**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# KARDİYAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN SIĞIR KALP KASININ HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMASI VE BİYOLOJİK İSKELE OLARAK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

**Yusuf Furkan GALATA**

**Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**

Tezin Sunulduğu Tarih: **16/08/2017**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN**

**ÇANAKKALE**

Yusuf Furkan GALATA tarafından Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **16/08/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Kardiyak Doku Mühendisliği için Sığır Kalp Kasının Hücrelerinden Arındırılması ve Biyolojik İskele Olarak Etkinliğinin Değerlendirilmesi**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı'**nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN …….....
**Başkan**

Doç. Dr. Uğur CENGİZ …….....
**Üye**

Doç. Dr. Fadime KIRAN …….....
**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Yusuf Furkan GALATA

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN 'a

Çalışma süresince maddi manevi tüm yardımlarını esirgemeyen Tuğba SEZGİN ARSLAN, Burcu EFE, Burak DERKUŞ, Kübra YILDIRIM, Evren ERTEN ve Eren ÖZÜDOĞRU'na

Tezin değerlendirmesi ve düzenlenmesi aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Fadime KIRAN ve Doç. Dr. Uğur CENGİZ 'e

Histolojik kesitler için Mer-ter Medikalden Yücel OKATALI'ya ve SEM görüntüleri için ÇOBİLTUM'dan Nilay TEZEL'e

Son olarak desteklerini hiç esirgemeyen tüm zor zamanlarımda yanımda olan sevgilerini hep hissettiğin annem Çiğdem KORULARA ve babam Cengiz GALATA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| HDM | Hücre Dışı Matriks |
| FTIR | Fourier dönüşümlü kızıl ötesi |
| TGA | Termal gravimetrik analiz |
| g | Gram |
| % | Yüzde oranı |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür |
| SDS-PAGE | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| MKH | Mezankimal kök hücre |
| NHS | N-hidroksi süksinimit |
| EDC | N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit |
| MES | 2-morfolinoetansülfonik asit |
| PBS | Sodyum klorür içeren fosfat tamponu |
| IPS | Uyarılmış pluripotent kök hücreler |
| PLA | Poli(laktik asit) |
| PGA | Poliglikolik asit |
| PLGA | Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) |
| GAG | Glikozaminoglikan |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| Ms | Milisaniye |
| EKH | Embriyonik kök hücre |
| iAKMK | İnsan adipoz kaynaklı mezankimal kök hücre |
| TBE | Tris-Borik asit EDTA |
| TNBF | Tri(N-Butil) Fosfat |
| Kilopascal | kPa |

# ÖZET

## KARDİYAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN SIĞIR KALP KASININ HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMASI VE BİYOLOJİK İSKELE OLARAK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yusuf Furkan GALATA
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN
16/08/2017, 67

Tez çalışmasında, kesimhanelerde ticari amaçlarla kesimi yapılan sığırların, kalbi çıkartılarak daha küçük parçalara ayrılmıştır ve kas dokusu alınmıştır. Kas dokusunu hücrelerinden arındırılması için dört farklı yöntem denenmiştir. Bu dört farklı yöntemden en iyi sonuç 4. yöntem ile elde edilmiştir. Bu yöntem ile kas dokusu sırasıyla Trizma.HCl/Etilendiamin tetraasetik asit çözeltisi, sodium dodecyl sulfate (SDS), DNAz, RNAz ve perasidikasit ile muamele edilerek hücrelerinden arındırılmış, ardından liyofilize edilmiştir. Hücrelerinden arındırılan liyofilize kas dokusuna sırasıyla DNA içerik analizi, agaroz jel elektroforezi, glikozaminoglikan (GAG) miktar tayini, hidroksiprolin içerik analizi ve Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez analizi yapılarak karakterize edilmiştir. Sonuç olarak, DNA içeriği kas dokusu için 886,11 ± 164,85 (n=3) µg/mg ve hücrelerinden arındırılmış kas doku için 47,66 ± 0,09 (n=3) µg/mg, GAG miktarı kas dokusu için 4,52 ± 0,17 (n=3) µg/mg ve hücrelerinden arındırılmış kas doku için 5,83 ± 0,17 (n=3) µg/mg, Hidroksiprolin içeriği kas dokusu için 3,96 ± 0,49 (n=3) µg/mg ve hücrelerinden arındırılmış kas doku için 37,22 ± 4,34 (n=3) µg/mg kuru kütle olarak bulunmuştur. Ardından hücrelerinden arındırılan kas dokusu pepsin enzimi ile sindirilmiştir ve 10X PBS, 0.1 N NaOH kullanılarak film haline getirilmiştir. Elde edilen filmler N-hidroksi süksinimit (NHS)- N-(3-dimetilaminopropil)-N’-etilkarbodiimit (EDC) ile çapraz bağlanarak dayanılıkları artırılmıştır

ve hücre kültürü çalışmaları için uygun hale getirilmiştir. Elde edilen filmler Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR), termal gravimetrik (TGA) ve mikro mekanik test ile karakterize edilmiştir. Ticari olarak satın alınan insan adipoz kaynaklı mezankimal kök hücreler kültüre edilerek çoklu soy farklılaşma (osteojenik, kondrojenik ve adipojenik) çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra kök hücreler üretilen filmler üzerine ekilmiştir ve filmler üzerindeki hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. 3, 7 ve 14. günlerde yapılan MTT testi sonuçlarına göre filmler hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Filmler üzerindeki hücrelerin tutunduğu ve proliferasyonunun günden güne arttığı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve invert-faz kontrast mikroskobu ile kanıtlanmıştır. Hücreli ve hücresiz filmlerin histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Kök hücrelerin film üzerinde 3 günden itibaren kalp kası hücrelerine farklılaştığı immünhistokimyasal boyamalar ile kanıtlanmıştır. Sonuç olarak kalp kası başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırılmış ve kalp kası dokusu kaynaklı filmler üretilmiştir. Üretilen filmlerin kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında kullanım potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Kardiyak Doku Mühendisliği, İnsan Adipoz Kaynaklı Mezankimal Kök Hücre, Kalp Kası Dokusu, Hücrelerinden Arındırma, Kardiyak Film, Rejeneratif Tıp.

## ABSTRACT

### DECELLULARIZATION OF BOVINE HEART MUSCLE AND EVALUATING THEIR EFFICACY AS A BIOLOGICAL SCAFFOLD FOR CARDIAC TISSUE ENGİNEERİNG

Yusuf Furkan GALATA

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural And Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Science Engineering

Advisor : Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

16/08/2017, 67

In this thesis, hearts of bovine commercially slaughtered in slaughterhouses were removed and cut into smaller pieces, and heart muscle tissue was taken. Four different methods were tried to decellularize the heart muscle. Out of these four different methods, the fourth one gave the best result. In this method, the heart muscle was decellularized by being respectively treated with a solution of Trizma HCI/Ethylenediaminetetraacetic acid, sodium dodecyl sulfate (SDS), DNAse, RNAse and peracetic acid it was later lyophilised. The decellularized lyophilised heart muscle was characterised by respectively going through DNA content analysis, agarose-gel electrophoresis, glycosaminoglycan (GAG) quantification, hydroxyproline content analysis and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. According to the results, the dry masses of the DNA content in the heart muscle and the decellularized heart muscle were 886,11 ± 164,85 (n=3) μg/mg and 47,66 ± 0,09 (n=3) μg/mg; the dry masses of the GAG amount in the heart muscle and the decellularized heart muscle were 4,52 ± 0,17 (n=3) μg/mg and 5,83 ± 0,17 (n=3) μg/mg; the dry masses of the hydroxyprolin content in the heart muscle and the decellularized heart muscle were 3,96 ± 0,49 (n=3) μg/mg and 37,22 ± 4,34 (n=3) μg/mg, respectively. The decellularized heart muscle was later digested with pepsin and film was obtained by using 10X PBS and 0,1 N NaOH. The films were later crosslinked with N-Hydroxysuccinimide (NHS)-

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N’-ethylcarbodiimide (EDC) to gain durability and become suitable for cell culture studies. The films were characterized with Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and micromechanical testing. Commercially-bought human adipose derived mesenchymal stem cells were cultured and multilineage differentiation (osteogenic, chondrogenic and adipogenic) studies were carried out. Then, the stem cells were seeded on the films and the cell viability on the films were evaluated through the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. According to the results of the MTT tests carried out on the 3rd, 7th and 14th days, the films did not have any cytotoxic effect on cell viability. It was proven via a scanning electron microscope (SEM) and an inverted phase-contrast microscope that the cells cling on the films and the proliferation keeps increasing day by day. Cellular and cell free films were characterized histochemically and immunohistochemically. The stem cells have been proven to differentiate into cardiac muscle cells on the film. The result was that the heart muscle was successfully decellularized and heart muscle derived films were produced. The produced films are considered to have a high potential use in cardiac tissue engineering applications.

**Keywords:** Cardiac Tissue Engineering, Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell, Heart Muscle Tissue, Decellularization, Cardiac Film, Regenerative Medicine.

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No**

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ..... ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI ..... iii
TEŞEKKÜR ..... iv
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... v
ÖZET ..... vi
ABSTRACT ..... viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... xii
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... xiv
BÖLÜM 1 ..... 1
GİRİŞ ..... 1
1.1. Doku mühendisliği ..... 3
1.2. Kök Hücreler ..... 5
1.3. Biyomalzemeler ..... 8
1.3.1. Doğal biyomalzemeler ..... 10
1.3.2. Sentetik Biyomalzemeler ..... 11
1.3.3 Hücrelerinden Arındırılmış Doku ve Organ Temelli Biyomalzemeler ..... 12
1.4. Kalbin Yapısı ..... 13
1.5. Kalp ve Damar Hastalıkları ..... 17
1.6 Kardiyak Doku Mühendisliği ..... 19
BÖLÜM 2 ..... 22
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR ..... 22
BÖLÜM 3 ..... 26
MATERYAL VE METOT ..... 26
3.1. Materyal ..... 26
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar ..... 26
3.2. Yöntem ..... 27
3.2.1. Kalp Kası Dokusunu Temini ve Hücrelerinden Arındırma İşlemi ..... 27
3.2.2. DNA İçerik Analizi ..... 29
3.2.3. GAG İçerik Analizi ..... 30
3.2.4. Hidroksiprolin içerik analizi ..... 30
3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi Analizi ..... 31

3.2.6. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunun film haline getirilmesi ..... 33
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi ..... 34
3.2.8. Mikro-Mekanik Test ..... 36
3.2.9. Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Farklılaşma Testlerinin Yapılması ..... 37
3.2.10. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmlerin üzerine hücre ekilmesi ..... 39
3.2.11. Filmlerin üzerine ekilen hücrelerin canlılık seviyelerinin belirlenmesi ..... 39
3.2.12. Filmler Fizikokimyasal Analizi ..... 40
3.2.13. Üretilen Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskop Analizi ..... 40
3.2.14. Histolojik Analiz ..... 40
3.2.15. İstatiksel Analiz ..... 41
BÖLÜM 4 ..... 42
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA ..... 42
4.1. Hücrelerinden arındırma işlemi ve DNA içerik analizi ..... 42
4.2. Glikozaminoglikan ve Hidroksiprolin İçeriği ..... 43
4.3. SDS-PAGE Analizi Sonuçları ..... 45
4.4 Filmlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu ..... 47
4.5 Hücrelerinden Arındırılmış Kalp Kası Dokusundan Film Elde Edilmesi ..... 49
4.6 Hücrelerinden Arındırılmış Kalp Kası Filmi Mikro-Mekanik Test ..... 49
4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları ..... 50
4.8. Elde Edilen Filmlerin Morfolojik Olarak Karakterizasyon ..... 53
4.9. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Karakterizasyon ..... 57
BÖLÜM 5 ..... 60
SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 60
KAYNAKLAR ..... 62
ÖZGEÇMİŞ ..... I

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Sayfa No**

Şekil 1.1. Doku mühendisliği temel prensibi ..... 4
Şekil 1.2. Simetrik ve asimetrik kök hücre bölünmesi ..... 5
Şekil 1.4. MKH kaynakları ve farklılaşma potansiyelleri (Meregalli ve ark., 2011) ..... 8
Şekil 1.6. İnsan kalbinin anatomik yapısı ..... 14
Şekil 1.8. Tam kalp atışının aşamalarını gösteren ve kalp döngüsü sırasında sol ventrikül basıncının ve hacminin değişimi. ..... 16
Şekil 1.9. Erkeklerde iskemik kalp hastalığına bağlı oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası ..... 18
Şekil 1.11. Dünyada 2008-2030 yılları arasında hastalıklara bağlı tahmin edilen olüm oranları ..... 19
Şekil 3.1. Hücrelerinden arındırma ve film prosedürü fotoğraflı gösterimi. Kalp kası ..... dokusu ham hali (A). 48 saat hipotonik sonrası kalp kası dokusu (B). 48 saat hipertonik ortam sonrası (C). Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunun pepsinle sindirimi (D). 72 saat Pepsin ile muamele edilmiş hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunun petri kabına dökülmesi (E). Elde edilen film (F). ..... 29
Şekil 3.2. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmi..... 34
Şekil 3.3. Mikro-Mekanik Test Cihazı ..... 36
Şekil 3.4. MTT reaksiyonu ..... 39
Şekil 4.1. DNA içeriği (A) ve Agaroz jel elektroforezi (B) ..... 43
Şekil 4.2. GAG içerik analizi..... 44
Şekil 4.4. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusuna ait SDS-PAGE analizi..... 46
Şekil 4.5. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmine ait FTIR spektrumu..... 47
Şekil 4.6. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmine ait TGA eğrisi ..... 48
Şekil 4.7. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış kalp kası filme ait mikro-mekanik test sonucu ..... 49
Şekil 4.8. Kök hücrelerin in vitro çoklu-soy farklılaşma kabiliyetlerinin belirlenmesi Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (A), adipogenezis; oil red O ile boyaması (B, C), osteogenezis; alizarin red S ile boyaması (D, E), kondrogenezis; safranin O boyaması (F) ve alcian blue 8gx boyaması (G) ..... 51
Şekil 4.9. MTT reaktifi ile muamele edilmiş filmlerin mikroskobik ve makroskobik görüntüsü(A). Filmler üzerindeki hücrelerin 3,7 ve 14 günlerdeki canlılık düzeyi (B) ..... 52
Şekil 4.10. Çapraz bağlı filmlerin kalınlığı belirlemek amacıyla kullanılan SEM mikrografisi ..... 54
Şekil 4.11. Çapraz bağlı hücreli ve hücresiz filmlerin SEM mikrografileri (x50 kat büyütme(A), x750 kat büyütme (B)) ..... 55
Şekil 4.12. Çapraz bağlı hücreli ve hücresiz filmlerin SEM mikrografileri (x1,500 kat büyütme (A), x5000 kat büyütme (B)) ..... 56
Şekil 4.13. Çapraz bağlı hücresiz ve iAKMH ekilmiş filmlerin histokimyasal boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri..... 58

Şekil 4.14. Çapraz bağlı hücresiz ve iAKMH ekilmiş filmlerin immünhistokimyasal boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri..... 59

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Sayfa No**

Çizelge 1.1. Doku mühendisliği çalışmalarından kullanılan bazı polimerler ve bu malzemeler ile hedeflenen dokulardan bazıları ..... 10
Çizelge 1.2. Kardiyak doku mühendisliği yaklaşımlarının avantajları ve dezavantajları ..... 21
Çizelge 3.1. SDS-PAGE jel hazırlama prosedürü ve kullanılan çözeltiler..... 33
Çizelge 3.2. TBE Tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar..... 35
Çizelge 3.3. Örnek yükleme tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar..... 35

# BÖLÜM 1
# GİRİŞ

Her yıl Amerika'da yaklaşık olarak 1 milyon Amerikan vatandaşı miyokard enfarktüsü geçirmekte ve bunların yaklaşık %10 kısmı ölümle sonuçlanmaktadır (Wang ve ark., 2010). Batı dünyasında İskemik kalp hastalığı ve kalp yetmezliği de başlıca ölüm nedenlerindendir. Bu hastalıklardan dolayı 2030 yılında dünya çapındaki ölümlerin %13,4 artacağı tahmin edilmektedir (Wang ve Christman, 2016). Miyokard infarktüs gibi kardiyovasküler hastalıklardan meydana gelen kalp yetmezliği ölüm ve morbidite'nin önde gelen sebeplerindendir (Wu ve ark., 2006). Miyokard İnfarktüs sonrası son evre kalp yetmezliği için kalp nakli başarılı bir tedavi olmaya devam ederken, dönor kalp eksikliği bu tedaviyi sınırlı kılmaktadır (Wang ve Christman, 2016). Diğer yandan başarılı organ nakillerinden sonra hastaların kullanmak zorunda olduğu immünosüpresif ilaçlar sorunu çözmek bir yana, yeni sorunlar doğurmakta; kanser, enfeksiyon gibi diğer ciddi risklere ortam hazırlamaktadırlar. (Nugent ve Edelman, 2003; Platt, 2004). Miyokard İnfarktüs esnasında zarar görmüş miyokard doku kendini yenileme özelliği olmadığından kalp hasarlarının geri dönüşümü yoktur. Çünkü kardiyomiyositlerin bölünme yeteneği cok düşüktür. Bu sebeple tedavi için potansiyel bir seçenek olan kardiyak doku mühendisliği stratejileri uygulanmalıdır (Weymann ve ark., 2011; Wang ve Christman, 2016).

Doku mühendisliğine çok büyük önem verilerek birçok türde doku ve organ yenilenmesi araştırılmıştır (Shimizu ve ark., 2007). Doku mühendsiliği; doku rejenerayonunda görevli suni yapılar oluşturmak için mühendislik ve yaşam bilimlerini kapsayan interdisiplinel bir alandır (Shin ve ark., 2003). Doku Mühendisliğinin hedefleri genel olarak hücrelerinden arındırılmış matriksler ve hasar görmüş doku ile yer değiştirecek ve hücreleri üzerinde barındıracak bir iskeledir (Demirbağ ve ark., 2011, Arslan ve ark., 2015). Dokudan izole edilen hücreler, *in vitro* ortamda çoğaltılır ve üç boyutlu iskeleler üzerine ekilir. Böylece iskeleler hücre dışı matriksin biyolojik fonksiyonlarını ve yapısını taklit ederek hem hücreleri üzerinde barındırır hem de gerçek dokunun rejenerasyonuna veya tedavisine destek olurlar (Langer ve Vacanti,

1993; Ma ve ark., 2005). Doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryaller doğal kaynaklı, sentetik kaynaklı polimerler ve kompozit olarak kategorize edilmektedir (Chen ve ark., 2013). Sentetik iskele avantajları fiziksel ve kimyasal içeriklerin iyi analiz edilebilmesi ve kontrollü olmalarıdır. Dezavantajları ise organ uyuşmazlıkları ve hücrelerin sentetik iskelelere tutunmasındaki problemlerdir. Bu dezavantajlara sahip malzemelere alternatif olarak kadavradan alınan dokulardan hücrelerinden arındırma yöntemiyle elde edilen doğal hücre dışı matrikse (HDM) en yakın HDM elde edilmektedir (Song, ve C. Ott, 2011).

Kardiyak doku mühendisliğinde miyokardiyal onarım için hücrelerin biyomalzeme ile etkileştirilmesinde faydalı etkilerin görülmesine rağmen, elde edilen polimer preparatları gerekli hücre-matriks etkileşimlerini tam anlamıyla taklit edememiştir (Oberwallner ve ark., 2014). Doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılabilicek en iyi seçeneklerden biri hücrelerinden arındırılmış HDM'dir. HDM dokuda bulunan hücrelerin büyümesini ve göçünü destekler ve dokuya özgü esneklik veya katılık işleveleri sağlarlar (Erten ve ark., 2016). Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp çalışmalarında kan damarı, kalp kapakçığı, deri, tendon, ince bağırsak submukozası ve karaciğer gibi birçok doku ve organdan elde edilen HDM kullanılmıştır (Gilbert ve ark., 2006). Hücrelerinden arındırma işlemi ile elde edilen bütün doku ve organlar klinik araştırmalar da başarıyla kullanılmıştır. Hücrelerinden arındırma yöntemiyle elde edilen dokular, doğal hücre dışı matriks içeriğini barındırmaları sayesinde mekanik özellikler ve biyouyumluluk açısından birçok avantaj sağlamaktadırlar. Diğer yaklaşımların aksine, bu dokulardan hücrelerin arındırılması ve daha sonra hedef canlının hücrelerinin bu yapılara ekilmesi ve transplantasyonu ile hasar görmüş veya fonksiyonunu yitirmiş doku ve/veya organların yeniden fonksiyonel hale getirilmesi sağlanmaktadır. Hücrelerinden arıdnırma işlemi tipik olarak deterjan, enzim inhibitörleri ve tampon kombinasyonları ile yapılmaktadır. Doku ve organları hücrelerinden arındırma yöntemi ile üretilen biyolojik HDM'ın miyokard rejenerasyonu için gelecek vaat eden bir yaklaşım olduğu yapılan çalışmalar ile de gösterilmiştir (Oberwallner ve ark., 2014; Isenberg ve ark., 2006,).

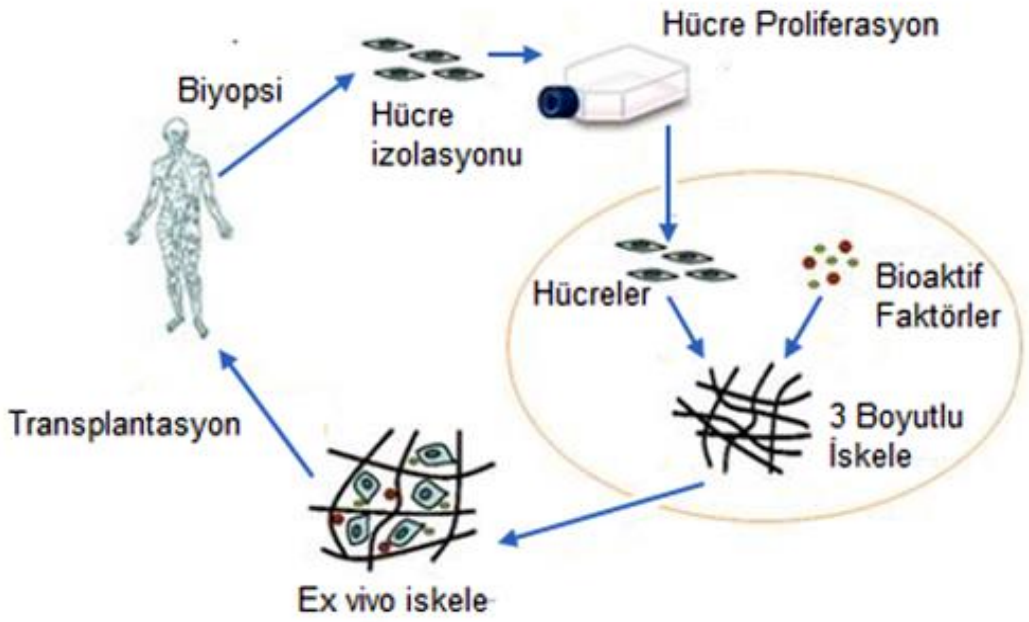
Yapılan bu tez çalışmasında, kesimhanede ticari amaçlarla kesimi yapılan sığırların, kalbi çıkartılarak daha küçük parçalara ayrılmıştır ve kas dokusu alınmıştır. Kas dokusu sırasıyla Trizma.HCl/EDTA çözeltisi ve SDS ile muamele edilerek hücrelerinden

arındırılmıştır. Hücrelerinden arındırılan liyofilize kas dokusu içerisindeki DNA miktarını belirlemek için DNA içerik analizi ve agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Yapıdaki protein içeriği ile doğru orantılı olan hidroksiprolin miktarı satın alınan hidroksiprolin test kiti ile analiz edilmiştir. Benzer şekilde diğer bir matriks bileşeni olan sülfatlanmış glikozaminoglikanlarda spektrofotometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Ayrıca hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusuna SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Ardından hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu pepsin, 10x PBS ve 0,1N NaOH çözeltileri kullanılarak film haline getirilmiştir. Elde edilen filmler SEM, FTIR ve TGA ile karakterize edilmiştir. Ticari olarak satın alınan insan adipoz kaynaklı mezankimal kök hücreler (iAMKH) farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla çoklu soy farklılaşma (adipojeniki kondrojenik ve osteojenik) çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra kök hücreler elde edilen filmler üzerine ekilmiştir ve filmler üzerindeki hücre canlılığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca film yüzeyindeki hücrelerin tutunması SEM ile analiz edilmiştir. Çapraz bağlı hücreli ve hücresiz filmler histokimyasal ve immünhistokimyasal analizleri yapılarak adipoz kaynaklı mezankimal kök hücrelerin film üzerinde kalp kası hücrelerine farklılaşıp farklılaşmadığı değerlendirilmiştir.

### 1.1. Doku mühendisliği

Hastalık, yaralanmalar ve travma insan vücudundaki dokuların hasar görmesine ve dejenerasyonuna sebep olabilmektedir. Bu hasarlı dokuların tedavisi veya tedavisini kolaylaştıra bilmek için birtakım işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Tedavi yöntemleri genel olarak hastanın kendisinden (otogreft) veya başka bir bireyden alınan dokunun (allogreft veya transplant) nakliyle gerçekleşmektedir. Bu tedavi yöntemleri devrim niteliğinde ve can kurtaran bir süreç olsada, her iki yöntemde de büyük sorunlar bulunmaktadır. Otogrefleri elde etmek pahalı, sancılı ve anatomiksel olarak kısıtlıdır. Benzer şekilde allogretfler ve transplantlar tüm hastalar için yeterli dokuya erişme problemleri, hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riski ve vericiden hastaya enfeksiyon veya hastalık geçirme imkanı olması gibi sebeplerden dolayı allogretfler ve transplantların kullanımları da kısıtlıdır (O'Brien, 2011). Alternatif olarak Doku mühendisliği alanının amacı, ana sisteme tamamen entegre olabilen işlevsel sağlıklı dokular oluşturmak ve içine dahil edilecek olan doğal

dokuların özelliklerine sahip bir destek iskelesi veya suni HDM tasarlamaktır. Tasarlanan biyomalzemeler, spesifik hücrelerin yapışmasını arttırmak için geniş bir yüzey alanına sahip gözenekli ve parçalanabilir bir yapıda olmalıdır (Flynn ve ark., 2006). Dokudan izole edilen hücreler, *in vitro* ortamda çoğaltılır ve üç boyutlu iskeleler üzerine ekilir. Böylece iskeleler hücre dışı matriksin biyolojik fonksiyonlarını ve yapısını taklit ederek hem hücreleri üzerinde barındırır hem de gerçek dokunun rejenerasyonuna veya tedavisine destek olurlar (Ma ve ark., 2005; Langer ve Vacanti, 1993) (Şekil 1.1).



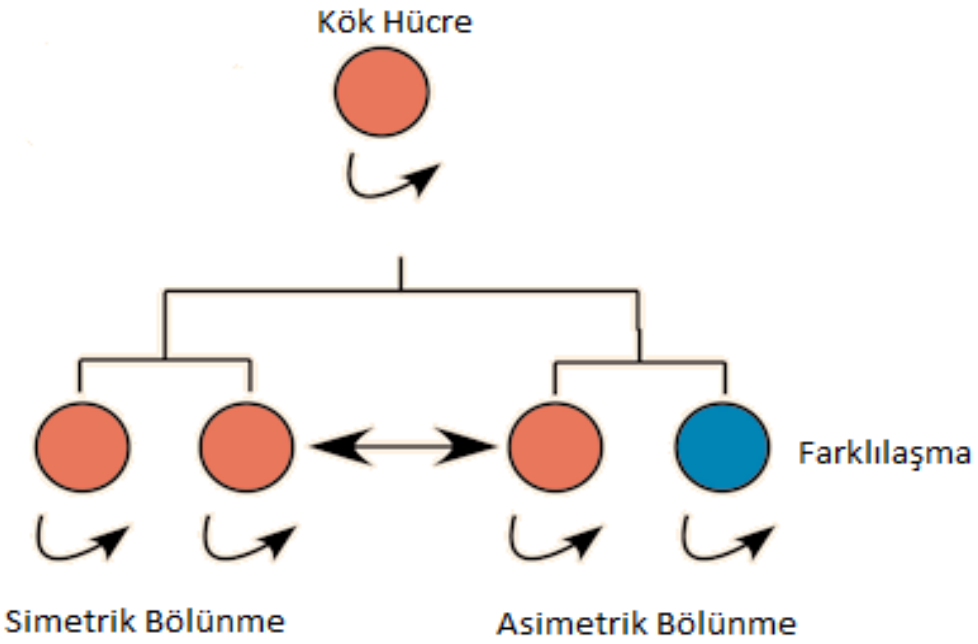

Şekil 1.1. Doku mühendisliği temel prensibi (http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som-registered programmes/nus-tissue-engineering-programme' den uyarlanmıştır)

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki çalışmalar son yıllarda muazzam bir artış göstermiştir. Bu alanda yapılan ilerlemeler ile birlikte akıllı polimerler, esnekliğe sahip polimerler, şekil hafızalı polimerler ve hücrelerinden arındırılmış matriksler gibi birçok yeni malzeme üretilmiştir. İnsan Embriyonik kök hücrelerin keşfi yeni doku oluşturma imkanını daha da arttırmıştır. Son yıllarda keşfedilen uyarılmış pluripotent kök hücreler (IPS) ile bu çalışmalar daha da genişletilmiştir. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanı çok parlak bir geleceğe sahiptir. Belirli bir ilaca ve terapiye dayanan bir hastalığı tedavi etmenin mümkün

olmadığı pek çok durum vardır. Örneğin karaciğer yetmezliği, omurilik tamiri ve buna benzer birçok hastalık. Bu tür hastalıkların tedavisinin tek yolu rejeneratif tıp ve doku mühendisliğidir. Gelecek yıllarda yapılacak çalışmalar ile birlikte tıbbın geleceği için umut vaad eden bu alan daha da ilerletilecektir (Chen ve ark., 2012; Langer, 2009).

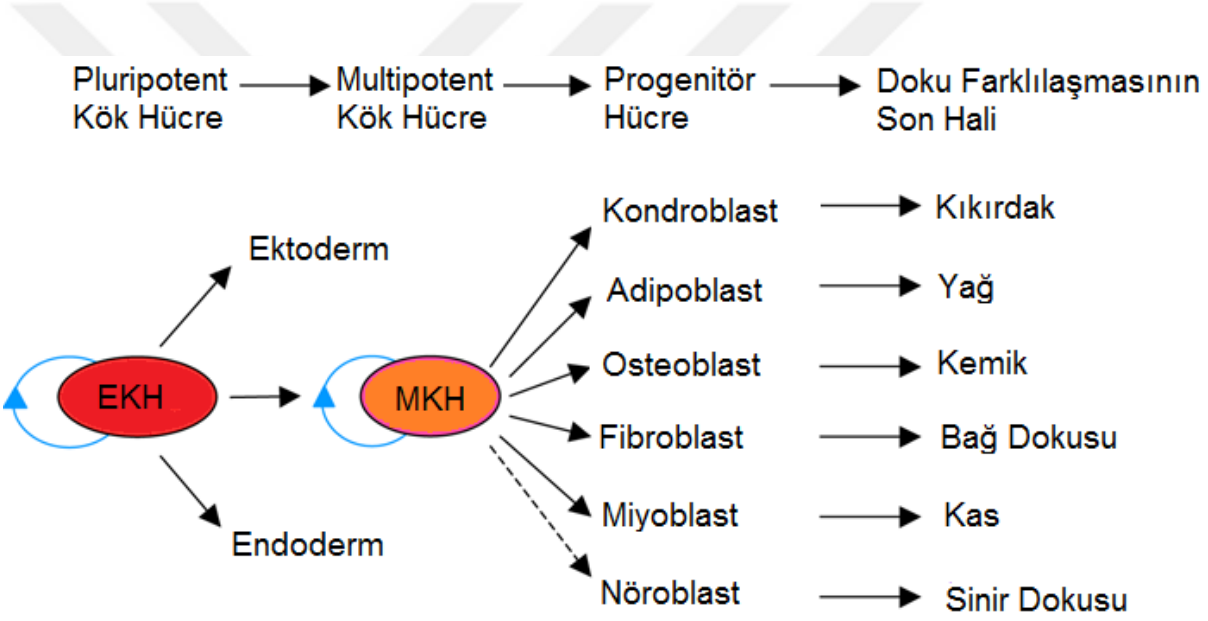
### 1.2. Kök Hücreler

Vücudumuzda sınırlı bir çoğalma yeteneğine sahip yaklaşık 200 farklı somatik hücre çeşitinin olduğu bilinmektedir. Ancak kök hücrelerin uygun ortam ve koşullarda sınırsız bir çoğalma yeteneğine sahiptirler (Dreesen ve Brivanlou, 2007). Kök hücre: farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelerdir (Şahin, 2005). Kök hücreler simetrik bölünme geçirerek kendilerini yenileyebilirler. Simetrik bölünme ile bir adet orijinal kök hücreden iki adet özdeş yavru hücre elde edilmektedir. Kök hücreler farklılaştıklarında ise asimetrik olarak bölünürler. Asimetrik bölünme ile özdeş hücrelerden biri aynı kalırken, diğer hücre belirli bir hücre tipinin özelliklerini alarak farklılaşmaktadır (Jung ve Kleinheinz, 2014; Weiss ve Troyer, 2006) (Şekil 1.2).




Şekil 1.2. Simetrik ve asimetrik kök hücre bölünmesi (Weiss ve Troyer, 2006)

Totipotent kök hücreler; döllenmeden sonra zigotun 8 hücreli morula evresine kadar bölünmesiyle meydana gelen hücrelerdir. Totipotent kök hücreler bütün bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahiptirler. Üç germ tabakasından türetilmiş (ektoderm, endoderm ve mezoderm) dokulara farklılaşabilen kök hücrelere "pluripotent" denilmektedir. Pluripotent kök hücrelere en iyi örnek, erken embiriyonun iç hücre kütlesinden eldi edilen embiriyonik kök hücrelerdir. Totipotent kök hücreler bütün bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahiptirler. İyi karakterize edilmiş kök hücrelerin birçoğu "multipotent" özelliktedir ve birçok doku tipine dönüşebilmektedir (Fortier, 2005) (Şekil 1.3).

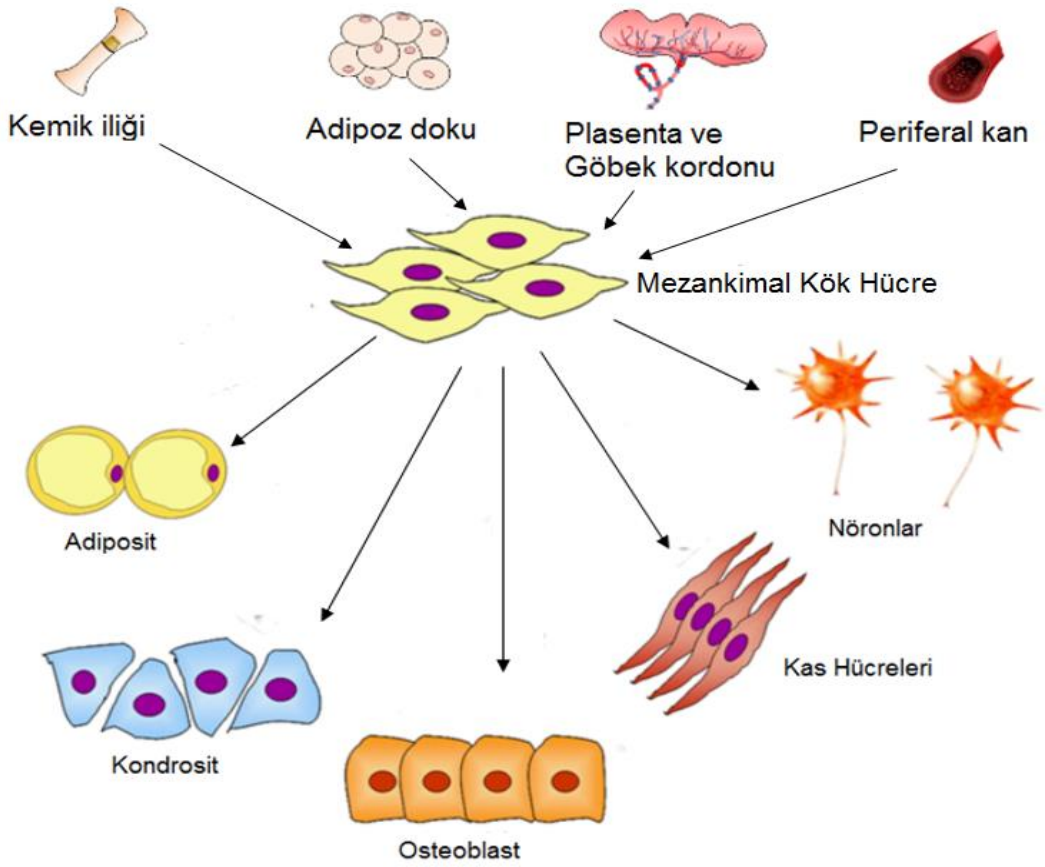



Şekil 1.3. Kök Hücre farklılaşma potansiyelleri (Oreffo ve ark., 2005)

Embriyonik kök hücreler (EKH) blastosist evresindeki (yaklaşık olarak bu süreç döllenmeden sonraki 1 hafta içerisinde gerçekleşir) embiriyonun iç hücre kütlesinden türetilmektedir. Embiriyonik kök hücreler kendi kendilerini yenileyebilme ve tüm doku tiplerine farklılaşabilme özelliklerine sahiptirler. Ayrıca EKH uzun süreli kültür kapasitesine sahiptirler (Her 36-48 saatte bir hücre bölünmesi ile 1-2 yıl) (Fortier, 2005). EKH'nin 20-30 yıl içerisinde gerçekleşen birçok araştırma konusuna önemli bir etkisi olmuştur. EKH hatları kemirgenlerden, tavşandan, domuzdan ve önemli ölçüde insanlardan elde edilmektedir. İnsan

EKH üretilmesi medyada büyük tartışmalara yol açmıştır ve bazı din toplulukları insan EKH kullanılmasını yasaklamıştır. İnsan EKH kullanılmasıyla ilgili yasalar ülkelere göre değişiklik göstermektedir.

EKH çok yüksek potansiyelli olmasına rağmen klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için üstesinden gelinmesi gereken birtakım engeller vardır. İlk olarak EKH farklılaşmasına yönelik hiçbir yaklaşım henüz %100 saf bir olgun soy elde edememiştir. EKH teratom oluşturma ve doku işlevinin daha fazla bozulması gibi riskleri olduğu için implantasyonundan kaçınılması gerekilmektedir. Tüm nakillerde olduğu gibi allojenik EKH kaynaklı implantların ev sahibi tarafından reddedilme riski vardır. Ayrıca nakil ardından kullanılması gereken immünbaskılayıcı ilaç birçok kötü yan etkiye sahiptir ve hastayı enfeksiyona son derece hassas hale getirmektedir. (Rippon ve Bishop, 2004). Mezankimal Kök Hücreler (MKH) 40 yıldan uzun süre önce ilk olarak kemik iliğinde tanımlanmıştır (Williams ve Hare, 2011). MKH osteoblastlara, kondroblastlara, adipositlere ve bazı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olan multipotent özellikteki erişkin kök hücrelerdir. MKH sahip olduğu kendini yeniliye bilme ve farklılaşabilme özelliklerinden dolayı klinik doku rejenerasyonu için büyük bir potansiyel sunmaktadır. MKH kemik iliğinde tanımlandığından bu yana başka dokularında MKH ile ortak özelliklere sahip olan hücreler içerdiği bilinmektedir. MKH benzer hücrelerin kemik iliğine ilaveten yağ dokusu, kalp, iskelet kası, amniyotik sıvı, pankreas da dahil olmak birçok doku tipinde olduğu gösterilmiştir. Yaygın olarak kullanılan MKH kaynakları; kemik iliği, göbek kordonu ve adipoz doku olduğu bilinmektedir (Şekil 1.4). Elde edilen miktar ve izolasyon kolaylığı bakımından bu kaynaklar klinik araştırmalar ve deneysel çalışmalar için en kullanışlı kaynaklardır. Adipoz kaynaklı MKH insan vücudunda her yerde bulunduğundan dolayı umut vaad eden bir kaynak olarak bilinmektedir (Arslan, 2017; Tekeli ve ark., 2016; Väänänen, 2005). Yapılan çalışmalar ile MKH in vitro olarak yağ, kemik, kıkırdak, kemik iliği stroması, miyotübüller gibi çeşitli mezenkimal dokulara farklılaşabilmesi için indüklenebileceği gösterilmiştir (Marshak ve ark., 2001).




Şekil 1.4 MKH kaynakları ve farklılaşma potansiyelleri (Meregalli ve ark., 2011)

MKH olarak sınıflandırabilmek için ilk olarak hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye yapışma özelliği göstermeli gerekmektedir. İkinci özellik ise MKH yüzeylerinde CD105, CD73, CD44, CD90 gibi yüzey işaretlerinin pozitif, CD34, CD45, CD14, CD79, CD11b gibi hematapoietik kök hücrelere ait yüzey antijenlerin ise negatif olması gerkemektedir. Son olarak *in vitro* ortam içerisinde yağ, kemik, kıkırdak gibi hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip olması gerekmektedir (Tekeli ve ark., 2016).

### 1.3. Biyomalzemeler

Doku mühendisliği, insan doku ve organların yenilenmesini hedeflemiş interdisiplinel bir alandır (Lee ve ark., 2014). Doku mühendisliği mühendislik ve biyoloji ilkelerini birleştirir ve biyomalzemeler, hücreler ve biyoaktif moleküllerin kombinasyonlarını içerirler. Doku

mühendisliği stratejileri hem in vitro hem de in vivo yaklaşımlar içermektedir ve kök hücre biyolojisi biyomalzeme bilimi ve biyoreaktör teknolojisi geliştikçe klinik uygulamalar için optimal yaklaşımlarda gelişmeye devam edecektir (Keane ve ark., 2014). Vücudun sahip olduğu kendini yeniliyebilme yeteneğine rağmen, onarım yeteneği dokular arası farklılık göstermektedir ve yaralanmaların ya da hastalıkların şiddetine göre ciddi hasarlar oluşturabilmektedir. Doku mühendisliğinin önemli bir amacı doku rejenerasyonu ve dokulara yeterli mekanik dayanıklılık kazandırabilen biyomalzemelerin üretilmesidir (Lee ve ark., 2014). Doku mühendisliğinde HDM benzeyen 3D iskeleler, hücre adezyonu çoğalması ve farklılaşması gibi bir dizi hücresel aktivite için 3D ortam sağlamak zorundadır. Birçok yöntem kullanılarak 3D iskele üretilirken, iskele gözenek boyutunu ve gözenekliliğini kontrol etmek zordur (Shim ve ark., 2011).

Doku mühendisliği temel olarak 3 adımdan oluşmaktadır.

Birinci adım: Arzu edilen türün hücreleri hastadan izole edilir ve hücreler klasik hücre kültürü teknikleriyle sayısı arttırılır.

İkinci adım: İstenilen hücre sayısına erişildikten sonra bu hücrelerin biyolojik olarak parçalanabilen bir iskele içine emdirmek gerekmektedir. Bu iskelenin kullanımı için alternatifler; bir hidrojel veya bir taşıyıcıdır. Biyomateryal; hücrelere geçici bir yapı kazandırır ve burada organ benzeri yapılar oluşturmak için çoğalır ve ayrılırlar.

Üçüncü adım: Hücre-biyomalzeme kombinasyonu bir fonksiyonel doku yapısına dönüşmesi sağlanır. Biyomalzemenin istenilen bir hücre tipine farklılaşmasını teşvik etmek için uygun özelliklere sahip olması gerekmektedir.

Doku mühendisliği için en büyük zorluk; hücrelerin, büyüme faktörlerin, kültür koşulların ve biyomalzemelerin en iyi kombinasyonunu bulmaktır (Eisenbarth, 2007). Biyomalzemenin ideal bir iskele olabilmesi için bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir. Tasarıma ve modifikasyona uygun temel birimler, malzemelerin kontrollü biyolojik parçalanma oranı, sititoksik etki göstermemesi, hücre-biyomalzeme etkileşimlerini spesifik olarak teşvik eden veya inhibe eden özellikler, minimum immün yanıt oluşturması ve iltihaplanmanın ortaya çıkmamasıdır. Bu kriterlerden birininin kaşılanmaması biyomalzemenin potansiyel yararlılığına sınır koymaktadır (Holmes, 2002). Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için biyomalzemeler genel olarak doğal veya sentetik kaynaklı

olarak sınıflandırılmaktadır. Her iki tür biyomalzemenin de kendi içinde avantajları ve dezavantajları vardır. Doğal olarak bulunan biyolojik malzeme iskeleleri (kolajen gibi), arzu edilen özellikleri vermek üzere kimyasal olarak modifiye edilebilmektedir. Organik polimerler, inorganik malzemeler veya karışık kopolimer kombinasyonları sentetik biyolojik malzeme iskeleleri oluşturmak için kullanılmıştır. Kullanılan biyomalzeme hangi kaynaklı olursa olsun dokuya tutunmada, onarımda, hücrelerin çoğalmasında ve zaman zaman hücre popülasyonlarının farklılaşmasında görev alması amaçlanmaktadır. Bunlara ek olarak da iskelelerin amaçlanan anatomik bölge için yeterli bir destek ve yapısal dayanıklılığı sağlaması gerekmektedir (Keane ve ark., 2014; O'Brien, 2011). Doku mühendisliği çalışmalarından kullanılan bazı polimerler ve bu polimerler ile hedeflenen dokular Çizelge 1.1.' de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Doku mühendisliği çalışmalarından kullanılan bazı polimerler ve bu malzemeler ile hedeflenen dokulardan bazıları (Wang ve ark., 2006)

| Polimerler | Hedef Dokular |
|---|---|
| Doğal kollajen | Deri, kemik, kıkırdak, tendon, ligament, akciğer, |
| Polisakkaritler (aljinat, kitozan, hiyalüronat) | Deri, kıkırdak, tendon, bağ doku |
| Doğal ipek fibroin | Bağ doku |
| Yenilenmiş ipek fibroin | Deri, kemik, kıkırdak |
| Poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik asit) (PLA) ve bunların kopolimerleri PLGA | Deri, kemik, kıkırdak, tendon, ligament, sinir |
| Poli (e-kaprolakton) (PCL) ve kompozitleri | Deri, kemik, kıkırdak, tendon |
| Polihidroksialkanoatlar (PHA) ve bileşikleri | Deri, kemik, kıkırdak, tendon |
| Tirozinden türetilmiş polikarbonatlar | Kemik |
| Poli (propilen fumarat) (PPF) | Kemik |
| Poli (gliserol sebakat) | Sinir |
| Poli (fosfoester) | Sinir, kemik |
| Poli (fosfazen) ve kompozitleri | Kemik |

### 1.3.1. Doğal biyomalzemeler

Doğal biyomalzemeler biyoaktivitileri, biyouyumlulukları, ayarlanılabilir bozunumları, doğal HDM dokusuna yapısal benzerlikleri nedeniyle doku mühendisliğinde kullanılmak üzere biyomalzemelerin önemli bir alt kümesini sunmaktadır. Doğal biyopolimerler genellikle

çevre dostu ve su bazlı yöntemler kullanılarak işlenmektedir. Doğal biyomalzemeler biyolojik sistemler içerisinde uygulandıklarında sitotoksik etki göstermezler ve bozulma oranları işleme koşullarını değiştirerek ayarlanabilmektedir (Chen ve Liu., 2015). Doğal biyomalzemeler; hücrelerinden arındırılmış doğal hücre dışı matriks iskelesi (deselülerize kalp kası, kalp kapakçıkları vb.), HDM ayrı bileşenlerinden türetilen doğal biyomalzemeler (kollejen jelatin vb.), normal yara iyileşmesinde yer alan proteinler (fibrin vb.) ve diğer doğal biyomalzemeler (Khaing ve Schmid., 2012).

Doğal biyomalzemeler HDM'yi taklit edebilecek özellikte ve hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemesinden dolayı büyük bir avantaja sahiptir. Teröpatik uygulamalar için bu polimerler genel olarak gözenekli iskele, hidrojel veya ince membranlar olarak işlenir ve *in vivo* ortamda enzimatik olarak paçalanabilen ve toksik etki göstermeyen bir ürün olarak kullanılmaktadır. Ek olarak doğal polimerlerin özel formları (Örn: Enjekte edilebilir hidrojel) doku hasarının olduğu hedef bölgeye noninvaziv olarak uygulanabilmektedir. (Chen ve Liu., 2015) Doğal biyomalzemelerin zayıf mekanik dayanıklılık, immün yanıt tepkisi, enfeksiyon oluşturma ve mikroorganizma bulaşma riskleri gibi bazı özellikler doğal biyomalzemelerinin kullanımı kısıtlamaktadır (De la Puente ve Ludeña, 2014). Bu kısıtlamaların üstesinden gelebilmek için doğal HDM'i taklit eden ligandları içeren biyomimetik iskele geliştirmeye eğilim olmuştur (Chen ve Liu., 2015).

### 1.3.2. Sentetik Biyomalzemeler

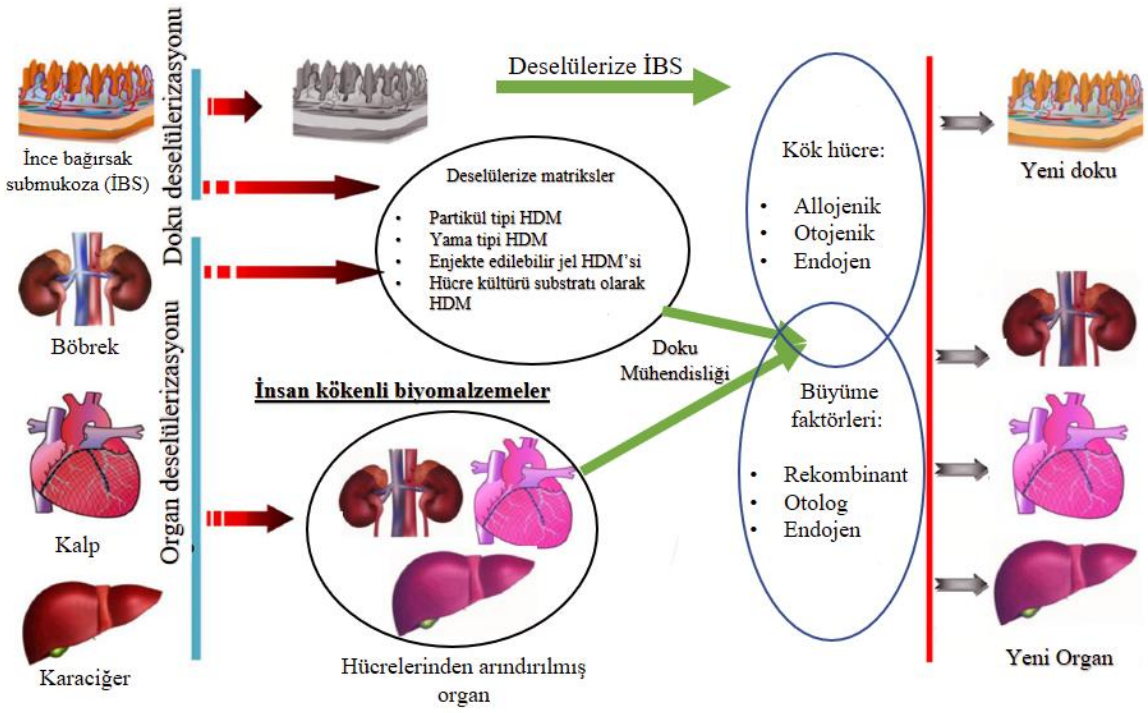
Tüm sentetik biyomalzemelerin ortak yararı biyolojik patojenleri veya kirleticileri taşıma riskini en aza indirgemesidir ve belirli ihtiyaçları karşılamak üzere tasarlanabilmeleridir. Sentetik biyomalzemeler, kontrollü ilaç salınımı, doku onarımı ve doku mühendisliği uygulamaları için cazip özellikler sergilemektedir. Son yıllarda geliştirilen sentetik biyomalzemeler, biyouyumluluk için umut verici gelişmeler göstermektedir. Sentetik biyomalzemelerin en büyük faydalarından biri belirli ihtiyaçları karşılamak üzere tasarlanabilmeleridir (Holmes, 2002). Doku rejenerasyonu için en yaygın kullanılan sentetik polimerler; polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimerleri, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) dır. Bu polimerlerin bozunma ürünleri toksik değildir ve metabolik yollarla vücuttan atılabilmektedir. Sentetik polimerlerin bozunma hızı, çekme

direnci ve mekanik dayanıklılık gibi özellikleri, Laktit / glikolid oranları ve polimerizasyon parametreleri değiştirilerek hedef uygulamalar için uygun hale getirilebilir.

Sentetik biyomalzemelerin avantajları; biyouyumlu olması, kullanım kolaylığı, kontrollü bozunma, patajoen ve kirletici taşıma riskinin az olmasıdır. Dezavantajları ise; hücre etkileşimini arttırmak için yüzey modifikasyonu, işleme yöntemlerinin mekaniksel ve bozunma özelliklerini etkileyebilmesi ve inflamasyona sebep olabilen bozunma ürünleri içermesidir (Puente ve Ludeña, 2014).

### 1.3.3 Hücrelerinden Arındırılmış Doku ve Organ Temelli Biyomalzemeler

Hücrelerinden arındırılmış doku ve organdaki son gelişmeler, insan veya hayvan kaynaklı hücresiz biyomalzemelerin kullanımını arttırmaktadır. Hücrelerinden arındırıma (deselülerizasyon) işlemi ile kollajen, GAG, fibronektin gibi yapısal proteinleri korunarak hücresiz HDM'ler elde edilmektedir. Bu yüzden deselülerizasyon doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için umut vaad eden bir yaklaşımdır. Deselülerize edilmiş HDM işlevselliğini koruyan ve çeşitli sinyal moleküllerini içeren bir biyomalzeme olarak kabul edilmektedir. Desellülerize olmuş HDM, hasarlı doku veya organa implante edildiğinde o bölgenin onarımında, yenilemesinde ve hücrelerin tutunmasında görev almaktadırlar (Chen ve Liu., 2016) (Şekil 1.5).

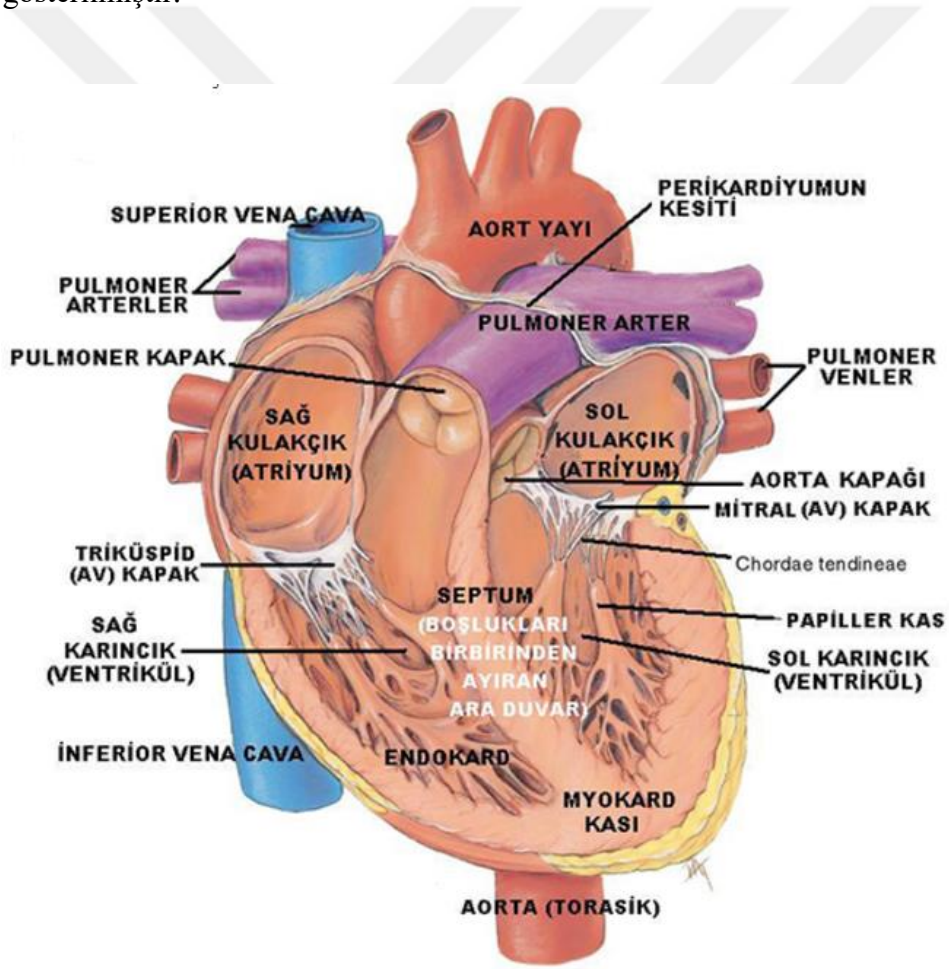



Şekil 1.5. Hücrelerinnden arındırılmış doku ve organ temelli biyomalzemelerin kullanımı (Chen ve Liu., 2015)

### 1.4. Kalbin Yapısı

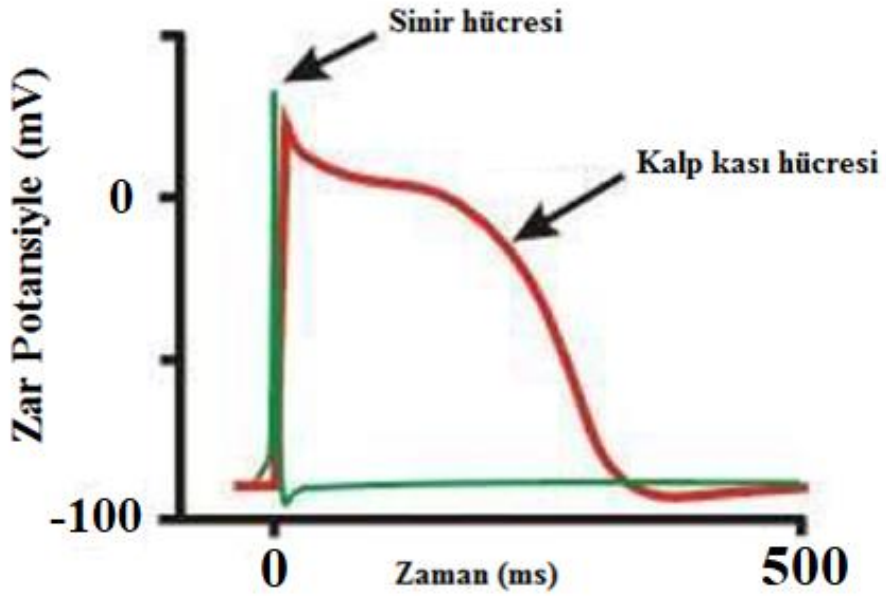
Kalp, akciğerler arasında, göğüs kafesinin arkasında bulunan kaslı bir organdır ve kardiyovasküler sistemin merkezi olarak kabul edilmektedir. Kalp hem üst hem de alt bölmelerin eş zamanlı kasılması ile kan pompalamaktadır. Bu sayede vücuttaki kan dolaşımı sağlanır ve metabolik fonksiyonların sürdürüle bilmesi için hayati önem taşıyan organlara oksijen ve besin maddeleri taşınır (Yılmaz, 2014). Bu kas kasılmaları, ventriküllerin duvarlarını oluşturan kas dokusu tarafından gerçekleştirilmektedir. Sağlıklı kalp kası duvarı üç katmandan oluşmaktadır; kas tabakası miyokard, endotel hücreleri tarafından doldurulan endokardiyum ve viceral perikard olarak da adlandırılan epikarddır. Kardiyomiyositlerin çapı genelde 10-15 µm'dir ve uzunluğu maksimum 100 µm'dir. Kardiyomiyositlerin ve fibroblastların miyokardın kompleks ağını düzenlemek ve inşa etmek için kollajen, elastin demetleri ve birbirine bağlı bazal membranlardan oluşan üç boyutlu HDM ihtiyaçları vardır (Kenar, 2008). Kalp dört odadan oluşur; sağ atriyum, sol atriyum, sağ ventrikül ve sol ventrikül. Sağ ve sol atriyum septum ile bölünmüştür ve bir rezervuar rolü vardır. Sağ atriyum

vücudun ve kalp kasının oksijensizleştirdiği kanı alır ve daha sonra sağ ventriküle yönlendirir. Öte yandan, sağ atriuma kıyasla daha kalın bir duvara sahip olan sol atriyum, akciğerlerden gelen oksijenlenmiş kan toplar ve onu sol ventriküle yönlendirir. Atriyumdan ventriküle kan akımı atriyoventriküler kapaklar, yani triküspid kapak ve biküspit kapak tarafından sağlanır. Sağ ventrikül, pulmoner arterler yoluyla akciğerlere kan taşırken, daha kalın bir duvara sahip olan sol ventrikül, vücuttaki ana arter olan aorta vasıtasıyla kan pompalar. Ventriküllerden akciğerlere ve vücuda tek yönlü kan akışı, sırasıyla pulmoner ve aort kapakçıkları olan semilunar vana tarafından sağlanır (Yılmaz, 2014). Şekil 1.6'da insan kalbinin anatomisi gösterilmiştir.



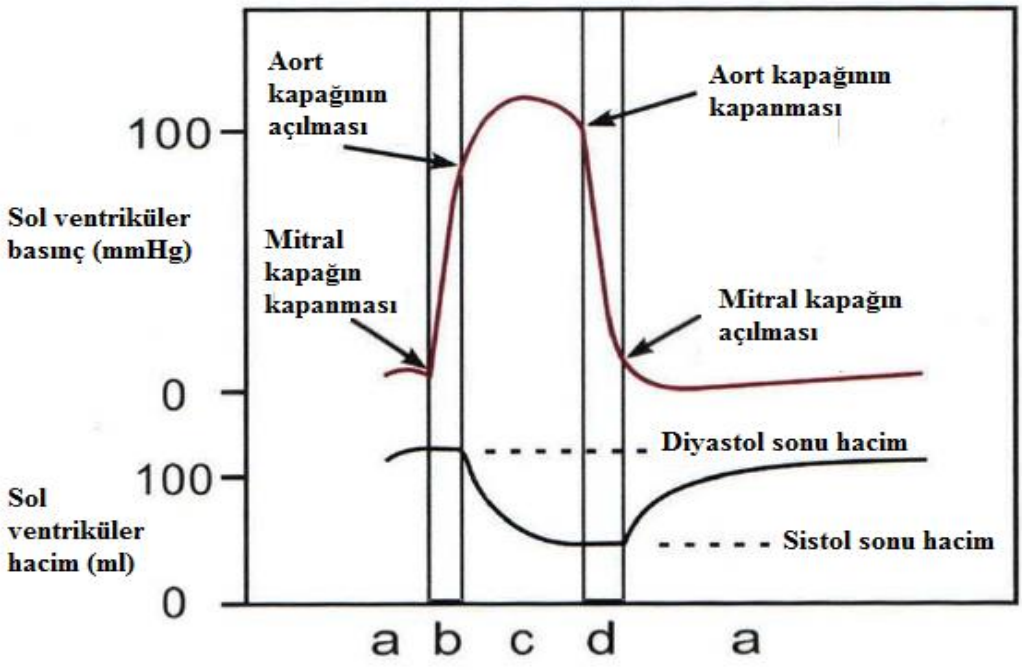

Şekil 1.6. İnsan kalbinin anatomik yapısı (http://www.anatomi.gen.tr/anatomi-kalp'den uyarlanmıştır)

Ventriküllerin daralıp gevşemesi arasındaki koordinasyon, kalp içindeki elektrik sistemi tarafından uyarılır ve kalp boyunca iletilir. Vücuttaki diğer kas hücrelerine benzer şekilde kalp miyositleri de uyarılmış hale gelme ve elektrik sinyallerini iletme özelliklerine sahiptirler. Kardiyak hücrelerin kasılması transmembran potansiyelinde bir değişiklik ile tetiklenmektedir ve miyositlerin mekanik olarak kasılmasına neden olmaktadır. Aksiyon potansiyelinin oluşumu genellikle iyon kanallarının açılması ve kapanmasıyla ile kardiyak hücreler uyarılmaktadır. Kardiyak aksiyon potansiyeli, nöronlar tarafından üretilen aksiyon potansiyelleri ile karşılaştırıldığında önemli farklılıklar göstermektedir. Bir sinir hücresinin aksiyon potansiyeli süresi yalnızca yaklaşık 1 milisaniye (ms) iken, Ventriküler miyositlerde üretilen aksiyon potansiyelleri yaklaşık 200 ila 400 ms arasında değişen farklı fazlara sahiptir. Şekil 1.7'de Bir sinir hücresi ve bir kalp içindeki aksiyon potansiyellerinin karşılaştırılması gösterilmiştir. Hücre zarında çeşitli iyon türleri olmasına rağmen, $Cl^-$, $Ca^{2+}$ ve $K^+$, kardiyak hücrelerindeki transmembran potansiyelini belirleyen birincil iyonlardır (Yılmaz, 2014).




Şekil 1.7. Sinir hücresi ve kalbin içindeki aksiyon potansiyellerinin karşılaştırılması (Yılmaz, 2014)

Bir kalp sistol ve diyastol olmak üzere iki ana safhadan oluşmakta ve bu safhalarda kalp kasları kasılmakta ve gevşemektedir. Sol ventriküler basınçtaki ve sol ventrikül hacmindeki değişiklik bir kalp döngüsünü göstermektedir. Kalp döngüsün de aşama a'nın sonunda izovolümik kasılmaya başladığı varsayılmaktadır. Bu sebeple kalp yoluyla iletilen elektriksel uyarılarla kardiyomiyositlerin depolarizasyonu sağlanır ve sol ventriküllerin basıncı artar. Faz b'de sol ventrikül basınç, sol atriyum basıncı ile aort basıncı arasında olduğu için hem mitral hem de aort kapakları kapalıdır. Bu nedenle, bu kapaklardan kan akışı olmaz ve ventriküler hacim de sabit tutulur. Ventriküler basınç aort basıncına ulaştığında aort kapağı açılır ve kan aort içine akarken ventriküler hacim azalır ve tahliye fazı başlar (faz c). Daha sonra, ventriküler basınç aort basıncının altına düştüğünde izovolümik gevşeme fazı başlar (faz d). Bu evrede mitral ve aort kapakları kapalı olduğu için ventriküler hacim değişmez ventriküler basınçta sol atriyumdaki basınçtan daha düşük olana kadar da bir azalma olur ve bu da mitral kapağın açılmasına neden olmaktadır. Sonra, dolum fazı (faz a) başlar ve sol atriyumdan sol ventriküle kan akımı olduğu için sol ventrikül hacmi artar (Yılmaz, 2014) (Şekil 1.8).

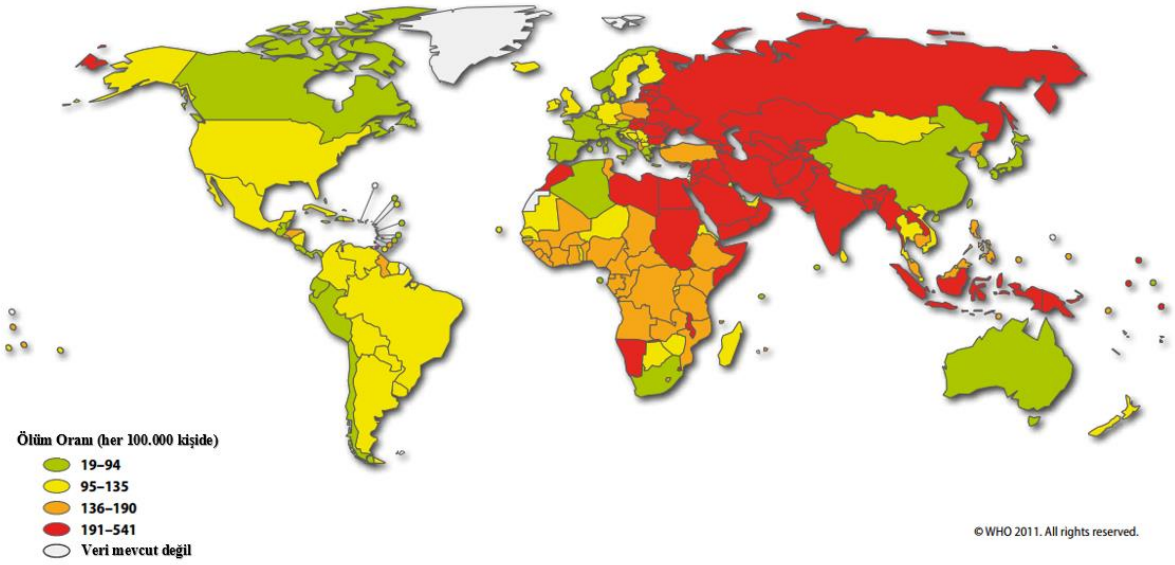



Şekil 1.8. Tam kalp atışının aşamalarını gösteren ve kalp döngüsü sırasında sol ventrikül basıncının ve hacminin değişimi (Yılmaz, 2014)

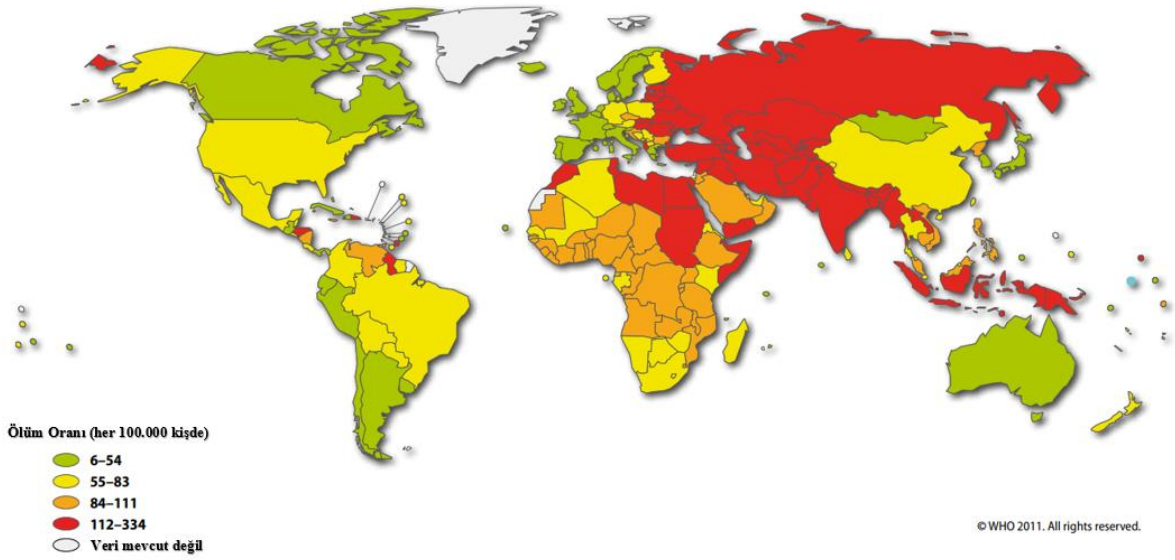
### 1.5. Kalp ve Damar Hastalıkları

2012 yılında kalp ve damar hastalıklarına bağlı olarak yaklaşık 17,5 milyon insanın ölümü gerçekleşmiştir. Bunların 7,4 milyon kalp krizi ve 6,7 milyonu ise inme nedeniyle gerçekleşmiştir. Dünyada kalp ve damar hastalıklarına bağlı ölümlerin %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmektedir (Mendis ve ark., 2011). 2009 yılında, kalp ve damar hastalıklarına 80 milyondan fazla Amerikalı yakalanmıştır. Amerikadaki ölümlerin %36'sı kalp ve damar hastalıkları sonucu olduğu belirlenmiştir. (Arslan, 2013)

Genel olarak kalp krizi olarak bilinen miyokard enfarktüsü dünyadaki mortalite ve morbiditenin ana nedenidir. ABD'de her yıl bir milyondan fazla kişinin ölümünün nedeni miyokard enfarktüsdür. Miyokard enfarktüsün birincil nedeni, genellikle kan pıhtısı nedeniyle kalpteki kan akışının tıkanmasıdır. İskelet ve düz kaslara benzeyen kalp kası hücreleri, düzgün çalışma bilmesi için oksijene ve besine ihtiyaç duymaktadır. Bir tıkanma durumunda, kalbe yeterli oksijen ve besin maddeleri verilemez, bu da kalp hücrelerinin ölmesine neden olur. Bu yüzden hastanın sakat veya ölümü olasılığını önlemek için derhal tedavi edilmelidir. (Yılmaz, 2014). Şekil 1.9 ve 1.10'da erkeklerde ve kadınlarda iskemik kalp hastalığına bağlı oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösterilmiştir.

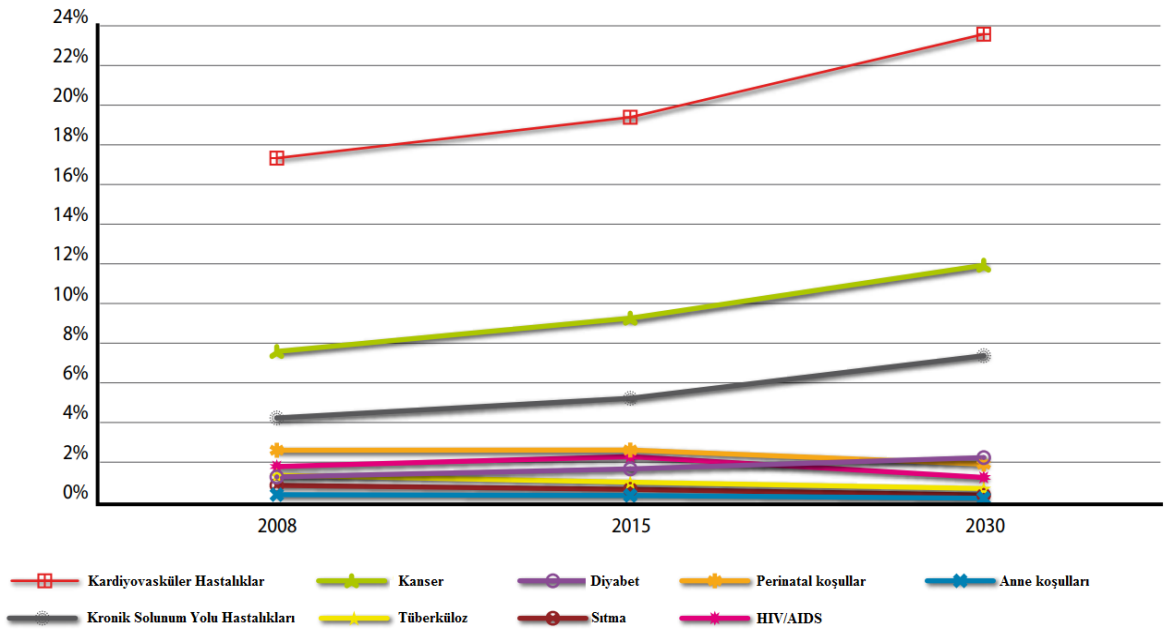



Şekil 1.9. Erkeklerde iskemik kalp hastalığına bağlı oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası (Kalp ve Damar Hastalıkları Üzerine Global Atlas, 2010)




Şekil 1.10. Kadınlarda iskemik kalp hastalığına bağlı oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası (Kalp ve Damar Hastalıkları Üzerine Global Atlas, 2010)

Amerika Birleşik Devletlerin de kardiyovasküler hastalıklar yılda 600.000 kişini ölümüne neden olmaktadır. Buda Amerika Birleşik Devletlerin'lerindeki tüm ölümlerine %25'i oluşturmaktadır. Kardiyovasküler hastalık, yalnızca yaşam kaybına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda çok fazla mali masrafa da neden olur. ABD'de kalp hastalıklarının toplam maliyeti yaklaşık 273 milyar dolardır (Yılmaz, 2014). Dünyada ortalama 23 milyon insanın 2023 yılında kalp ve damar hastalıkları sonucu öleceği düşünülmektedir (Arslan, 2013) (Şekil 1.11).




Şekil 1.11. Dünyada 2008-2030 yılları arasında hastalıklara bağlı tahmin edilen olüm oranları (Kalp ve Damar Hastalıkları Üzerine Global Atlas, 2010)

### 1.6 Kardiyak Doku Mühendisliği

Son dönemlerde kalp yetmezliği ve doğuştan kalp eksikliği gibi birçok hastalık için kalp nakli gereksinimi kaçınılmazdır. Çeşitli cerrahi prosedürler ve farmakolojik terapiler ile birlikte insan ömrü uzatılabilirken kesin bir tedavi sağlamamaktadır. Bu yüzden kalp transplantasyonu etkili bir tedavi yöntemidir ancak bu tedavi yönteminin en büyük sorunu donör organlarının yetersizliğidir. Buna ek olarak organ reddi, immünsüpresif ilaçların kullanımı ve bu tedavinin komplikasyonları da kalp naklinin başta gelen sorunlarındandır.

Artan bu ihtiyacı karşılamak için alternatif bir kalp dokusu kaynağı gerekmektedir (Tee ve ark., 2010). Kardiyak doku mühendisliği kalp ve damar rahatsızlıklarının tedavisinde umut vaad eden bir alandır. Sadece kalp nakline ihtiyacı olan hastalar değil kalp kası, kalp kapakçığı, damar gibi daha küçük yapılar içinde kardiyak doku mühendisliğinin imkanlarından faydalanılmaktadır. 2004 yılında ABD'de ilk kez kalp-akciğer makinesi kullanılarak kalp rahatsızlıkları tedavi edilmiştir. 1969 yılında ise ilk yapay kalp tanıtılmıştır. Ardından 1990'ların ortalarından ise hücre nakli gibi tedavi yöntemlerine başlanmıştır.

Kardiyak doku mühendisliğinin amacı; kalbin hasar görmüş bir bölümünü onarmak veya yenilemektir. Kardiyak doku mühendisliğin de hücreler ile kombine edilmiş iskeleler veya sentetik biyomalzemeler içermektedir. Kullanılan bu biyomalzemeler, hücrelerin hasar gören bölgesine verilebilmesi için bir araç olarak kullanılmaktadır. Hücreler istenilen bölgeye verildikten sonra hücrelerin doku ile bütünleşeceği ve yeni bir miyokard doku oluşturacağı hedeflenmektedir. Biyomalzemeler çok geniş çaplı bir konudur bu yüzden mühendis ve malzeme bilimciler sürekli olarak iskele olarak kullanılabilecek yeni biyomalzemeler araştırmaktadır. Bu zamana kadar kardiyak doku mühendisliği için alginat ve kollajen gibi birçok sentetik ve doğal polimer kullanılmıştır (Jawad ve ark., 2007). Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan iskele doğal kalp dokusunu yansıtmalıdır. Jelatin ve alginat gibi doğal malzemeler daha iyi hücre etkileşimi sebep olurken, kollajen tip I gibi malzemeler memeli HDM benzeri ortamlara en çok benzeyen ve implante edilmiş kardiyomiyositlerin adezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen bir malzemedir (Tee ve ark., 2010).

Kardiyak doku mühendisliğinde miyokardiyal onarım için hücrelerin biyomalzeme ile etkileştirilmesinde faydalı etkilerin görülmesine rağmen, elde edilen polimer preparatları gerekli hücre-matriks etkileşimlerini tam anlamıyla taklit edememiştir (Oberwallner ve ark., 2014). Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan bir diğer yaklaşım hücrelerinden arındırma yöntemidir. (Tee ve ark., 2010). Biyouyumlu, 3 boyutlu hücrelerinden arındırılmış doğal kalp dokusu tedavi için uygun yöntemlerden biridir. Bugüne kadar kalp dokusunu hücrelerinden arındıra bilmek için çeşitli deterjan ve enzim (Triton X-100, tripsin, SDS vb.) başarıyla kullanılmıştır. (Ye ve ark., 2016) Çizelge 1.2'de kardiyak doku mühendisliği yaklaşımlarının avantajları ve dezavantajları gösterilmiştir.

Çizelge 1.2 Kardiyak doku mühendisliği yaklaşımlarının avantajları ve dezavantajları (Curtis ve ark., 2009)

| **Yöntem** | **Klinik Avantajlar** | **Klinik Dezavantajlar** |
|---|---|---|
| Sadece Hücre; Hücrelerin enjeksiyonu | Tasarım yapacak bir yapı yok ve daha az invaziv teslim | Yüksek miktarda hücre kaybı ve zayıf hücre entegrasyonu |
| Hücre+ Malzeme; İstenilen düzende İskeleler | Hücreler için destek ve hücreler ile birlikte düzenli bir şekilde bozunma. | İmplantasyon için cerrahi riskler |
| HDM benzeri jeller | Hücreler ile kolayca birleştirilir | Yavaş vaskülarizasyon ve doğal bileşenler inflamasyon oluşturabilir. |
| Hücreler ve Doku yamaları | Yüksek hücre yoğunluğu ve organizasyonu | Sınırlı vaskülarizasyon ve cerrahi yerleştirmenin zorluğu |
| Sadece biyomalzeme; Enjekte edilebilir | İmmün yanıt oluşturmaz. | Hücreler olmadan yetersiz onarım |

# BÖLÜM 2
# ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Barbara Oberwallnerve ark. (2014) yapmış olduğu çalışmada hücrelerinden arındırındırma işleminin insan kalp kası hücresine etkisini ve hücre ekimi için iskele olarak kullanma yeteneğini test etmişlerdir. İnsan kalp kası dokusu hücrelerinden arındırma işlemi için farklı yöntemler denenmiştir. Bu yöntemler; %0,5 Sodium Dodecyl sulfate (SDS) 9 saat, %5 Triton X-100, hipotonik ve hipertonik çözelti 3 gün, %5 sodyum deoksikolat 40 saat ve 3 adım protokolü. (liziz tamponunda 2 saat inkübasyon, ardından 6 saat %0,5 SDS PBS içerisinde ve son olarak FBS ile 3 saat 37 Cº'de inkübe edilmiştir). Tüm yöntemler için GAG, elastin ve kollejen miktar tayini analizi yapılmıştır ve analiz sonuçlarına göre en çok GAG, elastin ve kollejen 3 adım protokolü ile elde edilmiştir. Hücrelerinden arındırma işlemi içinde en efektif olan 3 adım protokolü olmuştur ve %98 oranında hücrelerinden arındırılmıştır. 3 adım protokolü ile elde edilen iskeleler üzerine mezankimal kök hücreler ekilmiştir ve kök hücreler tutunarak çoğalmıştır. Bu çalışma sonucunda insan kalp kası HDM'in hücre-matriks etkileşimi çalışmaları için uygun olabileceği ve doku mühendisliği için bir biyomalzeme olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Eirini Pagoulatou ark. (2012) yapmış olduğu çalışmada deselülerize sığır perikardiyum dokusunun biyokimyasal ve biyomekanik değişiklikleri incelenmiştir. 2 farklı deselülerizasyon yöntemi uygulanmıştır. İlk yöntemde %1 Triton X-100, %0,1 SDS, 150 mM NaCI ve %1 deoksikolik asit 10mM tris solüsyonu içerisinde 4 ºC de 12 saat, ikinci yöntemde ise RNAaz (20 µg/ml) ve DNAaz (0,2 mg/ml) içeren tripsin/EDTA hipotonik tris tamponu çözeltisi 37 Cº 'de 48 saat muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ilk yöntem ile perikarduyum dokusu başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırılmıştır ve mekanik özellilerinin minumum düzeyde değişiklik olmuştur. İkinci yöntemde ise uzun süre deselülerize olması nedeniyle biyomekanik özellikleri azalmıştır. Deterjan yöntemi ile muamele edilen sığır perikardiyumun biyokimyasal bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak ikinci yöntemde ise önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. Her iki protokolde de hücre dostu bir biyomateryal elde edilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış sığır perikardiyum'un hücre farklılaşmasını arttırma ve doku oluşumuna yönelik işlevini incelemek için araştırmalar sürmektedir.

Kazunori Shimizu ark. (2007) yapmış olduğu çalışmada manyetik nanopartiküllerin kullanımı ile etkili hücre tohumlama tekniği ve hücrelerinden arındırılmış kan damarları için manyetik güç kazandırılması hedeflenmiştir. 3 boyutlu vasküler greftlerin boru şeklinde bir geometrisi olduğu için hücrelerin etkili bir biçimde ekilmesini engellemektedir. Yapılan çalışmada bu engellerden kurtulmak için manyetik kuvvet ve manyetik nanoparçaçıklar kullanılarak yeni bir hücre tohumlama tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğe Mag-ekimi denilmektedir. Çalışmada hücrelerinden arındırılmış domuz karotis arteri iskele olarak kullanılmıştur. Silindirik bir mıknatıs hücrelerinden arındırılmış domuz karotis arterinin lümenine sokulmuştur ve manyetik olarak etkilenmiş NIH/3T3 fibroblast (3T3s)'lı bir süspansiyona batırılmıştır. Hemen hemen tüm 3T3'ler hücrelerinden arındırılmış domuz karotis arterine tutunmuştur. Ancak buna karşın mıknatıs kullanılmadan yapılan deneyde hücrelerinden arındırılmış domuz karotis arterine düşük bir hücre tutunması gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar Mag-ekiminin vasküler doku mühendisliği için kullanılabileceğini göstermiştir.

Alexander Weymann ve ark. (2011) yapmış olduğu çalışmanın amacı perfüzyon yöntemi ile tüm domuz kalp dokusunun hücrelerinden arındırılmasıdır. Bu çalışmada langendorf perfüzyon hücrelerinden arındırma modeli modifiye edilerek domuz kalbi hücrelerinden arındırılması hedeflenmiştir. Hücrelerinden arındırma işlemi için domuz kalbi 100mmHg'lik sabit bir perfüzyon basıncı altında 12 saat %4 SDS'li (2.0L/dk 37 ° C'de) solüsyon ile muamele edilmiştir. Ardından 24 saat PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerinden arındırma işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Perfüzyon yöntemi ile doğal kardiyak içindeki taşıma koşullarına taklit edilmiştir ve 3 boyutlu yapı korunmuştur. Bu ortaya çıkan 3 boyutlu matriks bütün kalp dokusu mühendisliği alanında daha ileri çalışmalar için bir biyomalzeme sağlamaktadır.

Isaac Perea-Gil ve ark. (2015) yapmış olduğu çalışmada domuz kalp kası için 2 farklı hücrelerinden arındırma prosedürü denenmiştir ve in vitro ortamda karşılaştırılmıştır. İlk prosedür domuz kalp kası 72 saat %1SDS'li çözelti konulmuştur ardından 48 saat %1 Triton X-100 çözeltisi içerisine konulmuştur. Daha sonra 24 saat PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72 saat 0.1mg/ml DNAz 1 içeren çözelti içerisine konulmuştur ve 72 saatin sonunda 6 saat ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilerek -80°C'de saklanmıştır. İkinci prosedür de ise domuz kalp kasları ilk olarak 2'er saat hipotonik ve

hipertonik çözelti içerisine konulmuştur. Ardından 48 saat 37°C'de %0.05 tripsin ve %0.02 EDTA çözeltisinin içerisine konulmuştur. Daha sonra 96 saat %1 Triton X-100 ve %1 Amonyum hidroksit içeren çözelti içerisine konulmuştur ve 96 saatin sonunda deterjandan iyice arınana kadar ultra saf su ile yıkanarak -80°C'de saklanmıştır. Her iki prosedür için de başarılı bir şekilde doğal HDM özelliklerine sahip hücresiz iskeleler elde edilmiştir. İskeleler üzerine adipoz kaynaklı progenitör hücreler ekilmiştir. İlk prosedür ile elde edilen hücrelerinden arındırılmış iskeleler biyolojik olarak parçalanabilir ve birim yüzey alanı başına daha fazla adipoz kaynaklı progenitör hücre tutunmuştur. Bu sebeplerden dolayı ilk prosedür hücrelerinden arındırılmış bir iskele elde etmek için optimal bir protokoldür.

Jennifer M. Singelyn ark. (2009) yapmış olduğu çalışmada hücrelerinden arındırılan domuz kalp kası iskelesi enjekte edilebilir bir forma dönüştürülmüştür. Domuz kalp kası hücrelerinden arındırma işlemi için 4-5 gün %1 SDS içeren çözelti içerisine ardından %1 Triton X-100 içeren çözelti içerisine konulmuştur. Daha sonra deterjandan arındırılana kadar ultra saf su ile yıkanmıştır. Hücrelerinden arındırılan iskele hidrojel formuna dönüştürülebilmesi için 48 saat pepsin çözeltisiyle muamele edilmiştir ve elde edilen jelin karakterizasyonları yapılmıştır. Bu çalışma doğal miyokardiyal HDM'i taklit etmek üzere özel olarak tasarlanmış enjekte edilebilir bir biyomalzeme oluşturulmuştur. Çalışmanın sonuçları hücrelerinden arındırılmış domuz kalp kasının miyokardiyal doku mühendisliği için enjekte edilebilir bir jel haline getirilebildiğini göstermektedir.

Pravin D. Potdar ve Preeti Prasannan (2013) yapmış olduğu çalışmada insan derisi mezankimal kök hücreler izole edilerek karakterize edilmiştir. İzole edilen insan derisi mezankimal kök hücrelerin kök hücre olduğunu isptalamak için çoklu soy farklılaşma çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmada 5-Azasitidinin kullanılarak elde edilen bu kök hücreler in vitro olarak kardiyomiyositlere farklılaştırılmıştır. İnsan derisi mezankimal kök hücreler 10 uM ve 20uM 5-Azasitidinin ile muameleden sonra 4 gün ile 15 gün arasında kardiyomiyositlere farklılaştığı gözlemlenmiştir. Kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştığını, α-kardiyak aktin, β-miyozin ağır zinciri ve kardiyak troponin T ekspresyonunu inceleyerek kanıtlanmıştır.

Xiaofeng Ye ve ark. (2016) yapmış olduğu çalışmada yaygın olarak kullanılan hücrelerinden arındırma reaktiflerinin domuz miyokardı üzerine yapısal etkisine bakmışlardır. Tripsin,

Triton X-100 ve SDS ile domuz miyokardını hücrelerinden arındırmışlardır. Ardından dokunun morfolojik özelliklerini SEM, AFM ve iki fotonlu LSM ile analiz etmişlerdir. Ayrıca hücrelerinden arındırılan iskeleler sıçan miyokard fibroblastları ve kardiyomiyositler ile tekrardan hücrelendirilmiştir. DNA içerik analizine göre, SDS diğer iki reaktifle karşılaştırıldığında daha etkili bir şekilde hücrelerinden arındırmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların aksine SDS hücrelerinden arındırılan domuz kalp dokusunun biyouyumlu mikroyapısını koruduğu gözlemlenmiştir.

# BÖLÜM 3
# MATERYAL VE METOT

## 3.1. Materyal

### 3.1.1. Deneylerde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Sığır kaynaklı kalp kası dokusu, kesimhanede ticari amaçlarla kesimi yapılan sığırların, kalbi eksize edilerek çıkartılmıştır. Ardından daha küçük parçalara ayrılmıştır ve kas dokusu laboratuvara transfer edilmiştir. Kalp kası dokusunun hücrelerinden arındırma işlemi ve karakterizasyonu için kullanılan kimyasalların tamamı Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Kalp kası dokusu ve hücrelerinden arındırılan kalp kası dokusunun diyalizi için tubing selüloz membran (MWCO: 14000Da, Sigma Aldrich, D9527) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerinden arındırılan kalp kası dokusunun Pepsin (Sigma Aldrich, Almanya, 600-1200 U/mg) kullanılarak sindirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kalp kası dokusunun ve hücrelerinden arındırılan kalp kası dokusunun DNA içeriği satın alınan kit (Thermo Scientioc, GeneJET) ile belirlenmiştir. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve Kalp kası dokusunda bulunan toplam Hidroksiprolin miktarın satın alınan hidroksiprolin deney kiti ile belirlenmiştir (Sigma-Aldrich, Almanya). Üretilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmlerinin çapraz bağlama işlemi N-hidroksi süksinimit (NHS) (Sigma Aldrich) ve N-etil-N′-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit hidroklorür (EDC) (Merck) gibi kimyasallar kullanılarak yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan iAMKH'ler (Merck-Millipore, lot no: QVP1303200) yurt dışından temin edilmiştir. Temin edilen kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için adipogenezis (Gibco, A10064-01), kondrogenezis (Gibco, A10064-01) ve osteogenezis (Gibco, A10066-01) kitleri kullanılarak yapılmıştır. Adipojenik farklılaşmanın histokimyasal karakterizasyonu için Oil Red O (Sigma Aldrich, A0625) boyası kullanılmıştır. Osteojenik farklılaşmanın histokimyasal karakterizasyonu için Alizarin Red S (Sigma Aldrich, A5533) boyası kullanılmıştır. Kondrojenik histokimyasal karakterizasyonu için Safranin O (Sigma Aldrich, S8884) ve Alcian Blue 8gx (Sigma Aldrich, A3157) boyaları kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında steril doku kültür kapları (Corning, NY, ABD) ve özel bir besiyeri olarak (Merck-Millipore Human Mesenchymal –LS Supplemnet Kit, Lot: 2395792) kullanılmıştır. Kök hücreleri pasajlama işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma Aldrich,

Almanya) kullanılmıştır. Filmler üzerindeki hücrelerin çoğalma ve canlılık düzeyleri MTT test kiti (Sigma Aldrich) ile belirlenmiştir.

Deneylerde kullanılan saf su (Tip I ve Tip III) Merck-Millipore marka Milli Q model saf su sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Deneylerde gerekli karıştırma işlemleri çoklu karıştırıcı Jeio Tech (Kore) kullanılarak yapılmıştır. Deneylerde kullanılan çözeltilerin ve tamponların pH ölçümleri Mettler Toledo (ABD) marka pH metre ile yapılmıştır. Deneylerin santrifüj aşamaları Hettich EBA 20 ve Mikro 120 (Almanya) kullanılarak yapılmıştır. DNA, GAG ve Hidroksiprolin içerik analizi Shimadzu UVmini-1240 (Japonya) spektrofotometre kullanılarak tayin edilmiştir. Hücrelerinden arındırılan filmlerin kuru bir form haline gelebilmesi için liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan liyofilizatör Telstar marka LtoQuest modelidir. Belirli bir sıcaklıkta yapılan deneylerde Jeiotech marka blok ısıtıcı kullanılmıştır. Deneyler için gerekli tartımlar Mettler Toledo marka hassas terazide yapılmıştır. SDS-PAGE analizi için Thermo (Owl P8DS, USA) marka jel sistemi kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez analizi için Thermo (Owl EASYCAST B1, USA) marka jel sistemi kullanılmıştır. Elde edilen jeller Biorad marka (Gel Doc XR+, Dubai) görüntüleri alınmıştır. Üretilen malzemeler derin dondurucuda (-86 °C, Panasonic, Japonya) muhafaza edilmiştir. FTIR analizi için Shimadzu IRAffinity-1 (Japonya), TGA analizi için Shimadzu DTA60 cihazı kullanılmıştır. Filmler üzerine ekilen kök hücrelerin proliferasyonu ve canlılık oranları mikro plaka okuyucu (Thermo-Scientific, Multiskan™ with mdrop™ plate) kullanılarak ölçülmüştür. Hücre kültürü çalışmalarının tümü Class II A-2 laminar akışlı kabinde (Panasonic, MCO-18AC-PE, Japonya) gerçekleştirilmiştir. Kök hücreler inkübatörde (Telstar Bio II Advance) kültüre edilmiştir ve invert mikroskop (Primo-Vert Carl Zeiss, Almanya) ile hücre çoğalması görüntülenmiştir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Kalp Kası Dokusunu Temini ve Hücrelerinden Arındırma İşlemi

Kesimhanede ticari amaçlarla kesimi yapılan sığırların, kalbi çıkartılarak daha küçük parçalara ayrılmıştır ve kas dokusu alınmıştır. Kalbin kas dokusu ultra saf su ile yıkandıktan ve tampondan geçirildikten sonra porsiyonlanarak -86 ºC’ de saklanmıştır. Kas dokusu ufak

parçalar haline getirildikten sonra 4 farklı yöntem ile hücrelerinden arındırma işlemi denenmiştir.

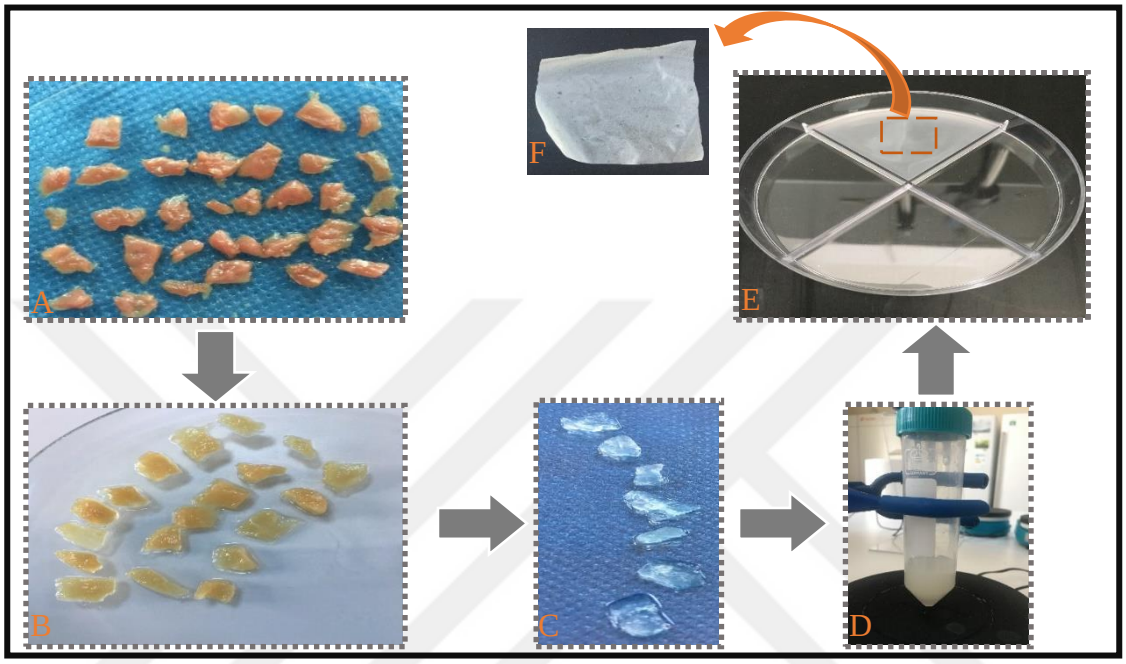
1. Yöntem; 48 saat boyunca hipotonik (10mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Sonrasında ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan dokular 72 saat boyunca %1,5 TNBF içeren hipertonik (50mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Hipertonik ortam sonrası ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan dokular liyofilizasyona hazır hale getirilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize halde bulanan dokular -26ºC saklanmıştır.

2. Yöntem; 48 saat boyunca hipotonik (10mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Sonrasında ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan dokular 72 saat boyunca %1 Triton X-100 içeren hipertonik (50mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Hipertonik ortam sonrası ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan dokular liyofilizasyona hazır hale getirilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize halde bulanan dokular -26ºC saklanmıştır.

3. Yöntem; 48 saat boyunca hipotonik (10mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Sonrasında ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan dokular 72 saat boyunca %0,5 SDS içeren hipertonik (50mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Hipertonik ortam sonrası ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında 5 saat Dekontaminasyon (%4 ethanol ve %0,1 perasidik asit) işlemi gerçekleştirlmiştir. Dekontaminasyon işleminin ardından ultra saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan dokular liyofilizasyona hazır hale getirilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize halde bulanan dokular -26ºC saklanmıştır.

4. Yöntem; 48 saat boyunca hipotonik (10mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Sonrasında ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan dokular 72 saat boyunca %1 SDS içeren hipertonik (50mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00) ortama maruz bırakılmıştır. Hipertonik ortam sonrası ultra saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından 24 saat boyunca 37 ºC'de DNaz ve RNaz (10Mm MgCl, 50Mm Trizma) içeren çözelti ile muamele edilmiştir. Daha sonra ultra saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında 5 saat Dekontaminasyon (%4 ethanol ve %0,1 perasidik asit) işlemi gerçekleştirlmiştir. Dekontaminasyon işleminin ardından ultra saf su ile

yıkanmıştır. Yıkanan dokular liyofilizasyona hazır hale getirilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize halde bulanan dokular -26ºC saklanmıştır (Şekil 3.1).




Şekil 3.1. Hücrelerinden arındırma ve film prosedürü fotoğraflı gösterimi. Kalp kası dokusu ham hali (A). 48 saat hipotonik sonrası kalp kası dokusu (B). 48 saat hipertonik ortam sonrası (C). Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunun pepsinle sindirimi (D). 72 saat Pepsin ile muamele edilmiş hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunun petri kabına dökülmesi (E). Elde edilen film (F)

### 3.2.2. DNA İçerik Analizi

Liyofilize halde bulanan kalp kası dokusuna ve hücrelerinden arındırılmış liyofilize kalp kası dokusuna DNA içerik analizi yapılmıştır. DNA içerik analizi için ticari olarak satın alınan kit (Thermo Scientioc, GeneJET) talimatları uygulanmıştır ve dokudan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Talimatlara göre 260nm ve 320nm'deki absorpsiyonlar spektrofotometre ile ölçülmüştür (Shimadzu UV mini-1240 UV-Vis Spectrophotometer, Japan). Hesaplamalar aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{DNA kons. } (\mu g\ ml^{-1}) = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times (10mm \text{ per } 0.51\ mm)$$

### 3.2.3. GAG İçerik Analizi

4. yöntem ile elde edilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusunda bulunan glikozaminoglikan (GAG) miktarı Erten ve ark. (2016) tarafından daha önceden belirlenen yöntem ile tespit edilmiştir. İki numunede papain çözeltisi içerisine konulmuştur ve blok ısıtıcı (Jeiotech, Korea) içerisinde 24 saat 65°C'lik sıcaklıkta sindirimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra papain reaktifi 100°C'de 15 dakika deaktive edilmiştir. Ardından ekstraktlar 1,9-dimetilmetilen mavisi boya reaktifi ile muamele edilmiştir. Hemen ardından 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü gerçekleştirilmiştir (Shimadzu UV mini-1240 UV-Vis Spectrophotometer, Japan). GAG içeriği aşağıda verileen denkleme göre hesaplanmıştır. (Erten ve ark., 2016)

GAG kuru ağırlık (µg/mg): [($OD_{525}$/eğim) x (seyreltme faktörü x toplam hacim)]/kas dokusu ağırlığı (mg)

### 3.2.4. Hidroksiprolin içerik analizi

4. yöntem ile elde edilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusunda bulunan toplam Hidroksiprolin miktarı ticari olarak satın alınan hidroksiprolin deney kiti kullanılarak belirlenmiştir (Sigma-Aldrich, Almanya). Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusu 5 mg tartılarak, 100 µl 12 M HCI ve 100 µl ultra saf su içerisinde 120°C'de 3 saat hidrolize edilmiştir. Hidroliz edildikten sonra kömür haline gelen partiküllerin uzaklaştırılması için 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Numuneler hazır hale geldiğinde hidroksiprolin kiti uygulanmıştır. 96 kuyucuklu plakaya 2 µl numune konularak 60°C'lik etüvde kurutulmuştur. Hidroksiprolin miktarının net olarak belirlenebilmesi için spike kullanılmıştır. Devamında kloramin T/ oksidasyon tampon karışımı ve 4-(Dimetilamino)benzaldehit eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda ölçümü alınmıştır. Hidroksiprolin konsantrasyonu aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır;

Hidroksiprolin miktarı: (A560)numune/(A560)spike kontrol-(A560)numune* 0,4(µg)

### 3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi Analizi

Proteinlerin moleküler büyüklüğünü belirlemek ve proteinlere ait karakteristik bantları göstermek için Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) analizi yapılmıştır. SDS-PAGE analizi yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan Laemmli (1970) metodunun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre 4. yöntem ile elde edilen hücrelerinden arındırılan kalp kası dokusu, kalp kası dokusu, BSA ve sıçan kuyruğu tip 1 kollajeni için %12'lik ayrıştırıcı jel ve %4'lük yükleme jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlamak için gereken çözeltiler ve prosedür Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. BSA konsantrasyonu 0,2mg/ml olacak şekilde ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Sıçan kuyruğu tip 1 kollajen ise 10mg/ml oranında 0,1M asedik asit içerisinde hazırlanmıştır. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusu konsantrasyonu 10mg/ml HCI olacak şekilde 1,5 mg pepsin ile 3 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. 3 günün sonunda protein çözeltisi hafif jelleştiğinden 40 ℃ su banyosunda kısa bir süre ısıtılmıştır. Ardından çözünmeyen partiküller için süzme işlemi yapılarak 3400'g de 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pepsin inhibisyonu için süpernatantlar toplanıp 0.02 M Sodium fosfat dibazik (Na2HPO4, pH: 8,8) tamponu içerisinde 4℃'de 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminin ardından çöken proteinlerden kurtulmak için çözelti 10,000 g'de 2dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen supernatantlar dondurularak liyofilize edilmiştir. Liyofilize olmuş proteinler ultra saf su içerisinde konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

Numuneler hazırlandıktan sonra jel tankı düzgün ve düz bir şekilde hazırlanmıştır. Jelin kalınlığını belirleyen açıklıktan ayırma jeli eklenmiştir ve üzerine jelin polimerleşmesi için %99,9 oranında izopropil alkol ilave edilerek 1 saat beklenmiştir. 1 saat sonunda yükleme jeli hazırlanmıştır ve tarak kuyucuk açmak için jele yerleştirilerek 30 dakika jelin donması için beklenmiştir. Jel kuruduktan sonra jel içeren sistem ve dikey tanka alınmıştır. Dikey tankın içi yürütme tamponu ile doldurulmuştur ve bir süre bekleyip jel iyice ıslandıktan sonra nazikçe tarak çıkartılmıştır. Proteinler yüklenmeden önce numune tamponu ile 1:1 oranında seyreltilmiş ve iyice vortekslendikten sonra blok ısıtıcıda 100 ℃'ta 5 dk. süreyle denatüre edilmiştir. Ardından kuyucuklara 5'er µl numuneler yüklenmiştir. Ardından cihaz çalıştırılarak 10℃'de 300v-15mA'de 120dakika yürütülmüştür. 120 dakikanın sonunda jel çıkartılarak

çeşme suyunda yıkanmıştır ve Commasie Blue (%0,025 Coomassie Brillant Blue R250, %40 v/v metanol, %7 asetik asit) ile boyama prosedürüne geçilmiştir. Jel 1 saat boya ile boyanmıştır. 1 saat sonunda fazla boyadan kurtulmak için boya uzaklaştırma 1 çözeltisinde (%40 (v/v) metanol ve %7 (v/v) asetik asit) 30 dakika bekletilmiştir. Ardından bantları iyice belirgin hale getirmek için boya uzaklaştırma 2 çözeltisinde (%5 (v/v) metanol ve %7 (v/v) asetik asit) bir süre bekletilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen jelin görüntüsü Biorad görüntüleme cihazı (Gel Doc XR+, Dubai) alınmıştır.

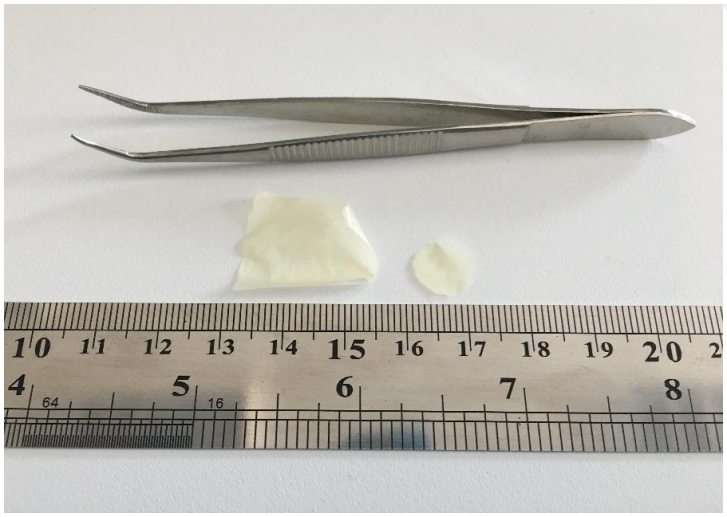
Çizelge 3.1. SDS-PAGE jel hazırlama prosedürü ve kullanılan çözeltiler

| **Kullanılan Çözeltiler** | **%12'lik 10ml yürütme jeli** |
|---|---|
| Akrilamid çözeltisi (%30 (w/v) ve akrilamid ve %0,8 (w/v) bisakrilamid suda çözünmüştür.) | 4 ml |
| 4x ayırma jeli tamponu (1.5 M Tris-hidroklorür (Tris-HCI) suda çözünmüştür. (pH: 8.8) | 2,5 ml |
| %10 SDS (%10 (w/v) SDS suda çözünmüştür) | 0,1 ml |
| Ultra Saf su | 3,35 ml |
| Amonyum per sülfat (APS) (%10 (w/v) Amonyum per sülfat suda çözünüştür) | 50µl |
| TEMED (Ticarı olarak satın alınmıştır.) | 3,3 µl |
| **%4 lük 10ml yükleme jeli** | |
| Akrilamid çözeltisi | 1,33 ml |
| %10 SDS | 0,1 ml |
| Ultra saf su | 6 ml |
| 4x yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris-CI suda çözünmüştür (pH:6.8) | 2,5 ml |
| APS | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |
| **Diğer Çözeltiler** | |
| **Elektroforez tamponu** (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS suda çözülmüştür. (pH: 8.3) | |
| **2x numune hazırlama tamponu** (0,125 M Tris-HCI, %4 SDS %20 (v/v) gliserol, 0,2 M 2-merkaptoethanol, %0,02 (w/v) bromofenol blue suda çözülmüştür. (pH:6.8) | |
| **Ayırma jeli overlay** (0,375M Tris-HCI, %0,1 SDS suda çözülmüştür pH 8.8) | |

### 3.2.6. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunun film haline getirilmesi

Bir gram liyofilize halde bulunan hücrelerinden arındırılmış kas dokusu HDM için 100 mg pepsin ve 100 ml 0,01 N HCI içeren çözelti hazırlanmıştır ve 3 gün boyunca oda sıcaklığında döndürülmüştür. 3 gün sonrasında gazlı bezle ile süzülüp çözülmeyen partiküller uzaklaştırılmıştır. Çözelti içerisine toplam çözelti hacminin 1/10 kadar 0.1 N NaOH ve 1/9 kadar 10X PBS (2,70 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$, 0.485 gram $NaH_2PO4.2H_2O$ ve 9 gram NaCI 100

ml ultra saf su içerisinde pH: 7.4) eklenmiştir. Her bir petri kabına 3'er ml çözeltiden konulmuştur ve 37 ºC'de 2 saat inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda +4 ºC'de 3 gün bekletilmiştir. Ardından oluşan filmler oda sıcaklığında saklanmıştır. Filmlerin sağlamlıklarını arttırmak amacıyla N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorür (EDC) ve N-hdiroksisüksinimit (NHS) gibi kimyasalları kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi Buttafoco ve ark. (2006) tarafından yapılan prosödürün modifiye edilmesiyle yapılmıştır. Öncelikle filmler 30 dakika %100 ethanol içerisine konulmuştur. Çapraz bağlama çözeltisi her bir 1 gram film için 2,3 gram EDC ve 0,56 gram NHS 215 ml MES (0,05 M MES %70 ethanol içerisinde pH:5.5) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Tüm çözeltileri hazırlandıktan sonra filmler üzerindeki alkol uzaklaştırılarak çapraz bağlayıcı çözeltisi konulmuştur ve 5 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. 5 saat sonunda filmler çapraz bağlayıcıdan arındırmak amacıyla ultra saf suda 24 saat boyunca yıkanmıştır. Yıkama işlemi ardından filmler dondurularak liyofilize edilmiştir (Şekil 3.2).




Şekil 3.2 Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmi

### 3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agarozun konsantrasyonuna göre DNA parçası jel içinde farklı hızlarda hareket edebilmektedir. Agaroz bir alg türünden elde edilir. Jel elektroforez tanponuna koyulmuş agarozun yüksek sıcaklıkta çözündürülmesi ile hazırlanır. Kaynatılmış agaroz çözeltisi 50ºC'de kadar soğutularak jel tepsilerine dökülür. Ayrımı yapılacak örnek taraklarla

oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir ve elektriksel alanda yürütülerek DNA fragmentlerinin ayrımı yapılır. Agaroz jel elektroforezi için Tris-Borik asit EDTA tamponu (TBE tamponu) (1X) (pH:8.3) hazırlanmıştır. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. TBE Tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar

| **Tris-Borik asit EDTA tamponu (TBE tamponu) (1X) (pH:8.3)** | |
|---|---|
| Tris 10,8 gram | $Na_2EDTA$ 0,94 gram |
| Borik asit 5,5 gram | Ultra saf su 1000 mL |

60 mL %1,5'luk agaroz jel hazırlanmıştır (24 gr agaroz 60ml TBE tamponu içinde hazırlanmıştır). Hazırlanan agaroz jel hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulur. Mikrodalga fırın agaroz jel kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılır. Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürülmüştür. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılır. Ardından 60 ml agaroz çözeltisi için 3 µL Red safe (Intrın Biotechnology) eklenmiştir ve çözelti jel tankına dökülerek üstüne tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon için 1 ile 1,5 saat arasında oda sıcaklığında beklenmiştir ve Çizelge 3.3 'e göre örnek yükleme tamponu hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Örnek yükleme tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar

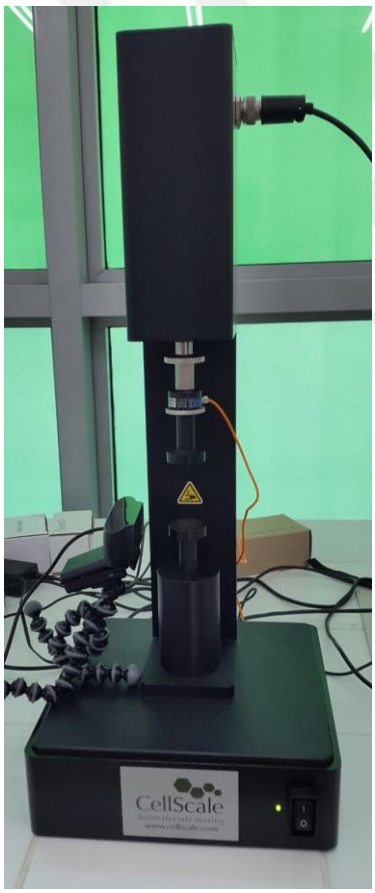
| **Örnek Yükleme Tamponu** | |
|---|---|
| Bromfenol Mavisi 250 mg | Sükroz 40 gram |
| -- | Ultra saf su 100 mL |

Ardından jel tanka yerleştirilmiştir ve jelin üstünü kapatacak kadar TBE tamponu konulmuştur. İki parça parafilm alınır ve üstüne ayrı ayrı 10µl hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve ham doku, 2µl örnek yükleme tamponundan koyularak karıştırılmıştır. Ardından jele yüklenmiştir. İlk kuyucuğa marker konulmuştur ve 2 saat 90 volt 400mA'de

yürütülmüştür. 2 saatin sonunda elde ettiğimiz jel Biorad görüntüleme cihazı (Gel Doc XR+, Dubai) ile görüntülenmiştir.

### 3.2.8. Mikro-Mekanik Test

Çapraz bağlı hücresiz filmleririn mekaniksel dayanımı mikro-mekanik test cihazıyla (CellScale biomaterials testing, Kanada) belirlenmiştir (Şekil 3.3). Mikro mekanik test için filmlerin boyutu 1x1 $cm^2$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Filmlerin tutturulduğu iki prob arasındaki mesafe 10 mm'dir.




Şekil 3.3. Mikro-Mekanik Test Cihazı

### 3.2.9. Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Farklılaşma Testlerinin Yapılması

İnsan adipoz mezankimal kök hücreler (Lot numarası: QVP1303200, USA) -196 °C'de dondurulmuş halde aracı firma tarafından hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. İçerisinde 1.000.000 hücre içeren vial 37°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konulmuştur ve içerisinde ufak bir buz kristali kalana kadar su banyosu içerisinde tutulmuştur. Ardından vial laminer kabin içerisine alınmıştır. Vial içerisindeki sıvı önceden hazırlanan kök hücre çoğaltma vasatı (rhFGF-b (5 ng/ml), Askorbik Asit (50 µg/ml), L-Glutamin (7,5 mM), hidrokortizon hemisüksinat (1.0 µg/ml), rh İnsülin (5 µg/ml) ve Fötal Sığır Serumu (%2)) içerisine yavaşça konulmuştur ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası çöken hücre pelleti T75 doku kültürü kaplarına ekilmiştir. Arından T75 37°C sıcaklık %5 $CO_2$ ve %80-90 bağıl nem sağlayan bir inkübatöre konulmuştur. Doku kültürü kapları içerisinde bulunan vasat her 2-3 gün de bir yenilenmiştir. Yeterli bolluğa ulaşan hücreler PBS içerisinde hazırlanmış %0,25 Tripsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi ile doku kültürü plastiğine yapışmış kök hücreleri besi yerine geçmesi sağlanmıştır. Kök hücreleri kaldırma işleminin ardından hücreler pasajlanmıştır. (P5-P6) Kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma kapasitelerini belirlemek için adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.9.1. Adipojenik Farklılaşma

T75'de bulunan kök hücreler %80 doluluğa ulaşınca PBS içerisinde hazırlanmış %0,25 Tripsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi ile kök hücreler kaldırılmıştır. Ardından 6-kuyucklu doku kültürü kaplarına 100.000 hücre/$cm^2$ kök hücre ekilerek inkübatöre alınmıştır. 24 saat beklendikten sonra kök hücre çoğaltma vasatı yerine adipogenez indüksiyon vasatı konularak indüksiyon yapılmıştır. İndüksiyon 2-3 günde bir tekrarlamıştır. 14 güne gelindiğinde histolojik değerlendirme için hücreler steril PBS ile yıkanmıştır ve %4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 30 dk. fikse edilmiştir. Ardından fiksatifden tamamen kurtulmak için ultra saf su ile birkaç tur yıkanmıştır. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında 5dk %60'lık izopropil alkol ile yıkanmıştır. 5dk sonunda üzerine doku kültürü plastiğini tamamen kapatacak şekilde Oil Red O çözeltisi eklenmiştir. Boyama oda sıcaklığında 10 dk. yapılmıştır. Ardından boya atılarak ve

ultra saf su ile 4-5 tur yıkanmıştır. Boyanan hücreler görüntülemek için invert faz-kontrast mikroskobu kullanılmıştır.

#### 3.2.9.2. Osteojenik Farklılaşma

T75'de bulunan kök hücreler %80 doluluğa ulaşınca PBS içerisinde hazırlanmış %0,25 Tripsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi ile kök hücreler kaldırılmıştır. Ardından 6-kuyucuklu doku kültürü kaplarına 100.000 hücre/$cm^2$ kök hücre ekilerek inkübatöre alınmıştır. 24 saat beklendikten sonra kök hücre çoğaltma vasatı yerine osteogenez indüksiyon vasatı konularak indüksiyon yapılmıştır. İndüksiyon 2-3 günde bir tekrarlamıştır. 21 güne gelindiğinde histolojik değerlendirme için hücreler steril PBS ile yıkanmıştır ve %4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 30 dk. fikse edilmiştir. Ardından fiksatifden tamamen kurtulmak için ultra saf su ile birkaç tur yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından hücreler ultra saf su içerisinde hazırlanmış %2'lik Alizarin Red S ile 30 dk. oda sıcaklığında boyanmıştır. Ardından boya atılmıştır ve ultra saf su ile 4-5 tur yıkanmıştır. Boyanan hücreler görüntülemek için invert faz-kontrast mikroskobu kullanılmıştır.

#### 3.2.9.3. Kondrojenik Farklılaşma

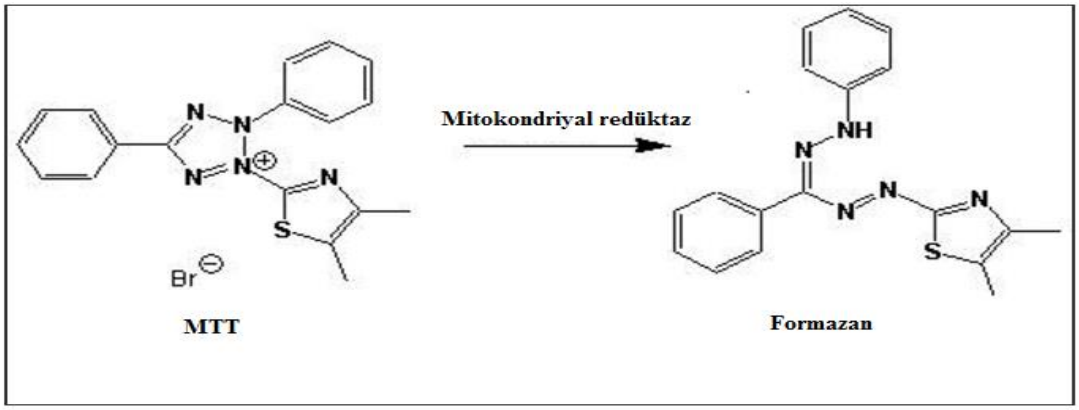
T75'de bulunan kök hücreler %80 doluluğa ulaşınca PBS içerisinde hazırlanmış %0,25 Tripsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi ile kök hücreler kaldırılmıştır. Ardından 6-kuyucklu doku kültürü kaplarına 100.000 hücre/$cm^2$ kök hücre ekilerek inkübatöre alınmıştır. 24 saat beklendikten sonra kök hücre çoğaltma vasatı yerine kondrogenez indüksiyon vasatı konularak indüksiyon yapılmıştır. İndüksiyon 2-3 günde bir tekrarlamıştır. 28 güne gelindiğinde histolojik değerlendirme için doku kültürü plastiğinde oluşan pellet steril PBS ile yıkanmıştır ve %4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 30 dk. fikse edilmiştir. Ardından fiksatifden tamamen kurtulmak için ultra saf su ile birkaç tur yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından pellet sırasıyla %50, %70, %80, %90, %100'lük etil alkollerden geçirilerek parafine gömme işlemi yapılmıştır. Kesitler mikatom ile alınmıştır ve hidrate edilmiştir. Hidrate edilen slaytlar Safranin o ve Alcian Blue 8gx ile boyanmıştır. Ardından boya atılmıştır ve ultra saf su ile 4-5 tur yıkanmıştır. Boyanan hücreler görüntülemek için ışık mikroskobu kullanılmıştır.

### 3.2.10. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmlerin üzerine hücre ekilmesi

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmleri laminer akışlı kabin içerisine alınmıştır ve UV ışık altında 70 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından filmler 48 kuyucuklu kültür kaplarına konulmuştur. P6 kadar pasajlanmış kök hücreler 75.000 hücre/film olacak şekilde film üzerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreli filmler üzerine %10 Fötal Sığır Serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve DMEM yüksek konsantrasyon'lu glikoz vasatı (Biological Industries, ABD) ilave edilmiştir. Ardından 37 ºC'de sıcaklıkta, %5 $CO_2$ ve %90 bağıl nem içeren bir inkübatöre konulmuştur. Kullanılan vasat 2 günde bir değiştirilmiştir ve 14 gün boyunca inkübasyona devam edilmiştir.

### 3.2.11. Filmlerin üzerine ekilen hücrelerin canlılık seviyelerinin belirlenmesi

Hücrelerin çoğalma ve canlılık seviyelerini belirlemek için MTT ((3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi yapılmıştır. MTT testinin çalışma prensibi sarı renkli tetrazolyum boyasının, çoğalan hücrelerin artan mitokandiriyal redüktaz enzimi ile verdiği tepkime sonucunda ortaya çıkan formazan kristallerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.3).




Şekil 3.4. MTT reaksiyonu (https://www.biotek.com/resources/application-notes/quantifying-cytotoxicity-of-thiostrepton-on-mesothelioma-cells-using-mtt-assay-and-the-epoch-microplate-spectrophotometer'den uyarlanmıştır)

MTT testi için filmler üzerindeki vasat tamamen çekilip atılmıştır ve steril PBS ile 1-2 tur yıkanmıştır. Ardından filmler steril 48 kuyucuklu kültür kabına alınmıştır ve her bir film üzerine 270 µl vasat ve 30 µl MTT çözeltisi konulmuştur. Çözelti konulduktan sonra kültür kabı 37 ºC'de sıcaklıkta, %5 $CO_2$ ve %90 bağıl nem içeren bir inkübatöre konulmuştur ve 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saatin sonunda filmler üzerindeki çözelti tamamen atılmıştır. Tüm filmler üzerine test kiti içerisinde bulunan MTT solüsyonu 300µl eklenmiştir. MTT solüsyonu eklendikten sonra mor renkli bir çözelti elde edilmiştir ve bu çözeltinin 570 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Bu yapılan işlemler hücre kültürünün 3, 7 ve 14 gününde tekrarlanmıştır.

### 3.2.12. Filmler Fizikokimyasal Analizi

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filminin fizikokimyasal karakterizasyonu için FTIR (Shimadzu IRAffinity-1, Japan) analizi yapılmıştır. FTIR analizi 1000-1700 $cm^{-1}$ aralığında yapılmıştır. Shimadzu DTA60 cihazı kullanılarak hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmi için TGA analizi yapılmıştır. Ölçümler sırasıyla 600°C'den 800 °C'ye kadar azot ve oksijenli hava altında gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.13. Üretilen Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmlerinin mikromimarisi, kök hücrelerin filmler üzerine tutunuşu ve hücrelerin film üzerindeki görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan) ile incelenmiştir. Hücreli filmler steril PBS ile 2-3 kez yıkanmıştır. Ardından filmler %2,5 glutaraldehit çözeltisi (PBS içerisinde pH:7,4) ile fikse edilmiştir. Daha sonra filmler ultra saf su ile yıkanmıştır ve etanol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %95 ve %100) geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Hücresiz ve çapraz bağlı hücreli filmler 90 saniye süreyle Au-Pd ile kaplanmıştır. Filmlerin görüntüleri 10 kV'de farklı büyütmelerde ve yüksek vakum altında alınmıştır

### 3.2.14. Histolojik Analiz

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmleri ve kök hücre ekilmiş kalp kası filmleri histolojik olarak değerlendirilmiştir. Tüm filmler %10 nötr tamponlu formaldehit

bekletilmiştir. Filmlerdeki suyun uzaklaştırılması için filmler artan ethanol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirilmiştir. Ardından filmler ksilene solüsyonuna konulmuştur ve daha sonra parafirine gömülmüştür. Filmler parafin blok haline getirilmiştir. Parafin blok haline getirlen filmlerden 3 µm kalınlığında kesitler elde edilmişltir. Ardından kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 2x10 dakika ksilole alınarak deparifizasyonları sağlanmıştır. Daha sonra kesitler azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (%100, %96, %80, %70, %50) edilmiştir. Ardından hematoksilen-eozin ve masson trikrom ile rutin boyama protokolleri izlenerek filmler boyanmıştır. İmmünohistokimyasal boyamada antigen maskesini kaldırmak için 1/10 Dilue EDTA Buffer (AP-9004-1000 Thermo Scientific) kullanılmıştır. Ardından 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile filmlerdeki endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir. Daha sonra filmler +4 ºC'de nemli ortamda birincil antikor ile inkübe edilmiştir. Birincil antikor olarak troponin I (Santa Cruz Technology kat. no: sc-73158) ve kollajen tip I (Biorbyt kat. no: orb10442) kullanılmıştır. İnkübasyonun ardınan ikincil antikor olarak sırasıyla 20 dakika Amplifier Quanto (TL-125-QPB ThermoScientific), 30 dakika HRP Polymer Quanto (TL-125-QPH ThermoScientific) ile muamele edilmiştir. Her aşama sonrasında slaylatlar PBS ile yıkanmıştır. Zemin boyaması için 1 dakika süreyle hematoksilen uygulanmıştır. Ardınan boyanan filmler ışık mikroskobuyla görüntülenmiştir (Zeiis Primo Star, Almanya- Kameram 5 megapiksel, Türkiye).

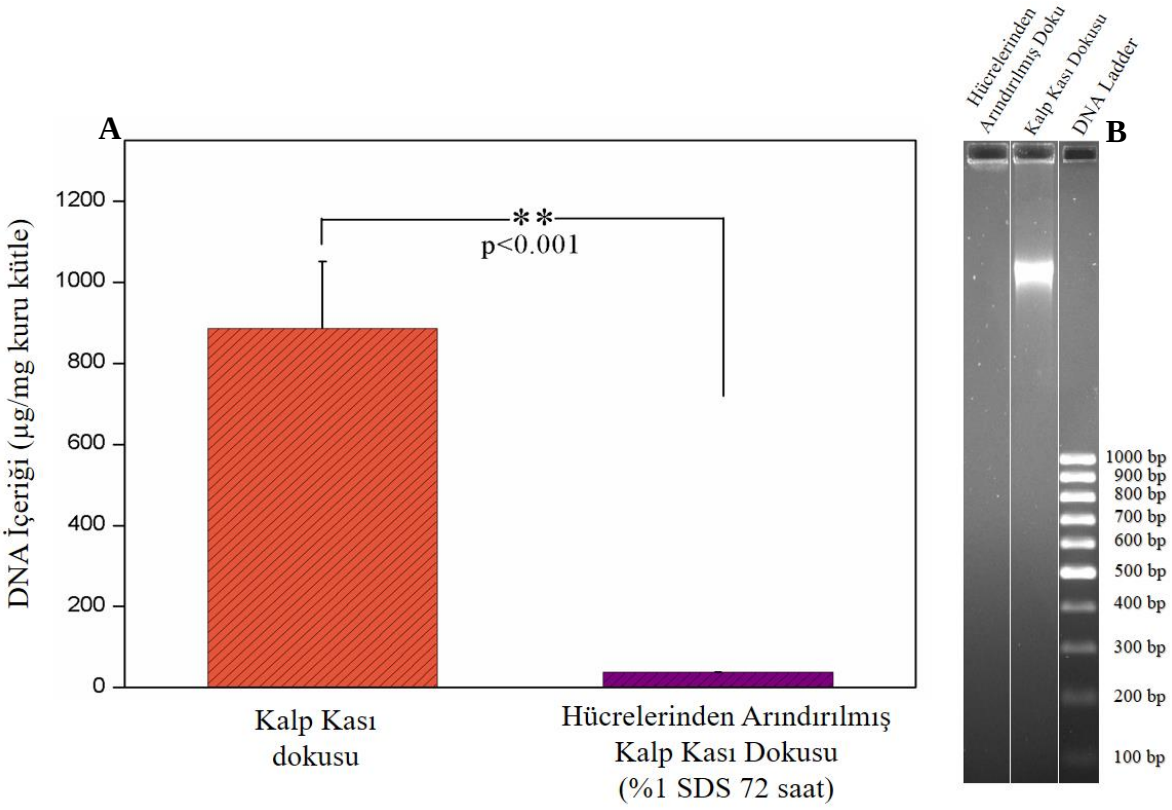
### 3.2.15. İstatiksel Analiz

Orijin Pro 8 (v.0724, OriginLab Corporation, MA, USA) programı kullanılarak İstatistiksel analizleri yapılmıştır. Deneyler sonucu elde edilen sonuçların ± standart hataları Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel programı ile yapılmıştır. $p \leq 0,05$ olarak belirlenen durumlarda farklılıkların istatiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir

# BÖLÜM 4
# ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

## 4.1. Hücrelerinden arındırma işlemi ve DNA içerik analizi

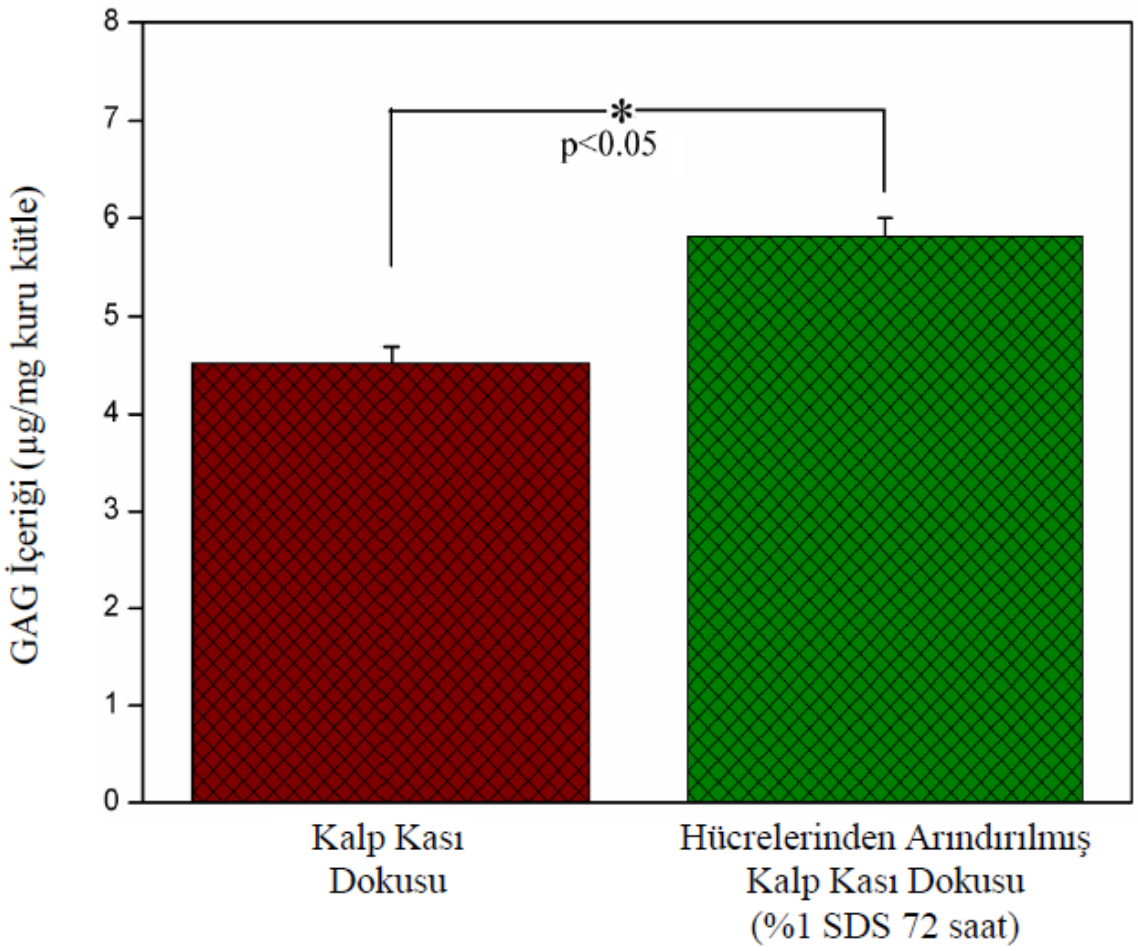
Sığır kaynaklı kalp kası dokusu hipotonik (10mM Trizma ve 5mM EDTA), hipertonik (%1SDS, 50mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00), DNaz, RNaz (10Mm MgCl, 50Mm Trizma) ve perasidikasit gibi çözeltiler kullanılarak hücrelerinden arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerinden arındırma işlemi için 4 farklı yöntem denenmiştir ve bu yöntemler içerisinden en az DNA içeriği 4. Yöntem ile elde edilmiştir. İlk 3 yöntem ile anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Hücrelerinden arındırma işleminin etkisini anlamak için DNA içerik analizi yapılmıştır ve DNA içeriği kalp kası doku için 886,11 ± 164,85 (n=3) µg/mg bulunurken 4. Yöntem ile elde edilden hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu için 47,66 ± 0,09 (n=3) µg/mg bulunmuştur (Şekil 4.1 (A)). Bu sonuçlar kullanılan 4. yöntemin DNA içeriğini %95 oranında azalttığını göstermektedir. Ye ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada da gösterildiği gibi kalp kası dokusunu hücrelerinden arındırmak için kullanılan en etkili kimyasallardan biri SDS olduğu belirlenmiştir. Ek olarak Agaroz jel elektroforezi ile bu sonuçlar teyit edilmiştir ve şekil 4.1 (B) de görüldüğü gibi ham dokunun aksine hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunda hiçbir bant gözlemlenmemiştir. Litarütürde bulunan diğer çalışmalarda da ham dokuda belirgin bir bant ortaya çıkarken hücrelerinden arındırılmış dokuda herhangi bir bant gözlemlenmemiştir (Bonvillain ve ark., 2012; Porzionato ve ark., 2015). Bu da kullanılan yöntemin gücünü göstermektedir ve literatürde bulunan çalışmalar ile benzerlik taşımaktadır (Pagoulatou ve ark., 2012; Singelyn ve ark., 2009; Weymann ve ark., 2011). Hücrelerinden arındırılmış dokuların klinik uygulamalarda sonra ortaya çıkan immün tepki ve doku uyuşmazlığı gibi çeşitli riskleri büyük ölçüde azaltmaktadır (Erten ve ark., 2016). Bu sonuçlar bize kullanılan 4. yöntemin başarılı bir şekilde kalp kası dokusunu hücrelerinden arındırdığını göstermektedir.




Şekil 4.1. DNA içeriği (A) ve Agaroz jel elektroforezi (B)

### 4.2. Glikozaminoglikan ve Hidroksiprolin İçeriği

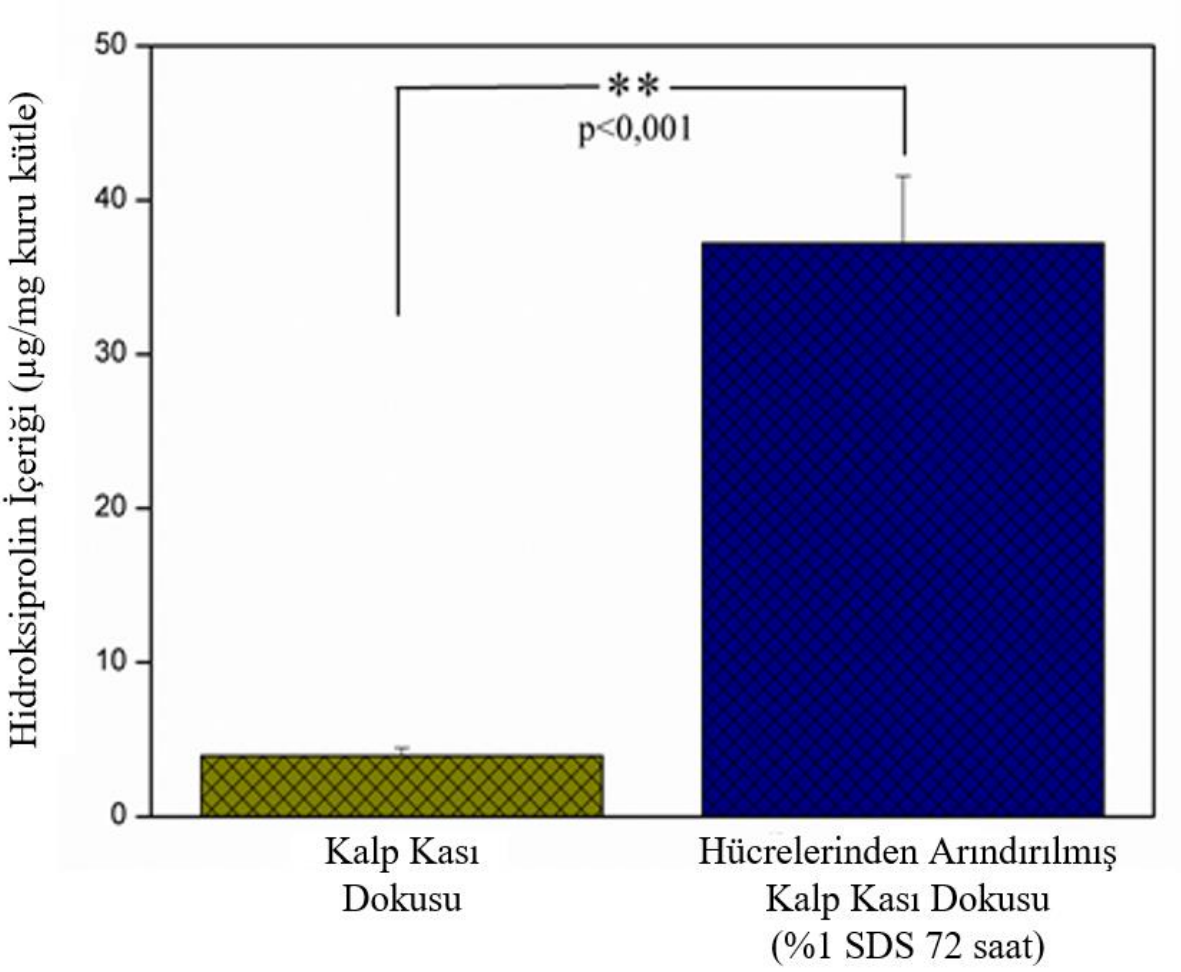
4.Yöntem ile elde edilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusunda ki glikozaminoglikan içeriği belirlenmiştir. Glikozaminoglikan içeriği kalp kası dokusu için 4,52 ± 0,17 (n=3) µg/mg, hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu için 5,83 ± 0,17 (n=3) µg/mg bulunmuştur. Yapılan ANOVA testi sonucuna göre glikozaminoglikan miktarları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p$<0,05). (Şekil 4.2.). Literatür incelendiğinde Falguni ve arakadaşları'nın (2014) yapmış olduğu çalışmada hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusundaki glikozaminoglikan miktarı ham dokudan yüksek bulunmuştur ve bizim bulduğumuz sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunda ki GAG miktarının kalp kası dokusundaki GAG miktarından yüksek olmasının sebebi hücresel materyallerin kaybı ve daha saf bir malzeme elde edilmesidir (Yang ve ark., 2010).




Şekil 4.2. GAG içerik analizi

Kollajen HDM'de en bol bulunan proteinlerden biri olup hücre çoğalmasında, göçünde ve mekanik dayanıklılık kazandırmada büyük bir öneme sahiptir (Erten ve ark., 2016). Kollajen moleküllerin için hidroksiprolin miktarı önemli bir belirteçtir. Bu yüzden hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusunda ki hidroksiprolin içeriği belirlenmiştir. Hidroksiprolin içeriği 4. Yöntem ile elde edilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu için 37,22 ± 4,34 µg/mg, kalp kası dokusu için 3,96 ± 0,49 (n=3) µg/mg olarak bulunmuştur. Yapılan ANOVA testi sonucuna göre hidroksiprolin miktarları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0,001$) (Şekil 4.3). Literatür incelendiğinde Falguni ve arakadşları'nın (2014) yapmış olduğu çalışmada hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusundaki hidroksiprolin miktarı ham dokudan yüksek bulunmuştur. Hücrelerinden

arındırılmış kalp kası dokusunda ki hidroksiprolin miktarının kalp kası dokusundaki hidroksiprolin miktarından yüksek olmasının sebebi hücresel materyallerin kaybı ve daha saf bir malzeme elde edilmesidir (Yang ve ark., 2010).

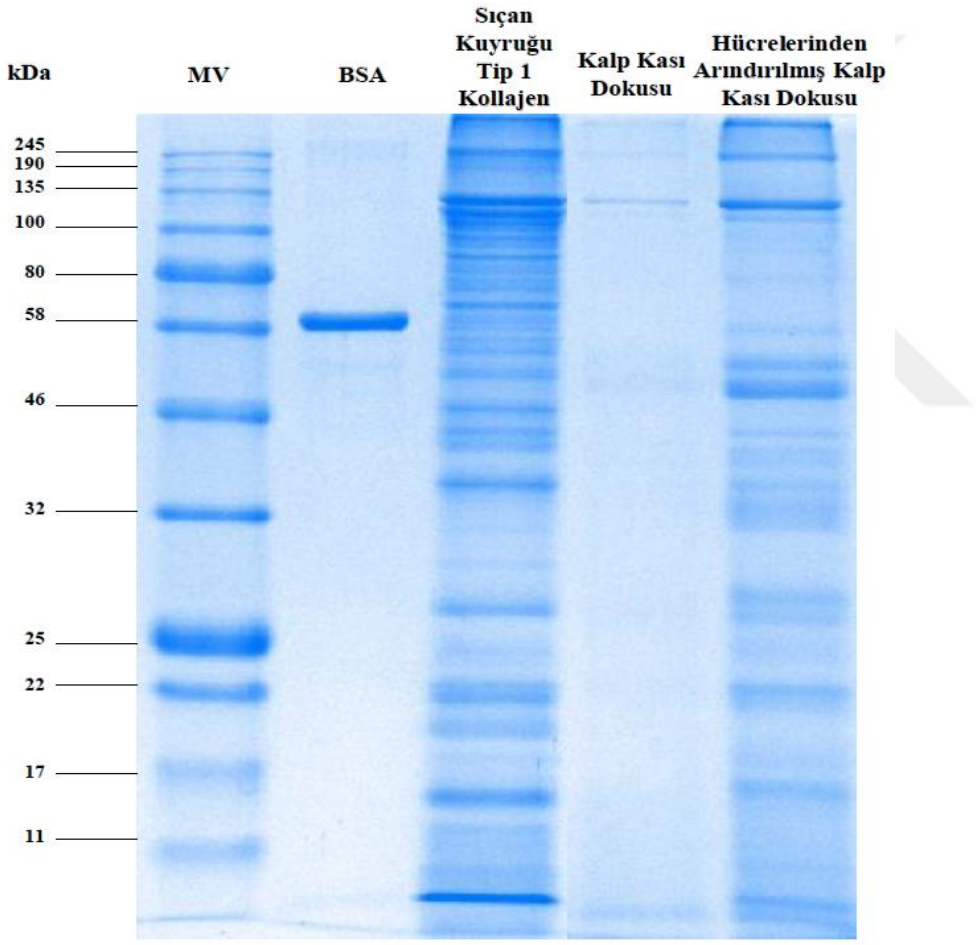



Şekil 4.3. Hidroksiprolin içerik analizi

### 4.3. SDS-PAGE Analizi Sonuçları

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu, kalp kası dokusu, BSA ve sıçan kuyruğu tip 1 kollajene ait spesifik bantlar %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yürütme jeli ile görüntülenmiştir. BSA negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Miyokardiyal matriksin yapısından en çok Kollajen tip I ve tip III bulunmaktadır. Kollajen tip I dokuya yapısal destek sağlamakta ve deformasyona karşı direnç kazandırmaktadır (Venugopal ve ark., 2011). Sıçan

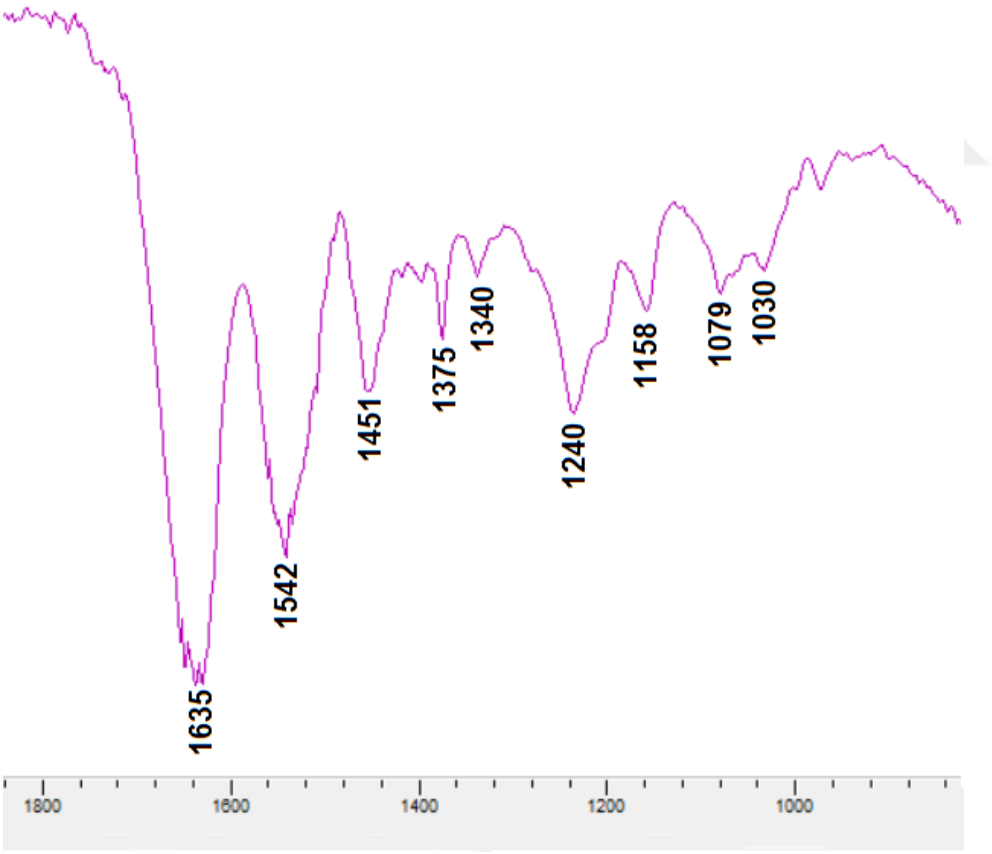
kuyruğu tip 1 kollajen, kalp kası dokusu ve hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunda benzer bantlar ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Dolayısıyla hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusunda kollajen tip 1'in başarılı bir şekilde korunduğu belirlenmiştir. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusundaki bantların kalp kası dokusundaki bantlardan daha belirgin olmasının sebebi GAG ve hidroksiprolin sonuçlarında olduğu gibi dokuların saflıklarıyla alakalıdır ve bulunan bu sonuçlar birbiriyle uyum göstermektedir. SDS-PAGE analizinde elde edilen sonuçlar litarütür ile benzerlik göstermektedir (Singelyn ve ark., 2009;).




Şekil 4.4. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusuna ait SDS-PAGE analizi

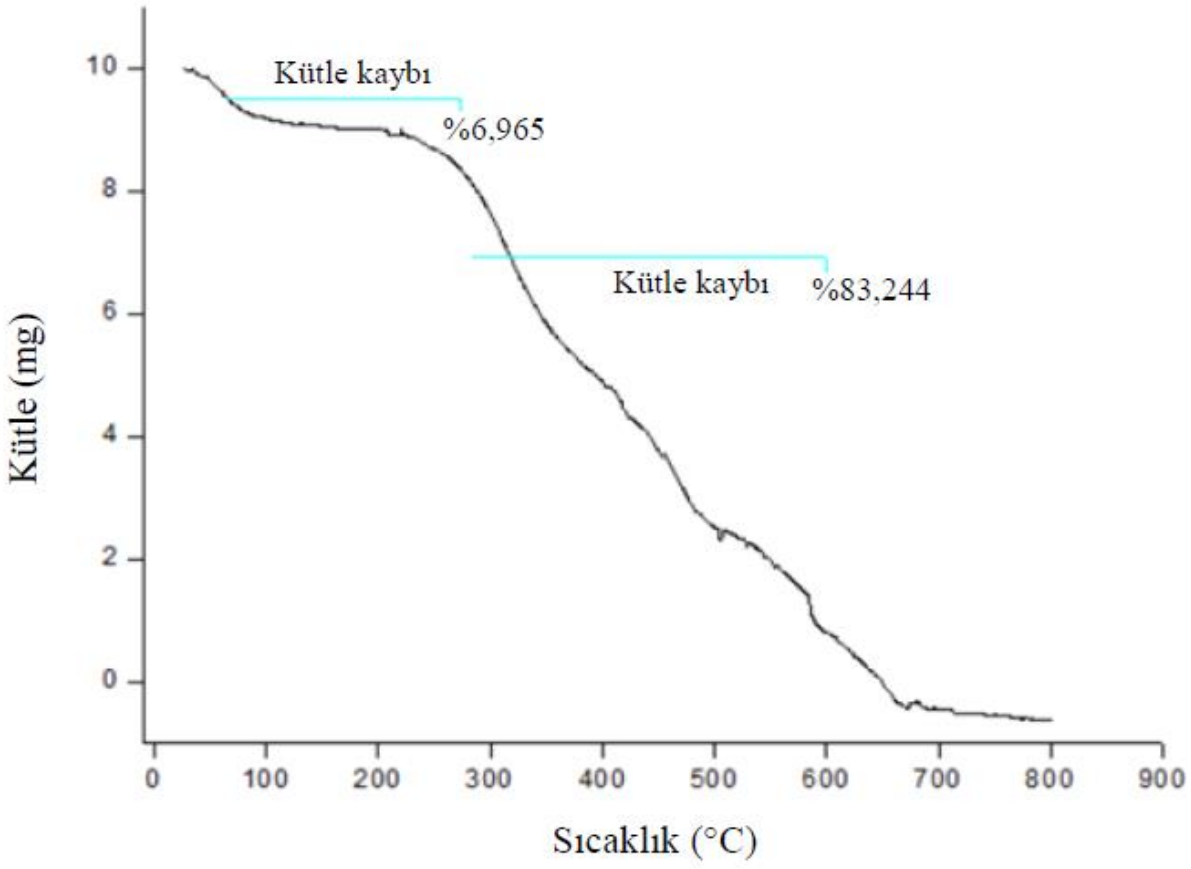
### 4.4. Filmlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası filminin fizikokimyasal karakterizasyonu için FTIR analizi yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Spektrum sonuçları araştırıldığında, hücre dışı matrisin önemli bir bölümünü oluşturan protein ve şeker esaslı yapılarla ilgili çok keskin pikler görülmektedir. 1635 $cm^{-1}$ civarında pikler amid I bandına ait iken, 1542 $cm^{-1}$ 'de görülen pikler amid II bandı'na aittir. 1451, 1375 ve 1340 $cm^{-1}$ 'deki pikler, üçlü helezonik yapı ile ilişkili olan amid III yapısını temsil etmektedir. Ayrıca, hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmindeki polisakkaritlerin varlığı hakkında bazı ipuçları vardır. 1240 $cm^{-1}$'deki bant, R-$SO3^{-1}$'in S=O gerginliğiyle ilgili olup kondroitin sülfat ve heparan sülfat varlığını göstermektedir (Seif-Naraghi ve ark., 2012). Ayrıca, 1200-1000 $cm^{-1}$'de (C-C-0 streç) polisakaritlerin absorpsiyon bantları görülmektedir.




Şekil 4.5. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmine ait FTIR spektrumu

Elde edilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası film matrisinin termal analizi (TGA) Shimadzu DTA60 cihazı kullanılarak yapılmıştır ve sonuçları Şekil 4.6 'da gösterilmiştir. Ölçümler sırasıyla 600 ºC'den 800 ºC'ye kadar azot ve oksijen'li ortam içerisinde gerçekleştirilmiştir. Polipeptid ve polisakkarit yapılarından oluşan kalp filminin kütle kaybı iki basamakta gerçekleşmektedir; Suyun yapıdan çıkartılarak, proteinlerin ve şekerin termal olarak parçalanmasıdır. Hücrelerinden arındırılmış kalp filminin yapısal olarak bağlı olan suyu yaklaşık 50-90 ºC sıcaklık aralığında kaybetmektedir ve plato sınırı 200 ºC'dir. Bu sıcaklık aralığında kütle kaybı yaklaşık %7'dir. Termal bozunma sıcaklığı 250 ºC ile 700 ºC arasında değişmektedir, bu da iskele içindeki en büyük bölümünü oluşturan proteinin ve polisakaritin bozunması ile ilişkilidir. Bu aralıkta iskele ağırlığının yaklaşık %83'ünü kaybetmiştir. Termal bozunma özelliği biyolojik olarak uygun bir yapıda olduğu belirlenmiştir.



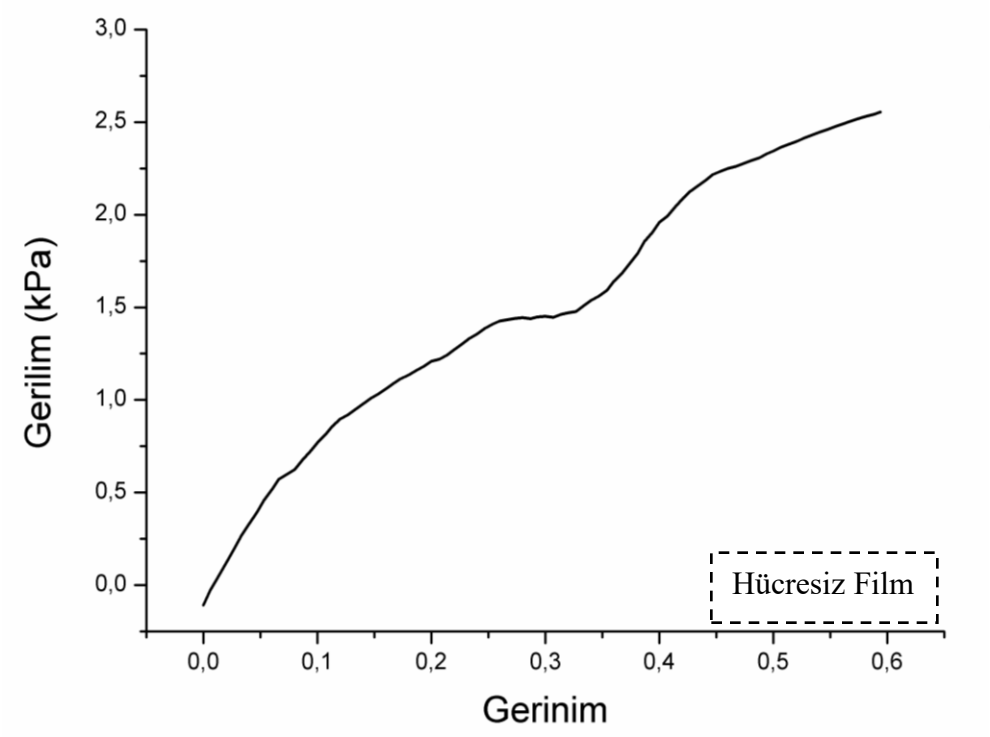

Şekil 4.6. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış kalp kası filmine ait TGA eğrisi

### 4.5 Hücrelerinden Arındırılmış Kalp Kası Dokusundan Film Elde Edilmesi

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu pepsin çözeltisi, NaOH ve PBS kullanılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti özel petri kaplarına dökülerek film haline getirilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusundan elde edilen filmlerin mekaniksel dayanıklılığını arttırmak için NHS/EDC gibi kimyasallar kullanılarak filmlerin başarılı bir şekilde çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama işlemi sayesinde filmlerin mekanik dayanıklılığının arttığı ve hücre kültürü çalışmaları için uygun sağlamlıkta olduğu belirlenmiştir.

### 4.6 Hücrelerinden Arındırılmış Kalp Kası Filmi Mikro-Mekanik Test

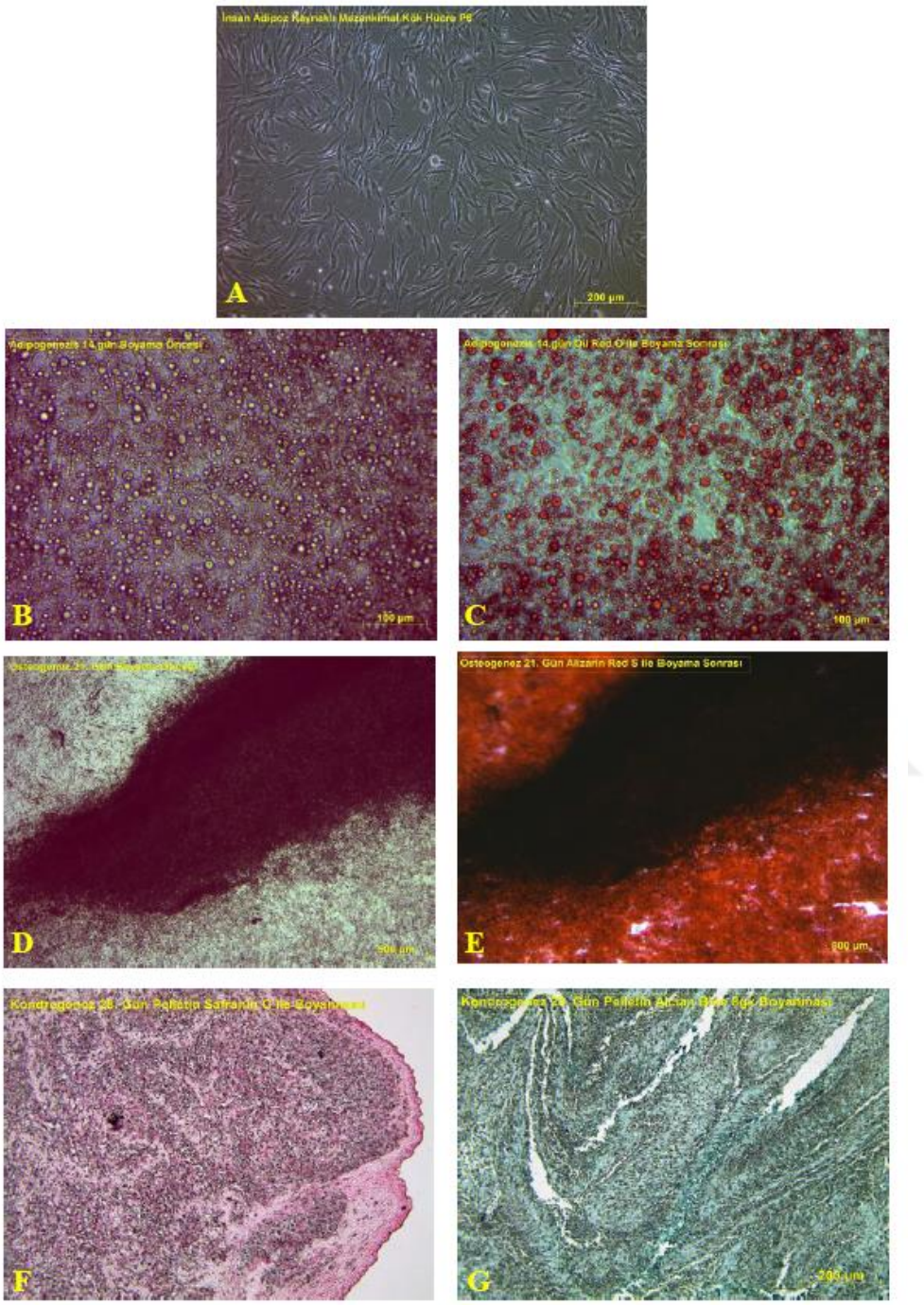
Çapraz bağlı hücresiz filmlerin mikro-mekanik test sonuçları incelendiğinde en yüksek gerilim değeri 2,51 kilopascal (kPa) olarak bulunmuştur.




Şekil 4.7. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış kalp kası filme ait mikro-mekanik test sonucu

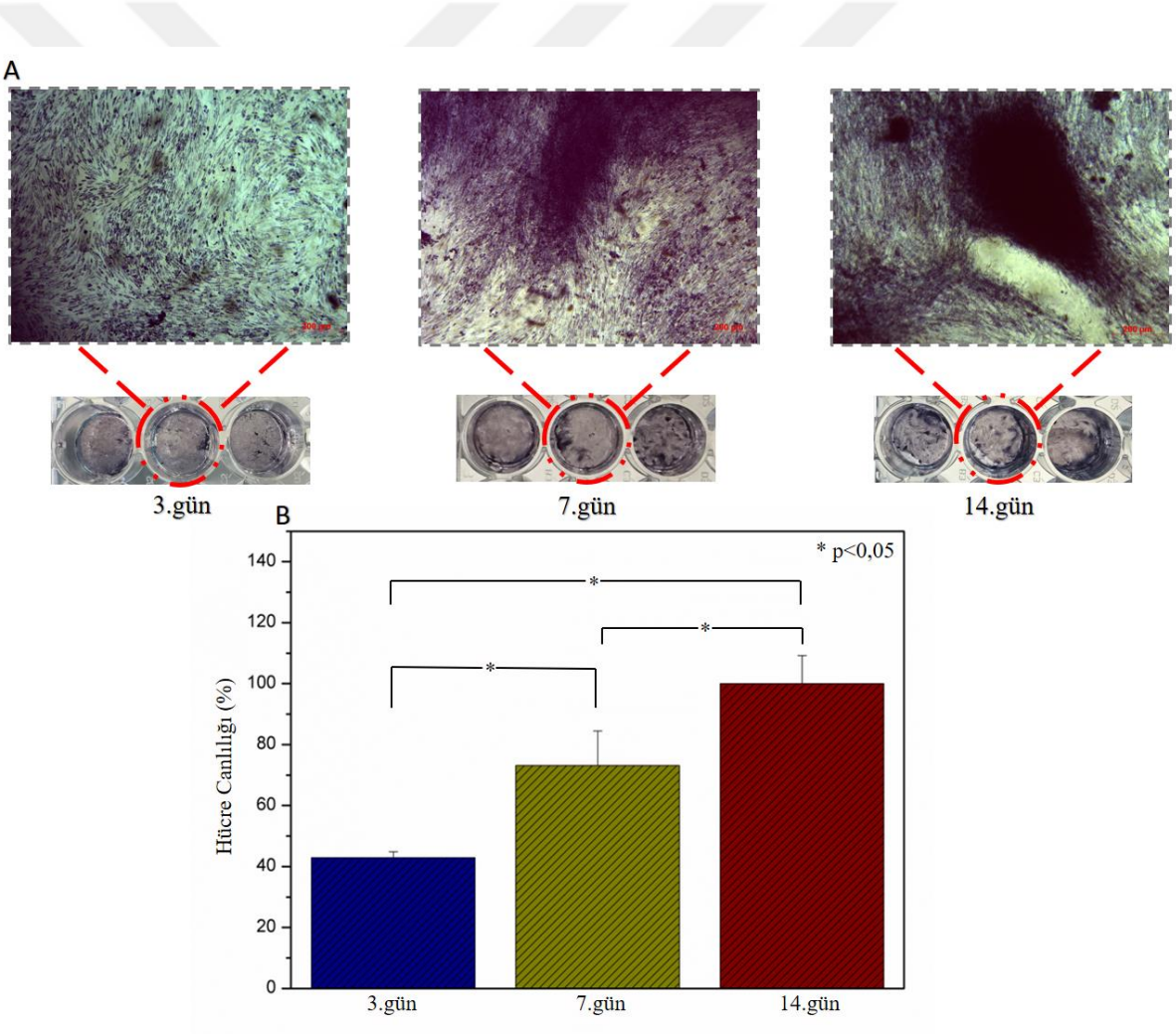
### 4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Ticari olarak satın alınan İAMKH'LER kök hücre çoğaltma vasatında pasaj 6'ya kadar çoğaltılmıştır. Pasaj 6 kadar çoğaltılan kök hücreler için çoklu soy (adipojenik, kondrojenik, osteojenik) farklılaşma kapasitesi çalışması yapılmıştır. Farklılaşma çalışmaları histokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Şekil 4.8 (A) görüldüğü gibi mezankimal kök hücrelerin T75 kültür plastiğine tutunduğu ve mezankimal kök hücreler için karakterislik bir özellik olan iğsi morfolojileri görülmektedir. Farklılaşma çalışmaları osteojenik ve kondrojenik için DMEM yüksek konsantrasyonlu glikoz vasatı (Biological Industries, ABD) kullanılırken adipojenik farklılaşma için DMEM düşük konsantrasyonlu glikoz vasatı (Biological Industries, ABD) kullanılmıştır ve indüksiyon koşullarına göre dizayn edilmiş kitler kullanılmıştır. 14 günün sonunda kök hücrelerin adipojenik farklılaşması incelendiğinde kültür plastiği yüzeyini kaplayan hücreler tarafından üretilen yağ damlacıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 (B)). Adipojenik farklılaşma Oil Red O boyaması ile karakterize edilmiştir. Boyama sonrasında adiposit hücrelerin ve yağ damlacıklarının boyandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 (C)). 21 günün sonunda kök hücrelerin osteojenik farklılaşması incelendiğinde kültür plastiği yüzeyini kaplayan hücreler tarafından kalsiyum üretildiği gözlemlenmiştir. (Şekil 4.8 (D)) Osteojenik farklılaşma Alizarin Red S boyası ile karakterize edilmiştir. Boyama sonrasında osteosit hücrelerin ve hücreler tarafından üretilen kalsiyumun boyandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 (E)). 28 günün sonunda kök gücrelerin kondrojenik farklılaşması incelendiğinde kültür kabı plastiğinde kendiliğinden oluşan kondrojenik peletten kesit alınmıştır ve bu kesitler Safranin O (Şekil 4.8 (F) ve Alcian Blue 8gx (Şekil 4.8 (G)) ile boyanmıştır.




Şekil 4.8. Kök hücrelerin in vitro çoklu-soy farklılaşma kabiliyetlerinin belirlenmesi Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (A), adipogenezis; oil red O ile boyaması (B, C), osteogenezis; alizarin red S ile boyaması (D, E), kondrogenezis; safranin O boyaması (F) ve alcian blue 8gx boyaması (G)

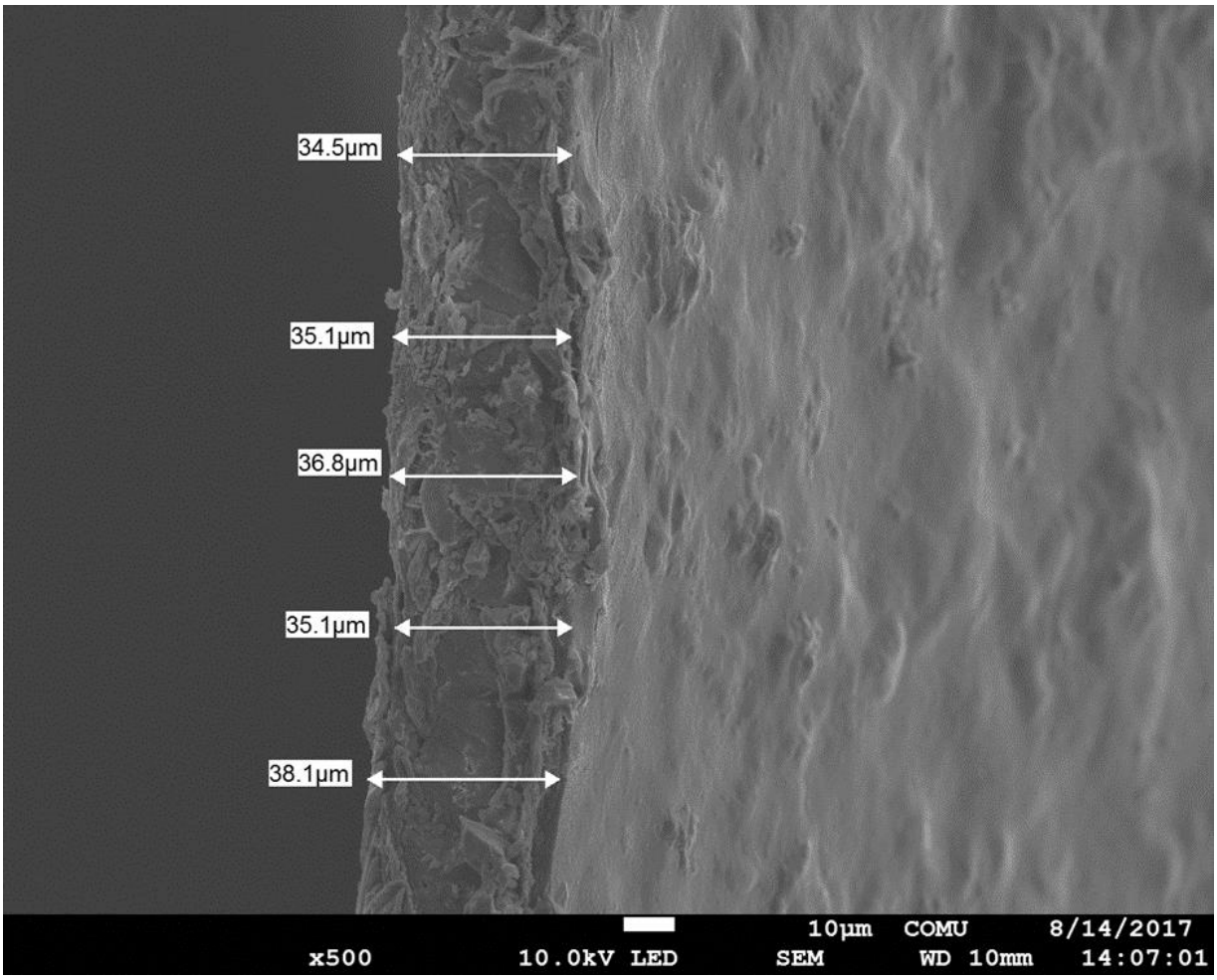
Yapılan farklılaşma çalışmaların ardından iAMKH'ler filmler üzerine ekilmiş ve 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. Filmler üzerindeki hücre proliferasyonu ve canlılık düzeyleri MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi 3, 7 ve 14 günlerin sonunda yapılmıştır. Şekil 4.9 (B) 'de verilen MTT test grafiği incelendiğinde filmler üzerindeki hücre canlılığı günden güne arttığı dolayısıyla filmlerin herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca filmlerin MTT reaktifi ile boyanmış mikroskobik ve makroskobik fotoları çekilmiştir. Filmler üzerindeki hücre canlılığının günden güne artığı mikroskobik fotolar ile de belirlenmiştir. (Şekil 4.9 (A))



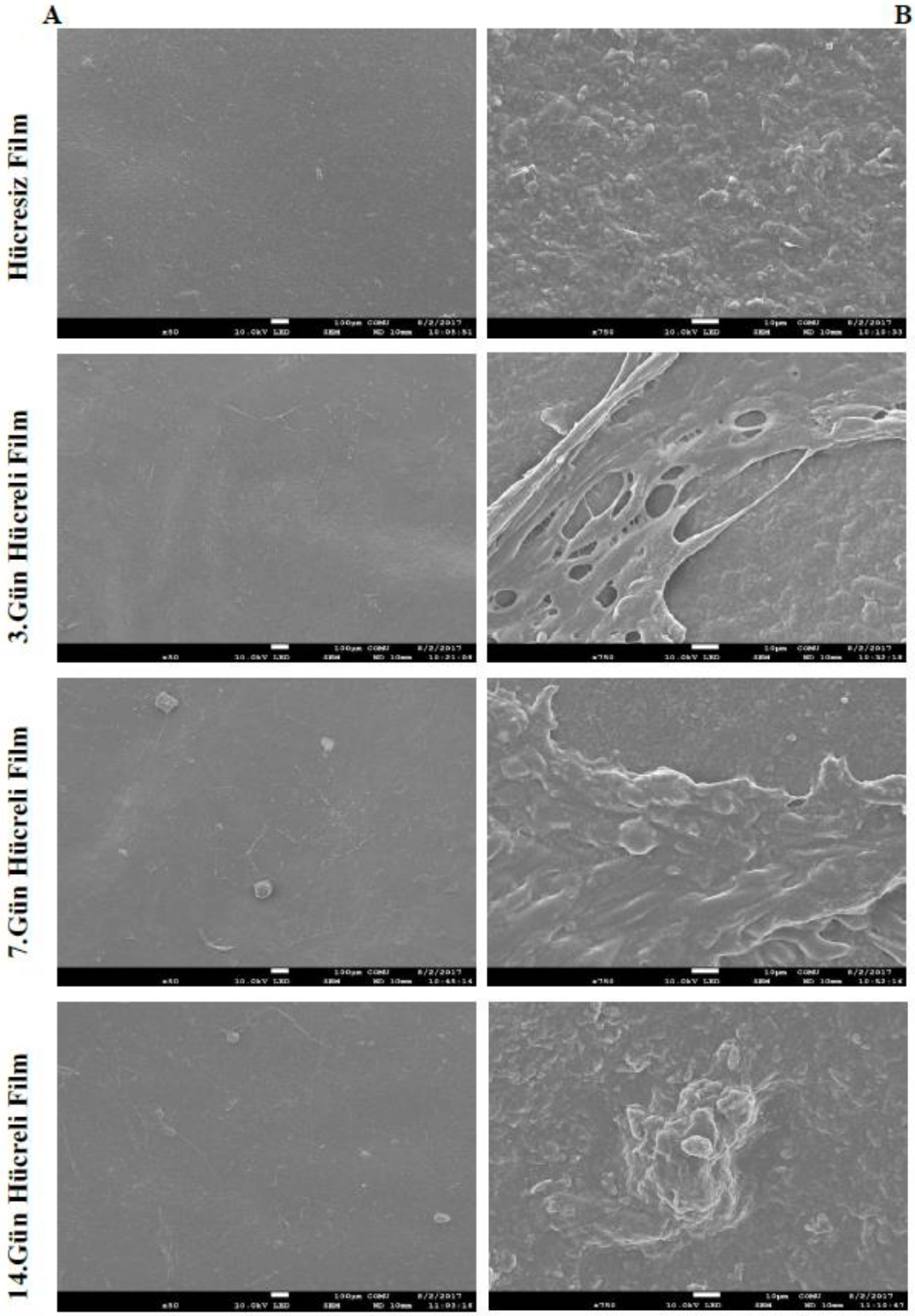

Şekil 4.9. MTT reaktifi ile muamele edilmiş filmlerin mikroskobik ve makroskobik görüntüsü(A). Filmler üzerindeki hücrelerin 3, 7 ve 14 günlerdeki canlılık düzeyi (B)

### 4.8. Elde Edilen Filmlerin Morfolojik Olarak Karakterizasyon

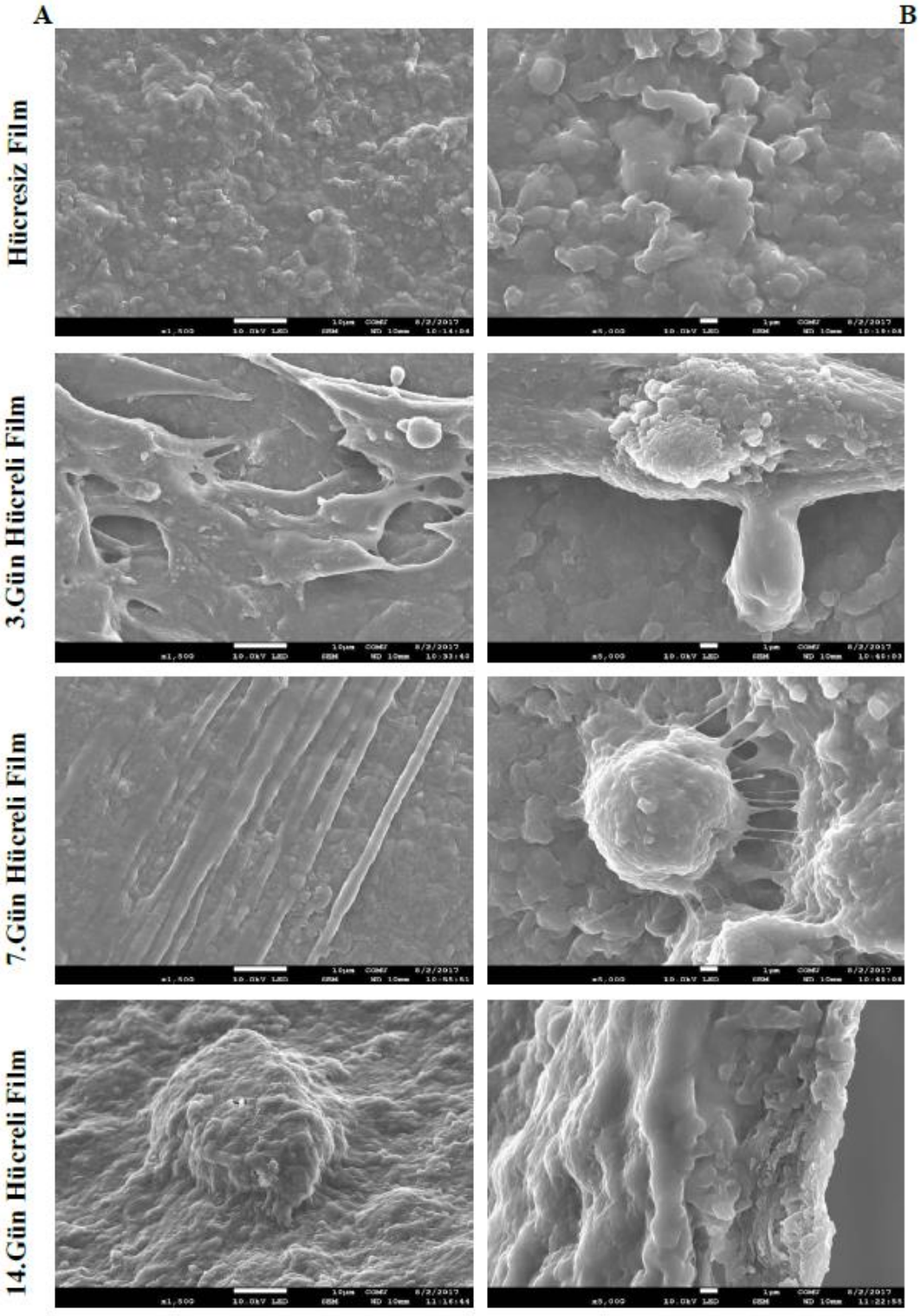
Üretilen çapraz bağlı filmlerin kalınlığı belirlemek amacıyla SEM mikrografisi alınmıştır (Şekil 4.10). SEM mikrografisi incelendiğinde filmlerin kalınlığı 35,92 ± 1,33 μm (n=5) olarak bulunmuştur. Hücresiz filmlerin yüzey analizini yapmak ve iAMKH ekilmiş filmlerin 3, 7 ve 14. günlerde hücre tutunmasını ve çoğalmasını destekleme potansiyelini belirlemek amacıyla SEM mikrografileri alınmıştır. (Şekil 4.11, Şekil 4.12). Hücresiz filmlerin SEM mikrografileri incelendiğinde başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırıldığı ve hücrelerin tutunması için yeterli pürüzlükte olduğu belirlenmiştir. iAMKH ekilmiş filmlerin SEM mikrografileri incelendiğinde ise 3. günde hücrelerin film yüzeyi üzerinde yayıldığı, 7 ve 14. günde ise filmler üzerindeki hücrelerin günden güne çoğalarak film yüzeyini kapladığı görülmektedir. Bu yüzden üretilen filmlerin hücre tutunmasını ve proliferasyonunu destekleyen doğal bir biyomalzeme olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar MTT sonuçları ile teyit edilmiştir.




Şekil 4.10. Çapraz bağlı filmlerin kalınlığı belirlemek amacıyla kullanılan SEM mikrografisi



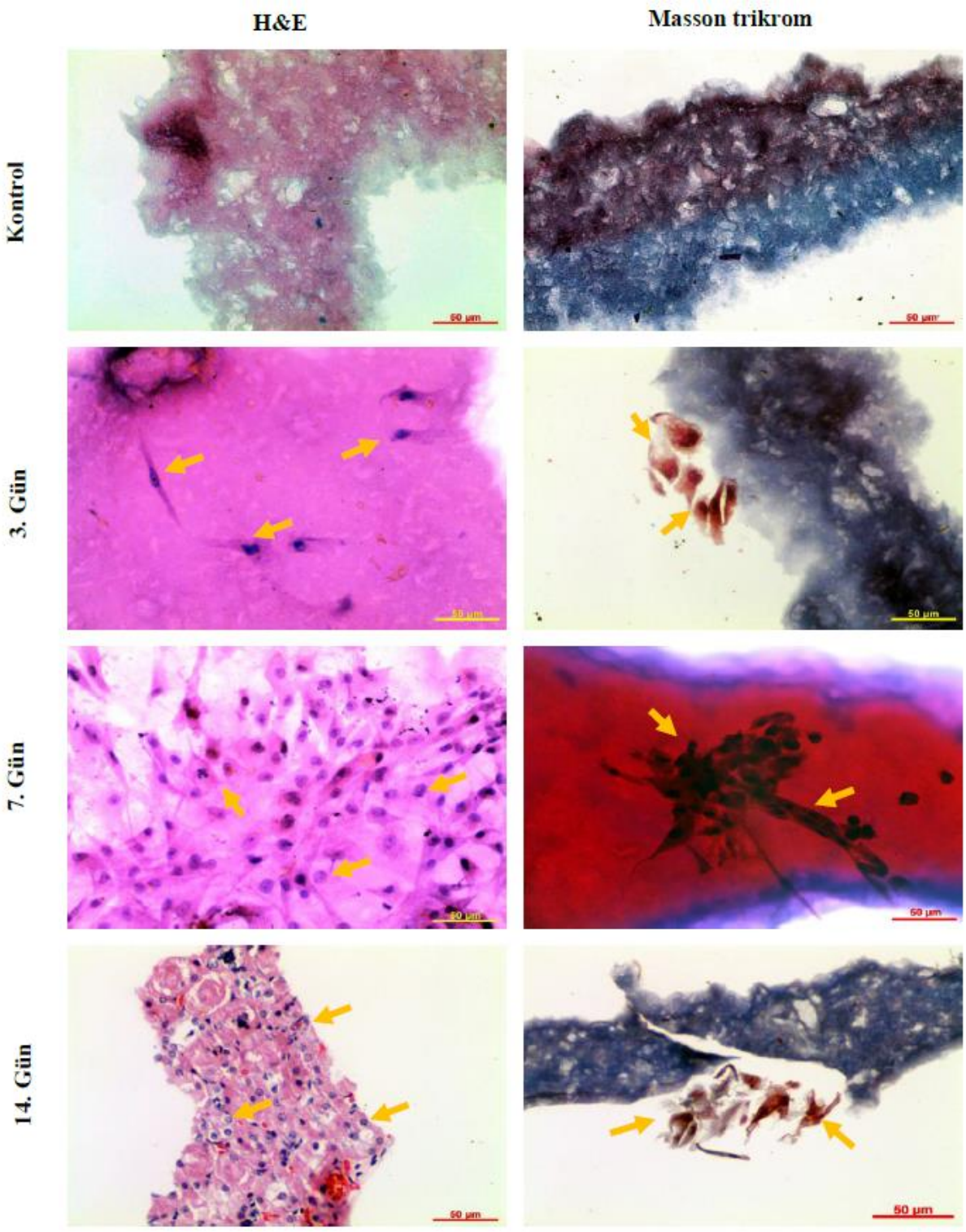

Şekil 4.11. Çapraz bağlı hücreli ve hücresiz filmlerin SEM mikrografileri (x50 kat büyütme(A), x750 kat büyütme (B))



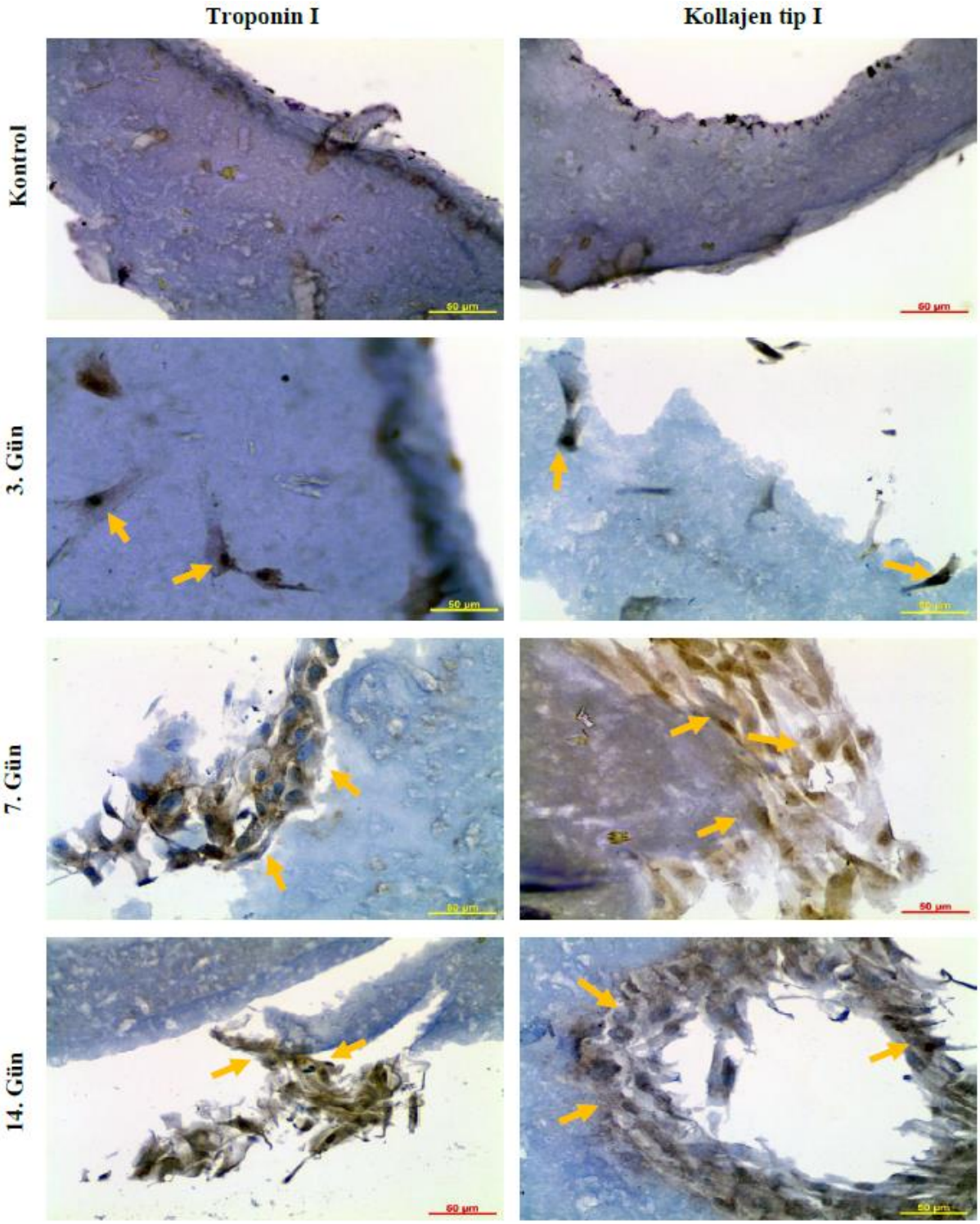

Şekil 4.12. Çapraz bağlı hücreli ve hücresiz filmlerin SEM mikrografileri (x1,500 kat büyütme (A), x5000 kat büyütme (B))

### 4.9. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Karakterizasyon

Çapraz bağlı hücresiz filmler ve iAMKH ekilmiş filmler histokimyasal ve immünhistokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.13, 4.14). Hücresiz filmlerin boyama sonrası görüntüleri incelendğinde herhangi bir hücre varlığına raslanmamıştır. Bu görüntüler DNA içerik analizi sonuçlarını destekler niteliktedir. Bu sayede filmlerin başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırıldığı kanıtlanmıştır. 3, 7 ve 14. günlere ait histokimyasal (hemotoksilen-eozin (H&E) ve masson trikrom) boyama görüntüleri incelendiğinde hücrelerin film yüzeyinde tutunarak günden güne çoğaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar MTT testi sonuçlarıyla benzerlik taşımaktadır. 3, 7 ve 14. günlere ait immünhistokimyasal (troponin I ve kollajen tip I) boyama görüntüleri incelendiğinde ise 3. günden itibaren iAMKH'ler film üzerinde kalp kası (kardiyomiyosit) hücrelerine farklılaştığı belirlenmiştir.




Şekil 4.13. Çapraz bağlı hücresiz ve iAKMH ekilmiş filmlerin histokimyasal boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri (Sarı oklar hücreleri göstermektedir)




Şekil 4.14. Çapraz bağlı hücresiz ve iAKMH ekilmiş filmlerin immünhistokimyasal boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri (Sarı renkli oklar hücreleri göstermektedir)

# BÖLÜM 5
# SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doku mühendsiliği; doku rejenerayonunda görevli suni yapılar oluşturmak için biyolojik moleküllerin ve hücrelerin birlikte kullanıldığı interdisipliner bir alandır. Doku mühendisliğinin hedefleri hasar görmüş doku ile yer değiştirecek ve hücreleri üzerinde barındıracak bir iskeledir. Doku mühendisliğini de kullanılan biyomalzemeler doğal kaynaklı, sentetik kaynaklı biyomalzeme olarak kategorize edilmektedir. Bu iki tip biyomalzemenin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar organ uyuşmazlıkları, biyobozunurluk ve hücrelerin sentetik iskelelere tutunmasındaki problemler gibi özellikler sayılabilmektedir. Bu dezavantajlara sahip malzemelere alternatif olarak kadavradan alınan dokulardan hücrelerinden arındırma yöntemiyle elde edilen doğal hücre dışı matrikse en yakın HDM elde edilmektedir. Bu nedenle araştırmacılar kardiyak doku mühendisliğinde miyokardiyal onarım için hücrelerinden arındırılmış HDM kullanımını önermektedir. Bu sebeple yapılan bu tez çalışmasında sığır kaynaklı kalp kası dokusunun çeşitli enzim ve deterjanlar ile hücrelerinden arındırılmıştır ve bu elde edilen hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu çeşitli yöntemler kullanılarak film haline getirilmiştir. Elde edilen filmin çeşitli karakterizasyonları yapılmıştır ve İnsan adipoz kaynaklı mezankimal kök hücreler üzerine in vitro koşullarda davranışına bakılmıştır. Çalışmada sığır kaynaklı kalp kası dokusu çeşitli enzim ve deterjanlar kullanılarak %95 oranında kalp kası dokusu hücrelerinden arındırılmıştır. Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu ve kalp kası dokusu için agaroz jel elektroforezi, SDS-PAGE, glikozaminoglikan analizi, hidroksiprolin testi, DNA içerik analizi gibi çeşitli yöntemler ile karakterize edilmiştir.

Hücrelerinden arındırılmış kalp kası dokusu film haline getirebilmek için pepsin çözeltisiyle 72 saat muamele edilmiştir. 72 saatin sonunda çözelti içerisine toplam çözelti hacminin 1/10 kadar 0.1 N NaOH ve 1/9 kadar 10X PBS eklenerek özel petri kaplarına dökülmüştür Elde edilen filmlerin mekanik dayanıklılığını arttırmak için çeşitli kimyasallar ile çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işleminin ardından filmlerin mekanik dayanım kazandığı ve su içerisinde parçalanmadığı gözlemlenmiştir. Çapraz bağlanan filmlerin hücre kültürü çalışmaları için uygun sağlamlıkta olduğu belirlenmiştir. Film yapısının bu dayanıklılığı sayesinde, hasara uğramış bölgeye implante edildiğinde tedavi süreci boyunca morfolojisini

koruyacağı sonucuna varılmaktadır. Ardından filmlerin fizokimyasal karakterizasyonları TGA, FTIR ve mikro-mekanik test ile belirlenmiştir. Filmlerin dayanıklılığını çapraz bağlama süresini ve filmlerin kalınlığını değiştirerek arttırmak mümkündür. Elde ettiğimiz filmlerin ticari olarak satın alınan İnsan Adipoz Kaynaklı mezankimal kök hücrelerin üzerine etkisine bakılmıştır. Öncelikle iAMKH pasaj 6 kadar çoğaltılmıştır. Pasaj 6 getirilen kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma çalışmaları yapılmıştır. iAMKH 'ler başarılı bir şekilde kondrojenik, osteojenik ve adipojenik soylara farklılaştığı yapılan boyama çalışmaları ile gösterilmiştir. Filmler üzerine 75.000 hücre/film olucak şekilde iAMKH ekilmiştir. Filmler üzerindeki kök hücrelerin canlılık düzeyleri 3, 7 ve 14. günde yapılan MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi sonuçlarına göre günden güne hücre canlılığının arttığı görülmüştür. Filmlerin hücreler için herhangi bir toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Üretilen çapraz bağlı filmlerin kalınlığı 35,92 ± 1,33 μm (n=5) olarak bulunmuştur. İlk olarak hücresiz filmlerin SEM görüntüleri ardından hücreyle etkileştirilmiş filmlerin 3, 7 ve 14. günlerde SEM görüntüleri alınmıştır. SEM mikrografileri incelendiğinde, hücresiz filmlerin pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu bu sayede hücrelerin tutunması için elverişli bir yapıda olduğu belirlenmiştir. iAMKH ekilmiş filmlerin SEM mikrografileri incelendiğinde ise hücrelerin filmlerin yüzeyini kapladığı ve günden güne hücre prolifeasyonunun arttığı görülmektedir. Hücresiz ve tekrardan iAMKH ile hücrelendirilen filmlerin histokimyasal ve immünhistokimyasal boyama sonuçları incelendiğinde, hücresiz filmlerde herhangi bir hücre varlığına rastlanmamıştır. Bu sonuç bize kullanılan 4. yöntemin kalp kası dokusunu başırılı bir şekilde hücrelerinden arındırdığını göstermektedir. iAMKH ekilmiş filmlerin 3, 7 ve 14. günlere ait histokimyasal boyama görüntüleri incelendiğinde hücrelerin film yüzeyine tutunarak günden güne proliferasyonunun arttığı belirlenmiştir. İmmünhistokimyasal boyama görüntüleri incelendiğinde ise iAMKH 3. günden itibaren dışarıdan herhangi bir indükleyici ajan kullanmadan film üzerinde kalp kası (kardiyomiyosit) hücrelerine farklılaştığı kanıtlanmıştır. Bu sayede elde edilen filmlerin kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek potansiyel bir aday olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR


Arslan T. E. 2017. Keratin Temelli İskele Üretimi Ve Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.

Arslan Y. E. 2013. Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin Damar Düz Kas Hücrelerine Farklılaştırılması ve Damar Doku Mühendisliğinde Kullanılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Türkiye.

Arslan Y. E., Hız M. M. ve Sezgin A., T., 2015. The Use of Decellularized Animal Tissues in Regenerative Therapies. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 21(1): 139–145.

Bonvillain R. W., Danchuk S., Sullivan D. E., Betancourt A. M., Semon J. A., Eagle M. E., Mayeux J. P., Gregory A. N., Wang G., Townley I. K., Borg Z. D., Weiss D. J., Bunnell B. A., 2012. A Nonhuman Primate Model of Lung Regeneration: Detergent-Mediated Decellularization and Initial In Vitro Recellularization with Mesenchymal Stem Cell. Tissue Engineering Part A, 18(23-24): 2437-2452.

Buttafoco L., Kolkman N. G., Engbers-buijtenhuijs P., Poot A. A., Dijkstra P. J., Vermes I., Feijen J., 2006. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. Biomaterials, 27: 724–734.

Chen F., Liu X., 2016. Progress in Polymer Science Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. Progress in Polymer Science, 53: 86–168.

Chen Q., Liang S., Thouas G. A., 2013. Progress in Polymer Science Elastomeric biomaterials for tissue engineering. Progress in Polymer Science, 38: 584–671.

Curtis M. W., Russell B., 2009. Cardiac Tissue Engineering. Journal of Cardiovascular Nursing, 24(2): 87–92.

Demirbag B., Huri P. Y., Kose G. T., Buyuksungur A., Hasirci V., 2011. Advanced cell therapies with and without scaffolds. Biotechnology Journal, 6(12): 1437–1453.

Dreesen O., Brivanlou A. H., 2007. Signaling Pathways in Cancer and Embryonic Stem Cells. Stem Cell Rev, 3: 7–17.

Eisenbarth B. E., 2007. Biomaterials for Tissue Engineering. Advenced Engıneering Materials, (12): 1051–1060.

Erten E., Arslan S. T., Derkus B., Arslan Y. E., 2016. Detergent-free decellularization of bovine costal cartilage for chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells in vitro. RSC Advance, 6: 94236–94246.

Flynn L., Semple J. L., Woodhouse K. A., 2006. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. Wiley InterScience, 359–369.

Fortier L. A., 2005. Stem Cells: Classifications, Controversies and Clinical Applications. The American College of Veterinary Surgeon, 34: 415–423.

Gil P. I., Uriarte J. J., Vidal P. C., Monton C. G., Roura S., Valldeperas A. L., Botija C. S., Farre R., Navajas D., Genis A. B., 2015. *In vitro* comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization. Am J Transl Res, 7(3): 558-573.

Gilbert T. W., Sellaro T. L., Badylak S. F., 2006. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials, 27: 3675–3683.

Holmes T. C., 2002. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering, Trends in Biotechnology, 20(1): 16–21.

Isenberg B. C., Williams C., Tranquillo R. T., 2006. Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro. Circulation Research, 98(1): 25–35.

Jawad H., Ali N. N., Lyon A. R., Chen Q. Z., Harding S. E., Boccaccini A. R., 2007. Myocardial tissue engineering: a review. J. Tissue Eng. Regen. Med, 1: 327–342.

Jung S., Kleinheinz J., 2014. Adult Mesenchymal Stem Cells in Current Tissue Engineering Concepts. Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine, 103–118.

Keane T. J. ve Badylak S. F. 2014. Seminars in Pediatric Surgery Biomaterials for tissue engineering applications. Seminars in Pediatric Surgery, 23(3): 112–118.

Kenar H. 2008. 3D Patterned Cardıac Tıssue Construct Formatıon Usıng Bıodegradable Materıals. Doktora Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Türkiye

Khaing Z. Z., Schmidt C. E., 2012. Neuroscience Letters Advances in natural biomaterials for nerve tissue repair. Neuroscience Letters, 519(2): 103–114.

Langer B. R., 2009. Perspectives and Challenges in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Advenced Materials. 2139: 3235–3236.

Langer R., Vacanti J. P., 1993. Tissue Engineering. Science, 260: 920–926

Lee E. J., Kasper F. K. U. K., Mıkos A. G., 2014. Biomaterials for Tissue Engineering. Annals of Biomedical Engineering, 42(2): 323–337.

Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S., 2005. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. Tıssue Engıneerıng, 11(1).

Marshak D. R., Gardner R. L., Gottlieb D., 2001. Stem Cell Biology 7-13.

Mendis, S., Puska, P., Norrving, B., 2011. Global Atlas on cardiovascular diseaseprevention and control. The World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization.

Meregalli M., Farini A., Torrente Y., 2011. Mesenchymal Stem Cells as Muscle Reservoir. Stem Cell Res. Ther. 1(2): 1-9.

Nugent H. M., Edelman E. R., 2003. Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease. Circulation Research. 1068–1079.

O'Brien F. J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials Today, 14(3): 88–95.

Oberwallner B., Brodarac A., Choi Y., Saric T., Anic P., Morawietz L., Stamm C., 2014. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human

myocardium. Society for Biomaterials. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 102A (9): 3263–3272.

Oreffo R. O. C., Cooper C., Mason C., Clements M., 2005. Mesenchymal Stem Cells Lineage, Plasticity and Skeletal Therapeutic Potential. Stem Cell Reviews, 1: 169–178.

Pagoulatou E., Demitrios I. T., Vynios D. H., Papachrtisou D. J., Koletsis E., Deligianni D., Mavrilas D., 2012. Biomechanical and structural changes following the decellularization of bovine pericardial tissues for use as a tissue engineering scaffold. J Mater Sci: Mater Med, 23: 1387–1396.

Pati F., Jang J., Ha D., Kim S. W., Rhie J., Shim J., Kim D., Cho D., 2014. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. Nature Communications, 5: 1–11.

Platt J. L., 2004. Preface: Future approaches to replacement of organs. American Journal of Transplantation, 4(4): 5–6.

Porzionato A., Sfriso M. M., Pontini A., Macchi V., Petrelli L., Pavan P. G., Natali A. N., Bassetto F., ve Vindigni V., 2015. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery. Int. J. Mol. Sci, 16: 14808–14831.

Potdar P. D., Prasannan P., 2013. Differentiation of Human Dermal Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes by Treatment with 5-Azacytidine: Concept for Regenerative Therapy in Myocardial Infarction. Hindawi, 2013.

Puenta P., Ludeña D., 2013. Cell culture in autologous fi brin scaffolds for applications in tissue engineering. Experimental Cell Research, 322(1): 1–11.

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

Seif-naraghi S. B., Horn D., Schup-magoffin P. J., Christman K. L., 2012. Acta Biomaterialia Injectable extracellular matrix derived hydrogel provides a platform for enhanced retention and delivery of a heparin-binding growth factor. Acta Biomaterialia, 8(10): 3695–3703.

Shim J. H., Kim J. Y., Park M., Park J., Cho D. W., 2011. Development of a hybrid scaffold with synthetic biomaterials and hydrogel using solid freeform fabrication technology. Biofabrication, 3: 034102.

Shimizu K., Ito A., Arinobe M., Murase Y., Iwata Y., Narita Y., Kagami H., Ueda M., Honda H., 2007. Effective Cell-Seeding Technique Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force onto Decellularized Blood Vessels for Vascular Tissue Engineering. Journal Of Bıoscıence And Bıoengıneerıng, 103(5): 472–478.

Shin H., Jo S., Mikos A. G., 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. Biomaterials, 24: 4353–4364.

Singelyn J. M., Dequach J. A., Seif-naraghi S. B., Littlefield R. B., Schup-magoffin P. J., Christman K. L., 2009. Biomaterials Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. Biomaterials, 30(29): 5409–5416.

Song J. J., Ott H. C., 2011. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. Trends in Molecular Medicine. Trends in Molecular Medicine, 17(8): 424–432.

Şahin F., Saydam G., Omay S. B., 2005. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi, 15.

Tee R., Lokmic Z., Morrison W. A., Dilley R. J., 2010. Strategies in cardiac tissue engineering. ANZ Journal of Surgery, 80: 683–693.

Tekeli S., Naghavi E. A., Gökçe B., Sır G., Yiğittürk G., Çavuşoğlu T., Uyanikgil Y.,2016. Stem cells; mesenchymal stem cells and current clinical applications. FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi 2016, 1(2): 72-83.

Väänänen H. K., 2015. Mesenchymal stem cells. Annals of Medicine, 37: 469–479

Venugopal J. R., Prabhakaran M. P., Mukherjee S., Ravichandran R., Dan K., Ramakrishna S., 2012. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. J. R. Soc. Interface, 9: 1–19.

Wang B., Borazjani A., Tahai M., Curry A. L. D. J., Simionescu D. T., Guan J., To F., Elder S. H., Liao J., 2010. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. Journal Of Bıomedıcal Materıals Research A, 94a(4): 1100-1110.

Wang R. M., Christman K. L., 2016. Decellularized myocardial matrix hydrogels: In basic research and preclinical studies. Advanced Drug Delivery Reviews, 96: 77–82.

Wang Y., Kim H., Vunjak-novakovic G., Kaplan D. L., 2006. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. Biomaterials, 27: 6064–6082.

Weiss M. L., Troyer D. L., 2006. Stem Cells in the Umbilical Cord. Stem Cell Reviews, 2: 155–162.

Weymann A., Loganathan S., Takahashi H., Schies C., Claus B., Hirschberg K., Soos P., Korkmaz S., Schmack B., Karck M., Szabo G., 2011. Development and Evaluation of a Perfusion Decellularization Porcine Heart Model. Circulation Journal, 75: 853-860.

Williams A. R., Hare J. M., 2011. Mesenchymal Stem Cells Biology, Pathophysiology, Translational Findings, and Therapeutic Implications for Cardiac Disease. 109: 923-940.

Wu H K., Liu L. Y., Zhou B., Han C. Z., 2006. Cellular therapy and myocardial tissue engineering: the role of adult stem and progenitor cells, European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 30: 770-781.

Yang B., Zhang Y., Zhou L., Sun Z., Zheng J., Chen Y., Dai Y., 2010. Development of a Porcine Bladder Acellular Matrix with Well-Preserved Extracellular Bioactive Factors for Tissue Engineering. Tıssue Engıneerıng: Part C, 16(5): 1201-1211.

Ye X., Wang H., Gong W., Li S., Li H., 2016. Impact of decellularization on porcine myocardium as scaffold for tissue engineered heart tissue. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, (197): 1–8.

Yılmaz B. E. 2014. Computatıonal Modelıng Of Cardıac Dysfunctıons, Yüksek lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Türkiye.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Yusuf Furkan GALATA

Doğum Yeri: Bakırköy

Doğum Tarihi: 16/05/1991

## EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

## BİLİMSEL FAALİYETLERİ

**a) Bildiriler:**

Galata Y. F., Arslan Y. E. "Kardiyak Doku Mühendisliği için Sığır Kalp kasının Hücrelerinden arındırılması ve Karakterizasyonu", Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisans Öğrenci Kongresi, EDİRNE, TÜRKİYE, 15-16 Mayıs 2017, ss.37-37

Efe B., Galata Y. F., Arslan Y. E., Yener A. Ü., "The cytotoxicity evaluation of Melia azedarach extracts on human adipose Mesenchymal stem cells" International Congress on Fundamental and applied Sciences, İSTANBUL, TÜRKİYE 22-26 Ağustos 2016, pp.189-190