sung, C.S. Hsu, Y.S. Lee, D.S. Lin, Crosslinking characteristics of an epoxy-fixed porcine tendon: Effects of pH, temperature, and fixative concentration, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 31 (1996) 511-518.
- [307] G.G. Pekozer, G.T. Kose, V. Hasirci, Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells, *Microvascular Research*, 108 (2016) 1-9.
- [308] H. Aksel, Ş. Öztürk, A. Serper, K. Ulubayram, VEGF/BMP-2 loaded three-dimensional model for enhanced angiogenic and odontogenic potential of dental pulp stem cells, *International Endodontic Journal*, 51 (2018) 420-430.
- [309] S. Tomita, R.-K. Li, R.D. Weisel, D.A. Mickle, E.-J. Kim, T. Sakai, Z.-Q. Jia, Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function, *Circulation*, 100 (1999) II-247-II-256.
- [310] X. Lian, J. Zhang, S.M. Azarin, K. Zhu, L.B. Hazeltine, X. Bao, C. Hsiao, T.J. Kamp, S.P. Palecek, Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions, *Nature Protocols*, 8 (2013) 162-175.
- [311] X.X. Zhao, X.L. An, X.C. Zhu, Y. Jiang, Y.H. Zhai, S. Zhang, N.N. Cai, B. Tang, Z.Y. Li, X.M. Zhang, Inhibiting transforming growth factor- β signaling regulates in vitro maintenance and differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells, *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 330 (2018) 406-416.
- [312] Y. Athar, S.L.A. Zainuddin, Z. Berahim, A. Hassan, A. Sagheer, M.K. Alam, Bovine pericardium: A highly versatile graft material, *Int. Med. J.*, 21 (2014) 321-324.
- [313] J.K. Zhang, R.X. Du, L. Zhang, Y.N. Li, M.L. Zhang, S. Zhao, X.H. Huang, Y.F. Xu, A new material for tissue engineered vagina reconstruction: acellular porcine vagina matrix, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105 (2017) 1949-1959.

- [314] M. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, G. Silberhumer, E. Wolner, G. Weigel, P. Simon, Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves, *The International Journal of Artificial Organs*, 26 (2003) 421-427.
- [315] J. Garci, E.J. Herrero, A.C. San Marti, J. Garci, G. Te, I. Milla, J. Salvador, A. Cordo, J. Castillo-Olivares, The influence of chemical treatment and suture on the elastic behavior of calf pericardium utilized in the construction of cardiac bioprotheses, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11 (2000) 459-464.
- [316] H.-C. Liang, Y. Chang, C.-K. Hsu, M.-H. Lee, H.-W. Sung, Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern, *Biomaterials*, 25 (2004) 3541-3552.
- [317] C.M. Murphy, M.G. Haugh, F.J. O'Brien, The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 31 (2010) 461-466.
- [318] U. Stachewicz, P.K. Szewczyk, A. Kruk, A.H. Barber, A. Czyrska-Filemonowicz, Pore shape and size dependence on cell growth into electrospun fiber scaffolds for tissue engineering: 2D and 3D analyses using SEM and FIB-SEM tomography, *Materials Science and Engineering: C*, 95 (2019) 397-408.
- [319] B. Wang, A. Borazjani, M. Tahai, A.L. de Jongh Curry, D.T. Simionescu, J. Guan, F. To, S.H. Elder, J. Liao, Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94 (2010) 1100-1110.
- [320] J.A. Hubbell, Materials as morphogenetic guides in tissue engineering, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (2003) 551-558.
- [321] H.W. Sung, R.N. Huang, L.L. Huang, C.C. Tsai, C.T. Chiu, Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42 (1998) 560-567.
- [322] H.W. Sung, W.H. Chang, C.Y. Ma, M.H. Lee, Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64 (2003) 427-438.
- [323] H.-W. Sung, R.-N. Huang, L.L. Huang, C.-C. Tsai, In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10 (1999) 63-78.
- [324] G. Golomb, F.J. Schoen, M. Smith, J. Linden, M. Dixon, R. Levy, The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprotheses, *The American Journal of Pathology*, 127 (1987) 122.
- [325] R.A. Manji, L.F. Zhu, N.K. Nijjar, D.C. Rayner, G.S. Korbitt, T.A. Churchill, R.V. Rajotte, A. Koshal, D.B. Ross, Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection, *Circulation*, 114 (2006) 318-327.

- [326] H.W. Sung, Y. Chang, I.L. Liang, W.H. Chang, Y.C. Chen, Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 52 (2000) 77-87.
- [327] H.W. Sung, I.L. Liang, C.N. Chen, R.N. Huang, H.F. Liang, Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin), *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 55 (2001) 538-546.
- [328] Y. Chang, P.-H. Lai, H.-J. Wei, W.-W. Lin, C.-H. Chen, S.-M. Hwang, S.-C. Chen, H.-W. Sung, Tissue regeneration observed in a basic fibroblast growth factor-loaded porous acellular bovine pericardium populated with mesenchymal stem cells, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 134 (2007) 65-73.e64.
- [329] H.G. Lim, S.H. Kim, S.Y. Choi, Y.J. Kim, Anticalcification effects of decellularization, solvent, and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 41 (2012) 383-390.
- [330] C.C. Tsai, R.N. Huang, H.W. Sung, H.C. Liang, In vitro evaluation of the genotoxicity of a naturally occurring crosslinking agent (genipin) for biologic tissue fixation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 52 (2000) 58-65.
- [331] A.V. Vashi, J.F. White, K.M. McLean, W.M. Neethling, D.I. Rhodes, J.A. Ramshaw, J.A. Werkmeister, Evaluation of an established pericardium patch for delivery of mesenchymal stem cells to cardiac tissue, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103 (2015) 1999-2005.
- [332] Q. Wu, M. Dai, P. Xu, M. Hou, Y. Teng, J. Feng, In vivo effects of human adipose-derived stem cells reseeded on acellular bovine pericardium in nude mice, *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 241 (2016) 31-39.
- [333] N.B. Azouna, F. Jenhani, Z. Regaya, L. Berraeis, T.B. Othman, E. Ducrocq, J. Domenech, Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum, *Stem Cell Research & Therapy*, 3 (2012) 1-14.
- [334] B.M. Kumar, G.-H. Maeng, Y.-M. Lee, T.-H. Kim, J.-H. Lee, B.-G. Jeon, S.-A. Ock, J.-G. Yoo, G.-J. Rho, Neurogenic and cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from minipig bone marrow, *Research in Veterinary Science*, 93 (2012) 749-757.
- [335] F.A. Jacobs, M. van de Vyver, W.F. Ferris, Isolation and characterization of different mesenchymal stem cell populations from rat femur, in: P.C. Guest (Ed.) *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2019, pp. 133-147.
- [336] P. Dong, X. Gu, G. Zhu, M. Li, B. Ma, Y. Zi, Melatonin induces osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes fracture healing in a rat model

of femoral fracture via neuropeptide Y/Neuropeptide Y Receptor Y1 signaling, *Pharmacology*, 102 (2018) 272-280.

[337] Q. Long, Q. Luo, K. Wang, A. Bates, A.K. Shetty, Mash1-dependent notch signaling pathway regulates GABAergic neuron-like differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Aging and Disease*, 8 (2017) 301-313.

[338] M. Maleki, F. Ghanbarvand, M.R. Behvarz, M. Ejtemaei, E. Ghadirkhomi, Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells, *International Journal of Stem Cells*, 7 (2014) 118.

[339] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284 (1999) 143-147.

[340] L. Jackson, D. Jones, P. Scotting, V. Sottile, Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications, *Journal of Postgraduate Medicine*, 53 (2007) 121.

[341] J.S. Harunaga, K.M. Yamada, Cell-matrix adhesions in 3D, *Matrix Biology*, 30 (2011) 363-368.

[342] M.M. Martino, M. Mochizuki, D.A. Rothenfluh, S.A. Rempel, J.A. Hubbell, T.H. Barker, Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability, *Biomaterials*, 30 (2009) 1089-1097.

[343] Q. Guo, X. Lu, Y. Xue, H. Zheng, X. Zhao, H. Zhao, A new candidate substrate for cell-matrix adhesion study: the acellular human amniotic matrix, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012 (2012) 306083.

[344] W.M. Neethling, S. Yadav, A.J. Hodge, R. Glancy, Enhanced biostability and biocompatibility of decellularized bovine pericardium, crosslinked with an ultra-low concentration monomeric aldehyde and treated with ADAPT, *The Journal of Heart Valve Disease*, 17 (2008) 456-463;

[345] Y. Chang, H.C. Liang, H.J. Wei, C.P. Chu, H.W. Sung, Tissue regeneration patterns in acellular bovine pericardia implanted in a canine model as a vascular patch, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 69 (2004) 323-333.

[346] B.C. Heng, H.K. Haider, E.K.-W. Sim, T. Cao, S.C. Ng, Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro, *Cardiovascular Research*, 62 (2004) 34-42.

[347] S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro, *The Journal of Clinical Investigation*, 103 (1999) 697-705.

- [348] K. Fukuda, Regeneration of cardiomyocytes from bone marrow: use of mesenchymal stem cell for cardiovascular tissue engineering, *Cytotechnology*, 41 (2003) 165-175.
- [349] Y. Huang, L. Zheng, X. Gong, X. Jia, W. Song, M. Liu, Y. Fan, Effect of cyclic strain on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells, *PloS one*, 7 (2012) e34960.
- [350] J. Joshi, G. Mahajan, C.R. Kothapalli, Three-dimensional collagenous niche and azacytidine selectively promote time-dependent cardiomyogenesis from human bone marrow-derived MSC spheroids, *Biotechnology and Bioengineering*, 115 (2018) 2013-2026.
- [351] S. Hasani, A. Javeri, A. Asadi, Cardiac Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells Is Driven by BMP4 and bFGF but Counteracted by 5-Azacytidine and Valproic Acid, *Cell Journal*, 22 (2019) 273-282.
- [352] Y. Guo, X. Zhang, C. Zhang, R. Li, Q. Zeng, C. Guo, Y. Zhang, Effects of mechanical stimulus on mesenchymal stem cells differentiation toward cardiomyocytes, *Asian Biomedicine*, 5 (2011) 655-661.
- [353] S.H. Bhang, S.J. Gwak, T.J. Lee, S.S. Kim, H.H. Park, M.H. Park, D.H. Lee, S.H. Lee, B.S. Kim, Cyclic mechanical strain promotes transforming-growth-factor- β 1-mediated cardiomyogenic marker expression in bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55 (2010) 191-197.
- [354] S. Amin, S.E. Banijamali, M. Tafazoli-Shadpour, M.A. Shokrgozar, M.M. Dehghan, N. Haghighipour, R. Mahdian, V. Bayati, P. Abbasnia, Comparing the effect of equiaxial cyclic mechanical stimulation on GATA4 expression in adipose-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Cell Biology International*, 38 (2014) 219-227.
- [355] J.-K. Yoon, T.I. Lee, S.H. Bhang, J.-Y. Shin, J.-M. Myoung, B.-S. Kim, Stretchable piezoelectric substrate providing pulsatile mechanoelectric cues for cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (2017) 22101-22111.
- [356] M. Rabbani, M. Janmaleki, M. Tafazzoli-Shadpour, M. Teymoori, S. Rezvaninejad, Effects of uniaxial cyclic stretch loading on morphology of adipose derived stem cells, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13 (2016) 396-402.
- [357] S. Dhein, A. Schreiber, S. Steinbach, D. Apel, A. Salameh, F. Schlegel, M. Kostelka, P.M. Dohmen, F.W. Mohr, Mechanical control of cell biology. Effects of cyclic mechanical stretch on cardiomyocyte cellular organization, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 115 (2014) 93-102.
- [358] M. Radisic, H. Park, H. Shing, T. Consi, F.J. Schoen, R. Langer, L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (2004) 18129-18134.

- [359] H.T.H. Au, I. Cheng, M.F. Chowdhury, M. Radisic, Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes, *Biomaterials*, 28 (2007) 4277-4293.
- [360] B. Wang, G. Wang, F. To, J.R. Butler, A. Claude, R.M. McLaughlin, L.N. Williams, A.L. de Jongh Curry, J. Liao, Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations, *Langmuir*, 29 (2013) 11109-11117.
- [361] A. Lluçia-Valldeperas, R. Bragós, A. Bayés-Genís, Simultaneous electrical and mechanical stimulation to enhance cells' cardiomyogenic potential, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (2019) e58934.
- [362] C.A. Cook, P.Y. Huri, B.P. Ginn, J. Gilbert-Honick, S.M. Somers, J.P. Temple, H.Q. Mao, W.L. Grayson, Characterization of a novel bioreactor system for 3D cellular mechanobiology studies, *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (2016) 1825-1837.
- [363] N. Tandon, A. Marsano, R. Maidhof, L. Wan, H. Park, G. Vunjak-Novakovic, Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5 (2011) e115-e125.
- [364] A. Pavesi, G. Adriani, M. Rasponi, I.K. Zervantonakis, G.B. Fiore, R.D. Kamm, Controlled electromechanical cell stimulation on-a-chip, *Scientific Reports*, 5 (2015) 1-12.
- [365] A. Lluçia-Valldeperas, C. Soler-Botija, C. Gálvez-Montón, S. Roura, C. Prat-Vidal, I. Perea-Gil, B. Sanchez, R. Bragos, G. Vunjak-Novakovic, A. Bayes-Genis, Electromechanical conditioning of adult progenitor cells improves recovery of cardiac function after myocardial infarction, *Stem Cells Translational Medicine*, 6 (2017) 970-981.
- [366] N.-H. Chi, M.-C. Yang, T.-W. Chung, N.-K. Chou, S.-S. Wang, Cardiac repair using chitosan-hyaluronan/silk fibroin patches in a rat heart model with myocardial infarction, *Carbohydrate Polymers*, 92 (2013) 591-597.
- [367] R. Kozlik-Feldmann, N. Lang, R. Aumann, A. Lehner, D. Rassouljian, R. Sodian, C. Schmitz, M. Hinterseer, R. Hinkel, E. Thein, Patch closure of muscular ventricular septal defects with a new hybrid therapy in a pig model, *Journal of the American College of Cardiology*, 51 (2008) 1597-1603.
- [368] B.D. Polizzotti, B. Ganapathy, B.J. Haubner, J.M. Penninger, B. Kühn, A cryoinjury model in neonatal mice for cardiac translational and regeneration research, *Nature Protocols*, 11 (2016) 542.
- [369] J.H. Ryu, I.-K. Kim, S.-W. Cho, M.-C. Cho, K.-K. Hwang, H. Piao, S. Piao, S.H. Lim, Y.S. Hong, C.Y. Choi, Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium, *Biomaterials*, 26 (2005) 319-326.

- [370] J.M. Leferovich, K. Bedelbaeva, S. Samulewicz, X.-M. Zhang, D. Zwas, E.B. Lankford, E. Heber-Katz, Heart regeneration in adult MRL mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (2001) 9830-9835.
- [371] S.-W. Cho, S.-J. Gwak, I.-K. Kim, M.-C. Cho, K.-K. Hwang, J.-S. Kwon, C.Y. Choi, K.J. Yoo, B.-S. Kim, Granulocyte colony-stimulating factor treatment enhances the efficacy of cellular cardiomyoplasty with transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in infarcted myocardium, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340 (2006) 573-582.
- [372] H. Lu, N. Zhang, M. Ma, Electroconductive hydrogels for biomedical applications, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11 (2019) e1568.
- [373] E.R. Molina, B.T. Smith, S.R. Shah, H. Shin, A.G. Mikos, Immunomodulatory properties of stem cells and bioactive molecules for tissue engineering, *Journal of Controlled Release*, 219 (2015) 107-118.
- [374] J. England, S. Loughna, Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70 (2013) 1221-1239.
- [375] K. Yamada, K.G. Green, A.M. Samarel, J.E. Saffitz, Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch, *Circulation Research*, 97 (2005) 346-353.
- [376] J. Zhuang, K.A. Yamada, J.E. Saffitz, A.G. Kléber, Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes, *Circulation Research*, 87 (2000) 316-322.
- [377] M.C. Ferreira-Cornwell, Y. Luo, N. Narula, J.M. Lenox, M. Lieberman, G.L. Radice, Remodeling the intercalated disc leads to cardiomyopathy in mice misexpressing cadherins in the heart, *Journal of Cell Science*, 115 (2002) 1623-1634.
- [378] Y. Zhang, Y. Chu, W. Shen, Z. Dou, Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells, *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 9 (2009) 943-946.
- [379] T.M. Schultheiss, S. Xydas, A.B. Lassar, Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm, *Development*, 121 (1995) 4203-4214.
- [380] R.J. Schwartz, E.N. Olson, Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription, *Development*, 126 (1999) 4187-4192.
- [381] V.P. Shirinsky, A.Y. Khapchaev, O.V. Stepanova, Molecular mechanisms of cardiomyogenesis and the prospects for cardiomyocyte regeneration in cardiac failure, *Molecular Biology*, 42 (2008) 762-772.
- [382] G. Mohan, A.A. Shamsuddin, D. Hasan Adli, S.Z. Moghadamtousi, R. Khanabdali, A. Saadat, M. Fazilah, N. Naeem, I. Khan, A. Salim, K. Bazli, R.-E.M. Qazi, R. Khalid, Promoting effect of small molecules in cardiomyogenic and neurogenic differentiation of

rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Drug Design, Development and Therapy*, (2015) 81.

[383] U.D. Akavia, O. Veinblat, D. Benayahu, Comparing the transcriptional profile of mesenchymal cells to cardiac and skeletal muscle cells, *Journal of Cellular Physiology*, 216 (2008) 663-672.

[384] T.A. McKinsey, C.L. Zhang, E.N. Olson, MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death, *Trends in biochemical sciences*, 27 (2002) 40-47.

[385] E.N. Olson, Sizing up the heart: development redux in disease, *Genes & Development*, 17 (2003) 1937-1956.

[386] Q. Lin, J. Schwarz, C. Bucana, E.N. Olson, Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C, *Science*, 276 (1997) 1404-1407.

[387] B.L. Black, E.N. Olson, Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14 (1998) 167-196.

[388] C.V. Mering, STRING: a database of predicted functional associations between proteins, *Nucleic Acids Research*, 31 (2003) 258-261.

[389] I.S. Skerjanc, H. Petropoulos, A.G. Ridgeway, S. Wilton, Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 34904-34910.

[390] T.M. Schultheiss, J.B. Burch, A.B. Lassar, A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis, *Genes & Development*, 11 (1997) 451-462.

[391] E. Abdelwahid, D. Rice, L.J. Pelliniemi, E. Jokinen, Overlapping and differential localization of Bmp-2, Bmp-4, Msx-2 and apoptosis in the endocardial cushion and adjacent tissues of the developing mouse heart, *Cell and Tissue Research*, 305 (2001) 67-78.

[392] M. Ieda, J.-D. Fu, P. Delgado-Olguin, V. Vedantham, Y. Hayashi, B.G. Bruneau, D. Srivastava, Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors, *Cell*, 142 (2010) 375-386.

[393] P. Antonitsis, E. Ioannidou-Papagiannaki, A. Kaidoglou, C. Papakonstantinou, In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine, *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 6 (2007) 593-597.

[394] H. Najafipour, Z. Bagheri-Hosseiniabadi, T. Eslaminejad, H.R. Mollaei, The effect of sodium valproate on differentiation of human adipose-derived stem cells into cardiomyocyte-like cells in two-dimensional culture and fibrin scaffold conditions, *Cell and Tissue Research*, 378 (2019) 127-141.

- [395] S. Somekawa, S. Fukuhara, Y. Nakaoka, H. Fujita, Y. Saito, N. Mochizuki, Enhanced Functional gap junction neofunction by protein kinase a-dependent and epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes, *Circulation Research*, 97 (2005) 655-662.
- [396] S.R. Ali, W. Ahmad, N. Naeem, A. Salim, I. Khan, Small molecule 2'-deoxycytidine differentiates human umbilical cord-derived MSCs into cardiac progenitors in vitro and their in vivo xeno-transplantation improves cardiac function, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 470 (2020) 99-113.
- [397] M. Gasiūnienė, E. Valatkaitė, A. Navakauskaitė, R. Navakauskienė, The effect of angiotensin II, retinoic acid, EGCG, and vitamin C on the cardiomyogenic differentiation induction of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 8752.
- [398] A. Vreeker, L. Van Stuijvenberg, T.J. Hund, P.J. Mohler, P.G.J. Nikkels, T.A.B. Van Veen, Assembly of the cardiac intercalated disk during pre- and postnatal development of the human heart, *PLoS ONE*, 9 (2014) e94722.
- [399] J. Woodcock-Mitchell, J.J. Mitchell, R.B. Low, M. Kieny, P. Sengel, L. Rubbia, O. Skalli, B. Jackson, G. Gabbiani, α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles, *Differentiation*, 39 (1988) 161-166.
- [400] S.P. Potta, H. Liang, J. Winkler, M.X. Doss, S. Chen, V. Wagh, K. Pfannkuche, J. Hescheler, A. Sachinidis, Isolation and functional characterization of α -smooth muscle actin expressing cardiomyocytes from embryonic stem cells, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 25 (2010) 595-604.
- [401] T. Kobayashi, L. Jin, P.P. De Tombe, Cardiac thin filament regulation, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 457 (2008) 37-46.
- [402] I.A. Katrukha, Human cardiac troponin complex. Structure and Functions, *Biochemistry (Moscow)*, 78 (2013) 1447-1465.
- [403] P.A. Anderson, N.N. Malouf, A.E. Oakeley, E.D. Pagani, P.D. Allen, Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle, *Circulation Research*, 69 (1991) 1226-1233.
- [404] R. Markmee, S. Aungsuchawan, W. Tancharoen, S. Narakornsak, P. Pothacharoen, Differentiation of cardiomyocyte-like cells from human amniotic fluid mesenchymal stem cells by combined induction with human platelet lysate and 5-azacytidine, *Heliyon*, 6 (2020) e04844.
- [405] M. Jain, E. Minocha, N.K. Tripathy, N. Singh, C.P. Chaturvedi, S. Nityanand, Comparison of the Cardiomyogenic Potency of Human Amniotic Fluid and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *International Journal of Stem Cells*, 12 (2019) 449-456.
- [406] F.Z. Asumda, P.B. Chase, Nuclear cardiac troponin and tropomyosin are expressed early in cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells, *Differentiation*, 83 (2012) 106-115.

- [407] B. Sjöblom, A. Salmazo, K. Djinović-Carugo, α -Actinin structure and regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (2008) 2688-2701.
- [408] J.A. Efe, S. Hilcove, J. Kim, H. Zhou, K. Ouyang, G. Wang, J. Chen, S. Ding, Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy, *Nature Cell Biology*, 13 (2011) 215-222.
- [409] A. Kakkar, S.B. Nandy, S. Gupta, B. Bharagava, B. Airan, S. Mohanty, Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are better respondents to TGF β 1 for in vitro generation of cardiomyocyte-like cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 460 (2019) 53-66.
- [410] V. Sequeira, L.L.A.M. Nijenkamp, J.A. Regan, J. Van Der Velden, The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838 (2014) 700-722.
- [411] P. Kwiecińska, E. Taubøll, E.Ł. Gregoraszczuk, Effects of valproic acid and levetiracetam on viability and cell cycle regulatory genes expression in the OVCAR-3 cell line, *Pharmacological Reports*, 64 (2012) 157-165.
- [412] M.A. Thal, P. Krishnamurthy, A.R. Mackie, E. Hoxha, E. Lambers, S. Verma, V. Ramirez, G. Qin, D.W. Losordo, R. Kishore, Enhanced angiogenic and cardiomyocyte differentiation capacity of epigenetically reprogrammed mouse and human endothelial progenitor cells augments their efficacy for ischemic myocardial repair, *Circulation Research*, 111 (2012) 180-190.
- [413] B. Chen, M.E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C.-W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N.S. Williams, M.G. Roth, J.F. Amatruda, C. Chen, L. Lum, Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer, *Nature Chemical Biology*, 5 (2009) 100-107.
- [414] R. Kleszcz, A. Szymańska, V. Krajka-Kuźniak, W. Baer-Dubowska, J. Paluszczak, Inhibition of CBP/ β -catenin and porcupine attenuates Wnt signaling and induces apoptosis in head and neck carcinoma cells, *Cellular Oncology*, 42 (2019) 505-520.
- [415] W.-P. Chen, Y.-H. Liu, Y.-J. Ho, S.M. Wu, Pharmacological inhibition of TGF β receptor improves Nkx2.5 cardiomyoblast-mediated regeneration, *Cardiovascular Research*, 105 (2015) 44-54.
- [416] A.S. Riching, E. Danis, Y.B. Zhao, Y.Q. Cao, C.W. Chi, R.A. Bagchi, B.J. Klein, H.Y. Xu, T.G. Kutateladze, T.A. McKinsey, P.M. Buttrick, K.H. Song, Suppression of canonical TGF-beta signaling enables GATA4 to interact with H3K27me3 demethylase JMJD3 to promote cardiomyogenesis, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 153 (2021) 44-59.
- [417] A. Coppola, A. Romito, C. Borel, C. Gehrig, M. Gagnebin, E. Falconnet, A. Izzo, L. Altucci, S. Banfi, S.E. Antonarakis, G. Minchiotti, G. Cobellis, Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications, *Stem Cell Research*, 12 (2014) 323-337.

- [418] B.J. Muller-Borer, W.E. Cascio, G.L. Esch, H.S. Kim, W.B. Coleman, J.W. Grisham, P.A.W. Anderson, N.N. Malouf, Mechanisms controlling the acquisition of a cardiac phenotype by liver stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (2007) 3877-3882.
- [419] Q. Lu, Y. Liu, Y. Wang, W. Wang, Z. Yang, T. Li, Y. Tian, P. Chen, K. Ma, Z. Jia, C. Zhou, Rapamycin efficiently promotes cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells, *Bioscience Reports*, 37 (2017) BSR20160552.
- [420] C. Feng, J. Zhu, L. Zhao, T. Lu, W. Zhang, Z. Liu, J. Tian, Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells, *Experimental Cell Research*, 315 (2009) 3044-3051.
- [421] J.B. Moore, J. Zhao, M.C.L. Keith, A.R. Amraotkar, M. Wysoczynski, K.U. Hong, R. Bolli, The Epigenetic regulator HDAC1 modulates transcription of a core cardiogenic program in human cardiac mesenchymal stromal cells through a p53-dependent mechanism, *Stem Cells*, 34 (2016) 2916-2929.
- [422] M. Iwatani, K. Ikegami, Y. Kremenska, N. Hattori, S. Tanaka, S. Yagi, K. Shiota, Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body, *Stem Cells*, 24 (2006) 2549-2556.
- [423] M.-H. Kang, S.-Y. You, K. Hong, J.-H. Kim, DMSO impairs the transcriptional program for maternal-to-embryonic transition by altering histone acetylation, *Biomaterials*, 230 (2020) 119604.
- [424] J. Cho, P. Rameshwar, J. Sadoshima, Distinct roles of glycogen synthase kinase (gsk)-3 α and gsk-3 β in mediating cardiomyocyte differentiation in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Journal of Biological Chemistry*, 284 (2009) 36647-36658.
- [425] P. De Sarno, X. Li, R.S. Jope, Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation by sodium valproate and lithium, *Neuropharmacology*, 43 (2002) 1158-1164.
- [426] J. Lu, T.A. McKinsey, R.L. Nicol, E.N. Olson, Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (2000) 4070-4075.
- [427] W. Hao, S. Shi, S. Zhou, X. Wang, S. Nie, Aspirin inhibits growth and enhances cardiomyocyte differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, *European Journal of Pharmacology*, 827 (2018) 198-207.
- [428] M. Gasiūnienė, A. Zubova, A. Utkus, R. Navakauskienė, Epigenetic and metabolic alterations in human amniotic fluid stem cells induced to cardiomyogenic differentiation by DNA methyltransferases and p53 inhibitors, *Journal of Cellular Biochemistry*, 120 (2019) 8129-8143.
- [429] L.D. Ghosh, V. Ravi, P. Sanpui, N.R. Sundaresan, K. Chatterjee, Keratin mediated attachment of stem cells to augment cardiomyogenic lineage commitment, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151 (2017) 178-188.

[430] M. Pekkanen-Mattila, M. Häkli, R.-P. Pölönen, T. Mansikkala, A. Junnila, E. Talvitie, J.T. Koivisto, M. Kellomäki, K. Aalto-Setälä, Polyethylene terephthalate textiles enhance the structural maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Materials*, 12 (2019) 1805.

[431] S. Clément, M. Stouffs, E. Bettiol, S. Kampf, K.-H. Krause, C. Chaponnier, M. Jaconi, Expression and function of α -smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation, *Journal of Cell Science*, 120 (2007) 229-238.

[432] D.L. Ruzicka, R.J. Schwartz, Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation, *Journal of Cell Biology*, 107 (1988) 2575-2586.



EK 2 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

Ş. Öztürk, R. Shahbazi, N.D. Zeybek, B. Kurum, M. Gultekinoglu, E.A. Aksoy, M. Demircin, K. Ulubayram, Assessment of Electromechanically Stimulated Bone Marrow Stem Cells Seeded Acellular Cardiac Patch in a Rat Myocardial Infarct Model. Biomedical Materials, 2021 (Under Revision).



EK 3 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

S. Ozturk, R. Shahbazi, M. Gultekinoglu, N.D. Zeybek, E.A. Aksoy, M. Demircin, K. Ulubayram, (2016), “Synergistic effects of chemical, biological and electromechanical stimulations on cardiomyogenic differentiation of BMSCs”, European Cells and Materials Vol. 31. Suppl. 1 (page P403)

K. Ulubayram, **S. Ozturk**, R., Shahbazi, N.D. Zeybek, (2016), “Engineering a 3D cardiac patch through cardiomyogenic differentiation of rMSCs by synchronous mechanical and electrical stimulations”, Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress, doi: **10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00653**.

R. Shahbazi, **S. Ozturk**, N.D. Zeybek, K. Ulubayram, (2015), “Acellular Scaffolds in Cardiac Tissue Engineering: Designing and Stem Cell Differentiation”, BIOMED 2015: 21th International Biomedical Science and Technology Symposium, 22-24 October, Antalya, Turkey (**Poster presentation**)